

Molekulare Basis des antimikrobiellen Systems von *Caenorhabditis elegans*

Dissertation

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

vorgelegt von

Dipl. Biol. Mareike Stanisak



Kiel, im September 2007

Referent:

Prof. Dr. Matthias Leippe

Koreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

der Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Grundlagen der angeborenen Immunität	1
1.2 Antimikrobielle Peptide als Effektoren des angeborenen Immunsystems	2
1.2.1 Die Familie der Saposin-ähnlichen Proteine	3
1.3 Der Modell-Organismus <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
1.4 <i>C. elegans</i> – Systematik, Morphologie und Lebensweise	7
1.5 Das Immunsystem von <i>C. elegans</i>	13
1.6 Immunrelevante Signaltransduktionswege in <i>C. elegans</i>	15
1.6.1 TGF- β (transforming growth factor- β)-Signaltransduktionsweg	15
1.6.2 p38-MAPK-Signaltransduktionsweg	16
1.6.3 PDC (programmed cell death)-Signaltransduktionsweg	17
1.6.4 IGF (Insulin-like receptor)-Signaltransduktionsweg	18
1.7 Antimikrobielle Peptide von <i>C. elegans</i>	20
1.7.1 Saposin-ähnliche Proteine von <i>C. elegans</i>	21
1.8 Versuche im Vorfeld	23
1.9 Zielsetzung der Arbeit	24
2 ERGEBNISSE	25
2.1 Molekulare Charakterisierung der Caenopore-kodierenden Gene von <i>C. elegans</i>	25
2.1.1 Lokalisation der Caenopore-kodierenden Gene auf den Chromosomen von <i>C. elegans</i>	27
2.1.2 Charakterisierung der potentiellen Caenopore-Peptide	28
2.1.3 Promotoranalyse der Caenopore-Genfamilie	32
2.2 Charakterisierung ausgewählter Mitglieder der Caenopore-Peptidfamilie	33
2.3 RNA-Interferenz-Versuche mit ausgesuchten Vertretern der Caenopore-Peptidfamilie	34
2.4 Expressions-Analyse ausgewählter Caenopores	35
2.4.1 Regulation der Transkription in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	35
2.4.2 Lokalisation der spp-5-Expression in <i>C. elegans</i> mittels eines <i>spp-5::gfp</i> -Reportergenkonstruktes	37
2.4.3 Nachweis der Transkription von <i>spp-1</i> , <i>-5</i> und <i>-12</i> über die Isolierung darmspezifischer RNA	38

2.5	Versuche zur Reinigung natürlicher Caenopores aus <i>C. elegans</i>	42
2.5.1	Gewinnung von Immunseren gegen Caenopore 1 und 5	42
2.5.2	Versuche zur Isolierung natürlicher Caenopore-Peptide aus <i>C. elegans</i>	43
2.6	Funktionale Charakterisierung ausgewählter Caenopore-Peptide	46
2.6.1	Klonierung der Expressionsvektoren für die rekombinante Synthese der Caenopore-Peptide	47
2.6.2	Synthese der Caenopores in bakteriellen Expressionssystemen	49
2.6.3	Zielgerichtete Mutagenese der Nukleotid-Sequenz von Caenopore 12	49
2.6.4	Reinigung der wasserlöslichen Caenopore-Peptide	50
2.6.5	Nachweis der strukturellen Integrität mittels Monobromobimane	52
2.6.6	Nachweis der molekularen Identität mittels MALDI-TOF-Analyse	53
2.6.7	Abspalten des Fusionspeptids mittels <i>Factor Xa</i>	54
2.7	Analyse der antimikrobiellen Aktivität der Caenopores	58
2.7.1	Antibakterielle Aktivität	58
2.7.2	Fungizide Aktivität gegen <i>C. albicans</i> und <i>S. cerevisiae</i>	61
2.7.3	Cytotoxische Aktivität gegen <i>Dictyostelium discoideum</i>	63
2.7.4	Cytotoxische Aktivität gegen Zellen der humanen T-Zelllinie „Jurkat“	64
2.7.5	Analyse der porenbildenden Aktivität	65
2.7.6	Einfluss des pH-Wertes auf Membranassoziation und porenbildende Aktivität	66
2.7.7	Einfluss des <i>HisTag</i> auf die porenbildende Aktivität der Caenopores	67
2.7.8	Analyse der Primärstruktur der Caenopores in Bezug auf die pH-abhängige Aktivität	68
2.7.9	Darstellung oligomerer Formen von Caenopore 1 und 5	70
3	DISKUSSION	72
4	ZUSAMMENFASSUNG	87
5	SUMMARY	89
6	MATERIAL	91
6.1	Chemikalien	91
6.1.1	Enzyme	93
6.1.2	Protein-Größenstandard	93
6.1.3	DNA-Längenstandard	94
6.1.4	Kontrollpeptide	94
6.1.5	Farbstoffe	94
6.1.6	Antibiotika	94
6.1.7	Immunoreagenzien	95
6.1.8	Vektoren	95
6.1.9	Oligonukleotide	95
6.2	Geräte	95
6.2.1	Mikroskope	95
6.2.2	Zentrifugen	96
6.2.3	Sonstige Geräte	96
6.2.4	Plastikmaterial	96

7	METHODEN	97
7.1	Haltung und Zucht von <i>C. elegans</i>	97
7.1.1	Gefrierlagerung von <i>C. elegans</i>	97
7.1.2	Synchronisation der <i>C. elegans</i> -Kulturen	98
7.1.3	Flüssig-Massenkultur mit <i>C. elegans</i>	98
7.2	Präparation und Fraktionierung von <i>C. elegans</i> -Extrakten	99
7.2.1	Präparation von Protein-Extrakten von <i>C. elegans</i>	99
7.2.2	Proteinfractionierung an einer hydrophoben Matrix (SepPak)	100
7.2.3	Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HPLC)	100
7.2.4	Ionenaustauch-Chromatographie	100
7.3	Analyse mittels Immunoblot	101
7.3.1	Immunisierung von Kaninchen	102
7.3.2	Reinigung der IgGs aus Antiseren mittels Protein-G-gekoppelten Dynabeads	102
7.3.3	Absorption der Antiseren mit <i>E. coli</i> -Extrakt	103
7.4	Isolierung von RNA aus <i>C. elegans</i>	103
7.5	Reverse Transkription der RNA	104
7.5.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	104
7.6	Analyse von DNA	105
7.6.1	Agarose-Gelelektrophorese	105
7.6.2	Reinigung von DNA nach PCR und Agarose-Gelelektrophorese	105
7.6.3	DNA-Konzentrationsbestimmung	106
7.6.4	Konzentrierung von Nukleinsäuren	106
7.7	Synthese und Amplifikation von Expressionsvektoren	106
7.7.1	Klonierung in den pDrive-Vektor	106
7.7.2	Ligation in den pIVEX2.4a-Expressionsvektor	106
7.7.3	Transformation über das Hitzeschock-Verfahren	107
7.7.4	Transformation über Elektroporation	108
7.7.5	Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA	108
7.7.6	DNA-Sequenzierung	108
7.7.7	Bakterien-Dauerkulturen	109
7.8	Zielgerichtete Mutagenese	109
7.9	Synthese rekombinanter Caenopore-Peptide in <i>E. coli</i>	110
7.9.1	Synthese und Reinigung von Caenopore 5	110
7.9.2	Aufschluss der bakteriellen Zellen mittels Ultraschall (Sonifikation)	111
7.9.3	Glutathion-Redoxsystem	111
7.9.4	Immobilisierte-Metal-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	111
7.9.5	Reinigung über eine hydrophobe Matrix (SepPak)	112
7.9.6	Gefriertrocknung	112
7.9.7	Generierung von Caenopore 5 II	112
7.9.8	Synthese von Caenopore 1 und 12	112
7.9.9	Abspaltung des <i>HisTag</i> mittels <i>Factor Xa</i>	114
7.9.10	SDS/Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	114

7.9.11	Silbernitratfärbung von Polyacrylamidgelen	115
7.9.12	Reduktion mittels Dithiothreitol (DTT)	116
7.9.13	Markierung von Cyteinresten mit Monobromobimane	116
7.9.14	Bestimmung von Peptidkonzentrationen in Lösung	117
7.9.15	MALDI-TOF-Analyse	117
7.10	Aktivitätstests	118
7.10.1	Antibakterielle Aktivitätstests	118
7.10.2	Test der membranpermeabilisierenden Aktivität gegen <i>D. discoideum</i>	121
7.10.3	Test der membranpermeabilisierenden Aktivität gegen Hefen	121
7.10.4	Cytotoxizitätstest	123
7.10.5	Viabilitätstest mit Trypanblau	124
7.10.6	Liposomendepolarisationstest	125
7.11	Darstellung von Oligomeren	126
7.11.1	Chemisches Kreuzvernetzen von Oligomeren in Lösung	126
7.11.2	Chemisches Kreuzvernetzen von Oligomeren an Liposomen	126
7.11.3	Auflösung oligomerer Protein-Strukturen	126
7.12	Analyse der Caenopore-Expression	127
7.12.1	Nachweis der Caenopore-Transkription in verschiedenen Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	127
7.12.2	Primäre embryonale Zellkultur mit <i>C. elegans</i>	127
7.12.3	Analyse der Zellen mittels Durchflusscytometrie (FACS)	128
7.13	Stilllegung von Genen über die RNA-Interferenz-Methode (RNAi)	129
7.14	Programme für <i>In-silico</i>-Sequenzanalysen	130
8	LITERATUR	131
9	ANHANG	145
9.1	Liste bisher identifizierter Caenopores	145
9.2	Liste potentieller Mitglieder der Caenopore-Peptidfamilie	146
9.3	Liste der verwendeten Oligonukleotide	147
10	ERKLÄRUNG	148
11	DANKSAGUNG	149
12	LEBENS LAUF	150

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Ala	Alanin
amp	Ampicillin
AP	alkalische-Phosphatase
APS	Ammonium-Peroxydisulfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	bovines (Rinder-) Serumalbumin
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
C / Cys	Cystein
carb	Carbenicillin
cDNA	komplementäre DNA
CFU	Koloniebildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)
CGC	<i>Caenorhabditis genetic center</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
EtOH	Ethanol
G	Glycin
g	Gramm

GFP	Grün-Fluoreszierendes Protein
Gly	Glycin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulphonsäure
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
Lys	Lysenin
l	Liter
M	Mol pro Liter, Molar
mA	Milliampère
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization - Time-of-Flight</i>
max.	maximal
mBBr	Monobromobimane
Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
min	Minute(n)
mM	millimolar
μ M	mikromolar
mol	Mol
mRNA	Messenger-RNA
NBT	Nitrotetrazoliumblausäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NK-Zellen	natürliche Killerzellen (<i>natural killer cells</i>)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
OD	optische Dichte

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R / Arg	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur/ Reverse Transkription
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
sek	Sekunde(n)
Ser	Serin
sog.	sogenannt
ss	einzelsträngig (<i>single stranded</i>)
T	Thymin
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
Tricin	Tris-[hydroxymethyl]methylglycin
Tris	Tris-[hydroxymethyl]aminomethan
U	Unit(s)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

1 EINLEITUNG

1.1 Grundlagen der angeborenen Immunität

Das angeborene Immunsystem ist ein ursprüngliches aber höchst effizientes Verteidigungssystem aller Lebewesen von den Protozoen bis hin zum Menschen. Die Möglichkeit zwischen eigenen und fremden Strukturen, zwischen selbst und nicht-selbst zu unterscheiden, bildet die Basis für die Erkennung und Abwehr von Pathogenen. Sowohl bei Pflanzen (Nürnberger und Brunner, 2002; Dangl und Jones, 2001; Cohn, Sessa und Martin; 2001, Holt *et al.*, 2003) als auch bei so verschiedenen Tiergruppen wie den Invertebraten und den Vertebraten wurden Mechanismen, die zur Abwehr von Pathogenen führen, teilweise sehr detailliert charakterisiert. Dabei sind die genauen Zusammenhänge noch immer Gegenstand intensiver Forschung (Medzhitov und Janeway, 1997; Underhill und Ozinsky, 1997; Aderem und Ulevitch, 2000; Khush und Lemaitre, 2000; Imler und Hoffmann, 2001).

In Wirbeltieren unterscheidet man zwei Systeme, ein angeborenes Immunsystem und ein adaptives, also anpassungsfähiges Immunsystem, die der Abwehr von Pathogenen dienen (Hoffmann *et al.*, 1999). Das angeborene Immunsystem besteht von Geburt an und reagiert schnell auf den Kontakt zu Pathogenen, ist aber auch verhältnismäßig unspezifisch, während das adaptive Immunsystem mit jedem Kontakt dazu „lernt“ und dadurch im Laufe der Zeit mehr und mehr an Effektivität gewinnt. Durch die Kombination dieser beiden Systeme erreichen die Vertebraten einen hoch effektiven Schutz vor Infektionen. Das angeborene Immunsystem ist daher nicht nur für wirbellose Tiere unentbehrlich, sondern auch für Wirbeltiere, deren adaptives Immunsystem zwar höchst effizient wirkt, aber auch mit zeitlicher Verzögerung einsetzt. Charakteristisch für das angeborene Immunsystem ist seine relativ unspezifische Wirkung gegen Krankheitserreger und das Vorhandensein von Abwehrmechanismen in Form von antimikrobiellen Effektoren sowie morphologischen Strukturen, die das Eindringen bzw. die Vermehrung der Erreger verhindern. In vielen aber nicht in allen Organismen übernehmen phagozytierende Zellen, wie z. B. T-Lymphocyten oder NK-Zellen (*natural killer cells*) eine wichtige Aufgabe bei der Bekämpfung dieser Erreger (Pena und Krensky, 1997; Pena *et al.*, 1997). Oft handelt es sich bei diesen Effektoren um Proteine oder Peptide, die von spezialisierten Zellen induzierbar oder konstitutiv synthetisiert werden.

Ein wesentlicher Aspekt der Forschung ist es, die Entwicklung der Komponenten des angeborenen Immunsystems während der Evolution zu verstehen, und dadurch Rückschlüsse auf ihre Funktionsweise zu ziehen. Der Einsatz verschiedener Modellorganismen bietet eine Möglichkeit zur Untersuchung von Faktoren und Strukturen, von

denen viele bis hin zum Menschen konserviert sind. So konnte 1995 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie u. a. an Christiane Nüsslein-Volhard „für ihre grundlegenden Erkenntnisse über die genetische Kontrolle der frühen Embryonalentwicklung“ und für die Entdeckung des Toll-Rezeptors vergeben werden (Nüsslein-Volhard, 1995). Mit dieser Feststellung eröffnet sich jedoch ein Problem bei der Definition eines Immunsystems, da einige Faktoren, wie auch der Toll-Rezeptor, sowohl in der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege als auch bei der Pathogenabwehr eine Rolle spielen. Ein ähnliches Problem stellt sich für Organismen, die sich von Bakterien und anderen Mikroorganismen ernähren. Ob die Faktoren, die zur Erkennung und Verarbeitung der „Futter“-Mikroorganismen führen, allein der Ernährung dienen oder ob sie ebenso an der Abwehr von potentiellen Pathogenen beteiligt sind, blieb bisher weitestgehend ungeklärt.

1.2 Antimikrobielle Peptide als Effektoren des angeborenen Immunsystems

Die Entdeckung des Lysozims im Jahre 1922 durch Alexander Fleming war nur der Anfang der Entdeckung einer ganzen Reihe antimikrobieller Proteine und Peptide, die gegen die unterschiedlichsten Organismen, zu denen Bakterien, Pilze, Protozoen und Viren gehören, aktiv sind. Diese Proteine und Peptide, welche abhängig von Organismus und Gewebe sowohl systemisch als auch lokal wirken können, zeichnet eine eindrucksvolle Vielfalt aus. So werden große Proteine wie das Lysozym mit einer Masse von bis zu ca. 30 kDa (Jollès und Jollès, 1984) ebenso gefunden wie winzige Peptide bis hin zu Tripeptiden (Azumi *et al.*, 1989). Weiterhin gibt es neben rein α -helikalen Peptiden wie dem Magainin aus *Xenopus laevis* oder reinen β -Faltblatt-Strukturen wie dem bovinen Protegrin-1 (Fahrner *et al.*, 1996) auch Proteine wie z. B. das Defensin A aus der Fliege *Phormia terranova* oder das Drosomycin aus *D. melanogaster*, die sowohl aus α -Helices als auch aus β -Faltblatt-Strukturen zusammengesetzt sind (Bulet *et al.*, 1999).

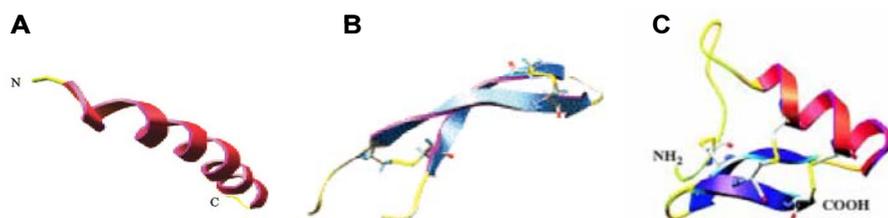


Abb. 1: Tertiärstruktur verschiedener antimikrobieller Peptide. (A) Magainin I (B) Protegrin-1 (C) Defensin A von *Phormia terranova*. Abbildungen verändert nach Bulet *et al.*, 2004 und Bulet *et al.*, 1999.

Während der letzten Jahre wurde eine Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden in den unterschiedlichsten Tiergruppen identifiziert. Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* vermeidet sehr erfolgreich Infektionen über das Peptid Magainin, welches in der Schleimschicht seiner Haut antimikrobiell wirksam ist (Zasloff, 1987; Ludtke *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997). In Insekten wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene antimikrobiell aktive Peptide wie z. B. Cecropin A und B, die erstmals in der Motte *Hyalophora cecropia* beschrieben wurden, isoliert und charakterisiert (Boman und Hultmark, 1987). Ein strukturell verwandtes Peptid, das Cecropin P1, wurde wenig später im Nematoden *Ascaris suum* entdeckt (Andersson *et al.*, 2003; Pillai *et al.*, 2005). Weitere Effektorproteine der Insekten, die die Vielfalt der antimikrobiellen Peptide verdeutlichen sind die bereits erwähnten Defensine sowie Drosomycin oder die Peptide Dipteracin, Drosocin und Attacin (Bulet *et al.*, 1999; Meister, Lemaitre und Hoffmann, 1997).

Neben den in Insekten und Amphibien charakterisierten antimikrobiellen Peptiden wurden auch in Säugetieren und vor allem im Menschen antimikrobielle Peptide detailliert analysiert. So ergab sich in den letzten Jahren ein breites Spektrum an Effektorproteinen, zu denen die Defensine ebenso gehören wie die Cathelicidine, das Psoriasin und das Granulysin (Pena und Krensky, 1997; Anderson *et al.*, 2003; Izadpanah *et al.*, 2005; Schröder und Harder, 2006).

1.2.1 Die Familie der Saposin-ähnlichen Proteine

Als weiteres Beispiel einer erfolgreichen und weit verbreiteten Peptidfamilie können die Saposin-ähnlichen Proteine, die auch als SAPLIPs (*saposin-like proteins*) bezeichnet werden, herangezogen werden. Sie wurden nach den Saposinen benannt, welche eine ähnliche Struktur aufweisen und als Kofaktoren des Sphingolipid-Stoffwechsels in den Lysosomen eukaryotischer Zellen eine bedeutende Rolle spielen (Tamaru *et al.*, 1986; Paton *et al.*, 1990; O'Brian und Kishimoto, 1991). Das Vorkommen der mehr als 200 verschiedenen SAPLIPs, die bis heute in den unterschiedlichsten Organismen gefunden wurden (Munford *et al.*, 1995), reicht von der parasitär lebenden Amöbe *Entamoeba histolytica* bis hin zu den Säugetieren. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie werden zum einen über die Anordnung ihrer sechs konservierten Cysteinreste, zwischen denen Disulfidbrücken ausgebildet werden, und zum anderen über ihre Sekundärstruktur charakterisiert, welche aus fünf α -Helices besteht.

Im Vergleich zur relativ konservierten Tertiärstruktur und der rein α -helikalen Sekundärstruktur ist die Primärstruktur dieser Proteinfamilie überaus heterogen. Trotz der

Unterschiede weisen diese antimikrobiellen Peptide untereinander eine ähnliche Wirkungsweise auf, da die meisten von ihnen in der Lage sind, mit Membranen zu interagieren.

Stammesgeschichtlich ursprüngliche Gene existieren schon in einfachen eukaryotischen Zellen wie den Amöben. So besitzt *Entamoeba histolytica* drei Isoformen antimikrobiell und cytolytisch aktiver Amoebapores (Leippe *et al.*, 1991; Leippe *et al.*, 1992; Leippe *et al.*, 1994b), die zudem eine starke bakteriolytische Aktivität gegen phagozytierte Bakterien aufweisen (Andrä *et al.*, 2003). Die Tertiärstruktur von Amoebapore A wurde 2004 über die Methode der Kernspinresonanzspektroskopie oder NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie aufgeklärt (Hecht *et al.*, 2004) und ist in Abbildung 2 dargestellt.

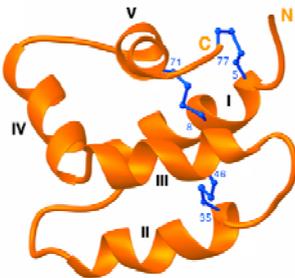


Abb. 2: Darstellung der Tertiärstruktur von Amoebapore A. Die fünf α -Helices (orange) werden über drei Disulfidbrücken (blau) stabilisiert. N und C bezeichnen den N- bzw. C-Terminus, die römischen Ziffern I bis V kennzeichnen die fünf α -Helices. Abbildung nach Hecht *et al.*, 2004.

Unter den Protozoen besitzt auch der Amöboflagellat *Naegleria fowleri* Gene, die für die sog. Naegleriapores kodieren und Pflanzen verfügen mit ihren „Swaposinen“ über Proteine mit spezifischen SAPLIP-Domänen (Ponting und Russell, 1995). Daneben besitzen auch die Leberegel *Fasciola hepatica* und *Clonorchis sinensis* sowie der Pärchenegel *Schistosoma mansoni* SAPLIP-kodierende Gene (Hancock *et al.*, 1997; Reed *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Espino *et al.*, 2003). In Säugetieren spielen SAPLIPs wie das NK-lysin des Schweins (Anderson *et al.*, 1995) oder das humane Granulysin (Pena und Krensky, 1997; Anderson *et al.*, 2003) als antimikrobielle, cytolytische Effektorproteine eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr. Beide Peptide, die in den Granula von T-Lymphocyten und NK-Zellen (*natural killer cells*) lokalisiert sind, besitzen antimikrobielle Aktivität gegen eine Reihe von Mikroorganismen, darunter auch Mykobakterien, Pilze und Protozoen (Stenger *et al.*, 1998; Ernst *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 2003; Farouk *et al.*, 2004).

Die Vorhersage der genauen Mechanismen der antimikrobiellen Aktivität ist problematisch, da sich die Primärstruktur der einzelnen SAPLIPs, wie oben bereits erwähnt, abgesehen von den sechs konservierten Cysteinresten als sehr uneinheitlich erweist. Die drei

Amoebapore-Isoformen von *E. histolytica* weisen z. B. zum NK-lysin lediglich eine Sequenzidentität von 25 - 30 % auf (Leippe, 1995). Nicht zuletzt aufgrund der erwähnten Heterogenität der Primärstrukturen, unterscheidet sich der Mechanismus der Porenbildung zwischen den einzelnen Proteinen. So bildet Amoebapore, das aufgrund seiner starken cytolytischen Aktivität als einer der Haupt-Pathogenitätsfaktoren des Parasiten *E. histolytica* gilt, stabile Poren aus, die zur Lyse der Zielzelle führen (Gutsmann *et al.*, 2003) während das NK-lysin die Membranen durch elektrostatische Prozesse so stark beeinträchtigt, dass dies letztendlich ebenfalls zur Zerstörung der Zelle führt (Miteva *et al.*, 1999).

Auch in Nematoden konnten durch Datenbank-Analysen Gene identifiziert werden, die für potentielle antimikrobielle Peptide der Saposin-ähnlichen Proteinfamilie kodieren. Bevor jedoch detailliert auf deren mögliche Rolle im Immunsystem der Nematoden eingegangen wird, sollen wesentliche Aspekte über *Caenorhabditis elegans*, den bekanntesten Vertreter des umfangreichen Stammes der Nematoden beschrieben werden. Der Schwerpunkt richtet sich dabei auf die Analyse des Immunsystems und auf die Abwehrstrategien, über die *C. elegans* verfügt, um gegen Pathogene vorzugehen.

1.3 Der Modell-Organismus *Caenorhabditis elegans*

C. elegans wurde in den 1960 Jahren durch Sydney Brenner als Modell-Organismus in die Wissenschaft eingeführt (Brenner, 1974). Seit dem entwickelte er sich, nicht zuletzt seiner einfachen Handhabung wegen, zu einem der derzeit bekanntesten Modell-Organismen. *C. elegans* bietet eine Reihe von Vorteilen, die es erlauben, Experimente durchzuführen, die in Wirbeltieren zum einen schwer oder gar nicht durchführbar wären, und zum anderen zu ethischen Problemen führen könnten. Die Würmer sind kostengünstig und einfach zu kultivieren und es ist möglich, einzelne Linien bei -80 °C für Jahre einzulagern. Die Tiere sind transparent, so dass Phänotypen in lebenden Tieren unter dem Mikroskop leicht erkennbar sind und sie besitzen eine kurze Generationsdauer sowie zwei Geschlechter - Hermaphroditen und Männchen. Die Hermaphroditen können sich selbst reproduzieren, so dass isogene Linien herangezogen werden können, andererseits können diese Linien aber auch durch den Einsatz von Männchen ausgekreuzt werden.

Da mittlerweile sowohl das Genom als auch das Transkriptom der Schwesterarten *C. briggsae* (Stein *et al.*, 2003) und *C. remanei* (Wylie *et al.*, 2004) vollständig bekannt sind, ergeben sich neue Möglichkeiten zum Vergleich nahe verwandter Arten.

Vielfältige Informationen über *C. elegans* und andere Nematoden sind im Internet erhältlich und finden sich z. B. unter den folgenden Internetadressen:

<i>Wormatlas</i>	http://www.wormatlas.org/
<i>Wormbase</i>	http://www.wormbase.org/
<i>Wormbook</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=wormbook
<i>C. elegans II</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=ce2
<i>C. elegans protocols</i>	http://www.dartmouth.edu/~ambros/protocols.html
<i>NematodeNet</i>	http://www.nematode.net/

Eigenschaften wie Zellkonstanz (Eutelie), eine relativ simple Anatomie, ein transparenter Körperbau sowie die Tatsache, dass *C. elegans* der erste Vielzeller war, dessen genomische Sequenz 1998 vollständig sequenziert und veröffentlicht wurde (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), trugen dazu bei, dass *C. elegans* in Forschungsrichtungen wie Entwicklungs- oder Zellbiologie, in der Physiologie und Ökologie sowie in der Neurobiologie einen festen Platz neben anderen angesehenen Modell-Organismen wie der Maus (*Mus musculus*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) oder dem Bakterium *Escherichia coli* eingenommen hat. Die Ontogenese von *C. elegans*, welcher trotz der bestehenden Zellkonstanz aufgrund zellulärer regulatorischer Prozesse keine zellautonome Entwicklung zugrunde liegt, wurde durch Sydney Brenner, H. Robert Horvitz und John E. Sulston in Zusammenhang mit der Apoptose, dem programmierten Zelltod, untersucht. Für ihre Forschung und für „Entdeckungen betreffend der genetischen Regulierung der Organentwicklung und dem programmiertem Zellsterben“ erhielten die drei Forscher aus Großbritannien und den USA im Jahre 2002 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

C. elegans zeichnet sich nicht zuletzt durch seine genetische Manipulierbarkeit aus. So erhielten Andrew Z. Fire und Craig C. Mello im Jahre 2006 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie für die Erforschung der Methode der RNA-Interferenz (RNAi), durch die sich Gene gezielt - wenn auch nicht ausschalten so doch zeitweise - stilllegen lassen. Für *C. elegans* wurden verschiedene Methoden zur Durchführung der RNA-Interferenz beschrieben, die alle zu einer systemischen Ausschaltung der Ziel-RNA und damit der Zielgene führen (Fire *et al.*, 1998; Tabara *et al.*, 1998; Timmons und Fire, 1998). Die Methode der RNA-Interferenz konnte seit dem auch in vielen anderen Organismen sowie in kultivierten Zellen angewandt werden und gilt heute in vielen Forschungsgruppen als eine zuverlässige Methode zur Erforschung einzelner Gene und ihrer Aufgaben sowie zur

Analyse von inter- und intrazellulären Vorgängen. Ein weiteres Beispiel für eine genetische Manipulation, welche an *C. elegans* durchgeführt werden kann, ist die Erzeugung transgener Tiere und *Knock-out*-Mutanten. Viele dieser Mutanten sind mittlerweile auf Nachfrage am *Caenorhabditis Genetic Center (CGC)* an der *University of Minnesota, USA* erhältlich.

1.4 *C. elegans* – Systematik, Morphologie und Lebensweise

Der Stamm der Nematoda beinhaltet ca. 16.000 Arten, unter denen es sowohl freilebende als auch parasitäre Arten gibt (Abb. 3). Zu den parasitären Arten gehören z. B. die Trichinen *Trichinella spiralis*, der Spulwurm *Ascaris suum* oder der Medinawurm *Dranunculus medinensis* (Mehlhorn und Pekarski, 2002).

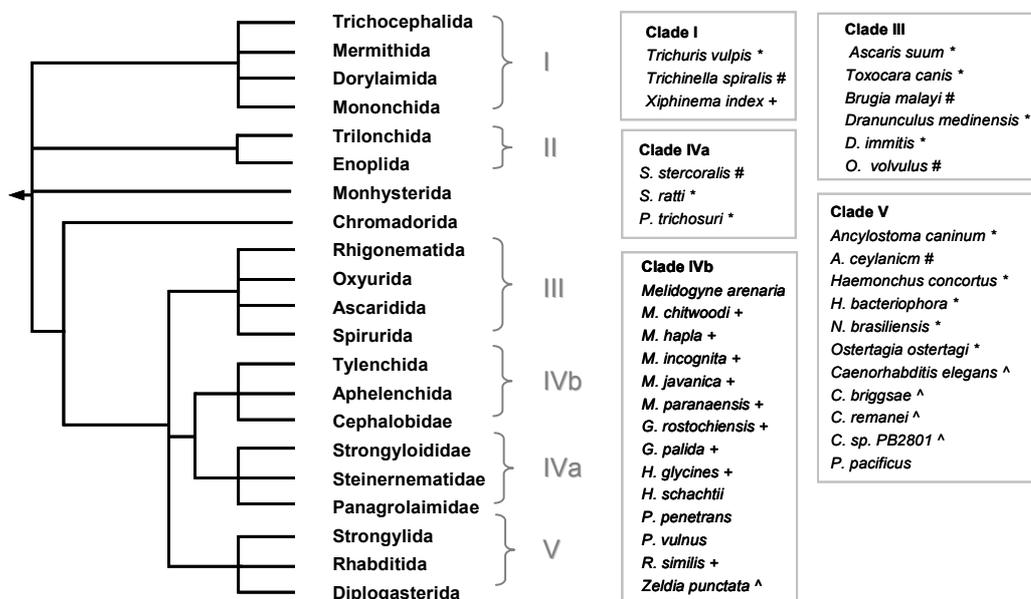


Abb. 3: Schematischer Stammbaum der Nematoda. # Human-Parasit, * Tier-Parasit, + Pflanzen-Parasit, ^ freilebende Spezies. Abbildung verändert nach: <http://tolweb.org/tree?group=Nematoda> und www.nematode.net/Phyla/index.php

C. elegans gehört innerhalb der Familie der Rhabditida und der Unterfamilie der Peloderinae zur Gattung *Caenorhabditis*, zu der auch andere freilebende Arten wie *C. briggsae*, *C. remanei*, *C. sp CB5161*, *C. japonica* und einige andere gehören (Abb. 4). Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Arten z. B. hinsichtlich der Wahl ihres Lebensraumes und auch in ihrer Fortpflanzung. Während *C. elegans*, *C. briggsae* und *C. remanei* im Boden auf mikroorganismenreichen Gründen leben, findet man die ebenfalls freilebenden, nicht-parasitären *C. japonica* in engem Kontakt zu Wanzen (Kiontke *et al.*, 2002). Außerdem besitzen einige der Arten, wie z. B. *C. remanei* oder

C. japonica, zwei Geschlechter – sie sind entweder weiblich oder männlich – während bei *C. elegans* und *C. briggsae* zwar ein männliches Geschlecht vorkommt, die selbstbefruchtenden Hermaphroditen aber deutlich überwiegen.

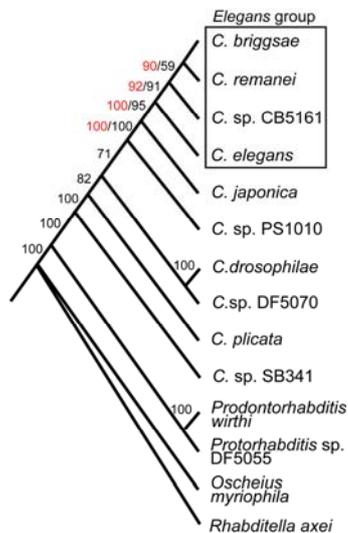


Abb. 4: Phylogenetischer Stammbaum der bisher bekannten *Caenorhabditis*-Arten und vier Vertreter von Außengruppen.

Abbildung nach Kiontke et al., 2004

C. elegans besitzt eine Körperlänge von bis zu 1,5 mm und lebt frei im Boden, wo er sich von Mikroorganismen wie Bakterien, Protozoen und Pilzen ernährt. Über seine natürlichen Lebensbedingungen, seine ökologische Nische und sein Nahrungsspektrum ist trotz der intensiven Forschung, die seit Jahren an *C. elegans* betrieben wird, nur wenig bekannt. Seine Verbreitungsgebiete erstrecken sich in den gemäßigten Klimazonen über große Teile der Welt (Koch et al., 2000; Barrière und Fèlix, 2005).

Das diploide Genom von *C. elegans* besitzt bei einer Größe von ca. 97 Mbp fünf Paar autosomale Chromosomen (I – V) und einem Paar Geschlechtschromosomen (X) und verfügt über ungefähr 19.000 kodierende Gene. Es gibt zwei Geschlechter, die durch die Verteilung der Geschlechtschromosomen festgelegt werden. Zu diesen zählen die selbstbefruchtenden Hermaphroditen (XX) und Männchen (X0), welche unter normalen Umständen nur zu 0,05 % in der Population vorkommen. Ein Hermaphrodit legt im Laufe seines zwei bis drei Wochen dauernden Lebens nahezu 300-600 Eier, aus denen L1-Larven schlüpfen. Dem L1-Larvenstadium folgen drei weitere Larvenstadien (L2 bis L4), die jeweils durch eine Häutung getrennt sind (Cassada und Russel, 1975). Die gesamte Generationszeit vom Embryo bis zur Imago, die bei einer Temperatur von 20 °C dreieinhalb Tage dauert, kann sich je nach Außentemperatur um Tage unterscheiden (Byerly et al., 1976) und ist in Abb. 5 schematisch dargestellt.

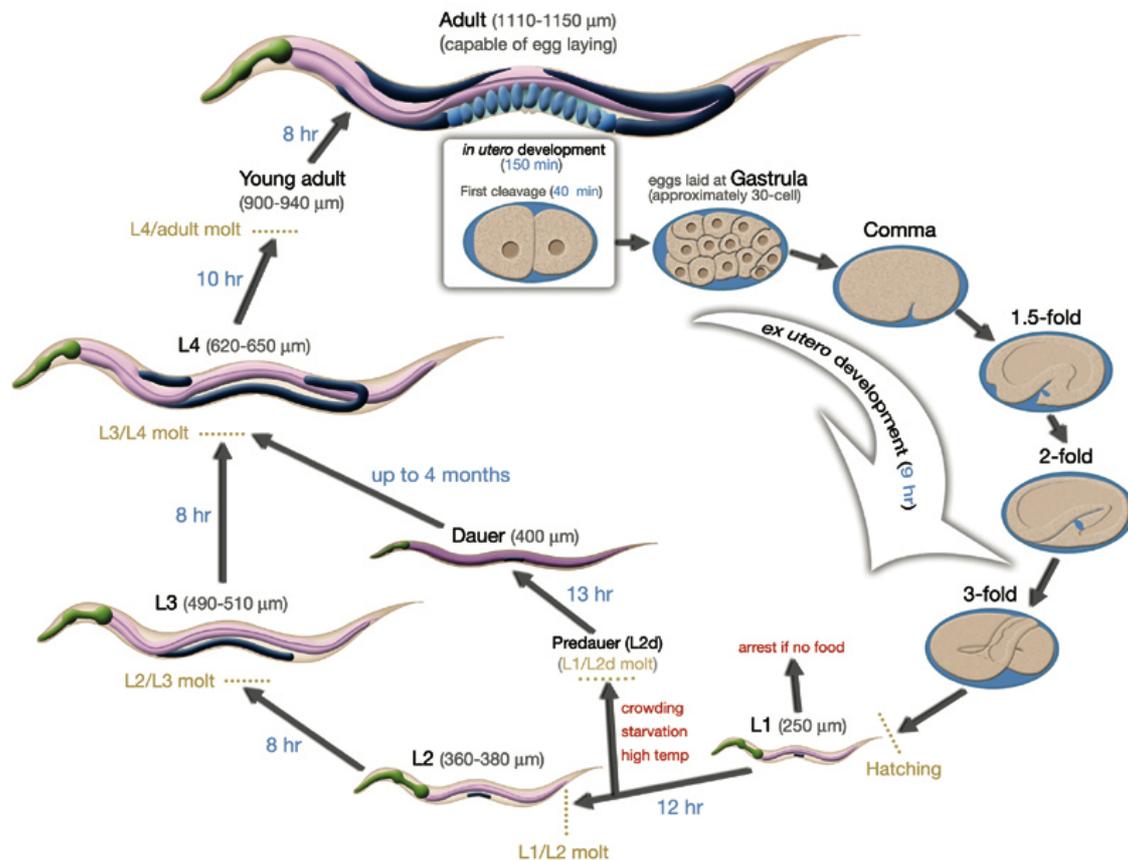


Abb. 5: Generationszyklus von *C. elegans* bei 22 °C. Quelle: <http://www.wormatlas.org/handbook/>

Die Embryonalentwicklung von *C. elegans* ist geprägt durch eine konstante Zellentwicklung und Zellzahl (Eutelie), welche es erlaubt, das Schicksal jeder einzelnen Zelle zu verfolgen. Nicht zuletzt wegen seiner Transparenz, die es erlaubt, jede einzelne Zelle im lebenden Tier zu erkennen, war es möglich festzulegen, wann und wo sich eine Zelle teilt und wo sie oder ihre Derivate im ausgewachsenen Tier lokalisiert sind. Eine frisch geschlüpfte L1-Larve, deren Aussehen zwar dem adulten Tier ähnelt, der aber die Keimdrüsen und die dazugehörigen Strukturen wie z. B. die Vulva fehlen, besitzt genau 558 Zellkerne, während ein erwachsener Hermaphrodit 959 und ein Männchen 1031 somatische Zellkerne und eine variable Zahl von Keimzellen aufweist (Sulston und Hodgkin, 1988). Während der Larval-Entwicklung sterben durch den Prozess des programmierten Zelltods exakt 131 definierte Zellen ab. Unter ungünstigen Umweltbedingungen verlassen die Tiere während der Larval-Entwicklung den normalen Zyklus und bilden aus den L2-Larven eine alternative L3-Larve, die sog. Dauerlarve (Albert und Riddle, 1988). Dieses Dauerlarvenstadium zeigt sich sehr resistent gegenüber Stress-Situationen und altert nicht. Sie kann bis zu einigen Monaten überdauern, bevor unter

günstigeren Bedingungen die Entwicklung zur L4-Larve und anschließend zur Imagination fortgesetzt wird.

Die Grundanatomie von *C. elegans* umfasst viele Organsysteme, die sich auch in anderen Tiergruppen wieder finden. Der Wurm ist unsegmentiert und bilateralsymmetrisch organisiert und besitzt ein sog. Pseudocoelom. Die Körperwand besteht aus einer Hypodermis, welche eine feste, collagene Cuticula sezerniert, die den gesamten Körper umschließt. Die Gonaden der Hermaphroditen bestehen aus zwei symmetrischen, zum anterioren bzw. posterioren Ende des Körpers gerichteten „Lappen“, die das Ovar, das Ovidukt, die Spermatheca und den Uterus enthalten. Beide Gonadenstränge enden in der mittig gelegenen Vulva.

Jedes Tier besitzt, abhängig von seinem Geschlecht entweder fünf (Männchen) oder sechs (Hermaphroditen) sogenannte Coelomocyten. Die genaue Funktion dieser Zellen, die jeweils in Paaren am anterioren, zentralen und posterioren Teil der Tiere lokalisiert sind (Abb. 6), ist bisher ungeklärt. In größeren Nematoden-Arten wie *Ascaris suum* wurde beschrieben, dass die Coelomocyten wahrscheinlich phagocytotisch aktiv sind und eine Vielzahl von Molekülen aus dem Pseudocoelom aufnehmen können (Chitwood und Chitwood, 1950; Bolla *et al.*, 1972; Fares und Greenwald, 2001).



Abb. 6: Lokalisation der Coelomocyten in einem adulten *C. elegans*-Hermaphroditen. Jeder adulte Hermaphrodit besitzt sechs Coelomocyten, die an definierten Positionen in drei Paaren entlang der Körperachse lokalisiert sind. (+) anteriore Coelomocyten, (*) zentrale Coelomocyten, (#) posteriore Coelomocyten. Die Abbildung wurde an einem Tier aufgenommen, das zu einer Linie mit Coelomocyten-spezifischer *gfp*-Expression gehört. Foto: M. Stanisak

Unter der Hypodermis liegen vier Muskelstränge, die aus der für Nematoden typischen Längsmuskulatur bestehen. Während die Ringmuskulatur in Nematoden nicht existiert, besitzen sie die Besonderheit, dass einige Muskelzellen Ausläufer zu den Nervenzellen und damit neuromuskuläre Synapsen ausbilden (Waterston, 1988). Hermaphroditen besitzen 302 Nervenzellen, die sich im circumpharyngealen Nervenring, im ventralen Bauchmark und im Schwanz konzentrieren. Die sensorischen Nervenzellen verdichten sich dabei im Kopfbereich der Tiere.

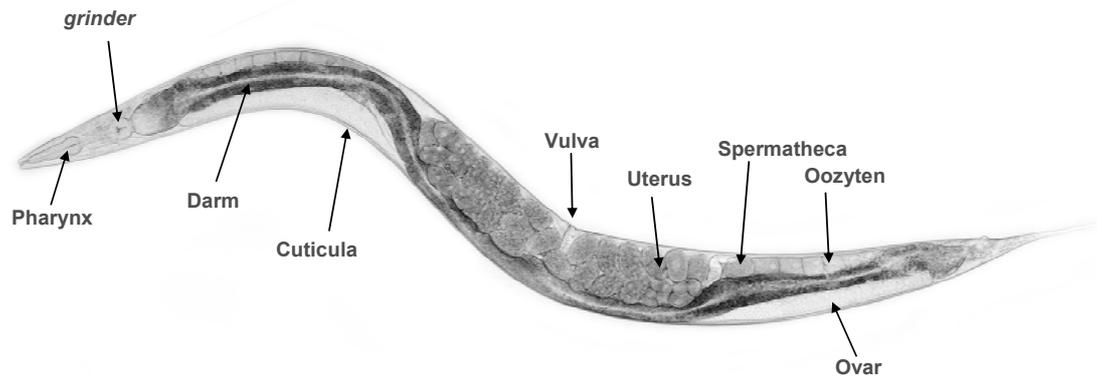


Abb. 7: Mikroskopische Aufnahme eines adulten *C. elegans*-Hermaphroditen bei 32-facher Vergrößerung. Die Länge des Tieres beträgt ca. 1 mm. Die anatomischen Strukturen sind mit Pfeilen markiert und mit den entsprechenden Bezeichnungen versehen. Linke Seite: anterior; rechte Seite: posterior. Foto: M. Stanisak

Männchen unterscheiden sich von den Hermaphroditen hauptsächlich durch das Fehlen von Ovar, Uterus und Vulva aber auch über ihre komplexere Schwanzstruktur. Sie besitzen spezialisierte Muskeln die der Fortpflanzung dienen. Außerdem weisen sie 79 zusätzliche Nervenzellen auf (Ware *et al.*, 1975; White *et al.*, 1986; Hall und Russel, 1991), die das abweichende Sozial- und Fortpflanzungsverhalten erklären könnten.

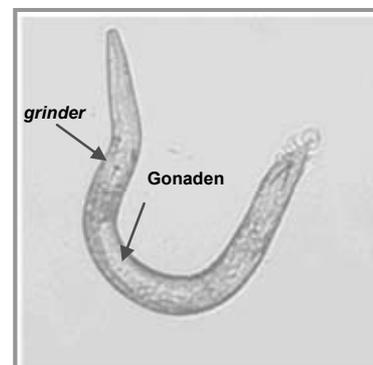
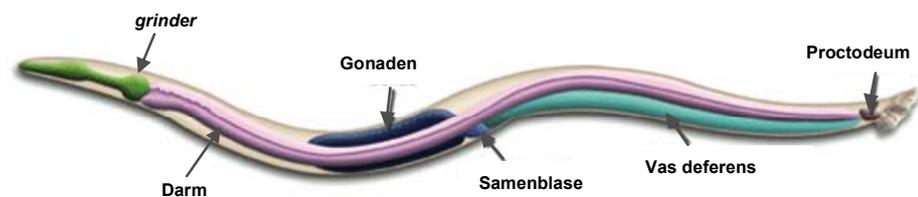


Abb. 8: Schematische und Mikroskopische Aufnahme eines adulten *C. elegans*-Männchens. Die Länge des Tieres beträgt ca. 1 mm. Oben: die anatomischen Strukturen sind mit Pfeilen markiert und mit den entsprechenden Bezeichnungen versehen. oben: schem. Darstellung www.wormbase.org/handbook, unten rechts: fotografische Aufnahme: M. Stanisak

Wie die Muskulatur ist auch das Sekretions-/Exkretionssystem der Nematoden einzigartig im Tierreich. Es ist für die Osmoregulation verantwortlich und besteht aus vier spezialisierten Zelltypen (Nelson *et al.*, 1983).

Im Verdauungstrakt, der sich aus Mundöffnung, Pharynx, Darm und After zusammensetzt, werden die aufgenommenen Mikroorganismen zunächst im terminal des Pharynx gelegenen *grinder* zermahlen, bevor sie in den Darm gelangen. Der Darm besteht aus zwanzig Zellen, welche als einzellige Schicht eine Röhre zwischen Mundöffnung und After bilden. Dabei bilden je zwei Zellen einen Ring (II - IX) während der anterior gelegene Ring (I) aus vier Zellen besteht. Der Darm wird nicht direkt über Nerven innerviert, besitzt aber einen assoziierten Muskel am posterioren Ende. Während der postembryonalen Entwicklung des Darms, der aus einer einzigen Vorläuferzellen entsteht (Leung *et al.*, 1999), werden die zwanzig Darmzellen zu binucleären, polyploiden Zellen, sodass das adulte Tier letztendlich 20 Darmzellen besitzt, welche insgesamt 30-34 Zellkerne mit je 32 Chromosomen aufweisen (Sulston und Horvitz, 1977; Hedgecock und White, 1985; Leung *et al.*, 1999). Die großen Darmzellen besitzen eine distinkte apikale, laterale und basale Region, wobei die apikalen Bereiche das mit Mikrovilli ausgekleidete Darmlumen bilden, welches von einer extrazellulären Glykokalyx bedeckt wird (Sulston und Horvitz, 1977). Die intestinalen Zellen besitzen sehr große Zellkerne und eine Vielzahl autofluoreszenter, cytoplasmatischer Granula. Der Darm von *C. elegans* besitzt verschiedene Funktionen. Er stellt ein großes Speicherorgan dar und übernimmt die Verdauung der aufgenommenen Mikroorganismen, indem Verdauungsenzyme wie Cystein-Proteasen oder Lysozyme in das Darmlumen sezerniert werden (White, 1988). Er ist nicht einheitlich aufgebaut, sondern hinsichtlich seiner Funktion und seiner Morphologie entlang der anterior-posterioren Achse differenziert. So ist z. B. die Sekretion des Verdauungsenzyms CPR-1 im anterioren Teil des Darms verstärkt (Britton *et al.*, 1998), während im posterioren Teil die Nährstoff- und Energiespeicherung dominiert und damit Lipid-Vesikel vorherrschen. In Dauerlarvenstadien findet man eine stark veränderte Funktion und Anatomie des Darms, die vor allem darauf zurückzuführen ist, dass Dauerlarven keine Nahrung zu sich nehmen (Popham und Webster, 1979).

1.5 Das Immunsystem von *C. elegans*

Das Interesse für *C. elegans* als Modell-Organismus beschränkt sich nicht nur auf die Erforschung von Apoptose, Zellzyklus oder Gerontologie (Altersforschung), sondern es gilt ebenso seiner Fähigkeit, sich vor Gefahren aus der Umwelt zu schützen. Erst in den letzten Jahren wurden Indizien für die Existenz eines komplexen Immunsystems in *C. elegans* gefunden.

Die Erforschung des Immunsystems von *C. elegans* mithilfe moderner molekularbiologischer Methoden bietet die Möglichkeit, allgemeine Prinzipien der angeborenen Immunität aufzuklären. Die Lebensweise des in seiner natürlichen Umgebung lebenden *C. elegans* fordert eine gewisse Anpassungsfähigkeit an verschiedene Situationen, wie z. B. Kälte oder Hitze, Trockenheit oder Nässe und nicht zuletzt Nahrungsmangel oder Kontakt zu pathogenen Mikroorganismen. Ist die entsprechende Situation so problematisch, dass *C. elegans* ihr, trotz seiner anatomischen Besonderheiten wie der Cuticula, nicht gewachsen ist, entgeht er dieser Situation in erster Linie durch sein Verhalten. Sein Nervensystem bietet ihm die Möglichkeit, spezifisch auf Umweltreize zu reagieren. Auf Futtermangel wird er mit einem Wechsel des Standortes reagieren oder er wird in ein Dauerlarvenstadium eintreten. Eine besondere Herausforderung ist die Unterscheidung harmloser und pathogener Bakterien. Den Kontakt zu Pathogenen vermeidet *C. elegans* entweder durch Flucht oder, wenn das nicht möglich, ist durch die Reduzierung der Futteraufnahme (Tan *et al.*, 1999; Aballay *et al.*, 2000; Pujol *et al.*, 2001). Die genetische Basis für diese Fähigkeiten wird zurzeit noch erforscht.

Verschiedene Gene, die sowohl in der Immunantwort der Vertebraten als auch in der von *Drosophila melanogaster* involviert sind, wurden für Sequenzvergleiche herangezogen, um orthologe Gene in *C. elegans* zu identifizieren, deren Funktion in der Abwehr von Pathogenen liegen könnte. Interessanterweise wurden in *C. elegans* kaum entsprechende Gene gefunden. So ist z. B. der für *Drosophila* und die Wirbeltiere so wichtige Toll-Signaltransduktionsweg nur teilweise konserviert. Obwohl *C. elegans* homologe Gene zu einigen der Komponenten besitzt, fehlen ihm andere wichtige Gene wie z. B. das NF- κ B-kodierende Gen (Pujol *et al.*, 2001). Auch gibt es Hinweise darauf, dass der TOL-1-Rezeptor von *C. elegans*, welcher u. a. in potentiellen chemosensorischen Neuronen lokalisiert ist, bei der Resistenz gegen Bakterien und Pilze keine direkte Rolle spielt, sondern eher eine Position im Verhalten von *C. elegans* einnimmt (Pujol *et al.*, 2001; Aballay *et al.*, 2003). In homozygoten *tol*⁻-Mutanten ist die Erkennung des pathogenen Bakterienstammes *Serratia marcescens* Db11 gestört und *C. elegans* verfügt nicht mehr

über die Fähigkeit, einen Kontakt mit diesen Bakterien zu vermeiden (Pujol *et al.*, 2001; Kurz *et al.*, 2003). TOL-1 scheint also ein Teil des Mechanismus zu sein, mit dem der Wurm zwischen harmlosen und pathogenen Bakterien unterscheidet.

C. elegans wurde als Ersatzwirt (*model host*) für die pathogenen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* etabliert (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Garsin *et al.*, 2001), welche in der Lage sind, die verschiedensten Organismen zu infizieren, darunter auch Pflanzen, Insekten und Säugetiere. Seither wurden weitere Mikroorganismen, wie die Gram-positiven Bakterien *Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus aureus* oder die Gram-negativen Bakterien *Burkholderia pseudomallei* und *Serratia marcescens* und auch Pilze wie die Hefe *Cryptococcus neoformans* getestet (Mylonakis *et al.*, 2002).

Durch seine Lebensweise ist *C. elegans* und vor allem sein Darmepithel permanent der Konfrontation mit potentiell pathogenen Bakterien ausgesetzt (Sifri *et al.*, 2005). Um einer möglichen Infektion zu entgehen, verfügt *C. elegans* über verschiedene Mechanismen. Seine Abwehrstrategien lassen sich grob in drei Teile gliedern: i) *C. elegans* begegnet einer Gefahr durch Flucht oder Vermeidung (Tan *et al.*, 1999; Aballay *et al.*, 2000; Pujol *et al.*, 2001); ii) Die physischen Barrieren, wie die Cuticula oder der *grinder*, verhindern einen direkten Kontakt zum lebenden Pathogen (Borgonie *et al.*, 1995; Tan *et al.*, 1999; Labrousse *et al.*, 2000; Kim, 2002; Tan, 2002; Kurz und Ewbank, 2003; Kurz *et al.*, 2003); iii) Die physiologische Abwehrreaktion, welche das eigentliche Immunsystem von *C. elegans* ausmacht, verhindert weiterhin die Infektion durch Pathogene, die trotz allem in den Wurm eingedrungen sind (Schulenburg *et al.*, 2004). Innerhalb dieses Immunsystems unterscheidet man zwischen konstitutiven und induzierbaren Komponenten. Zu den konstitutiven physiologischen Komponenten zählen z. B. Verdauungsenzyme oder antimikrobielle Peptide, welche ständig in Darm, Pharynx oder Hypodermis synthetisiert werden. Die induzierbaren Komponenten werden spezifisch nach dem Kontakt zu einem potentiellen Pathogen aktiviert. Im Jahr 2002 wurde z. B. eine induzierbare Antwort entdeckt, die gegen den Bakterienstamm *S. marcescens* Db11 gerichtet war (Mallo *et al.*, 2002), und Gene wie *lys-1*, *lys-7* und *lys-8* sowie Lektin-kodierende Gene miteinbezogen. Andere Bakterien, wie z. B. das potente Pathogen *P. aeruginosa* bewirkten die Aktivierung der Gene *spp-3* und *spp-18*, die voraussichtlich für Mitglieder der Saposin-ähnlichen Proteinfamilie kodieren (Kurz und Tan, 2004).

1.6 Immunrelevante Signaltransduktionswege in *C. elegans*

In den letzten Jahren wurden viele Informationen über Signalkaskaden in *C. elegans* gewonnen, welche in direktem oder indirektem Bezug zu dessen Immunsystem stehen. Diese Signaltransduktionswege wurden in verschiedenen Übersichtsartikeln dargestellt (Kurz und Ewbank, 2003; Millet und Ewbank, 2004; Schulenburg *et al.*, 2004; Gravato-Nobre und Hodgkin, 2005).

Zur Aufklärung dieser Signalkaskaden trug z. B. die Beobachtung bei, dass die Expression einiger der oben erwähnten Gene durch den sog. TGF- β (*transforming growth factor- β*)-Signaltransduktionsweg reguliert wird. Aufgrund dieser Erkenntnis wurde der TGF- β -Signaltransduktionsweg mit der induzierbaren Immunantwort in Verbindung gebracht (Mallo *et al.*, 2002).

Drei weitere Signaltransduktionswege, welche eine Beteiligung am Immunsystem haben könnten, wurden seitdem in *C. elegans* ermittelt: der p38-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signaltransduktionsweg (Kim *et al.*, 2002; Aballay *et al.*, 2003), welcher Resistenz gegenüber *P. aeruginosa* und *S. enterica* vermittelt, der PCD (*programmed cell death*)-Signaltransduktionsweg (Aballay *et al.*, 2003) und der *Insulin-like*-Signaltransduktionsweg, welcher in Gegenwart verschiedener Bakterien, vor allem aber bei Kontakt zu Gram-positiven Bakterien wie *S. aureus* oder *E. faecalis* aktiviert wird (Garsin *et al.*, 2003). Alle diese Signaltransduktionswege scheinen zu interagieren, und die meisten vermitteln ebenfalls Reaktionen in generellen Stress-Situationen.

Die vier bisher ermittelten Signaltransduktionswege sollen im Folgenden dargestellt werden.

1.6.1 TGF- β (*transforming growth factor- β*)-Signaltransduktionsweg

Bei der Suche nach hypersensitiven *C. elegans*-Mutanten fand man heraus, dass der TGF- β -Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle in der Abwehr von Infektionen spielt (Mallo *et al.*, 2002). *Microarray*-Analysen zeigten, dass die Transkription einiger Gene - wie z. B. *lys-8* - welche unter positiver Kontrolle des TGF- β -verwandten DBL-1 stehen nach Kontakt zu *Serratia marcescens* induziert werden. *dbl-1*-Mutanten zeigten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit *P. aeruginosa* und *S. marcescens* (Tan, 2001; Mallo *et al.*, 2002).

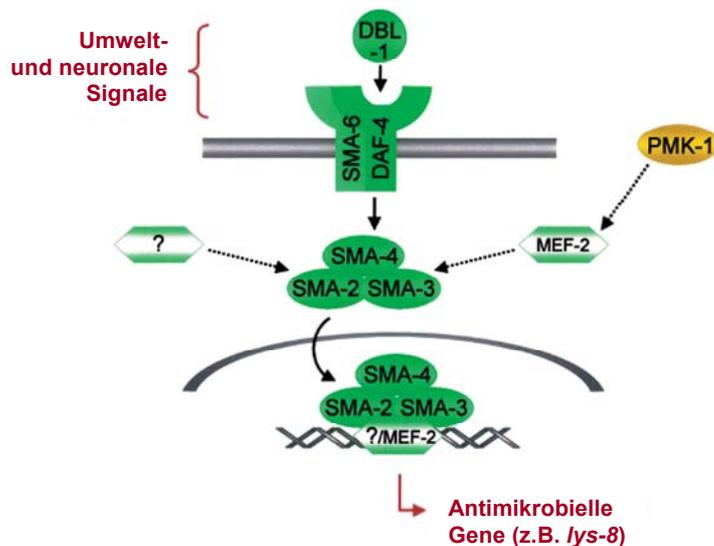


Abb. 9: TGF- β -Signaltransduktionsweg. Direkt in das Immunsystem einbezogene Komponenten sind massiv eingefärbt und durchgehenden Pfeilen dargestellt. Gestrichelte Pfeile weisen auf möglichen Interaktionen zwischen Signaltransduktionswegen hin. Fragezeichen bezeichnen nicht identifizierte Faktoren. Verändert nach Schulenburg et al., 2004.

1.6.2 p38-MAPK-Signaltransduktionsweg

Die Komponenten des p38-MAPK-Signaltransduktionsweges in *C. elegans* wurden erstmals von Kim et al. beschrieben (Kim et al., 2002). Der Signaltransduktionsweg ist zwischen verschiedenen Organismen wie Pflanzen (Asai et al., 2002), Insekten (Inoue et al., 2001) und auch Säugetieren (Kyriakis et al., 2001) konserviert und repräsentiert damit den wohl ursprünglichsten, evolutionär konserviertesten Signaltransduktionsweg im Immunsystem der Metazoa (Kurz und Ewbank, 2003). Die Komponenten dieses Signaltransduktionsweges sind sowohl an der physiologischen Stressantwort als auch an der Pathogen-Abwehr bzw. -Resistenz beteiligt (Kim et al., 2002). Über RNA-Interferenz-Versuche wurde herausgefunden, dass die MAPK-Kinasen-kodierenden Gene *sek-1* und *nsy-1* über *pmk-1*, einem der zwei p38 homologen Gene von *C. elegans*, auf die Resistenz gegenüber Pathogenen wie *P. aeruginosa* einwirken (Kim et al., 2002). Ebenso führte die Stilllegung des *pmk-1* Gens mittels RNAi zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Gram-negativen Bakterien wie *Salmonella typhimurium*. Von diesem Bakterium ist bekannt, dass Infektionen zur Induktion des programmierten Zelltods in *C. elegans* führen (Aballay und Ausubel, 2001). Da ebenso bekannt ist, dass die Apoptose an der Resistenz gegen *Salmonella*-Infektionen beteiligt ist, wurde gezeigt, dass diese Resistenz von den Genen *sek-1*, *nsy-1* und *pmk-1* abhängt.

Drei Hauptwege dieser Signalkaskade wurden beschrieben: die p38-MAPK-Kaskade, die ERK (*extracellular-signal regulated protein kinase*)-Kaskade und die JUN-Kinase (JNK)-Kaskade (Kurz und Ewbank, 2003).

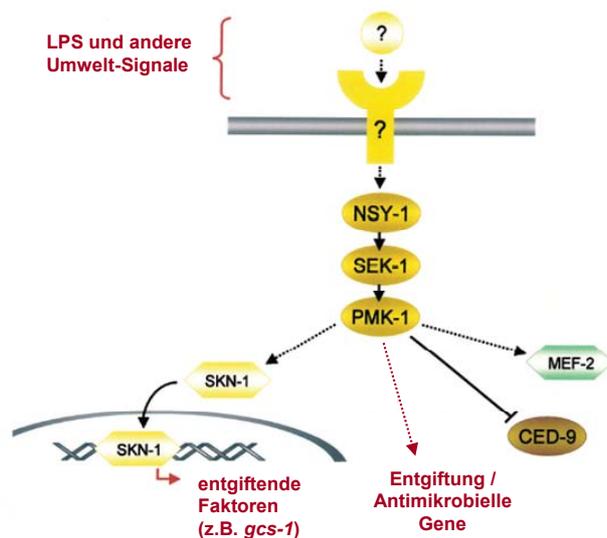


Abb. 10: p38-MAPK (mitogen-activated protein kinase)-Signaltransduktionsweg. Direkt in das Immunsystem einbezogene Komponenten sind massiv eingefärbt und durchgehenden Pfeilen dargestellt. Gestrichelte Pfeile und weisen auf möglichen Interaktionen zwischen Signaltransduktionswegen hin. Fragezeichen bezeichnen nicht identifizierte Faktoren. LPS, Lipopolysaccharid. Verändert nach Schulenburg *et al.*, 2004.

1.6.3 PDC (programmed cell death)-Signaltransduktionsweg

Der Mechanismus der Apoptose wurde an *C. elegans* erstmals grundlegend durch Sydney Brenner, Robert Horvitz und John Sulston erforscht, welche dafür 2002 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurden (Brenner, 2002). In Säugetieren vermittelt der Kontakt zu Pathogenen häufig die Apoptose von somatischen Zellen und Immunzellen (Hasnain *et al.*, 2003). In *C. elegans* führen Infektionen mit *Salmonella enterica* zum programmierten Zelltod der Gonaden. Der Verlust der Gene *ced-3*, *ced-4* und *egl-1* sowie die Überexpression des Gens *ced-9* führen zu einer verringerten Apoptose-Rate und gleichzeitig zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber *Salmonella*-Infektionen (Aballay *et al.*, 2001). Der genaue Mechanismus wurde bis heute nicht aufgeklärt, da die *Salmonella*-Infektionen ausschließlich den Darm betreffen, während die Apoptose die Gonaden betrifft (Aballay *et al.*, 2000; Labrousse *et al.*, 2000). Es gibt aber einige Theorien zu der Frage, wie der Abbau der Zellen der Gonaden die Resistenz gegen bakterielle Infektionen unterstützen könnte (Aballay *et al.*, 2001;

Schulenburg *et al.*, 2004). Ein Regulator des PCD-Signaltransduktionsweges ist z. B. PMK-1, das p38-Homolog aus *C. elegans*, welches im p38-MAPK-Signaltransduktionsweg die vermittelnde Rolle spielt (Aballay *et al.*, 2003).

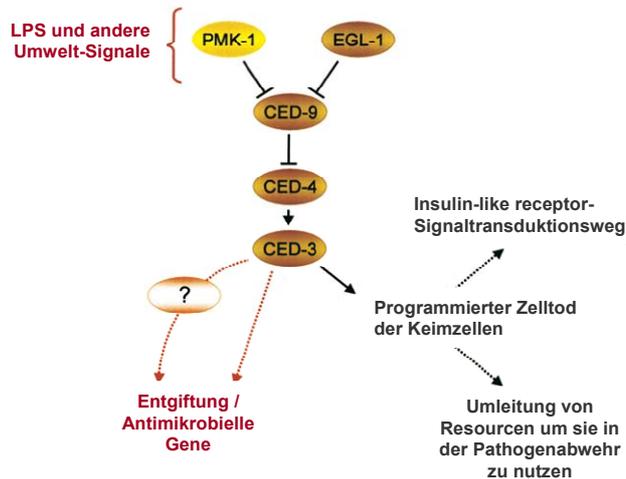


Abb. 11: PDC (programmed cell death)-Signaltransduktionsweg. Beschriftung siehe Abb. 10. Verändert nach Schulenburg *et al.*, 2004.

Eine weitere mögliche Erklärung ist die Entsendung von Signalen, die zur Aktivierung alternativer Signalkaskaden, wie z. B. des *insulin-like receptor*-Signaltransduktionsweges, führen könnten. Von diesem weiß man, dass er durch die Apoptose von Keimzellen inhibiert wird und damit eine Immunantwort vermittelt (Hsin und Kenyon, 1999; Garsin *et al.*, 2003).

Es ist bis heute unklar, ob die Gene, welche durch den PCD-Weg aktiviert werden, direkt gegen *S. enterica* wirken oder ob sie wiederum andere Signaltransduktionswege regulieren, die dann die Immunantwort vermitteln (Schulenburg *et al.*, 2004).

1.6.4 IGF (Insulin-like receptor)-Signaltransduktionsweg

Viele der Gene, die im *insulin-like receptor*-Signaltransduktionsweg involviert sind, wurden über Mutanten charakterisiert, die eine anormale Dauerlarvenstadien-Entwicklung aufwiesen (*dauer larva formation abnormal, daf*). Da die Komponenten dieses Signaltransduktionsweges nicht nur in *C. elegans* sondern auch in anderen Organismen wie *Drosophila* oder der Maus vorkommen, wird angenommen, dass es sich dabei um eine hochkonservierte Signalkaskade handelt, die an vielen Mechanismen wie Langlebigkeit, Thermotoleranz, Resistenz gegen UV-Licht oder Schwermetalle sowie an der Bildung von

Nachkommen beteiligt ist (Dorman *et al.*, 1995; Guarente und Kenyon, 2000; Finch und Ruvkun, 2001; Nelson und Padgett, 2003; Tatar *et al.*, 2003).

Bekannt wurde der DAF-2-Rezeptor für seinen starken Einfluss in der Regulation des Alterungsprozesses, da seine Aktivierung die Lebenslänge von *C. elegans* signifikant verkürzt, während seine Inhibition diese verlängert (Guarente und Kenyon, 2000).

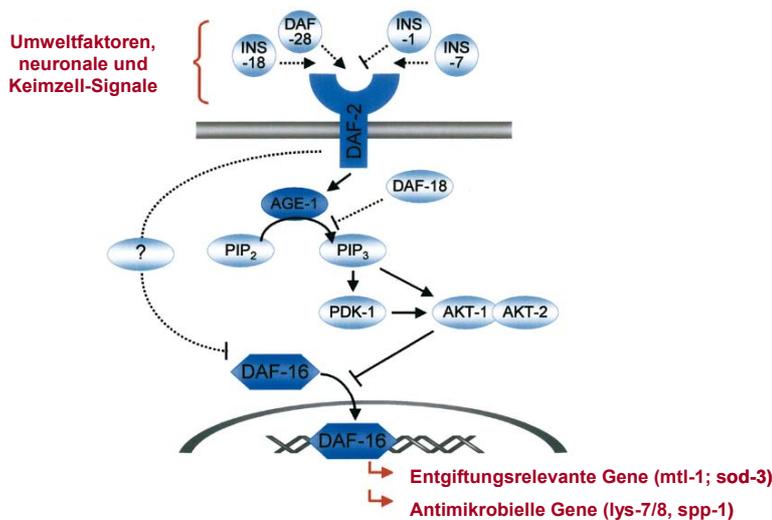


Abb. 12: IGF (insulin-like receptor)-Signaltransduktionsweg. Beschriftung siehe Abb. 10. PIP₂ Phosphatidylinositol bisphosphate. Verändert nach Schulenburg *et al.*, 2004.

Anhand dieser Beobachtungen wurde das Modell einer Signalkaskade erstellt, in welcher der DAF-2-Rezeptor, ein membranständiger Tyrosinkinase-Rezeptor mit Homologie zum Insulin-Rezeptor, einen Insulin-ähnlichen Liganden bindet und dadurch aktiviert wird. Die Aktivierung des DAF-2-Rezeptors führt letztendlich zur Inaktivierung des Transkriptionsfaktors DAF-16, wodurch dessen Translokation in den Zellkern behindert wird. Die Transkription der entsprechenden Zielgene, wozu auch einige der antimikrobiellen Peptide gehören, wird also durch die Aktivierung des DAF-2-Rezeptors unterbunden. Durch die Bindung unterschiedlicher Liganden, die sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken können, kann die Expression dieser Zielgene reguliert werden.

Vor einiger Zeit wurde entdeckt, dass diese Signalkaskade auch an der Resistenz gegen verschiedene Bakterien wie *P. aeruginosa*, *E. faecalis* oder *S. aureus* beteiligt ist (Garsin *et al.*, 2003). Tiere, denen das Gen *daf-2* fehlte, zeigten eine erhöhte Überlebensrate in Anwesenheit von Pathogenen. Im Gegensatz dazu verringerte sich die Resistenz der Tiere, denen das Transkriptionsfaktor-kodierende Gen *daf-16* fehlte. Doppelmutanten, in

denen sowohl das Gen *daf-2* als auch das Gen *daf-16* inaktiviert war, zeigten sich so anfällig für Infektionen wie Tiere des Wildtypstammes N2 (Garsin *et al.*, 2003).

Über *Microarray*-Analysen konnte gezeigt werden, dass viele der DAF-16-Zielgene für potentielle antimikrobielle Peptide kodieren. Zu diesen gehören u. a. die Lysozym-kodierenden Gene *lys-7* und *lys-8* sowie *spp-1* und *spp-12*, Mitglieder einer Genfamilie, die vermutlich für Saposin-ähnliche Proteine kodieren (Murphy *et al.*, 2003).

1.7 Antimikrobielle Peptide von *C. elegans*

C. elegans verfügt über eine ganze Reihe von potentiellen Effektorproteinen, sog. antimikrobiellen Peptiden, die an der Abwehr von Pathogenen beteiligt sein könnten (Nicholas und Hodgkin, 2004). Zu diesen zählen auch zwei Klassen von Lysozymen, die von mindestens zehn Genen kodiert werden. Interessanterweise kodieren die Gene der einen Klasse für Proteine, die eine große Ähnlichkeit zu den Lysozymen von *E. histolytica* aufwiesen (Nickel *et al.* 1998, Leippe, 1999). Die Gene *lys-1*, *lys-7* und *lys-8* werden konstitutiv im Darm exprimiert, wobei die Expressionsrate nach Kontakt zu *S. marcescens* gesteigert wird (Mallo *et al.*, 2002). Außerdem ist *lys-8* durch den TGF- β -Signaltransduktionsweg induzierbar (Mochii *et al.*, 1999), während die Transkription von *lys-1* und *lys-7* über die Bindung des Transkriptionsfaktors DAF-16 aktiviert wird (Murphy *et al.*, 2003). Ein anderes Gen, das Gen ZK6.7, das für eine Lipase kodiert und dessen Transkriptionsrate ebenfalls nach einer *S. marcescens*-Infektion herauf reguliert wird, wurde von Mallo *et al.* 2002 identifiziert.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass Gene, wie z. B. das Gen *dod-2* bzw. *thn-1* (F28D1.3), für Thamatin/PR-5-ähnliche Proteine kodieren. Die Expression dieser Gene wird ebenfalls über die Bindung des Transkriptionsfaktors DAF-16 aktiviert und die Proteine vermitteln antimykotische Aktivität (Murphy *et al.*, 2003). Weitere potentielle antimikrobielle Peptide, die als Metridin / ShK-Domänen-ähnliche Proteine bezeichnet werden, lassen, aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu antimykotischen Peptiden aus *Amaranthus caudatus*, auf eine fungizide Aktivität schließen. Die Transkription der entsprechenden Gene, T20G5.7 und T20G5.8, wird ebenfalls über den Transkriptionsfaktor DAF-16 aktiviert (Murphy *et al.*, 2003). Weiterhin konnten sechs Gene (*abf-1* bis *abf-6*) in *C. elegans* identifiziert werden, die als *antibacterial factor related* bezeichnet werden. Sie kodieren für sog. ASABF (*Ascaris suum-antibacterial factor*)-Peptide. Rekombinant synthetisiertes ABF-2 verfügt über antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie gegen Hefezellen. Verschiedene Experimente weisen darauf hin, dass die Expression von *abf-2* im Pharynx lokalisiert ist (Kato *et al.*, 2002). Die Expression

von zwei weiteren Genen, *nlp-29* und *nlp-31* (*neuropeptide-like protein*), die für potentielle antimikrobielle Peptide kodieren, wurde *in vivo* durch den Kontakt zu Bakterien und Pilzen induziert. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die beiden Gene durch TIR-1, ein Protein mit Homologie zum Toll-Interleucin 1-Rezeptor, kontrolliert werden (Couillault *et al.*, 2004). Das Gen *nlp-29* wurde dabei sowohl durch den Kontakt zum Pilz *Drechmeria coniospora* als auch über das Gram-negative Bakterium *S. marcescens* aktiviert. In derselben Expressions-Studie konnte *cnc-2*, ein weiteres Gen mit identischer Regulation, identifiziert werden, das für ein Peptid kodiert, dessen Primärstruktur starke Ähnlichkeit zu NLP-29 aufweist. *Cnc-2* wurde einer Genfamilie zugeordnet, die aus sechs Genen besteht und für die sog. Caenacine (*Caenorhabditis bacteriocin*) kodiert. Die fungizide Aktivität von NLP-31 wurde getestet, indem das Peptid chemisch synthetisiert und in *In-vitro*-Aktivitätstests gegen *D. coniospora*, *Neurospora crassa* und *Aspergillus fumigatus* eingesetzt wurde. Neben der fungiziden Aktivität zeigte NLP-31 auch eine vergleichsweise schwache antibakterielle Aktivität gegen *M. luteus* und *E. coli*. Interessanterweise konnte die Expression der Gene *nlp-31* und *nlp-33* sowie die Expression von *cnc-4* in der Hypodermis ausgemacht werden.

1.7.1 Saposin-ähnliche Proteine von *C. elegans*

Wie bereits erwähnt, verfügt *C. elegans* auch über Gene, die für Saposin-ähnliche Proteine kodieren könnten. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Amoebapore und zu anderen porenbildenden Peptiden wurde für diese Peptide eine antimikrobielle und porenbildende Aktivität vorhergesagt.

Die Genfamilie besteht aus mindestens 23 Mitgliedern (*spp-1* bis *spp-23*) und ihre vorhergesagten Genprodukte werden im Folgenden als Caenopores bezeichnet. Die Caenopores verfügen über die in Abschnitt 1.2.1 erwähnten charakteristischen Strukturen der weit verbreiteten Saposin-ähnlichen Proteine und damit über die sechs konservierten Cysteinreste und die rein α -helicale Sekundärstruktur. Die Peptide Caenopore 1, 12 und 15 weisen von allen Caenopores hinsichtlich ihrer Primärstruktur die größte Ähnlichkeit zu den beiden NK-lysin-Isoformen auf (Abb. 13), die bei der Immunantwort des Schweins eine wichtige Rolle spielen (Anderson *et al.*, 1995).

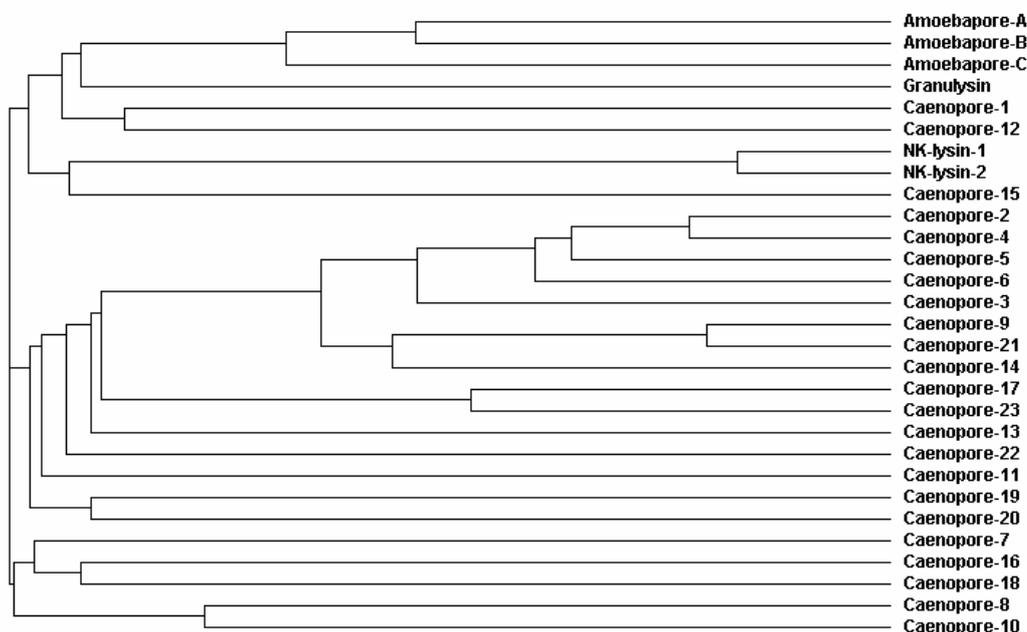


Abb. 13: Phylogenetischer Stammbaum der Caenopores. Der Stammbaum basiert auf der SAPLIP-Domäne der Peptide und vier zusätzlichen N-terminalen Aminosäure-Resten.

Die Existenz der fünf Gene *spp-1*, *spp-3*, *spp-4*, *spp-5* und *spp-6* wurde erstmals 1998 beschrieben (Banyai und Patthy, 1998). In dieser Arbeit wurde auch die bis dahin prognostizierte antibakterielle Aktivität der Caenopores an einem der Mitglieder, nämlich am Caenopore 1 nachgewiesen, indem es rekombinant synthetisiert und *in vitro* einem in Agar-Diffusionstest gegen *E. coli*-Bakterien getestet wurde. Caenopore 1 führte zur Wachstumshemmung der eingesetzten Bakterien.

Wie bereits in Abschnitt 1.6.4 erwähnt, ist die Transkription einiger Caenopore-kodierender Gene nicht konstitutiv, sondern wird durch unterschiedliche Faktoren wie z. B. pathogene Bakterien reguliert. So wird z. B. die Transkription der Gene *spp-3* und *spp-18* durch den Kontakt zum pathogenen Bakterium *P. aeruginosa* aktiviert (Kurz und Tan, 2004), während die Transkription von *spp-1* und *spp-12* durch den Transkriptionsfaktor DAF-16 positiv beeinflusst wird (Murphy *et al.*, 2003). Dieser Transkriptionsfaktor ist, wie bereits in Abschnitt 1.7 erwähnt, ebenfalls an der Aktivierung anderer Gene beteiligt, zu denen die kodierenden Gene der Lysozyme, der Thaumatin/PR-5-ähnlichen Proteine und der Metridin / ShK-Domänen-ähnliche Proteine gezählt werden können.

1.8 Versuche im Vorfeld

Im Vorfeld dieser Arbeit standen Experimente, die größtenteils von Dr. Thomas Roeder durchgeführt wurden (jetzt Professor für Zoophysiologie am Zoologischen Institut der CAU Kiel). Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Analyse der biologischen Signifikanz der Caenopores in *C. elegans*. Dabei wurden RNA-Interferenz-Experimente mit fünf ausgewählten Mitgliedern der Genfamilie durchgeführt (Roeder und Leippe, 2004), deren Ergebnisse im Anschluss kurz dargestellt werden sollen.

Durch die RNA-Interferenz wurde die Expression der ausgewählten Gene vorübergehend unterbunden, so dass durch die entstehenden Phänotypen Rückschlüsse auf die Funktion der entsprechenden Gene in *C. elegans* gezogen werden konnten. Die Analyse beinhaltete die Quantifizierung der Wachstumsrate, der gelegten Eier und der Anzahl der Nachkommen.

Nach der transienten Ausschaltung der Gene *spp-1*, *spp-2*, *spp-4* und *spp-6* war keine Veränderung, weder in der Morphologie noch im Verhalten, im Vergleich zum *C. elegans*-Wildtyp erkennbar. Im Gegensatz dazu hatte das Fehlen von *spp-5* und damit offenbar der Verlust des Caenopore 5-Peptids dramatische Folgen für *C. elegans*. Das Wachstum und die Bewegung der entsprechenden Würmer waren ebenso eingeschränkt wie die Fähigkeit, Eier zu produzieren und dadurch Nachkommen zu erzeugen. Dies äußerte sich darin, dass, im Vergleich zu den Wildtyp-Würmern, bei den Caenopore 5-defizienten Würmern nur ungefähr zehn Prozent der Eier ausgezählt werden konnten. Um zu analysieren, ob es sich bei diesem Unvermögen um eine Störung in der Embryonalentwicklung oder um einen Effekt handelte, der die Elterntiere betraf, wurde die Anzahl der adulten Hermaphroditen, die sich aus einer definierte Zahl von Larven entwickelte, nach 96 Stunden ausgezählt. Es zeigte sich, dass im Vergleich zum Wildtyp weniger als fünf Prozent der Larven zu adulten Tieren heranwuchsen.

Um diese zeitliche Verzögerung in der Entwicklung zu analysieren, wurde der Ernährungsstatus der Würmer überprüft, in dem die Menge und die Verteilung des Körperfettes mit Hilfe des Farbstoffes Nil-Rot dargestellt wurde. Als Kontrollen wurden *daf-2*-Mutanten eingesetzt, von denen bekannt ist, dass sie eine starke Fettleibigkeit entwickeln (Guarente und Kenyon, 2000). Die *daf-2*-Mutanten wiesen wie erwartet einen hohen Körperfettanteil auf, während die Wildtyp-Würmer einen deutlich geringeren aber immer noch relativ hohen Fettanteil besaßen. Im Vergleich dazu verfügten die Caenopore 5-defizienten Tiere nur über sehr geringe Fett-Reserven.

Diese Beobachtung wies darauf hin, dass letztere nicht in der Lage waren, Energiereserven in Form von Fett anzulegen, welche aber für die Produktion von Eiern

zwingend benötigt werden. Um zu analysieren, worauf die beobachtete Unterernährung zurückzuführen sein könnte, wurde die Zahl der lebenden *E. coli*-Bakterien, die sich im Darm der Würmern befanden, ausgezählt (Abschnitt 7.13). Dabei zeigte sich, dass die Anzahl der lebenden Bakterien, die im Darm der Caenopore 5-defizienten Tiere gefunden wurden, im Vergleich zum Wildtypen um mehr als das Zehnfache erhöht war. Dieser Umstand wies darauf hin, dass die Caenopore 5-defizienten Tiere nicht mehr in der Lage waren, die überlebenden Bakterien im Darm zu töten. Dies führte dazu, dass sie einen Mangel an Nährstoffen aufwiesen und somit verhungerten, was zu dem beobachteten Phänotyp führte.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Beteiligung der Caenopores an der Immunantwort von *C. elegans* untersucht werden. Aufgrund der erheblichen Größe der Genfamilie und der Ergebnisse aus im Vorfeld durchgeführten Experimenten (Abschnitt 1.8) beschränkte sich die Analyse der antimikrobiellen Aktivität auf die Peptide Caenopore 1, 5 und 12. Der detaillierten Charakterisierung der entsprechenden Gene und ihrer Genprodukte sollte zunächst die Analyse ihrer Genexpression folgen, welche Gelegenheit gab, Informationen über die Lokalisation der Expression in *C. elegans* und die Gen-Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erhalten. In einem weiteren Schritt sollten die ausgewählten Caenopores rekombinant in *E. coli*-Expressionssystemen synthetisiert und *in vitro* hinsichtlich ihres Zielzellspektrums getestet werden. Dabei sollte die antimikrobielle Aktivität gegen verschiedene Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze sowie die cytotoxische Aktivität gegen Amöben und Säugerzellen untersucht werden. Im Zuge der Analyse der antimikrobiellen Aktivität sollte sowohl die wachstumshemmende Aktivität, charakterisiert durch die minimale inhibitorische Konzentration, als auch die abtötende Aktivität und damit die minimale letale Konzentration definiert werden. Des Weiteren sollte identifiziert werden, auf welche Weise die Peptide die jeweiligen Zielzellen zerstören. Dazu wurden Membran-Permeabilisierungs-Tests durchgeführt. Die Zerstörung der Membranen lebender Zellen durch die Caenopore-Peptide wurde dabei über den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green® dargestellt. Um schließlich den Mechanismus dieser membranpermeabilisierenden Aktivität aufzuklären, wurde die Fähigkeit der Caenopores zur Ausbildung von Poren in Membranen überprüft. Dazu wurde ein System verwendet, in dem die Depolarisation liposomaler Membranen und damit die Porenbildung verfolgt werden konnte.

2 ERGEBNISSE

2.1 Molekulare Charakterisierung der Caenopore-kodierenden Gene von *C. elegans*

Die Sequenz des vollständig sequenzierten und 1998 veröffentlichten Genoms von *C. elegans* (*C. elegans* sequencing consortium, 1998) ermöglicht den Zugriff auf ausführliche Informationen zu allen bisher identifizierten Genen. Beispiele dafür sind die genomische Lokalisation der Gene auf den Chromosomen, Expressionsanalysen oder die Ergebnisse von RNAi *gene-silencing*-Experimenten. Die verfügbaren Daten sind in der Datenbank *Wormbase* (www.wormbase.org) zusammengefasst.

Analysen der genomischen Sequenz von *C. elegans* ergaben eine große Genfamilie, deren Mitglieder voraussichtlich für Saposin-ähnliche Proteine, die sog. SAPLIPs oder *saposin-like proteins* kodieren. Die potentiellen Genprodukte dieser Gene werden im Folgenden als Caenopores bezeichnet. Sie sind Mitglieder einer strukturell konservierten Peptidfamilie in *C. elegans*. Die 23 Mitglieder der Gen- bzw. Peptidfamilie (siehe Tabelle 1), sollen im Folgenden vergleichenden Analysen unterzogen werden. In Tabelle 1 sind die Namen der Gene, wobei „*spp*“ für „*Saposin-like protein*“ steht, sowie die Namen der entsprechenden Transkripte aufgeführt. Des Weiteren ist für jedes Gen die entsprechende Chromosomen-Nummer und die Verfügbarkeit von ESTs (*expressed sequence tags*) angegeben. Die Aminosäuresequenzen der Caenopore-kodierten Genprodukte und der darin enthaltenen SAPLIP-Domänen sind in Abschnitt 9.1 dargestellt. Im zweiten Teil von Tabelle 1 sind fünf weitere Gene dargestellt, deren potentiellen Gen-Produkte strukturelle Ähnlichkeit zu den Saposin-ähnlichen Proteinen aufweisen. Sie wurden aber bisher nicht unter dem Gen-Namen *spp* in der *Wormbase*-Datenbank registriert.

Der Großteil der Genprodukte verfügt über ein prognostiziertes Signalpeptid, dass mit dem Programm *SignalP* vorausgesagt wurde (Nielsen und Engelbrecht, 1997). Dieses fehlt allerdings in zwei der Gene, nämlich in *spp-6* und *spp-19*. Für diese zwei Gene konnten des Weiteren keine entsprechenden Transkripte (ESTs) identifiziert werden. Zwei andere Gene, *spp-21* und *spp-22* weisen hingegen ebenfalls keine ESTs, wohl aber ein Signalpeptid auf.

Die meisten der Caenopore-kodierenden Gene von *C. elegans* besitzen orthologe Gene in den Schwesterarten *Caenorhabditis briggsae* und *Caenorhabditis remanei*, die eindeutig anhand ihrer Sequenz den Genen von *C. elegans* zugeordnet werden können. Die Gene dieser Genfamilie sind damit innerhalb der Gattung *Caenorhabditis* konserviert.

Tabelle 1. Liste und schematische Darstellung der bisher identifizierten Caenopores.

Gen-Name	Chr. Nr.	Transkript-Name	ESTs	Protein-Name
<i>spp-1</i>	III	T07C4.4	+	Caenopore 1
<i>spp-2</i>	X	T08A9.12	+	Caenopore 2
<i>spp-3</i>	X	T08A9.7	+	Caenopore 3
<i>spp-4</i>	X	T08A9.8	+	Caenopore 4
<i>spp-5</i>	X	T08A9.9	+	Caenopore 5
<i>spp-6</i>	X	T08A9.10	-	Caenopore 6
<i>spp-7</i>	IV	ZK616.9	+	Caenopore 7
<i>spp-8</i>	IV	C28C12.5	+	Caenopore 8
<i>spp-9</i>	X	T25C12.2	+	Caenopore 9
<i>spp-10</i>	IV	C28C12.7	+	Caenopore 10
<i>spp-11</i>	II	T25D10.3	+	Caenopore 11
<i>spp-12</i>	V	T22G5.7	+	Caenopore 12
<i>spp-13</i>	X	F08F1.6	+	Caenopore 13
<i>spp-14</i>	X	K09F5.3	+	Caenopore 14
<i>spp-15</i>	I	C48E7.10	+	Caenopore 15
<i>spp-16</i>	I	F32D8.9	+	Caenopore 16
<i>spp-17</i>	I	C54G6.5	+	Caenopore 17
<i>spp-18</i>	IV	F27C8.4	+	Caenopore 18
<i>spp-19</i>	V	K04A8.9	-	Caenopore 19
<i>spp-20</i>	V	K04A8.8	+	Caenopore 20
<i>spp-21</i>	X	T25C12.4	-	Caenopore 21
<i>spp-22</i>	X	ZK867.3	-	Caenopore 22
<i>spp-23</i>	I	Y34D9A.11	+	Caenopore 23

Potentielle Mitglieder der Caenopore-Genfamilie

Chr. Nr.	Gen-Name	ESTs
I	Y37F4.3	+
V	Y116F11A.3	+
I	F30A10.11	-
I	K02A11.4	-
II	F23F1.7	+

2.1.1 Lokalisation der Caenopore-kodierenden Gene auf den Chromosomen von *C. elegans*

Alle Gene der Genfamilie, mit der Ausnahme von *spp-23*, besitzen Introns variabler Länge. Die Lokalisation der Gene erstreckt sich über alle sechs Chromosomen von *C. elegans*. Einige der Gene liegen in Gruppen, sog. *clustern*, auf dem entsprechenden Chromosom, andere vereinzelt. Auf Chromosom X wurde z. B. ein solches *cluster* identifiziert (Abb. 14). In seiner Mitte sind 10 der 23 Gene der Genfamilie innerhalb eines eng begrenzten Bereiches lokalisiert. Fünf diese Gene liegen, nur durch relativ kurze, nicht-kodierende Bereiche getrennt, direkt hintereinander. Interessant ist, dass sich die Orientierung der Caenopores auch innerhalb dieser *cluster* unterscheiden kann, wie man am Beispiel der Gene *spp-2*, *-3*, *-4*, *-5* und *-6* sieht, wobei *spp-6* eine andere Orientierung besitzt als die anderen vier Gene (Abb. 14).

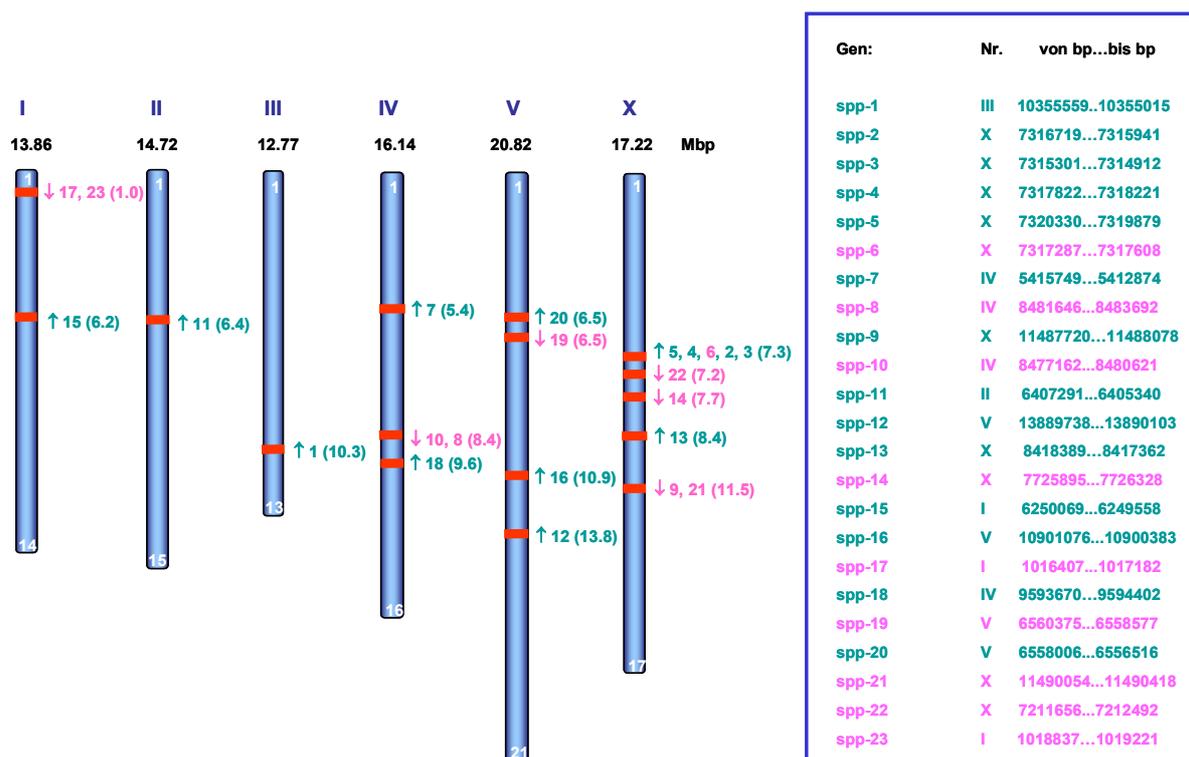


Abb. 14: Lokalisation der Gene *spp-1* bis *spp-23* im Genom von *C. elegans*. Schematische Darstellung der sechs Chromosomen von *C. elegans*. Die Größe der Chromosomen wurde in Megabasenpaaren (Mbp) angegeben. Die ungefähre Lokalisation sowie Orientierung der 23 Caenopore-kodierenden Gene auf den Chromosomen wurde markiert. Gene in Genclustern wurden durch Kommata getrennt. Die Liste auf der rechten Seite gibt die Nummer des Chromosoms sowie die Lokalisation des entsprechenden Gens auf dem Chromosom an. Die Lokalisation wird dabei in Basenpaaren (bp) angegeben. Die rosafarbene bzw. grüne Färbung gibt Aufschluss über die jeweilige Orientierung des Gens.

Mit *spp-9* und *spp-21* liegt ein weiteres Gen-Paar nur etwa zwei Kilobasenpaare (kbp) voneinander entfernt auf Chromosom X, während *spp-23* und *spp-17* in einem vergleichbaren Abstand auf Chromosom I lokalisiert sind. Auf Chromosom IV folgt das Gen *spp-19* auf *spp-20*, wobei die beiden Gene durch einen nicht-kodierenden Bereich getrennt sind, der weniger als ein kbp beträgt. Die Gene *spp-7*, *spp-8* und *spp-10*, die für diejenigen Caenopores kodieren, die mehr als eine SAPLIP-Domäne besitzen, sind ebenfalls auf einem Chromosom, nämlich auf Chromosom IV lokalisiert. Während sich die Caenopore-kodierenden Gene auf einigen Chromosomen häufen, tragen andere, wie z. B. Chromosom II und III, je nur eines der Gene, nämlich *spp-1* bzw. *spp-11*.

2.1.2 Charakterisierung der potentiellen Caenopore-Peptide

Die Caenopores bilden eine Gruppe vermutlich löslicher, amphipatischer Peptide, deren Sekundärstruktur rein α -helical ist. Der Großteil der primären Translationsprodukte der Caenopore-kodierenden Gene besitzt augenscheinlich große strukturelle Ähnlichkeit zu anderen bekannten SAPLIPs wie z. B. den Amoebapores oder dem NK-lysin. Sie bestehen aus einem prognostizierten N-terminalen Signalpeptid mit einer Länge von meist zwanzig Aminosäureresten und einer SAPLIP-Domäne (Abb. 15 und 16). Sechs konservierte Cysteinreste ermöglichen die Ausbildung von drei Disulfidbrücken (Abb. 15). Im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Caenopores verfügen drei der primären Translationsprodukte, Caenopore 7, 8 und 10, über mehrere solcher Domänen (Abb. 16). Es ist also nicht ausgeschlossen, dass es sich bei diesen drei Caenopores um Pro-Peptide handelt, deren einzelne SAPLIP-Domänen, wie im Fall der Naegleriapores, posttranslational voneinander getrennt werden (Herbst *et al.*, 2002). In diesem Fall würde sich die Zahl der potentiell antimikrobiell aktiven SAPLIPs in *C. elegans* auf 29 erhöhen. Rechnet man die fünf zusätzlich identifizierten Gene (Tab. 1) hinzu, käme man auf eine Anzahl von 34 potentiellen SAPLIPs.

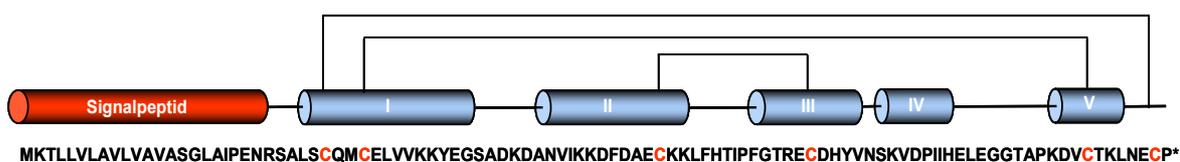


Abb. 15: Schematische Darstellung der Primär- und Sekundärstruktur der Caenopore-Peptide am Beispiel von Caenopore 5. Die Sekundärstruktur der Caenopores besteht aus fünf α -Helices (I-V) (blau). N-terminal dieser Domäne liegt ein prognostiziertes Signalpeptid (rot). Die Sequenz der Primärstruktur von Caenopore 5 wurde in Anlehnung an die Sekundärstruktur dargestellt. Unterstrichene Bereiche markieren die α -Helices bzw. das Signalpeptid. Die konservierten Cysteinreste wurden in rot hervorgehoben; sie bilden drei Disulfidbrücken aus.

Drei weitere Mitglieder der Peptidfamilie, Caenopore 11, 20 und 22 weisen ebenfalls einen abweichenden Aufbau auf. Sie besitzen wie viele andere Caenopores eine SAPLIP-Domäne, die aber nicht direkt N-terminal des Signalpeptids liegt, sondern durch einen Abschnitt, dessen Länge zwischen den Peptiden variiert, von diesem getrennt ist (Abb. 16). Die Funktion dieser Protein-Abschnitte ist bisher unbekannt, jedoch weisen sie teilweise, basierend auf ihrer Primärstruktur, eine Homologie zu verschiedenen Proteinen auf. Durch vergleichende Sequenzanalysen, die mit dem Programm BLAST (Altschul *et al.*, 1990) durchgeführt wurden, wurde z. B. ermittelt, dass der entsprechende Abschnitt in Caenopore 11, der aus 291 Aminosäureresten besteht, aufgrund seiner prolinreichen Primärstruktur, Ähnlichkeit zum Periaxin, einem proteinbindenden Protein verschiedener Wirbeltiere, aufweist. Caenopore 20 dagegen könnte ursprünglich eines der Caenopores gewesen sein, welches über zwei SAPLIP-Domänen verfügte, da zusätzlich zur vollständigen SAPLIP-Domäne C-terminal ein Proteinabschnitt liegt, dessen Sequenz die ersten vier der typischen sechs konservierten Cysteinreste aufweist. Die threoninreiche Aminosäure-Sequenz der Region von Caenopore 7, die zwischen den beiden SAPLIP-Domänen liegt, zeigt keine Homologie zu anderen Proteinen, ist aber innerhalb der Gattung *Caenorhabditis* konserviert, da ein Ortholog zu diesem Gen in *C. briggsae* existiert.

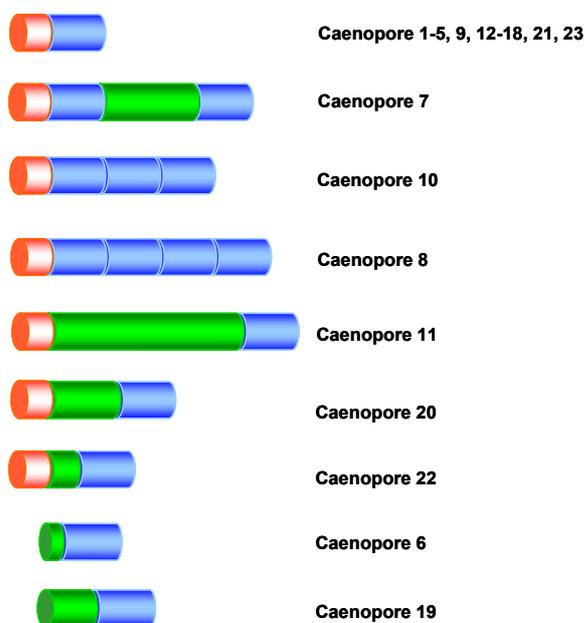


Abb. 16: Schematische Darstellung der unterschiedlichen Strukturen der Caenopores. C-terminal des Signalpeptides (rot) liegt eine SAPLIP-Domäne (blau). Einige Mitglieder der Caenopore-Peptidfamilie besitzen mehr als eine SAPLIP-Domäne (Caenopore 7, 8 und 19). Andere Caenopores, Caenopore 11, 20 und 22 besitzen längere oder kürzere Abschnitte, deren Funktion unbekannt ist (grün). Zwei der Caenopores, Caenopore 6 und 19 weisen kein N-terminales Signalpeptid auf.

Abbildung 17 zeigt einen Sequenzvergleich (*sequence alignment*) der Caenopore-Aminosäuresequenzen, der mit dem Programm *ClustalW* generiert wurde (Thompson et al., 1994). Der Sequenzvergleich beschränkt sich auf die SAPLIP-Domänen und wird durch die zwei äußersten der sechs konservierten Cysteinreste begrenzt. Die SAPLIP-Domänen der Caenopores, die mehr als eine Domäne aufweisen, wurden als eigenständige Domänen in das *sequence alignment* miteinbezogen und alphabetisch sortiert. Einzelne Mitglieder der Caenopore-Peptid-Familie weisen Bereiche mit hydrophoben Aminosäureresten auf. So besitzt z. B. Caenopore 1 in seinem mittleren Abschnitt mehrere dieser hydrophoben Aminosäurereste, welche zur Ausbildung einer kurzen hydrophoben Region führen (Abb. 17). Des Weiteren verfügen alle Caenopores sowohl über Aminosäurereste positiver als auch negativer Ladung, wobei die meisten ein annähernd ausgeglichenes Verhältnis zwischen kationischen und anionischen Seitenketten aufweisen. In Abschnitt 2.7.8 wird auf die Eigenschaften der Primärstruktur und eine mögliche Bedeutung für die Aktivität der Peptide näher eingegangen.



Abb. 17: Sequenzvergleich der Caenopores mit anderen Saposin-ähnlichen Proteinen. Die Darstellung beschränkt sich auf die SAPLIP-Domänen, die durch zwei der sechs konservierten Cysteinreste flankiert werden. Bei Proteinen mit mehreren SAPLIP-Domänen wurden diese getrennt dargestellt und alphabetisch sortiert. Die sechs konservierten Cysteinreste wurden schwarz unterlegt. Anionische Aminosäurereste wurden in rot, kationische Aminosäurereste in blau und hydrophobe Aminosäurereste in grün dargestellt. AmoebaporeA-C: *E. histolytica*, NK-lysin-1 und -2: *Sus scrofa*, Granulysin und Saposin A-D: *Homo sapiens*.

Die SAPLIP-Domänen der Caenopores, welche in Abbildung 17 im Sequenzvergleich dargestellt wurden, bilden auch die Grundlage für den in Abbildung 18 erstellten Stammbaum, welcher die Peptide anhand ihrer Sequenzidentität in ein Verhältnis zueinander stellt. Der Stammbaum wurde nach dem *Neighbor-Joining* Verfahren mit dem Programm Mega 3.1 generiert (Kumar *et al.*, 2004). Augenfällig sind die engen Verbindungen von Caenopores, deren Gene, wie z. B. *spp-2*, -3, -4, -5 und -6, in *clustern* vorliegen. Die Lage der entsprechenden Gene im Genom spiegelt sich also bis zu einem gewissen Grad in ähnlichen Primärstrukturen wider.

Zwei der Gene, deren Genprodukte im Stammbaum in engem Kontakt stehen, sind allerdings getrennt voneinander auf verschiedenen Chromosomen von *C. elegans* lokalisiert. *Spp-1* liegt als einziges der Gene auf Chromosom III, während *spp-12* zusammen mit drei anderen Genen auf Chromosom V lokalisiert ist.

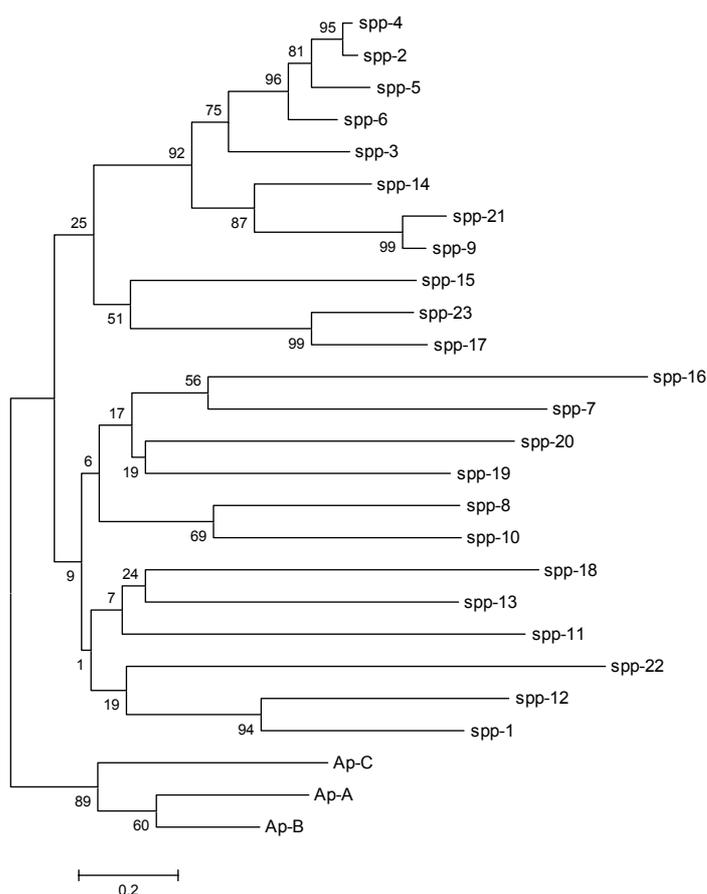


Abb. 18: Phylogenetische Analyse der Caenopore-Peptide. Der Stammbaum basiert auf der Primärstruktur der SAPLIP-Domänen. Als Außengruppe wurden die Peptide Amoebapore A, B und C eingesetzt. Programm: Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004).

2.1.3 Promotoranalyse der Caenopore-Genfamilie

Um einen Einblick in die Regulation der Caenopore-kodierenden Gene zu erhalten, wurden vergleichende *In-silico*-Analysen der Promotor-Regionen mit den Programmen *ConSite* (Sandelin *et al.*, 2004) und *VISTA* (Frazer *et al.*, 2004) durchgeführt, die auf frei zugänglichen Internet-Plattformen zur Verfügung stehen. In diesem Ansatz wurden die Promotor-Regionen hinsichtlich ihrer Konservierung analysiert. Des Weiteren wurde nach konservierten *cis*-regulatorischen Elementen gesucht, die Aufschluss über beteiligte Transkriptionsfaktoren geben könnten.

Die dahingehende Analyse ergab eine überraschend große Heterogenität der regulatorischen Bereiche. Ähnliche bzw. konservierte Bereiche fanden sich nur in den Promotoren der Gene *spp-17* und *-23* sowie *spp-19* und *-21* (Abb. 19), während die Promotor-Sequenzen anderer Gen-cluster, wie z. B. *spp-2* bis *-6* oder *spp-8* und *-10*, keine Ähnlichkeit aufwiesen.

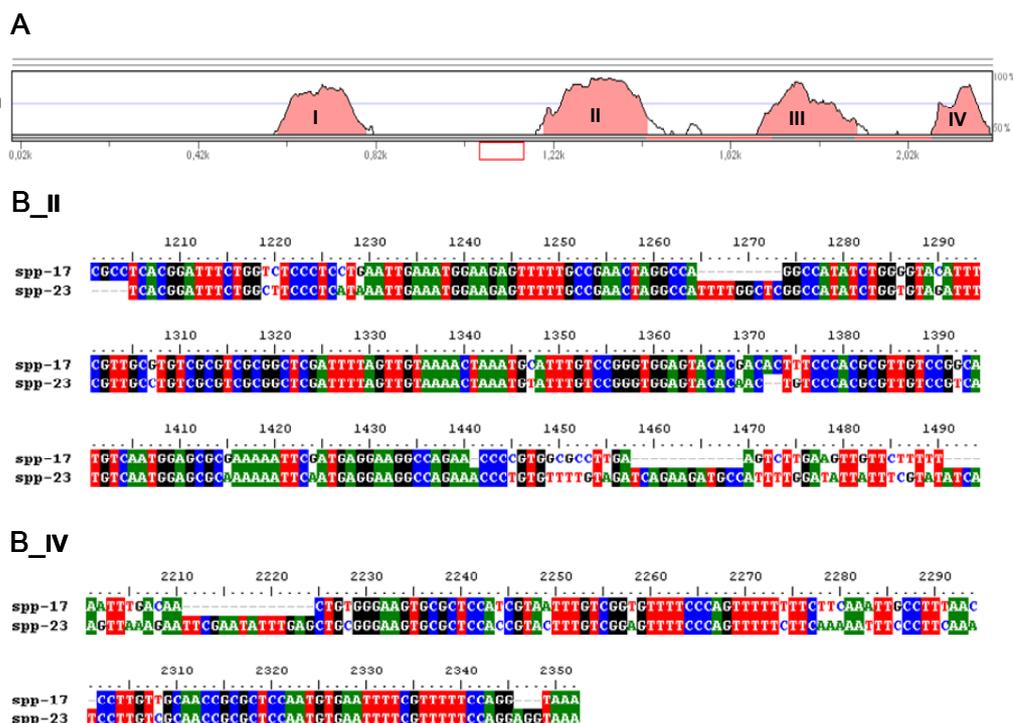


Abb. 19: Konservierte Bereiche in den Promotorsequenzen von *spp-17* und *spp-23*. (A) konservierte Bereiche auf den Promotorregionen der Gene *spp-19* und *spp-21*. Die Sequenz-Übereinstimmung liegt verglichen zu Kontroll-Sequenzen bei über 50 %. (B) Sequenz-Vergleich der konservierten Bereiche II und IV aus Abbildung 19 A. Die Analyse wurde mit dem Programm Vista durchgeführt (<http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml>).

Die Suche nach konservierten *cis*-regulatorischen Elementen, die mit dem Programm *ConSite* durchgeführt wurde ergab keine Ähnlichkeiten zu *C. elegans*-spezifischen Transkriptionsfaktorbindungsstellen. Daher wurde die Suche nach solchen Sequenzen manuell fortgeführt. Da bekannt ist, dass Transkriptionsfaktoren existieren, die die Aktivierung darmspezifischer oder im Darmepithel angereicherter Gene steuern (McGhee *et al.*, 2007), wurde nach der kurzen Nukleotidsequenz TGATAA gesucht, die spezifisch für den darmspezifischen Transkriptionsfaktor ELT-2 ist. Diese Transkriptionsfaktorbindungsstelle konnte im überwiegenden Teil der Caenopore-kodierenden Gene nachgewiesen werden, wobei bei vier der Gene (*spp-2*, *-12*, *-16* und *-19*) eine entsprechende ELT-2-Bindungsstelle fehlte.

Auch die Promotoren der Gene *spp-1* und *spp-12* weisen keine Ähnlichkeit zueinander auf, obwohl die Transkription beider Gene durch die Bindung des Transkriptionsfaktors DAF-16 aktiviert wird (Murphy *et al.*, 2003). Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Promotoranalyse der Gene *spp-3* und *spp-18*, deren Expression durch den Kontakt zum pathogenen Bakterium *P. aeruginosa* positiv reguliert wird (Kurz und Tan, 2004).

Trotz der fehlenden Übereinstimmungen in der Promotor-Nukleotidsequenz kann nicht ausgeschlossen werden, dass kurze konservierte Abschnitte existieren, die über die angewandten Methoden nicht identifiziert werden konnten.

2.2 Charakterisierung ausgewählter Mitglieder der Caenopore-Peptidfamilie

Die weiterführende Analyse und Charakterisierung der Caenopores beschränkte sich, teilweise ausgehend von den Ergebnissen der Vorversuche (Abschnitt 1.8), auf drei Vertreter der Peptidfamilie. Es handelte sich dabei um Caenopore 5, 1 und 12. Letztere zwei wurden dabei aus folgenden Gründen ausgewählt. Einerseits weisen sie hinsichtlich ihrer Primärstruktur große Ähnlichkeit zu den antimikrobiell und cytolytisch aktiven NK-lysin-Isoformen des Schweins auf (Abb. 13), andererseits werden sie, wie bereits erwähnt, durch den Transkriptionsfaktor DAF-16 aktiviert, der sowohl in der Langlebigkeit als auch in der Resistenz gegenüber Pathogenen eine wichtige Rolle in *C. elegans* spielt (Murphy *et al.*, 2003).

Die Auswahl von Caenopore 5 basierte auf den Ergebnissen von RNA-Interferenz-Versuchen, in denen die Expression des Gens transient stillgelegt wurde. Die Ergebnisse dieser RNA-Interferenz-Versuche wiesen auf eine wichtige Rolle von Caenopore 5 bei der Ernährung und in der Immunantwort von *C. elegans* hin (Abschnitt 1.8).

2.3 RNA-Interferenz-Versuche mit ausgesuchten Vertretern der Caenopore-Peptidfamilie

Im Anschluss an die Ergebnisse der bereits in Abschnitt 1.8 aufgeführten RNAi-Experimente, in denen die Expression der Gene *spp-1*, *-2*, *-4*, *-5* und *-6* zeitweise unterbunden wurde und in denen allein die Tiere, denen das Gen *spp-5* fehlte einen starken Phänotyp aufwiesen, wurden die Experimente wiederholt. Dabei wurde zusätzlich die Expression von *spp-12* transient stillgelegt. Dafür wurde der pSport I-Vektor eingesetzt, der über zwei einander gegenläufige T7-Promotoren verfügt. Zwischen diese Promotoren wurde die kodierende Sequenz von *spp-12* ligiert (Abb. 20). Durch die Aktivierung der T7-Promotoren wurde die Transkription von *spp-12* gestartet, durch die zwei einzelsträngige RNA-Transkripte entstanden, die einander komplementär waren. Die Hybridisierung dieser beiden RNA-Stränge ergibt ein doppelsträngiges RNA-Fragment (dsRNA), dessen Sequenz identisch zur kodierenden Sequenz von *spp-12* ist. Diese dsRNA, die in *E. coli* synthetisiert und von *C. elegans* mitsamt der Bakterien aufgenommen wird, bewirkt in *C. elegans* die transiente Stilllegung von *spp-12*.

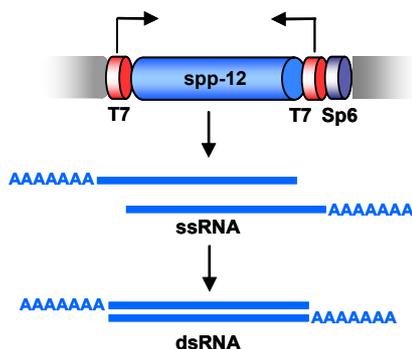


Abb. 20: Schematische Darstellung des pSport I-Vektors zur transienten Stilllegung von *spp-12*. Kodierende Sequenz des *spp-12* Gens (blau), T7-Promotorsequenzen (rot), (ssRNA) einzelsträngige RNA, (dsRNA) doppelsträngige RNA

In diesem Ansatz diente, wie im vorhergehenden Ansatz auch, die kodierende Sequenz des *gfp*-Gens als Negativkontrolle. Zusätzlich wurde eine Positivkontrolle eingeführt, die aus einem Gen bestand, das für eine Thymidilat-Synthase von *C. elegans* kodiert (Y110A7A.4) (Sonnichsen *et al.*, 2005). Durch die Interferenz dieses Gens wurde die Entwicklung der embryonalen Zellen stark negativ beeinflusst.

Wie schon bei *spp-1*, *spp-2*, *spp-4* und *spp-6* beobachtet, zeigte auch die Stilllegung von *spp-12* unter den gewählten Bedingungen keinen Effekt auf den Phänotyp von *C. elegans*.

2.4 Expressions-Analyse ausgewählter Caenopores

Da im Hinblick auf die Ergebnisse der RNA-Interferenz-Experimente Hinweise auf die biologische Signifikanz von Caenopore 5 vorlagen und auch die induzierbare Expression von Caenopore 1 und 12 auf eine wichtige *In-vivo*-Funktion in *C. elegans* hinwies, wurde die Expression der entsprechenden Gene analysiert.

Für den Nachweis der Transkription wurden spezifische Oligonukleotide eingesetzt, die spezifisch den Teil des Transkripts abdeckten, der für die SAPLIP-Domäne kodierte (Abschnitt 9.3). Die erwartete Größe der amplifizierten Fragmente entsprach bei *spp-1* 288 Basenpaaren (bp), bei *spp-5* 266 bp und bei *spp-12* 255 bp.

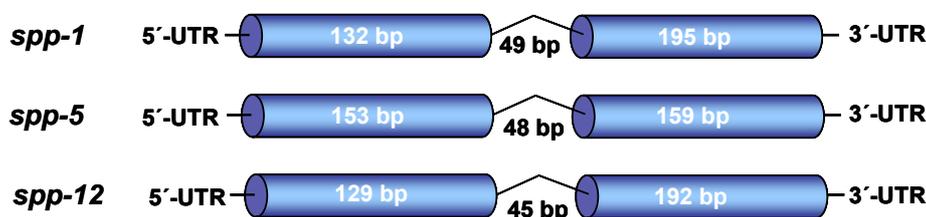


Abb. 21: Schematische Darstellung der Gen-Struktur von *spp-1*, *-5* und *-12*. Die drei Gene *spp-1*, *spp-5* und *spp-12* weisen jeweils zwei Exons (blau) und ein dazwischen liegendes Intron auf.

2.4.1 Regulation der Transkription in verschiedenen Entwicklungsstadien von *C. elegans*

Immer wieder wurde beobachtet, dass *C. elegans*-Larven eine höhere Resistenz gegenüber pathogenen Bakterien aufweisen als ältere Tiere (Kurz *et al.*, 2003; Kurz und Tan, 2004; Laws *et al.*, 2004). Ob sich dieser Effekt, wie häufig angenommen, auf die altersabhängige Abnutzung des *grinders* zurückführen lässt (Albertson und Thomson, 1976; Labrousse *et al.*, 2000) oder ob eventuell eine erhöhte Syntheserate von antimikrobiellen Peptiden eine Erklärung bieten könnte, ist unklar.

Um die Transkriptionsrate der ausgewählten Gene während der Ontogenese von *C. elegans* zu analysieren, wurde die RNA aus Tieren unterschiedlicher Entwicklungsstadien isoliert. Dafür wurden jeweils einige hundert Embryonen bzw. *C. elegans*-Eier, Larven unterschiedlicher Stadien und adulte Hermaphroditen eingesetzt. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Matrize eingesetzt, um, unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotide, die gewünschten Transkripte zu amplifizieren. Die Äquilibration der cDNA-Ansätze wurde durch den Einsatz spezifischer Oligonukleotide für das ribosomale Gen *rpl-29* überprüft, so dass eine Quantifizierung der Transkriptionsrate der Gene möglich war. Um eine

Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde eine PCR durchgeführt, in der parallel zur cDNA auch die isolierte RNA eingesetzt wurde. In diesem Ansatz war die Amplifikation des *rpl-29* sowie der Caenopore-kodierenden Gene nicht möglich.

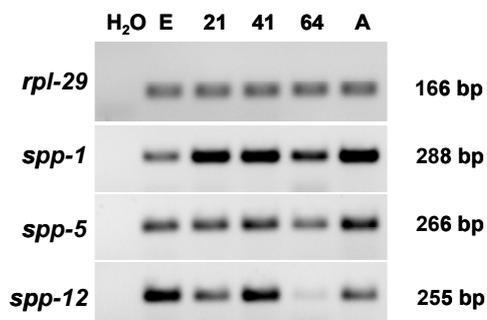


Abb. 22: Transkriptionsrate der Caenopores in verschiedenen Larvenstadien von *C. elegans*. Die Äquilibrierungskontrolle der cDNA-Ansätze wurde über das ribosomale Gen *rpl-29* durchgeführt. E: Embryonen (Eier nach Synchronisation einer *C. elegans*-Kultur), 21, 41, 64: Larven 21, 41 bzw. 64 Stunden nach dem Synchronisieren der Kultur, A: adulte Hermaphroditen. H₂O: Wasserkontrolle. Die Fluoreszenz des an die DNA gebundenen Ethidiumbromid wurde für die Abbildung invertiert dargestellt.

Die Transkription der Gene *spp-1*, -5 und -12 konnte in allen getesteten Entwicklungsstadien, sowohl in Embryonen, in verschiedene Larvenstadien sowie in adulten Hermaphroditen, nachgewiesen werden, wobei die Höhe der Banden mit der erwarteten Größe der Transkripte übereinstimmte.

Die im Ansatz enthaltene Transkriptmenge von *spp-1* war gegenüber *spp-5* erhöht. Interessanterweise war die Anzahl der Transkripte beider Gene in den verschiedenen Stadien sehr ähnlich, während die Verteilung von *spp-12* leicht davon abwich. So war *spp-12* in frühen Entwicklungsstadien stärker exprimiert als in adulten Tieren, während die adulten Tiere im Fall von *spp-1* und *spp-5* eine vergleichsweise höhere Transkriptmenge aufwiesen.

Auffällig war ebenso, dass die Anzahl der Transkripte in den Larven, deren RNA 64 Stunden nach der Synchronisation isoliert wurde, insgesamt geringer ausfiel als in den 41-Stunden-Larvenstadien bzw. in den adulten Tieren. Dieser Effekt war reproduzierbar und besonders deutlich bei *spp-12* auszumachen.

2.4.2 Lokalisation der *spp-5*-Expression in *C. elegans* mittels eines *spp-5::gfp*-Reportergenkonstruktes

Um die Lokalisation der Genexpression zu analysieren, wurden transgene Tiere eingesetzt, die ein *spp-5::gfp*-Fusionskonstrukt trugen. Dafür wurde die Promotor-Region von *spp-5* der kodierenden Sequenz des *gfp*-Gens vorgeschaltet (Abb. 23). Die Wahl des entsprechenden Vektors (pPD95.77) ermöglichte, durch die Fluoreszenz des GFP, die Visualisierung von Caenopore 5 am Ort seiner Expression.



Abb. 23: Schematische Darstellung des *spp-5::gfp*-Fusionskonstruktes. Vektor: pPD95.77, Promotor-Sequenz von *spp-5* (blau), GFP-kodierende Sequenz (grün). *Pst*-1/ *Xba*-1 Restriktionsendonukleasen.

Diese transgenen Tiere wurden unabhängig voneinander von Dr. T. Roeder (jetzt Prof. am Zool. Institut, CAU Kiel) und von Kunitomo *et al.* am *Molecular Genetics Research Laboratory, University of Tokyo* generiert (Kunitomo *et al.*, 2005). Einige Exemplare dieses zuletzt genannten *C. elegans*-Stammes wurden von Yuichi Iino für die Analyse der *spp-5*-Expression zur Verfügung gestellt.

Die Expression von *spp-5* sowie die Synthese von Caenopore 5 findet, wie in Abbildung 24 dargestellt, in den Epithelzellen des Darms statt, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass in anderen Zellen oder Geweben ebenfalls eine gering ausgeprägte Genexpression besteht. Eine Steigerung der Expressionsrate in einem bestimmten - anterioren oder posterioren - Bereich des Darms war nicht zu beobachten, da sich die Expression gleichmäßig über die gesamte Länge des Darmepithels erstreckte.

Der gedrungene Phänotyp der Tiere ist darauf zurückzuführen, dass diese zusätzlich zum *spp-5::gfp*-Fusionskonstrukt ein Plasmid trugen, welches zur Ausprägung des sogenannten *dumpy*-Phänotyps führte.

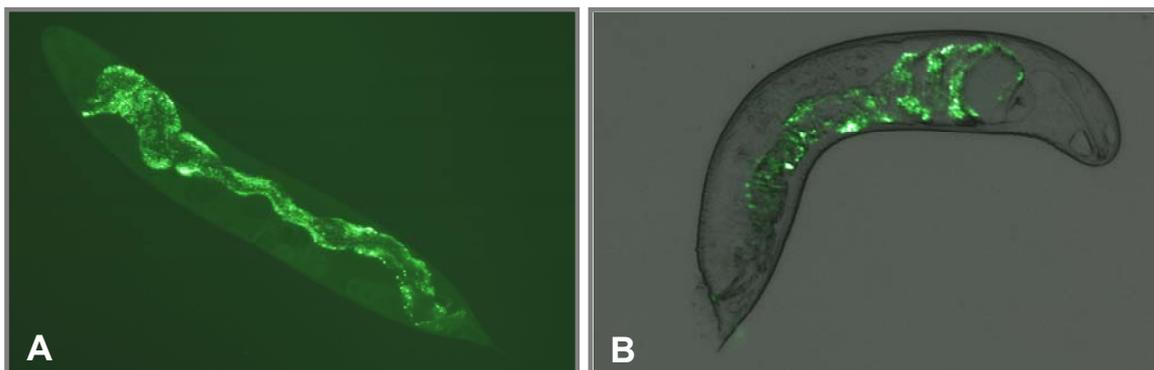


Abb. 24: Lokalisation der Expression von *spp-5*. Der Expressionsort von *spp-5* wird durch die Fluoreszenz von GFP visualisiert. (A) adulter *C. elegans*-Hermaphrodit (B) *C. elegans* Männchen. Die transgenen Tiere tragen ein Fusionskonstrukt, welches aus der *spp-5* Promotorregion und der vollständigen kodierenden Sequenz des *gfp*-Gens besteht (*spp-5::gfp*). Die Tiere wurden freundlicherweise von Yuichi Iino zur Verfügung gestellt (Kunitomo *et al.*, 2005). Die Tiere dieser Linie tragen zusätzlich zum *spp-5::gfp*-Fusionskonstrukt ein Plasmid mit einem Selektionsmarker, der den Phänotyp „dumpy“ vermittelt. Die Fotos wurden an einem Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt (Fotos: M. Stanisak).

2.4.3 Nachweis der Transkription von *spp-1*, *-5* und *-12* über die Isolierung darmspezifischer RNA

Des Weiteren sollte auch die Lokalisation der Genexpression von *spp-1* und *spp-12* analysiert werden, um sie mit dem Expressionsmuster von *spp-5* zu vergleichen. Für den Nachweis der Genexpression in spezifischen Geweben bzw. im Darmepithel von *C. elegans* war die Isolierung gewebe- bzw. darmspezifischer RNA erforderlich. Es bestehen grundsätzlich mehrere Möglichkeiten der Gewinnung darmspezifischer Zellen und damit ihrer RNA, wobei die Isolierung dieser Zellen aus *C. elegans* sich aufgrund der geringen Körpergröße der Tiere als schwierig erweist. Einige Methoden sollten im Folgenden kurz erwähnt werden.

Die manuelle Isolierung des Darmes aus adulten Tieren wurde von McGhee beschrieben (McGhee *et al.*, 2007). Dafür wurden Kopf und Schwanz der Tiere entfernt und der Darm, heraus präpariert, nachdem die Tiere durch eine von Hallick beschriebene Methode vorbehandelt wurden (Hallick *et al.*, 1977). Eine Alternative zur Präparation des *C. elegans*-Darms eröffnet die Methode des sog. „*mRNA-Tagging*“ (Roy *et al.*, 2002), mit deren Hilfe darmspezifische mRNA aus adulten Tieren isoliert werden kann. Über diese Methode können auch Gene identifiziert werden, deren Expression z. B. in den Muskelzellen oder in den Neuronen lokalisiert ist (Roy *et al.*, 2002; Kunitomo *et al.*, 2005; Pauli *et al.*, 2005). Die Methode basiert auf der Verwendung transgener *C. elegans*-Linien, die zellspezifisch epitop-markierte mRNA-bindende Proteine (PAB-1) synthetisieren. Die mRNA-PAB-1-Komplexe können über eine Co-Immunopräzipitation mit einem

monoklonalen Antikörper, der gegen das Epitop gerichtet ist, isoliert werden. Im Anschluss steht die so isolierte gewebe- oder zellspezifische mRNA für *Microarray*-Analysen zur Verfügung.

Um einzelne Darmzellen aus *C. elegans* zu isolieren, wurden diese, im Zuge dieser Arbeit, in einer primären, embryonalen Zellkultur kultiviert und mittels Durchflusscytometrie (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) isoliert (Christensen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002). Die Vorteile der Methode bestehen darin, dass vollständig erhaltene Zellen gewonnen werden, wobei eine Kontamination mit anderen Zellen von *C. elegans* stark reduziert werden kann. Des Weiteren ist es möglich, eine hohe Anzahl dieser Darmzellen zu erhalten und die Qualität der RNA wird nicht durch langwierige Reinigungsmethoden beeinträchtigt. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die RNA aus Zellen einer Zellkultur und nicht aus intakten Tieren stammt. Eine Voraussetzung für die Durchführung dieser Methode ist der Einsatz von *C. elegans*-Stämmen, die eine darmzellspezifische *gfp*-Expression aufweisen. Ein solcher Stamm ist z. B. der Stamm JR1838 wls84 (Estevez *et al.* 2003; Clucas *et al.* 2002), dessen Phänotyp in Abbildung 25 dargestellt ist. Der Vorteil dieser Tiere besteht darin, dass die Expression des GFP-kodierenden Gens bereits in embryonalen Zellen aktiviert wird (Abb. 25 B). So weisen bereits die Vorläuferzellen in der primären Zellkultur vor ihrer Differenzierung zu Darmzellen eine ausgeprägte Fluoreszenz auf, die sie an ihre Derivate weitergeben. Damit lässt sich jederzeit der Differenzierungsgrad sowie die Menge der Darmzellen in der Zellkultur kontrollieren.

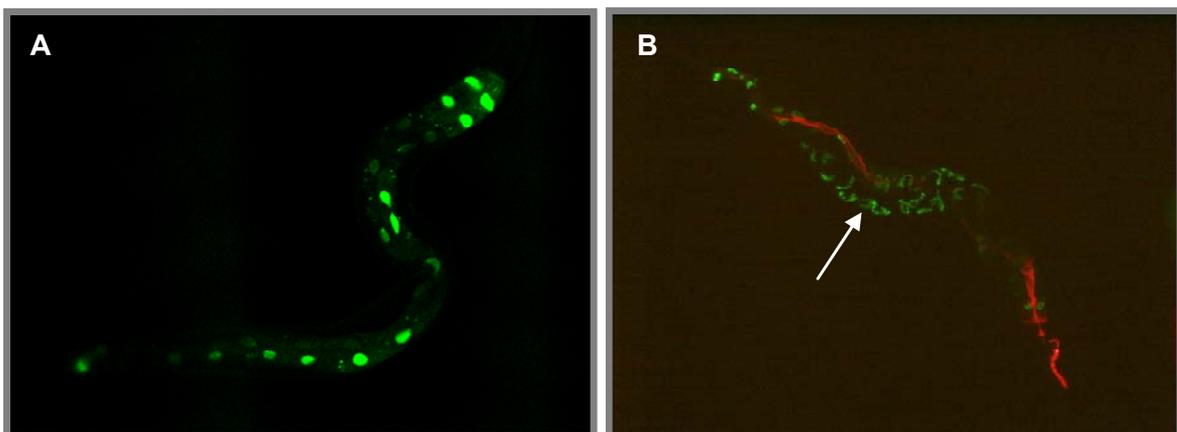


Abb. 25: *gfp*-exprimierende Darmzellen in der *C. elegans* Linie JR1838. (A) *C. elegans* L4-Larve. Die Fluoreszenz des GFP wurde an einem CLSM der Firma Leica aufgenommen (B) Adulter *C. elegans*-Hermaphrodit (Foto: Fluoreszenzmikroskop, Zeiss). Zur Veranschaulichung des Darmverlaufes wurde das adulte Tier mit *dsRed*-exprimierenden *E. coli*-Bakterien gefüttert, deren Fluoreszenz im Darmlumen verfolgt werden konnte. Der Pfeil verweist auf *gfp*-Expression der Embryonen. Die Fluoreszenz wurde in Falschfarben dargestellt: *gfp*-Expression (grün), *dsRed*-Expression (rot). (Fotos: M. Stanisak)

Ein Schema der Durchführung dieser Methode ist in Abb. 26 dargestellt. Die Eier adulter Hermaphroditen des *C. elegans*-Stammes JR1838 wurden entsprechend Abschnitt 7.12.2 isoliert und weiterbearbeitet. Neben den erwarteten GFP-enthaltenden Darmzellen konnte auch die Differenzierung anderer Zelltypen wie z. B. Muskel- oder Nervenzellen beobachtet werden, die nach drei bis vier Tagen der Kultivierung abgeschlossen war (Abb. 26 B, C und D). Die Differenzierung der verschiedenen Zelltypen war an die Adhäsion der Zellen an eine Lektin-beschichtete Glasoberfläche gebunden, da die Differenzierung von Zellen, die nicht adhären waren, ausblieb.

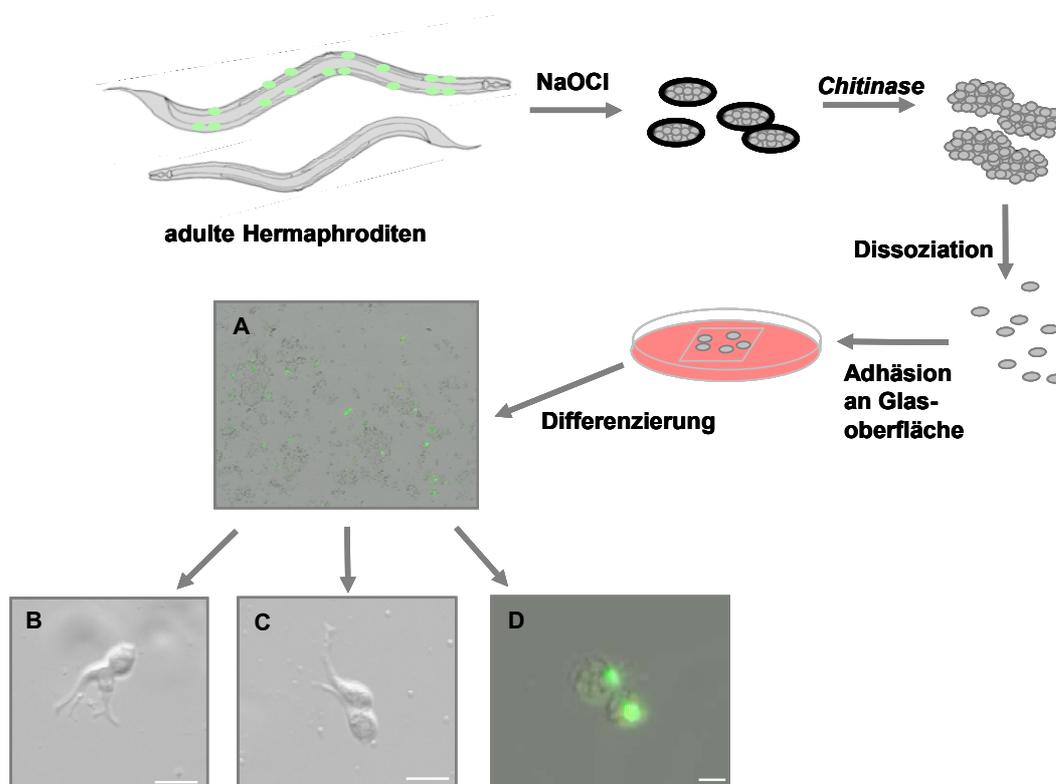


Abb. 26: Schema der primären Zellkultur mit embryonalen Zellen von *C. elegans*. Schematische Darstellung der Generierung einer primären *C. elegans*-Zellkultur. Der Isolierung von Eiern aus adulten Hermaphroditen der *C. elegans* Linie JR1838 folgte die Dissoziation der embryonalen Zellen. Die Differenzierung der Zellen erfolgt im Verlauf von 3-4 Tagen in Nährmedium auf Lektin-beschichteten Glasoberflächen. (A) Zellkultur im Überblick (B) Muskelzelle (C) Nervenzellen (D) gfp-exprimierende Darmzellen. Die Fotos der differenzierten Zellen wurden jeweils nach 4 Tagen der Zell-Kultur aufgenommen. Der Größenstandard entspricht 10 µm. (Fotos: M. Stanisak)

Die embryonalen Zellen wurden in Kulturmedium drei bis vier Tage kultiviert, bevor sie von den beschichteten Glasoberflächen gelöst und mittels Durchflusszytometrie sortiert wurden (Abb. 27 A). Auf diese Weise konnten ca. 45.000 *gfp*-exprimierende Darmzellen und 20.000 „Nicht-Darmzellen“ sortiert und getrennt gesammelt werden. Um die Darmzellen von den anderen *C. elegans*-Zellen zu isolieren, wurde sowohl die starke Fluoreszenz der Darmzellen, die größtenteils auf das enthaltene GFP zurückzuführen war,

als auch die außergewöhnliche Größe der Zellen berücksichtigt. Um die Reinheit der isolierten Zellen zu testen, wurde ein Teil der sortierten Darmzellen (500 Zellen) in einem abermals durchgeführten Analyse-Schritt überprüft (Abb. 27 B).

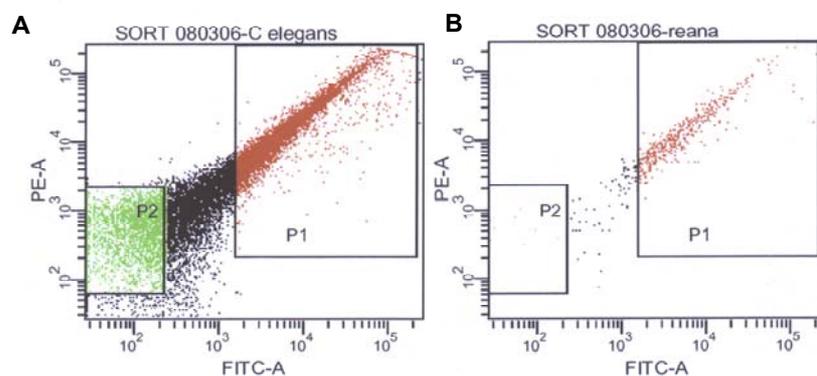


Abb. 27: Ergebnis der FACS-Analyse. Die Zellen wurden sortiert und in zwei Fraktionen gesammelt (A) (P1) *gfp*-exprimierende Darmzellen und (P2) „Nicht-Darmzellen“ (B) Re-Analyse der P1-Fraktion: Überprüfung der Reinheit der isolierten *gfp*-exprimierenden Darmzellen.

Die Zellen beider Fraktionen wurden in TRizol[®] aufgenommen. Nach der Isolierung der RNA aus den *gfp*-exprimierenden Darmzellen sowie aus den „Nicht-Darmzellen“ wurde diese in cDNA umgeschrieben und in einer quantitativen PCR eingesetzt (Abb. 28). Eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA konnte entsprechend Abschnitt 2.4.1 ausgeschlossen werden.

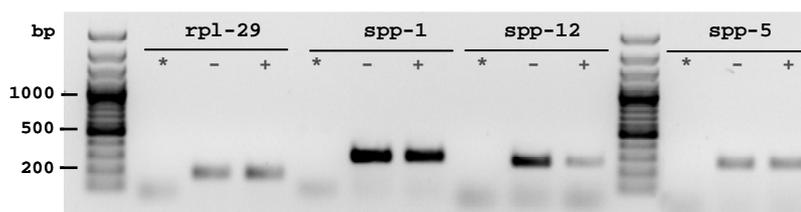


Abb. 28: Transkriptionsanalyse der Caenopore-kodierenden Gene in Darmzellen. Die Analyse wurde mittels quantitativer PCR durchgeführt. Die Abbildung wurde invertiert dargestellt. Die Äquilibration der Ansätze wurde mittels *rpl-29* kontrolliert. (*) Wasserkontrolle (-) RNA aus „Nicht-Darmzellen“ (+) RNA aus *gfp*-exprimierende Darmzellen. DNA-Größenstandard: GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Fermentas).

Nach Äquilibration der beiden Ansätze (*rpl-29*) wurden die Gene *spp-1*, *spp-5* und *spp-12* jeweils durch die Verwendung spezifischer Oligonukleotide amplifiziert. Die Höhe der Banden auf dem Agarose-Gel entsprach der erwarteten Größe der Transkripte.

Mit Hilfe dieser Methode konnte, wie erwartet, die Expression der Caenopore-kodierenden Gene in den Darmzellen nachgewiesen werden. Allerdings war diese nicht ausschließlich

auf die Zellen des Darms beschränkt, sondern konnte ebenso in cDNA nachgewiesen werden, die nicht dem Darm zuzuordnen war. Während die Transkriptionsrate der Gene *spp-1* und *spp-5* in Darmzellen und „Nicht-Darmzellen“ ausgewogen schien, zeigte sich, dass die Transkription von *spp-12* hauptsächlich in den „Nicht-Darmzellen“ lokalisiert war. Die Stärke der Banden und damit wahrscheinlich auch die Transkriptmenge von *spp-1* war ausgeprägter als die von *spp-5*, während sich die Transkription von *spp-12* wiederholt aufgrund der uneinheitlichen Verteilung nicht mit den beiden anderen Genen vergleichen ließ.

2.5 Versuche zur Reinigung natürlicher Caenopores aus *C. elegans*

Die Nukleotid-Sequenz der *spp*-Transkripte gab aufgrund des Stop-Kodons am Ende der Sequenz zwar Aufschluss über den C-Terminus des Proteins, sie bot aber keinen Hinweis auf dessen N-terminales Ende. Um den N-Terminus eines Proteins klar zu definieren, ist es nötig, die Primärstruktur des natürlichen Proteins zu analysieren. Im Hinblick auf die Charakterisierung antimikrobieller Peptide bietet die Reinigung des entsprechenden natürlichen Proteins aus dem jeweiligen Organismus außerdem den Vorteil, dass dessen Aktivität mit der eines rekombinant synthetisierten Peptids gleicher Aminosäuresequenz verglichen werden kann.

Ein Beispiel für die erfolgreiche Isolierung eines antimikrobiellen Peptids ist z. B. das Amoebapore A. Sie ermöglichte die Analyse der Tertiärstruktur (Hecht *et al.*, 2004) sowie der porenbildenden Aktivität des natürlichen Amoebapore A (Leippe *et al.*, 1991). Diese Überlegungen führten zu dem Ansatz, eines der Caenopore-Peptide aus *C. elegans* zu isolieren. Für die Umsetzung wurden verschiedene Ansätze getestet, die alle auf der Extraktion von *C. elegans* in einem sauren Extraktionsmedium basierten. Der Nachweis der Caenopores sollte mit Hilfe von spezifischen Antisera durchgeführt werden.

2.5.1 Gewinnung von Immunsereen gegen Caenopore 1 und 5

Durch den Einsatz hochreiner, rekombinant synthetisierter Caenopore-Peptide in der Immunisierung von Kaninchen wurde für jedes Antigen ein spezifisches Antiserum gewonnen. Die Antisera zu den jeweiligen Caenopore-Antigenen waren, wie sich im Immunoblot zeigte, so spezifisch, dass z. B. das anti-Caenopore 5-Antiserum keine Bindung zu den rekombinant synthetisierten Peptiden Caenopore 1 und 12 einging.

2.5.2 Versuche zur Isolierung natürlicher Caenopore-Peptide aus *C. elegans*

Die Würmer wurden in einer Flüssigmassenkultur kultiviert und anschließend in saurem Extraktionsmedium, das aus hoch konzentrierter Salzsäure, Ameisensäure, Trifluoressigsäure sowie aus Kochsalz bestand, extrahiert. Die Extraktion sowie die anschließende Reinigung der Proteine wurde, wie in Andrä *et al.*, 2003 beschrieben, durchgeführt, indem der saure Proteinextrakt über eine hydrophobe Matrix (SepPak) fraktioniert wurde. Die Proteine wurden in einem Stufengradienten von der Säule eluiert und in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Anschließend wurde ein Immunoblot durchgeführt, in welchem, über Protein-G-gekoppelte *Dynabeads* gereinigte, anti-Caenopore 1- und anti-Caenopore 5-Antiseren eingesetzt wurden.

Wie in Abbildung 29 zu erkennen ist, waren auf dem Immunoblot keine Proteine mit der erwarteten molekularen Masse, die ungefähr zwischen 9 und 11 kDa lag, nachzuweisen. Da die Proteine in den einzelnen Fraktionen vor der Auftrennung mittels Dithiothreitol (DTT) reduziert wurden, konnte auch die Aggregation der Caenopores ausgeschlossen werden.

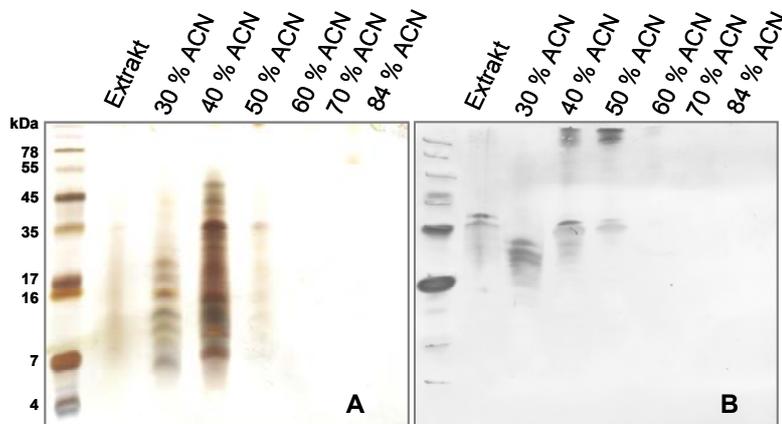


Abb. 29: Fraktionierung von *C. elegans*-Extrakt über eine hydrophobe Matrix (SepPak). (A) *C. elegans*-Extrakt und Proteinfraktionen der SepPak-Säule (30-84 % Acetonitril (ACN)) nach Reduktion mit DTT und Auftrennung mittels SDS-PAGE (Silberfärbung) (B) Immunoblot mit anti-Caenopore-Antiserum. Proteinstandard: SeeBlue Plus2 prestained standard (Invitrogen). Die molekularen Massen sind in kDa angegeben.

In einem zweiten Ansatz wurde die Extraktion von *C. elegans* mit 10 % Essigsäure durchgeführt (Abschnitt 7.2.1). Nach Extraktion und Ultrazentrifugation des Extraktes wurde der Überstand auf eine hydrophobe Matrix (SepPak) gegeben wobei schwach gebundene Proteine mit 20 % Acetonitril (ACN) in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) entfernt wurden, bevor der Großteil der Proteine mit 70 % ACN in 0,1 % TFA eluiert wurde. Der Fraktionierung über die hydrophobe Matrix folgte eine Aktivitätskontrolle der Fraktionen,

die mittels eines Liposomen-Depolarisationstests durchgeführt wurde (Abschnitt 7.10.6). Für diesen Test wurden die Fraktionen gefriergetrocknet und in 0,01 % TFA resuspendiert. Dabei zeigte nur die 70 %-Fraktion nicht aber die 20 %-Fraktion porenbildende Aktivität (Abb. 30).

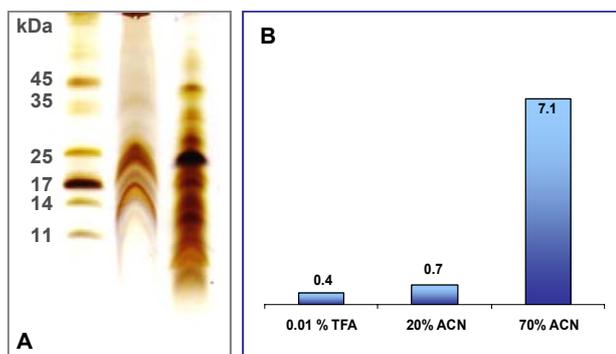


Abb 30: Fraktionen nach Reinigung eines *C. elegans*-Extraktes über eine hydrophobe Matrix (SepPak). (A) Proteinfractionen der SepPak nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Darstellung der Proteine mittels Silberfärbung (links) 20 % ACN (rechts) 70 % ACN. Proteinstandard: #SM0431 protein molecular weight marker (Fermentas). Die molekularen Massen der Eichproteine sind in kDa angegeben (B) Porenbildende Aktivität der SepPak-Fractionen in Units.

Die 70 %-Fraktion der SepPak wurde zur weiteren Fraktionierung auf eine HPLC-Säule gegeben. Die Fraktionen, die im Laufe eines Acetonitril-Gradienten eluiert wurden (Abb. 31), wurden erneut hinsichtlich ihrer porenbildenden Aktivität getestet, wobei die höchste Aktivität in den Fraktionen A14 bis B3 zu verzeichnen war, was einer Acetonitril-Konzentration von ca. 60 % entsprach (Abb. 31).

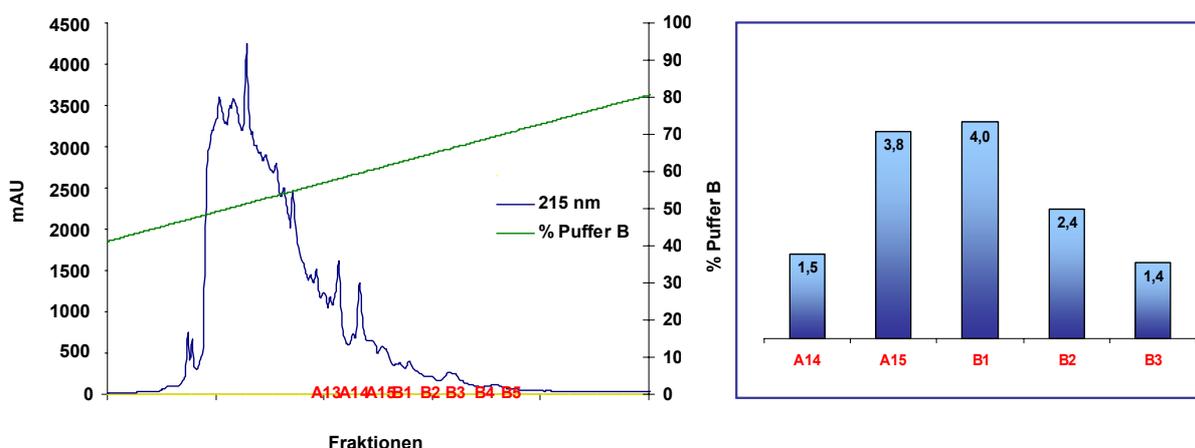


Abb. 31: Chromatogramm der hydrophoben Interaktionschromatographie. Ausgangsmaterial: aktive Fraktion der SepPak. (links) Fraktionierung über hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HPLC). (rot) Fraktionen mit porenbildender Aktivität. Ordinate: mAU bei 215 nm, Abszisse: Fraktionen. HPLC-Säule Bischoff C18, Laufparameter: Gradient: 2 % bis 100 % Puffer B (84 % ACN in 0,1 % TFA), 30 CV, Flussrate: 0,25 ml/min, Fraktionsgröße: 0,5 ml (rechts) Porenbildende Aktivität der einzelnen HPLC-Fractionen in Units.

Die aktiven Fraktionen wurden in einem Immunoblot eingesetzt. Vor der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese reduziert und 10 min bei 95 °C denaturiert. Rekombinant synthetisierte Caenopore-Peptide dienten als Positivkontrollen und wurden jeweils parallel zu den HPLC-Fraktionen elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Anfärbung unspezifischer Banden auf den Immunoblots zu minimieren, wurden die Antiseren vor ihrem Einsatz im Immunoblot mit *E. coli*-Extrakten absorbiert (Abschnitt 7.3.3). Die Membranen, auf welche die Proteine übertragen wurden, wurden daher einerseits mit den unveränderten anti-Caenopore-Antiseren inkubiert und andererseits mit Antiseren, die durch die Absorption mit *E. coli*-Extrakt vorbehandelt wurden. Die so vorbehandelten Antiseren wurden verwendet, da die Caenopore-Antigene, die für die Immunisierung der Kaninchen eingesetzt wurden, rekombinant in *E. coli*-Expressions-Systemen synthetisiert wurden. So konnte trotz der intensiven Reinigung der rekombinanten Peptide eine Verunreinigung mit bakteriellen Proteinen und eine Kontamination der anti-Caenopore-Antiseren mit Antikörpern, die gegen bakterielle Antigene gerichtet waren, nicht ausgeschlossen werden.

Zwischen den Immunoblots, die mit unbehandelten bzw. mit *E. coli*-Extrakt absorbierten Antiseren inkubiert wurden, waren keine Unterschiede zu erkennen und auch im Vergleich zu dem Ansatz, in dem das entsprechende Prä-Immuserum eingesetzt wurde, konnten keine zusätzlichen Proteinbanden der erwarteten molekularen Masse identifiziert werden.

Neben dem Ansatz, eines der natürlichen Caenopores aus *C. elegans* über hydrophobe Interaktionschromatographie zu isolieren, wurde auch die Methode der Ionenaustausch-Chromatographie verwendet. Da der *C. elegans*-Extrakt aber im verwendeten Puffer seine porenbildende Aktivität verlor und diese auch durch die Rückführung in ein anderes Medium nicht zurück zu erlangen war, war die Identifizierung aktiver Fraktionen über Aktivitätstests wie den Liposomen-Depolarisationstest nicht möglich.

2.6 Funktionale Charakterisierung ausgewählter Caenopore-Peptide

Parallel zu dem Versuch, eines der natürlichen Caenopores aus *C. elegans* zu isolieren, wurden die ausgewählten Caenopore-Peptide rekombinant synthetisiert, um *in vitro* funktionelle mit ihnen Tests durchführen zu können. Abbildung 32 zeigt grob schematisch den Verlauf der Synthese, der Reinigung und der funktionalen Analyse, auf deren Einzelheiten näher eingegangen werden soll.

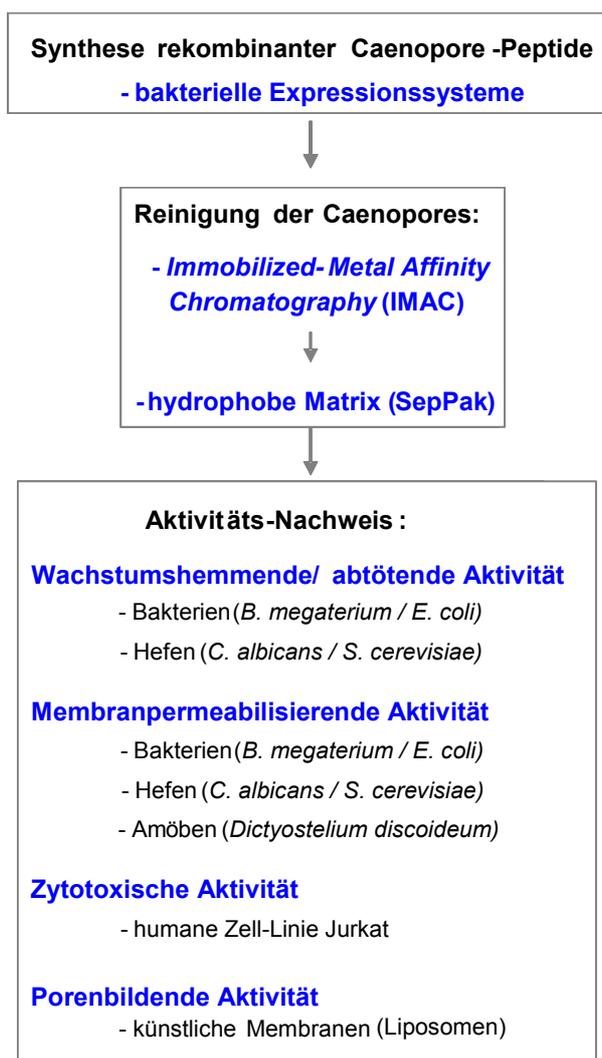


Abb. 32: Schema der Expression und der funktionalen Analyse der rekombinant synthetisierten Caenopores.

2.6.1 Klonierung der Expressionsvektoren für die rekombinante Synthese der Caenopore-Peptide

Die Nukleotidsequenzen der entsprechenden *spp-1*, *spp-5* und *spp-12*-Transkripte kodieren jeweils für ein Genprodukt, das aus einem vorhergesagten N-terminalen Signalpeptid sowie einer SAPLIP-Domäne besteht. Abbildung 33 zeigt die kodierenden Sequenzen, die jeweils mit dem Startkodon (ATG) beginnen. Der Transkript-Name T07C4.4 entspricht dabei *spp-1*, T08A9.9 entspricht *spp-5* und T22G5.7 entspricht *spp-12*.

```

T08A9.9 ---ATGAAGACTCTTCT---TGTAAGACTCTTCT---TGTACTAGCCGTTTTGGTCGCCGTTGCGCTCAGGACTTGCCATCCAGAAAATAGAAAGCCGATGAGCTGTCAAATGTGTG 94
T07C4.4 ATGACTCGCAATCTTCCGTTGCTTTTCCCTTGTCTTTGCTCGCCGCTGCTCCACTTCTAGCCAATCCAGCTAACCCACTCAATCTCAA--GAAGCATCACGG 98
T22G5.7 ---ATGTTTAGTAAACAGTTGTTGTTACTTCTAAATGGTTGTGCCCGCAATCTCACTTGCGCAGCCAGCTTCACCCTGGTACTCAA--GAAATCTCACGG 95

T08A9.9 AGTTGGTTGTCAAGAAATACGAAGGATCCGCCGATAAGGATGCCAATGTTCATCAAGAAGGATTTTCGATGCTGAATGCAAGAAGCTTTTCCACACCATCCC 194
T07C4.4 TGTTTTCTGTGATGTC-TGCAAGGCTCTCGTCGAGGGTGGAGAGAAGTTGGAGATGATGATCTCGATGCTGCTGATGATGGAACATCGGAATCTTTTG 197
T22G5.7 AGCAITTTGTTCATCTA-TGCGAGGACCTCATTAAAGGATGGCAAGGAAGCTGGAGATGTTGCTCTCGATGCTGCGCTGATGAGGAAATCGGATCCCGCTG 194

T08A9.9 ATTCGGAACCAGAGAATGCGATCATTACG---TCAACAGCAAGGTAGACCCCAATCATTACGAGCTGGAAGGAGGAACCGCTCCAAAGGATG-TGTGCAC 290
T07C4.4 CTGGACTATGCTGTGTGCCGTTGCATCACGAGTGTGAGGAAGAGCTGAAGAAGGTCAAGAAGGAGCTGAAAAAGGATATTGAGAACAAGGATTTCTCCAGAC 297
T22G5.7 CAAAG--ATTTTGGAGTGTGCGTGC-GAGTGTCTTTAAGGAGTTGAAAGTGGCTGAGCATGACATCTGGGAAAGCTATTGATCAAGAGATTCCAGAGGAT 291

T08A9.9 CAAGCTTA-ACGAATGCCATAA----- 312
T07C4.4 AAGGCGTGAAGGATGTTGATTTGTGCTAA 327
T22G5.7 AAAACTTGCAAAAGAAGCCAAACTCTGTGTA 321

```

Abb. 33: Sequenzvergleich der kodierenden Sequenzen der *spp*-Transkripte. Nukleotid-Sequenzen der Transkripte von *spp-1*, 5 und 12. Die Transkript-Namen entsprechen den folgenden Genen: T08A9.9 = *spp-5*, T07C4.4 = *spp-1*, T22G5.7 = *spp-12*. Die kodierenden Sequenzen beginnen jeweils mit dem Startkodon ATG.

Für die nachfolgende rekombinante Synthese der Peptide wurde jeweils der Abschnitt der Transkripte ausgewählt, der für die SAPLIP-Domäne mit einigen N-terminalen Aminosäureresten kodiert (Abb. 35).

Da der N-Terminus der Peptide nicht bekannt war, wurde die Primärstruktur von Amoebapore A zum Vergleich herangezogen. Sein N-terminales Ende liegt vier Aminosäurereste vor dem ersten der konservierten Cysteinreste. Die Caenopore-spezifischen Oligonukleotide wurden entsprechend so gewählt, dass die rekombinant synthetisierten Peptide eine dem Amoebapore A ähnliche Struktur aufwiesen. Eine Ausnahme bildete Caenopore 1, das um elf N-terminale Aminosäurereste länger war als die beiden anderen Caenopores. Die Wahl der Oligonukleotide richtete sich in diesem Fall nach den Angaben von Banyai und Patthy, die in ihrer Arbeit erstmals die antibakterielle Aktivität eines Caenopores anhand von Caenopore 1 nachgewiesen hatten (Banyai und Patthy, 1998).

Für die Ligation des Transkripts in den pIVEX2.4a-Expressionsvektor innerhalb eines offenen Leserahmens musste die Sequenz der Oligonukleotide so gewählt werden, dass ein zusätzlicher, N-terminal des Caenopore-Peptids gelegener Glycinrest synthetisiert wurde. Dieser artifizielle Glycinrest verblieb nach dem Entfernen des Fusionsproteins als zusätzlicher Aminosäurerest am N-Terminus des entsprechenden Caenopore-Peptids (Abb. 35).

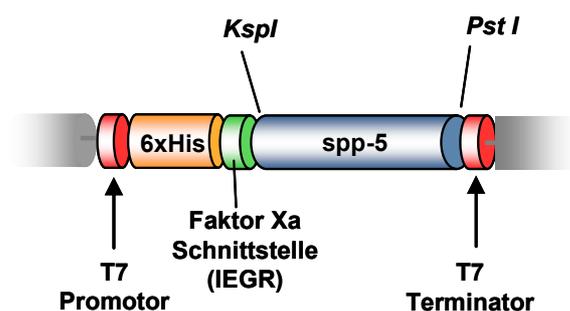


Abb. 34: Schematische Darstellung des pIVEX2.4a-Expressionsvektors mit der Caenopore 5-kodierenden Sequenz. Kodierende Sequenz von spp-5 (blau), Faktor Xa-Erkennungssequenz (grün), 6xHisTag (orange) T7-Terminator bzw. T7-Promotor-Sequenz (rot). Ksp-1 / Pst-1 Restriktionsendonukleasen.

Durch die Wahl des pIVEX2.4a-Expressionsvektors wiesen die drei Caenopore-Fusionsproteine eine zusätzliche N-terminale Kette aus sechs Histidinresten (*HisTag*) auf, welche durch eine aus vier Aminosäureresten (IEGR) bestehende *Factor Xa*-Erkennungssequenz vom eigentlichen Caenopore-Peptid getrennt war (Abb. 34 und 35). An diese Erkennungssequenz konnte die Protease *Factor Xa* binden. Durch ihre Aktivität war die Protease in der Lage, das N-terminale Fusionspeptid mitsamt dem *HisTag* vom eigentlichen Caenopore-Peptid abzuspalten.

```

Caenopore 5  MSGSHHHHHSSGIEGRGR-----SALSQMCCELVVKKYEGSADKDANV-IKKDFDAECKKLFHT 59
Caenopore 1  MSGSHHHHHSSGIEGRGNPANPLNLKHHGVFCDVCKALVEGGEKVGDDDLDAWLDVNIGTLCWTMLLP 70
Caenopore 12 MSGSHHHHHSSGIEGRGS-----HGAFCHLCEDLIKDGKEAGDVALDVWLDEEIGSRCKDFGV- 59

Caenopore 5  IPFGTRECDHYVNSKVDPIIHELEGGTAPKDVCTKLNECP 99
Caenopore 1  LHH---ECEEELKKVKELKKDIENKDSPDKACKDVDLC- 106
Caenopore 12 LAS---ECFKELKVAEHDWEAIDQEIPEDKTCKEAKLC- 95

```

Abb. 35: Sequenzvergleich der Primärstruktur der rekombinant synthetisierten Caenopore-Peptide. Das N-terminale Fusionspeptid mit HisTag wurde rot dargestellt, die Faktor Xa-Erkennungssequenz blau und die konservierten Cysteinreste der SAPLIP-Domäne gelb.

2.6.2 Synthese der Caenopores in bakteriellen Expressionssystemen

Die rekombinante Synthese der drei Caenopore-Peptide wurde in zwei verschiedenen *E. coli*-Expressionssystemen durchgeführt. Die Synthese der Peptide Caenopore 1 und 5 erfolgte im Bakterienstamm BL21(DE3)[pAPlacI^Q], während Caenopore 12 im *E. coli*-Stamm BL21TrxB(DE3) synthetisiert wurde.

Die Synthese der Peptide erfolgte nach Induktion des T7 Promotors mittels IPTG über Nacht bei 37 °C und resultierte in wasserlöslichen Peptiden, welche nach Aufschluss der bakteriellen Zellen mittels Ultraschall in einer SDS/Tricin-PAGE nach Schagger & Jagow überprüft wurde (Abb. 36 A). Die drei Caenopore-Fusionskonstrukte besaßen durch die ungleichen Primärstrukturen leicht unterschiedliche molekulare Massen. Caenopore 1 wies mit 9954,4 Da die größte molekulare Masse auf, während Caenopore 12 eine Masse von 8681.7 Da und Caenopore 5 eine Masse von 9059.3 Da, und damit ein deutlich geringeres Molekulargewicht aufwies. Die wesentlich höhere molekulare Masse des Caenopore 1 ist außerdem auf die zusätzlichen N-terminalen Aminosäurereste zurückzuführen (Abb. 35).

2.6.3 Zielgerichtete Mutagenese der Nukleotid-Sequenz von Caenopore 12

Die Synthese des rekombinanten Caenopore 12-Peptids war erst nach Austausch einer Nukleinsäure innerhalb seiner Nukleotidsequenz möglich, da die *E. coli*-Bakterien des Expressionssystems für die Translation des Transkriptes andere DNA-Tripletts verwendeten als *C. elegans*. Die problematischen Kodons wurden mit dem Programm GCUA 2.0 (*Graphical codon usage analyser*) (Fuhrmann *et al.*, 2004) identifiziert. Mittels der Methode der zielgerichteten Mutagenese (Urban *et al.*, 1997) wurde das Triplet CTA durch das Triplet CTC ersetzt. In Abb. 36 B ist die Steigerung der Syntheserate von Caenopore 12 vor und nach dem Austausch der Nukleinsäure dargestellt.

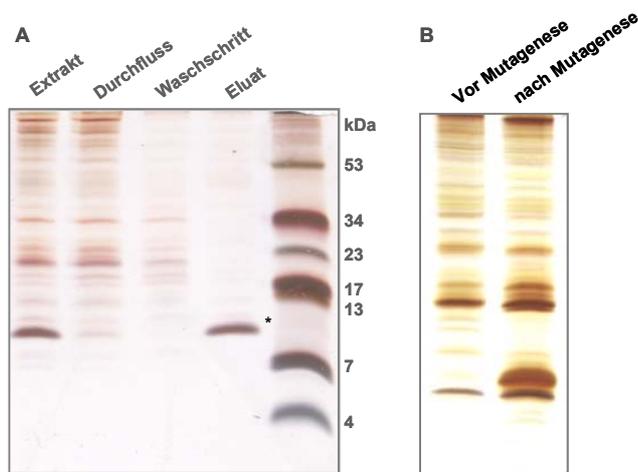


Abb. 36: Expressions-Analyse nach rekombinanter Synthese von Caenopore 5 und 12 mittels SDS-PAGE und Silberfärbung (A) Die Reinigung des wasserlöslichen *E. coli*-Extraktes wurde mittels IMAC-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt. (Extrakt) wasserlösliche Proteine, (Durchfluss) ungebundene bakterielle Proteine, (Waschschrift) Elution schwach gebundener Proteine mit 25 mM Imidazol, (Eluat) Elution der Fusions-Proteine. Das Caenopore 5-Fusionsprotein ist durch einen Stern gekennzeichnet. Größenstandard: Molecular-weight marker (M.W. range 2,5 - 16,9 Da; BDH Laboratory supplies, Poole, GB). (B) Syntheserate von Caenopore 12 vor und nach zielgerichteter Mutagenese seiner Nukleotidsequenz. Aufgetragen wurde der wasserlösliche Extrakt der rekombinanten Expression in *E. coli* nach Reduktion mit DTT ohne vorhergehende Reinigungs-Schritte.

2.6.4 Reinigung der wasserlöslichen Caenopore-Peptide

Nach Aufschluss der bakteriellen Zellen wurden die wasserlöslichen Peptide mittels Zentrifugation von den wasserunlöslichen Bestandteilen des Bakterienextraktes getrennt. Die Isolierung der Fusionsproteine von den bakteriellen Proteinen erfolgte über die Methode der Immobilisierten-Metal-Affinitäts-Chromatographie (IMAC), wobei die einzelnen Reinigungs-Schritte mittels SDS-PAGE analysiert wurden (Abb. 36).

Bei der Analyse der löslichen rekombinanten Caenopores zeigten sich erste Unterschiede zwischen den Peptiden, da Caenopore 1 und 12 zur Bildung stabiler Di- und Oligomere neigten und die entsprechenden Monomere nur durch Reduktion mit DTT darzustellen waren. Dagegen lag Caenopore 5 ausschließlich als Monomer vor (Abb. 36 und 37). Die Aggregate von Caenopore 1 und 12 waren pH-unabhängig und selbst während der SDS-PAGE, also nach Inkubation mit SDS sowie der Denaturierung bei 95 °C für 10 Minuten stabil. Um die Stabilität der Aggregate zu testen, wurden die Peptide, wie in Abschnitt 7.11.3 beschrieben, in denaturierenden bzw. reduzierenden Chemikalien wie Harnstoff, Guanidin-Hydrochlorid, DTT oder Iodacetamid resuspendiert und für unterschiedliche Zeiträume und bei Temperaturen bis zu 99 °C inkubiert (Podack und Tschopp, 1982). Auch unter diesen stringenten Bedingungen blieben die Dimere von Caenopore 1 und 12 stabil. Einzig bei der Inkubation mit 50 mM DTT für 20 min bei 70 °C

sowie in 8 M Harnstoff und Iodacetamid bei 99 °C für eine Stunde konnte die Dissoziation größerer Aggregate zu Monomeren fast vollständig erzielt werden.

Um einen optimalen Reinigungseffekt zu erzielen, wurden die Bedingungen der IMAC-Chromatographie jedem der drei Caenopores angepasst. In Abbildung 37 wird der Unterschied zwischen Caenopore 1 und 5 deutlich, wobei Caenopore 5 bereits bei einer Imidazol-Konzentration von 120 mM von der Säulenmatrix eluiert werden konnte, während Caenopore 1 stärker an den Nickel-Ionen der Matrix gebunden blieb. Möglicherweise war dieser Effekt auf das Vorkommen und die Verteilung von internen Histidinresten zurückzuführen. Caenopore 1 verfügt über vier solcher Histidinreste, welche in zwei Paaren N-terminal und in der Mitte des Peptids liegen, während Caenopore 5 - und im Übrigen auch Caenopore 12 - nur über drei weit auseinander liegende Histidinreste verfügt.

Interessant ist auch das Elutions-Verhalten der Caenopore 1 und 12-Dimere. Sie werden im Vergleich zu den Monomeren deutlich fester an den Nickelionen der Säulenmatrix gebunden (Abb. 37). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Dimere, statt über die üblichen sechs Histidinreste des *HisTag*, über zwölf dieser Bindungsstellen verfügen und somit stärker an die Nickelionen des Nickel-NTA binden können.

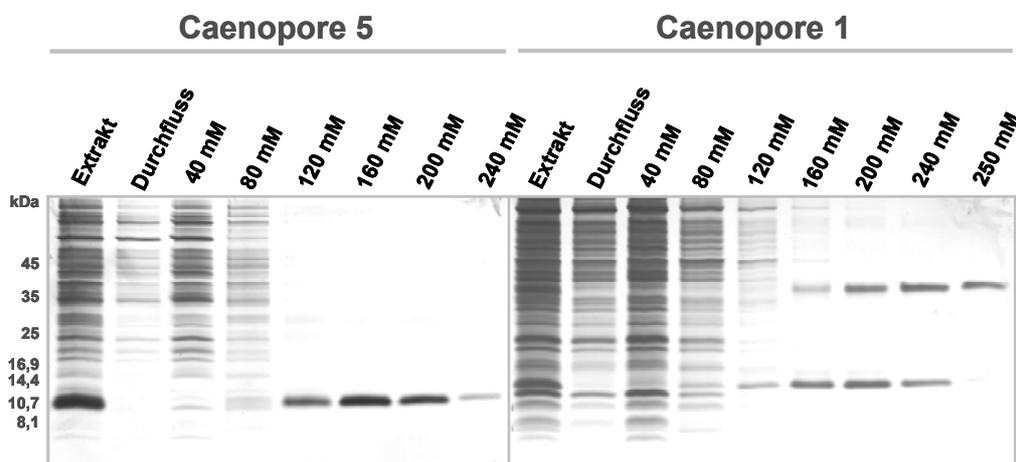


Abb. 37: Ermittlung der optimalen Imidazol-Konzentration für die Elution der Caenopore-Fusionsproteine am Beispiel von Caenopore 1 und 5. Reinigung der rekombinanten Caenopores 1 und 5 mittels IMAC (Immobilisierte-Metal-Affinitäts-Chromatographie). Es wurde ein Imidazol-Stufengradient eingesetzt (40-250 mM Imidazol), um die Caenopore-Fusionsproteine von der IMAC-Säule zu eluieren. Eichproteine: #SM0431 protein molecular weight marker (Fermentas). Die molekularen Massen wurden in kDa angegeben.

Ein weiterer Reinigungseffekt wurde erzielt, in dem die Peptide aus dem Elutionsansatz der IMAC mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) versehen und auf eine hydrophobe Matrix (SepPak) gegeben wurden. Mit stufenweise ansteigender Konzentration des Lösungsmittels Acetonitril (ACN) wurden die Proteine wieder von der SepPak-Säule eluiert, nachdem auch Salze und schwächer gebundene bakterielle Proteine entfernt wurden. Die Lösungsmittel wurden durch die anschließende Gefriertrocknung der Peptide entfernt.

Die Konzentration der gereinigten Caenopore-Peptide wurde ermittelt, indem die Absorption der Peptidbindungen bei 214 nm gemessen wurde (Buck *et al.*, 1989). Dazu wurde für jedes Peptid ein sequenz-spezifischer Extinktionskoeffizient bestimmt.

2.6.5 Nachweis der strukturellen Integrität mittels Monobromobimane

Die sechs konservierten Cysteinreste der Caenopore-Peptide ermöglichen die Ausbildung von drei Disulfidbrücken. Um zu überprüfen, ob jeder der Cysteinreste in eine Disulfidbrücken involviert ist, wurden die Peptide mit Monobromobimane (mBBr) inkubiert. Dieses reagiert mit Thiolgruppen wie z. B. mit reduzierten und damit ungebundenen Cysteinresten in Proteinen, woraufhin es mittels UV-Licht nachgewiesen werden kann. Durch das Ausbleiben der Fluoreszenz wurde die Assemblierung der Peptide in Abwesenheit von DTT gezeigt (Abb. 38), während dieselbe Stoffmenge des Peptids nach Reduktion der Disulfidbrücken eine deutliche Fluoreszenz aufwies. Die unterschiedlichen Farbintensitäten der entsprechenden Proteinbanden in der anschließenden Silberfärbung sind auf die An- bzw. Abwesenheit des DTT im Ansatz zurückzuführen und geben keinen Aufschluss über die enthaltene Proteinmenge.

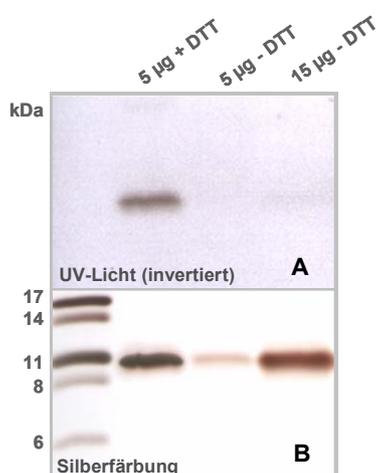
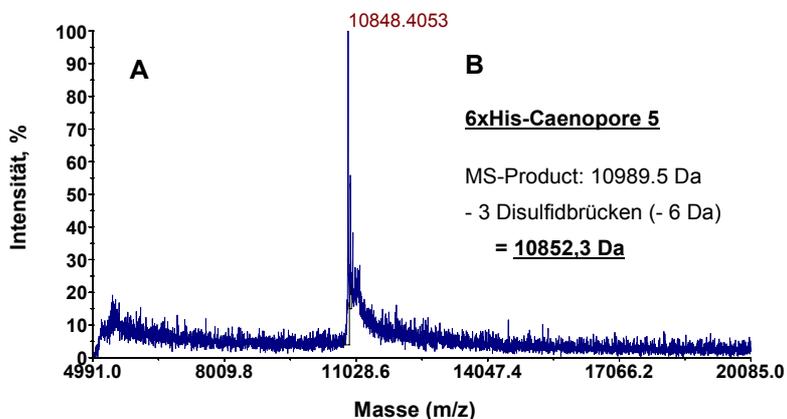
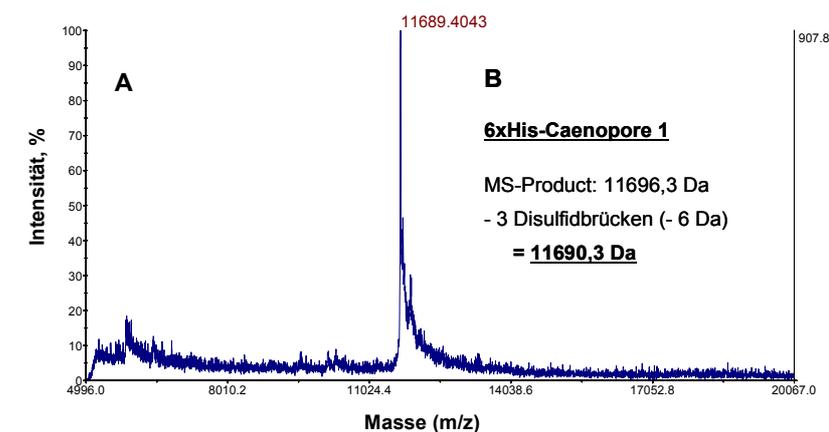


Abb. 38: Nachweis der strukturellen Integrität der rekombinanten Caenopores am Beispiel von Caenopore 5. (A) Reduzierte Cysteinreste, welche nicht über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind interagieren mit Monobromobimane (mBBr). Die Peptide wurden mit mBBr inkubiert und nach Reduktion mit 3 mM DTT mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Fluoreszenz des mBBr an den reduzierten Cysteinresten kann mittels UV-Licht dargestellt werden. (B) Darstellung der mBBr-markierten Peptide mittels Silberfärbung. Protein-Größenstandard: #SM0431 protein molecular weight marker (Fermentas).

2.6.6 Nachweis der molekularen Identität mittels MALDI-TOF-Analyse

Die Identität und die Reinheit der Fusionsproteine wurde mittels MALDI-TOF-Analyse festgestellt (Abb. 39 A). Die jeweils gemessene molekulare Masse wurde mit der im Programm *MS-Digest* errechneten Masse verglichen (Abb. 39 B). Die genaue Analyse der molekularen Masse ermöglichte zusätzlich eine Aussage über den Anteil ungebundener, reduzierter Cysteinreste im Peptid, da diese durch das Vorhandensein zusätzlicher Wasserstoffatome eine geringfügig höhere Masse aufweisen. Über die exakte Messung der molekularen Masse konnte so analysiert werden, ob alle Disulfidbrücken im Peptid geschlossen sind. In Abbildung 39 sind die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analysen dargestellt.

Bei diesen Analysen wurde deutlich, dass jeweils die Masse eines Methioninrestes fehlte, was darauf hinwies, dass der N-terminale Methioninrest der Fusionsproteine von den Expressionsbakterien nicht synthetisiert wurde.



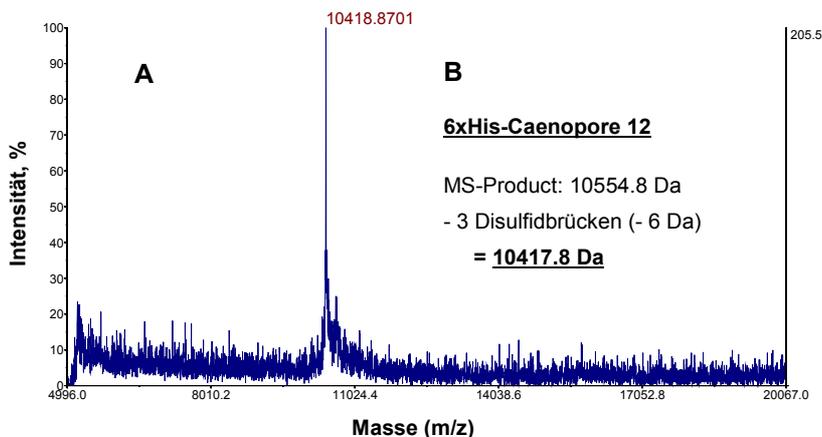


Abb. 39: Analyse der Protein-Identität der Caenopores mittels MALDI-TOF. (A) Masse des jeweiligen Caenopore-Fusionsproteins (6xHis-Caenopore). Nach Reinigung an einer hydrophoben Matrix (SepPak) wurden 0,5 µg Fusionsprotein in 0,01 % TFA eingesetzt. Die Messung erfolgte ohne vorhergehenden Trypsin-Verdau. (B) Berechnung der molekularen Masse anhand der Aminosäuresequenz des Caenopore-Fusionsproteins. Die Berechnung der molekularen Masse wurde mit dem Programm „MS-Digest“ durchgeführt. Von der berechneten Masse wurden jeweils 6 Da subtrahiert, da die sechs Cysteinreste oxidiert waren und Disulfidbrücken ausbildeten.

2.6.7 Abspalten des Fusionspeptids mittels *Factor Xa*

Über die Protease-Aktivität des *Factor Xa* wurde das rekombinant synthetisierte Fusionsprotein von seinem artifiziellen N-terminalen Fusionspeptid getrennt. Dafür wurden die gereinigten und gefriergetrockneten Caenopore-Fusionsproteine in einem entsprechenden Puffer resuspendiert, mit der Protease *Factor Xa* versetzt und für acht Stunden bei 37 °C inkubiert. *Factor Xa* schneidet bevorzugt C-terminal der Aminosäuresequenz „IEGR“, welcher den *HisTag* vom eigentlichen Peptid trennt (Nagai *et al.*, 1985) (Abb. 34, 35).

Die Effektivität des *Factor Xa* war stark vom jeweiligen Peptid abhängig. Wie in Abbildung 40 zu erkennen ist, war die Abtrennung des *HisTag* von den Fusionsproteinen Caenopore 1 und 12 nach einer Inkubationszeit von vier Stunden abgeschlossen. Demgegenüber bedurfte es bei den Caenopore 5- bzw. Caenopore 5 II-Fusionsproteinen (Abschnitt 7.9.7), einer längeren Inkubationszeit von mehr als 24 Stunden, um das Fusionspeptid in einem Teil des Ansatzes zu entfernen (Abb. 40 C).

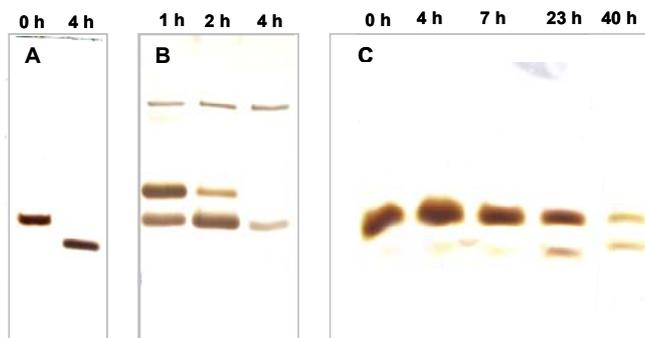


Abb. 40: Abtrennung des HisTag von den Caenopore-Fusionsproteinen durch Factor Xa. Aliquots der Reaktions-Ansätze wurden vor Zugabe der Protease bzw. nach definierten Zeitpunkten entnommen, mit DTT reduziert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend über Silberfärbung dargestellt. (A) Caenopore 1 (B) Caenopore 12 (C) Caenopore 5 II. Die Reaktion wurde jeweils bei 37 °C durchgeführt.

In Abbildung 41 wird am Beispiel von Caenopore 1 der Effekt des *Factor Xa* auf die molekulare Masse der Peptide verdeutlicht. Durch den Verlust des N-terminalen Fusionspeptids nimmt die Masse des rekombinant synthetisierten Caenopore 1-Fusionsproteins um ca. 1,5 kDa ab (Abb. 41).

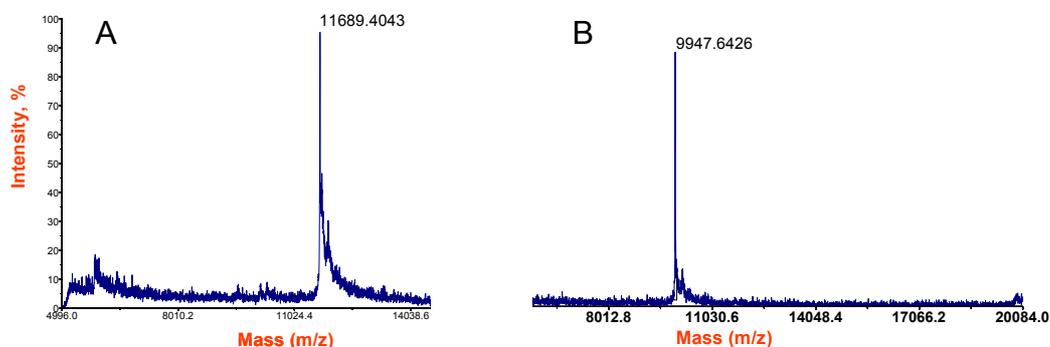


Abb. 41: MALDI-TOF-Analyse von Caenopore 1 vor und nach Hydrolyse mittels Factor Xa. (A) Spektrum des Caenopore 1-Fusionsproteins (B) Spektrum von Caenopore 1 nach Abspaltung des N-terminalen Fusionspeptids mittels Factor Xa.

Um den *HisTag* von den Caenopore-Peptiden zu separieren, wurde eine IMAC-Chromatographie durchgeführt, in welcher die Histidinreste des *HisTag* gebunden wurden, während die Caenopore-Peptide sich im Durchfluss befanden. In Abbildung 42 wird deutlich, dass im Elutionsansatz der IMAC fast ausschließlich ungeschnittenes Caenopore 1 sowie der abgetrennte *HisTag* vorliegt, wobei letzterer aufgrund seiner geringen molekularen Masse nicht dargestellt werden konnte.

Wiederholt konnte beobachtet werden, dass die stabilen Dimere von Caenopore 1 und 12 (Abschnitt 2.6.4) eine stärkere Resistenz gegenüber dem *Factor Xa* aufwiesen als die

jeweiligen Monomere. Dieser Effekt wird auch in Abbildung 42 deutlich, wobei die Proteine des Elutions-Ansatzes jeweils mit und ohne vorhergehende Reduktion aufgetrennt wurden. Im nicht reduzierten Ansatz befindet sich fast ausschließlich das Dimer des Caenopore 1-Fusionsproteins, während das entsprechende Monomer bereits vollständig von seinem *HisTag* getrennt wurde und sich somit im Durchfluss befindet. Durch die Reduktion des Elutions-Ansatzes ist in dieser Fraktion ausschließlich das ungeschnittene Fusionsprotein als Monomer zu erkennen.

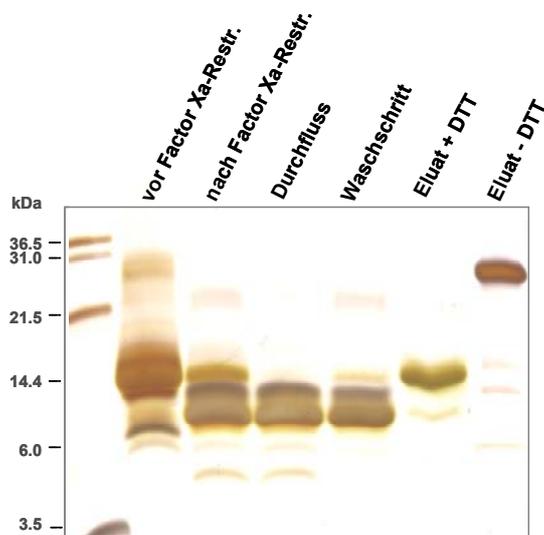


Abb. 42: Darstellung der Caenopore 1 Proteinfraktionen nach Entfernung des Fusionspeptids und Reinigung mittels IMAC-Affinitäts-Chromatographie. Die Reaktion erfolgte für 4 h bei 37 °C. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE. Fraktion 1-5: Reduktion mit 50 mM DTT, Fraktion 6: nicht reduziert. Eichproteine: Mark12 unstained standard (Invitrogen). Silberfärbung

Eine Besonderheit zeigte sich beim Caenopore 5-Fusionsprotein. Die Spaltung des Fusionsproteins mittels *Factor Xa* war, wie bereits erwähnt, im Vergleich zu Caenopore 1 und 12 sehr ineffizient. Die Ursache dafür basiert wahrscheinlich auf spezifischen Eigenschaften von Caenopore 5 und konnte im Zuge der Arbeit nicht aufgeklärt werden. Interessanterweise wurde während der MALDI-TOF-Analyse von Caenopore 5 deutlich, dass ein Teil des Caenopore 5-Fusionsproteins hinter der spezifischen *Factor Xa*-Erkennungs-Sequenz (IEGR) geschnitten wurde, während die Restriktion des anderen Teils zwei Aminosäurereste C-terminal dieser Schnittstelle stattfand (Abb. 43 A). Diese zwei Aminosäurereste bestanden aus dem artifizialen Glycin- und einem Argininrest, und somit wurde durch diese beiden Aminosäurereste im Prinzip der zweite Teil der Erkennungs-Sequenz wiederholt.

Um diesen Effekt zu unterbinden wurde, die Primärstruktur des Caenopore 5-Fusionsproteins über die Methode der zielgerichteten Mutagenese um den C-terminalen Argininrest verkürzt, so dass der *Factor Xa*-Schnittstelle und dem Glycinrest nicht ein weiterer Argininrest sondern ein Serinrest folgte. Die Aktivität des Caenopore 5-Peptids blieb durch diese Veränderung der Primärstruktur unbeeinflusst, während die MALDI-TOF-Analyse bestätigte, dass der *Factor Xa* im verkürzten Caenopore 5 II-Peptid ausschließlich hinter der spezifischen *Factor Xa*-Erkennungssequenz schnitt (Abb. 43 B). Allerdings konnte durch diese Veränderung der Primärstruktur die Effektivität des *Factor Xa* nicht gesteigert werden und die ursprünglichen Schwierigkeiten mit der Restriktion des *HisTag* blieben bestehen.

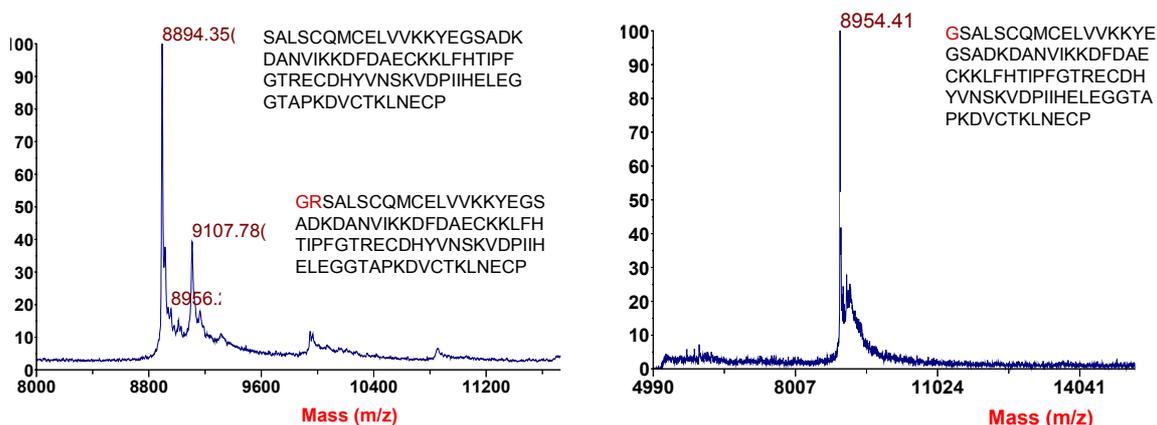


Abb. 43: MALDI-TOF-Analyse von Caenopore 5 und Caenopore 5 II nach der Abspaltung des HisTag. (links) Spektrum des Caenopore 5-Peptids nach *Factor Xa*-inkubation (rechts) Spektrum des Caenopore II-Peptids nach *Factor Xa*-Inkubation. Die Nukleotidsequenz von Caenopore 5 II wurde über die Methode der zielgerichteten Mutagenese so verändert, dass die Primärstruktur des Peptids um den N-terminalen Argininrest verkürzt war. Vor der Durchführung der MALDI-TOF-Analyse wurden die Peptide von den Fusionspeptiden getrennt und gereinigt.

2.7 Analyse der antimikrobiellen Aktivität der Caenopores

Um mehr über die biologische Funktion *in vivo* und die aufgrund ihrer Struktur postulierte antimikrobielle Wirkung der Caenopore-Peptide zu erfahren, wurden *In-vitro*-Experimente mit den rekombinant synthetisierten Caenopores durchgeführt. Dabei wurde die Aktivität der Caenopores untereinander und mit anderen ausgewählten antimikrobiellen Peptiden verglichen. Es wurde sowohl das Wirkungsspektrum gegen verschiedene Bakterien und eukaryotische Zellen getestet sowie das pH-Optimum bestimmt.

2.7.1 Antibakterielle Aktivität

Eingangs wurde die Wirkung auf Bakterien getestet. Es zeigte sich, dass alle drei Caenopores starke antibakterielle Aktivität gegen Bakterien aufwiesen, wobei die Aktivität mit steigendem pH nachließ. Die stärkste Aktivität zeigte sich bei einem pH-Wert von 5,2, während sie schon bei einem neutralen pH-Wert um pH 7,4 in den eingesetzten Peptid-Konzentrationen nicht mehr nachzuweisen war.

Mikrosuszeptibilitätstest

Im Mikrosuszeptibilitätstest wurde die Spezifität der Caenopore-Peptide für verschiedene Bakterienarten getestet, wobei der Gram-positive Bakterienstamm *Bacillus megaterium* ATCC14581 sowie drei Gram-negative *Escherichia coli*-Stämme eingesetzt wurden. Bei den *E. coli*-Stämmen handelte es sich um den Stamm *E. coli* K12, um eine Mutante dieses K12-Stammes, die als K12 D31 bezeichnet wurde und um *E. coli* OP50, welche die Futterbakterien der Würmer darstellten. Der Mikrosuszeptibilitätstest gab sowohl Aufschluss über die bakteriostatische als auch über die bakterizide Wirkung der Peptide, wobei erstere als MIC (minimale inhibitorische Konzentration) und letztere als MBC (minimale bakterizide Konzentration) bezeichnet wurde.

Es zeigte sich, dass Caenopore 5 sowohl bakteriostatische als auch bakterizide Aktivität gegen *E. coli* und *B. megaterium* besaß, während Caenopore 1 und 12 ausschließlich gegen Gram-positive Bakterien aktiv waren. Dabei unterschied sich die Aktivität von Caenopore 5 hinsichtlich der verschiedenen *E. coli*-Stämme nur sehr unwesentlich. Im weiteren Verlauf werden die Daten angegeben, die mit *E. coli* K12 D31 erhoben wurden. Die inhibitorische Konzentration des Caenopore 5-Peptids gegen *E. coli* lag bei ca. 100 nM, wohingegen die Konzentration, die benötigt wurde, um das Wachstum von *B. megaterium* zu inhibieren, bei nur ca. 50 nM lag. Die minimale bakterizide Konzentration (MIC) war jeweils doppelt so hoch wie die minimale inhibitorische Konzentration (MBC).

Im Gegensatz zu Caenopore 5 wiesen Caenopore 1 und 12 auch bei einer Konzentration von bis zu 5 μM keine Aktivität gegen *E. coli* auf, während beide Peptide gegen *B. megaterium* deutliche Aktivität zeigten. Hier lag die inhibitorische Konzentration des Caenopore 1 bei ca. 100 nM, während 250 nM des Caenopore 12-Peptids eingesetzt werden mussten, um das Wachstum der Bakterien zu inhibieren. Die minimale bakterizide Konzentration von Caenopore 1 lag um eine Verdünnungsstufe höher bei 200 nM, während der MBC für Caenopore 12 mit 250 nM der inhibitorischen Konzentration glich.

Test der membranpermeabilisierenden Aktivität

Die membranpermeabilisierende Aktivität der Caenopores wurde anhand der ansteigenden Fluoreszenzintensität des Farbstoffes SYTOX Green[®] ermittelt. Durch die Zerstörung der bakteriellen Membran gelangt der Farbstoff in die Zelle und interkaliert dort mit der DNA.

Als Negativkontrolle (0 %-Wert) wurde jeweils das Lösungsmittel eingesetzt, in dem die Peptide vorlagen, wobei es sich um 0,01 % Trifluoressigsäure (TFA) handelte. In keinem Fall konnte eine antibakterielle Aktivität von TFA in der eingesetzten Konzentration nachgewiesen werden. Der 100 %-Wert wurde durch Inkubation der Bakterien mit 70 % Ethanol gewonnen, da in diesem Fall davon auszugehen war, dass alle Bakterien im Ansatz getötet bzw. permeabilisiert wurden. Beide Werte dienten der Berechnung der permeabilisierten Bakterien in Prozent (s.u.).

Die Aktivität der Caenopores war mit der anderer antimikrobieller Peptide wie Cecropin P1, Cecropin A, Cecropin B und Magainin I vergleichbar (Abb. 44). Die Messungen fanden alle zehn Minuten über einen Zeitraum von zwei Stunden statt. Es zeigte sich, dass sowohl die Caenopores als auch die Kontrollpeptide in ihrer jeweiligen Konzentration spätestens nach einer Stunde hundert Prozent der Bakterien permeabilisiert hatten. Die Messung der membranpermeabilisierenden Aktivität wurde bei pH 5,2 sowie bei pH 7,4 durchgeführt und daher konnte wiederholt der starke Einfluss des pH-Wertes auf die Caenopores festgestellt werden, da ihre Aktivität, im Gegensatz zur Aktivität der Kontrollpeptide, auf einen Bereich um pH 5,2 beschränkt blieb.

Die Spezifität der Caenopores hinsichtlich des Bakterienstammes konnte ebenfalls bestätigt werden, da Caenopore 1 und 12 bis zu einer finalen Konzentration von 5 μM keine Aktivität gegen *E. coli*-Bakterien aufwiesen, während sie wiederholt starke Aktivität gegen *Bacillus megaterium* zeigten. Die Aktivität von Caenopore 5 richtete sich dagegen wiederum sowohl gegen *E. coli* als auch gegen *B. megaterium*.

Caenopore 1 und 5 zeigten bei einer Konzentration von 50 nM eine ungefähr siebzigprozentige Permeabilisierung der bakteriellen Zellen, während Caenopore 12 mit ungefähr

zehn Prozent permeabilisierten Bakterien bei 50 nM eine schwächere Aktivität aufwies (Abb. 44 A). Eine hundert-prozentige Permeabilisierung der Bakterien konnte mit Caenopore 1 und 12 erst bei einer Konzentration von ca. 200 nM erreicht werden, während Caenopore 5 seine volle Aktivität bereits bei 100 nM erreichte.

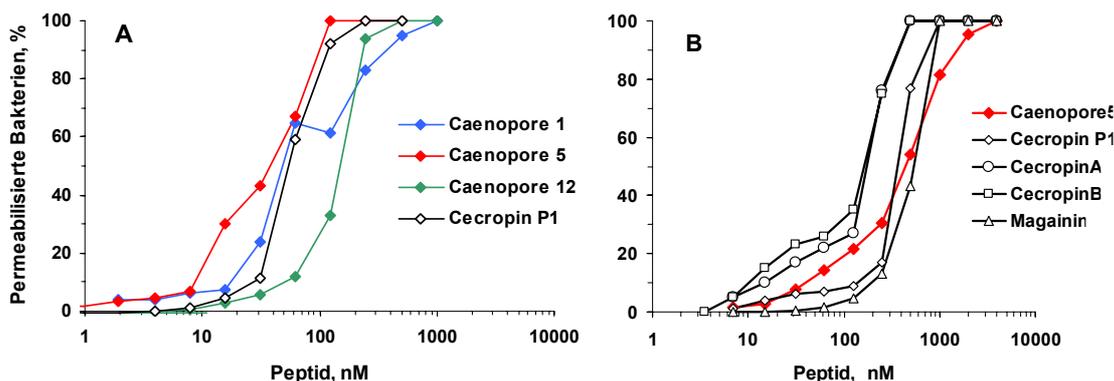


Abb. 44: Membranpermeabilisierende Aktivität der Caenopores im Vergleich zu anderen antimikrobiellen Peptiden. Die jeweiligen Peptide wurden mit je 2×10^5 Bakterien in 20 mM MES, pH 5,2; 25 mM NaCl für 1 h inkubiert. (A) Membranpermeabilisierende Aktivität von Caenopore 1, 5 und 12 sowie Cecropin P1 gegen *B. megaterium* ATCC 14581 bzw. gegen (B) *E. coli* K12 D31. Die membranpermeabilisierende Aktivität wurde durch permeabilisierte Bakterien in % wiedergegeben, die in Abhängigkeit von der jeweiligen Peptid-Konzentration steht. Die Messpunkte entsprechen dem arithmetischen Mittelwert von experimentellen Dreifachwerten.

Die schnell ansteigende Aktivitätskurve von Caenopore 1, die eingangs mit der von Caenopore 5 vergleichbar war, wurde zwischen 50 und 100 nM durch eine kurzfristige Stagnation der Aktivitäts-Steigerung unterbrochen. Dieser „Knick“ war in allen Messungen mit leicht unterschiedlicher Intensität zu beobachten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass eine Verdopplung der Konzentration von 50 auf 100 nM nicht in einer Steigerung der Aktivität resultiert. Die auslösenden Umstände, die zu diesem Phänomen führten, konnten nicht geklärt werden aber sie führten dazu, dass Caenopore 1 und 12 ihre volle Aktivität erst bei einer Konzentration erreichten, die ungefähr vergleichbar war.

Obwohl sich die Hauptaktivität der Caenopores auf pH 5,2 beschränkte zeigte Caenopore 1 nach einem längeren Inkubations-Zeitraum und bei höheren Konzentrationen auch bei pH 7,4 Aktivität gegen *B. megaterium* (Abb. 45). Sie war allerdings nicht sehr ausgeprägt und konnte auch durch eine längere Inkubationszeit nicht erhöht werden. Für die beiden anderen Caenopores konnte ein solcher Effekt nicht beobachtet werden; ihre Aktivität blieb auf einen sauren pH-Wert beschränkt.

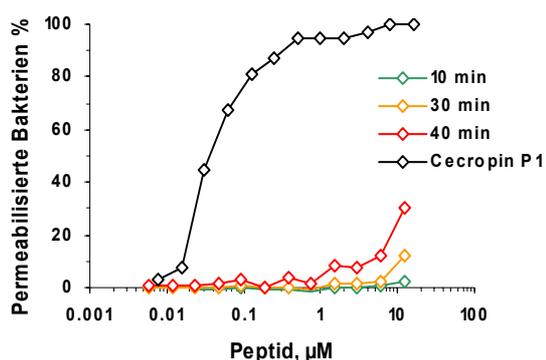


Abb. 45: Membranpermeabilisierende Aktivität von Caenopore 1 gegen *B. megaterium* bei pH 7,4. Die Peptide wurden mit je 2×10^5 Bakterien in 20 mM HEPES, pH 7,4; 25 mM NaCl für 1 h inkubiert. Als Kontrollpeptid wurde Cecropin P1 eingesetzt.

2.7.2 Fungizide Aktivität gegen *C. albicans* und *S. cerevisiae*

Die fungizide Aktivität der Caenopores wurde an den Hefen *Candida albicans* ATCC10231 und dem Wildtyp-Stamm der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* S150 getestet. Die fungistatische sowie fungizide Aktivität gegen die Hefezellen wurde, wie auch schon zuvor in den antibakteriellen Tests, in einem Mikrosuszeptibilitätstest ermittelt. Zusammen mit verschiedenen Peptid-Konzentrationen wurden 30 - 40 CFU (*Colony Forming Units*) für je 48 Stunden bei 28 °C in 10 mM Natrium-Phosphatpuffer bei pH 5,2 inkubiert. Als Kontroll-Peptid wurde das antimikrobielle Peptid Melittin eingesetzt. Das Lösungsmittel aller getesteten Peptide bestand aus 0,01 % TFA und wies in der eingesetzten Konzentration keine Aktivität gegen die getesteten Hefezellen auf.

Sowohl Melittin als auch die drei getesteten Caenopores, welche in einer Anfangskonzentration von 2 µM eingesetzt wurden, zeigten deutliche inhibitorische sowie fungizide Aktivität. Die dafür erforderliche Peptid-Konzentration, bezeichnet als MIC (minimale inhibitorische Konzentration) bzw. MLC (minimale letale Konzentration), war höher als die Konzentration, die benötigt wurde, um das Wachstum Gram-positiver Bakterien zu inhibieren. Sie betrug bei Caenopore 1 und 12 ungefähr 1 µM und bei Caenopore 5 500 nM. Die minimale letale Konzentration entsprach bei Caenopore 1 und 5 der inhibitorischen Konzentration, während Caenopore 12 in einer Konzentration von 2 µM eingesetzt werden musste, um die Zellen zu töten. Die Positivkontrolle Melittin wies eine minimale inhibitorische sowie letale Konzentration von ungefähr 0,6 µM auf.

Um die membranpermeabilisierende Wirkung der Caenopores, die schon gegen bakterielle Membranen gezeigt wurde, zu verifizieren, wurde erneut der Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green® im Membran-Permeabilisierungstest eingesetzt. Wie in

Abschnitt 7.10.1 beschrieben, wurde der Anstieg der Fluoreszenz des Farbstoffes als Maß für die Permeabilisierung der Membranen herangezogen. Dieser Test wurde sowohl mit Zellen von *C. albicans* als auch mit der Bäckerhefe *S. cerevisiae* durchgeführt, wobei nur die Messung mit *S. cerevisiae* dargestellt wurde (Abb. 46). Für die Tests wurden je 1×10^4 CFU / 25 μ l beider Hefestämme mit den unterschiedlich konzentrierten Peptiden bei 28 °C inkubiert. Wiederum wurde das Kontroll-Peptid Melittin eingesetzt. Einen 100 % „Tot“-Wert zu ermitteln, erwies sich als schwierig, da sich die Zellen weder durch die Inkubation mit 70 % Ethanol noch durch Detergenzien wie Triton X-100 (finale Konz. 1 %) oder Essigsäure (finale Konz. 1,5 %) lysieren ließen. Als Tot-Wert wurde daraufhin der Wert festgelegt, welcher sich aus der Fluoreszenz des Melittin-Ansatzes bei einer Konzentration von 1 μ M ergab. Da das Lösungsmittel der Peptide (0,01 % TFA) keine Aktivität gegen die Hefezellen zeigte, wurden die so ermittelten Werte als 0 % Werte verwendet. Nach einem Zeitraum von 3,5 Stunden wurde die membranpermeabilisierende Aktivität der Caenopores gemessen. Alle drei Caenopores zeigten deutliche Aktivität gegen die Hefezellen, die mit der Aktivität von Melittin vergleichbar war. Wie schon im zuvor erwähnten Membran-Permeabilisierungs-Test gegen die Gram-positiven *B. megaterium*-Bakterien (Abschnitt 2.7.1) war auch hier die Aktivität des Caenopore 12 geringfügig schwächer als die Aktivität von Caenopore 1 und 5. So vermittelten Caenopore 1 und 5 bei einer Konzentration von 150 - 200 nM eine 50 % Membranpermeabilisierung, während Caenopore 12 in einer Konzentration von 300 nM eingesetzt wurde, um denselben Effekt zu erzielen. Im Vergleich zu den Bakterien fiel der Unterschied zwischen den Aktivitäten der Caenopores aber geringer aus.

Wie schon bei den Bakterien war eine leichte Unterbrechung der Aktivitätssteigerung von Caenopore 1 zu beobachten, welche wiederum bei einer Konzentration zwischen ungefähr 50 und 100 nM eintrat.

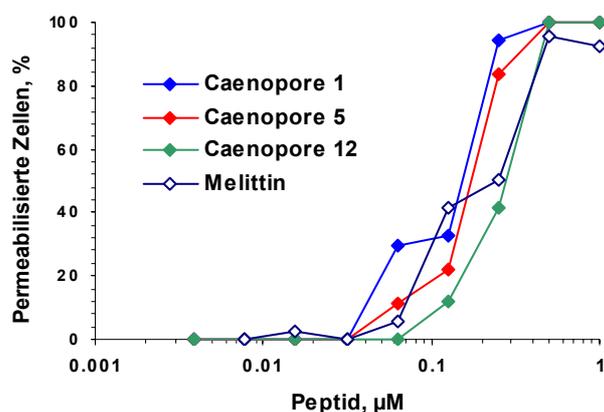


Abb. 46: Membranpermeabilisierende Aktivität der Caenopores gegen Zellen der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Es wurden 1×10^4 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Peptids in 20 mM MES, pH 5,2; 25 mM NaCl bei 28 °C für 4 h inkubiert. Die Messungen wurden alle 30 min durchgeführt. Die Grafik entspricht den Messergebnissen nach 3,5 h.

2.7.3 Cytotoxische Aktivität gegen *Dictyostelium discoideum*

Um die antimikrobielle Aktivität der Caenopores gegen weitere eukaryotische Organismen zu testen, die aufgrund ihres Lebensraumes und ihrer Lebensweise im Nahrungsspektrum von *C. elegans* eine Rolle spielen könnten, wurde die Aktivität gegen die frei im Boden lebende Amöbe *Dictyostelium discoideum* untersucht. Die Membranpermeabilisierung der amöboiden Zellen wurde mit einigen Modifikationen gemäß dem bereits erwähnten SYTOX Green®-Test durchgeführt. In dem Test, der bei pH 5,2 durchgeführt wurde, wurden je 5×10^4 Zellen mit den unterschiedlich konzentrierten Peptiden bei Raumtemperatur für drei Stunden inkubiert.

Die Permeabilisierung der amöboiden Zellmembranen erforderte im Vergleich zu Bakterien und Pilzen eine höhere Peptid-Konzentration. Sowohl das Kontrollpeptid Cecropin P1 als auch die drei Caenopores zeigten erst ab einer Konzentration von 1 μM beginnende membranpermeabilisierende Aktivität, während die Aktivität des Kontrollpeptids Melittin höher und mit der Aktivität gegen Bakterien und Pilze vergleichbar war (Abb. 44, 46, 47). Eine hundertprozentige Permeabilisierung der Zellen konnte mit der eingesetzten Caenopore-Peptid-Konzentration nicht erreicht werden.

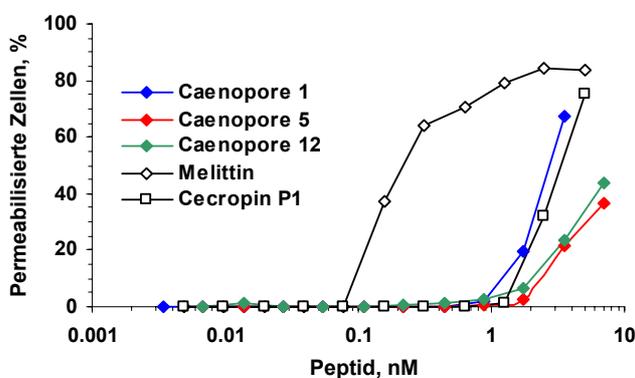


Abb. 47: Membranpermeabilisierende Aktivität der Caenopores gegen Zellen der Amöbe *Dictyostelium discoideum* „Ax3-Orf“. Es wurden jeweils 5×10^4 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Peptids in 20 mM MES pH 5,5, 150 mM NaCl, 320 mosmol/kg bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubiert, wobei die Ergebnisse der dargestellten Messung nach einer Stunde gewonnen wurden.

2.7.4 Cytotoxische Aktivität gegen Zellen der humanen T-Zelllinie „Jurkat“

Die cytotoxische Aktivität der Caenopores wurde ebenfalls an Zellen der humanen T-Zelllinie Jurkat getestet. Die Messungen wurden von H. Ließgang nach den Angaben von Bruhn *et al.*, 2003 durchgeführt. Dafür wurden die drei Caenopore-Peptide sowie Melittin und Alamethicin entsprechend Abschnitt 7.10.4 analysiert. Die Tests wurden bei pH 5,5 durchgeführt, da ein geringerer pH-Wert negative Auswirkungen auf die Zellen zeigte. Der Zelltod bzw. die abnehmende metabolische Aktivität wurde durch den Einsatz des Farbstoffs Alamar Blue[®] nachgewiesen, welcher in toten Zellen eine höhere Fluoreszenzrate als in lebenden Zellen aufwies (O'Brien *et al.*, 2000).

Während das Lösungsmittel der Peptide (0,01 % TFA) keine Auswirkungen auf die Zellen zeigte, wies das Kontrollpeptid Melittin nach drei Stunden bei 37 °C und einer Konzentration von 5 µM eine nahezu hundertprozentige cytotoxische Aktivität auf. Im Gegensatz zu Melittin erreichte das Kontrollpeptid Alamethicin bei derselben Konzentration nur einen Wirkungsgrad von ungefähr vierzig Prozent.

Es stellte sich heraus, dass die Caenopores im Gegensatz zu den Kontrollpeptiden und anderen hier nicht getesteten SAPLIPs wie Amoebapore, NK-lysin oder Granulysin (Leippe *et al.*, 1993; Pena *et al.*, 1997; Schröder-Borm *et al.*, 2005) auch bei einer Konzentration von 5 µM unter den herrschenden Bedingungen keine oder bestenfalls kaum nachweisbare cytotoxische Aktivität gegen die Jurkat-Zellen aufwiesen. Auch nach einer Inkubationszeit von bis zu zwölf Stunden konnte keine Steigerung der Aktivität nachgewiesen werden.

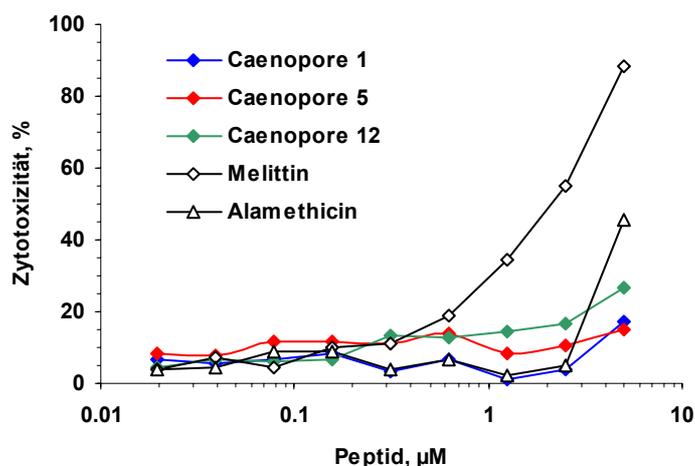


Abb. 48: Cytotoxische Aktivität der Caenopores gegen humane Jurkat-Zellen. Es wurden verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Peptids mit 5×10^5 Zellen in 20 mM MES pH 5,5 150 mM NaCl, 320 mosmol/kg für 3 h inkubiert. Dargestellt ist die cytotoxische Aktivität der Peptide in Prozent, welche sich auf die jeweilige Konzentration des Peptids bezieht. Die Messwerte entsprechen dem Mittelwert experimenteller Dreifachwerte.

2.7.5 Analyse der porenbildenden Aktivität

Der Mechanismus der membranpermeabilisierenden Aktivität der Caenopores basiert wie auch bei Amoebapore und anderen SAPLIPs auf der Ausbildung von Poren in Membranen. Die porenbildende Aktivität wurde mit Hilfe des Liposomen-Depolarisationstests ermittelt, indem ein Valinomycin-induziertes Diffusionspotential durch Porenbildung zerstört wurde. Dieses äußerte sich in einem Anstieg der Fluoreszenz des Farbstoffes 3,3'-Diethylthiodicarbo-cyaniniodid, dessen Emission bei einer Wellenlänge von 670 nm gemessen wurde (Loew *et al.*, 1983). Die Aktivität der Caenopores wurde mit der Aktivität des Kontrollpeptids Alamethicin verglichen, welches ein typisches porenbildendes antimikrobielles Peptid darstellt und dessen Mechanismus entsprechend dem „barrel stave“ Model funktioniert (Baumann *et al.*, 1974).

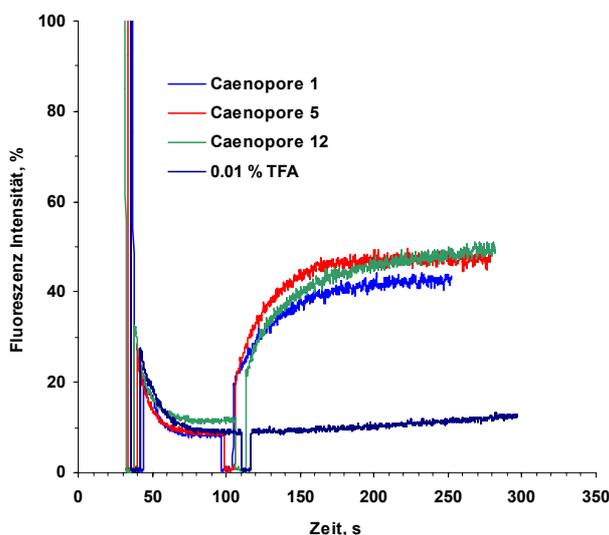


Abb. 49: Porenbildende Aktivität der Caenopores. Die Aktivität wurde im Liposomen-Depolarisationstest ermittelt. Der Anstieg der Fluoreszenz basiert auf der Auflösung eines Valinomycin-induzierten Diffusionspotentials durch die Zugabe von Caenopore 1, 5 und 12. Die Aktivität der Caenopores beträgt jeweils 30 U/nmol. Das Lösungsmittel der Peptide (0,01 % TFA) wurde als Negativkontrolle eingesetzt und zeigte keine porenbildende Aktivität. Der pH-Wert des verwendeten Küvettenpuffers betrug pH 5,2.

In Abbildung 49 wurden identische Mengen der Caenopore-Peptide eingesetzt. Jedes zeigte eine Aktivität von ca. 30 U/nmol. Dabei war ein Unit (U) als Fluoreszenz-Anstieg um fünf Prozent innerhalb einer Minute bei 25 °C definiert (Leippe *et al.*, 1991). Eine Aktivität von 30 U/nmol ist vergleichbar mit der Aktivität anderer porenbildender Peptide wie z. B. Magainin I (ca. 30 U/nmol) oder Cecropin P1 (ca. 10 U/nmol), aber sehr viel schwächer als z. B. die Aktivität der drei Amoebapore-Isoformen mit jeweils ca. 5 U/pmol (Andrä *et al.*, 2003). Dennoch gibt es Ähnlichkeiten zwischen der Aktivität der Amoebapores und den Caenopores. So ist ihre porenbildende Wirkung bei einer maximalen Aktivität um pH 5,2 auf einen sauren pH-Wert beschränkt. Andere potente porenbildende Peptide unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aktivität bei verschiedenen pH-Werten stark von den Caenopores und den Amoebapores, da sie sowohl im sauren wie auch im neutralen Bereich wirksam sind.

2.7.6 Einfluss des pH-Wertes auf Membranassoziation und porenbildende Aktivität

Abbildung 50 verdeutlicht die Abhängigkeit der Caenopore-Aktivität vom pH-Wert. Dabei wird offensichtlich, dass die porenbildende Aktivität von Caenopore 12 stärker von einem sauren Milieu abhängig ist als die Aktivität von Caenopore 5 und vor allem von Caenopore 1. Die Fähigkeit der Peptide, an die artifiziellen liposomalen Membranen zu binden, unterstreicht die Bedeutung des pH-Wertes für die Assoziation der Caenopore-Peptide mit Membranen.

In Abbildung 50 ist die Bindungskapazität der Peptide unter dem Einfluss unterschiedlicher pH-Werte dargestellt. Dabei wurden identische Mengen jedes Peptids (je 0,5 µg) mit Liposomen inkubiert, woraufhin die Membran-gebundenen Peptide im Sediment und die ungebundenen Peptide im Überstand mittels SDS-PAGE entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt wurden. Die reduzierte Bindungskapazität von Caenopore 12 und 5 bei pH 7,4 ist deutlich zu erkennen, während der Verlust der Bindungsfähigkeit beim Caenopore 1-Peptid weniger stark ausgeprägt ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Messungen der porenbildenden Aktivität im Liposomen-Depolarisationstest (Abb. 50 B).

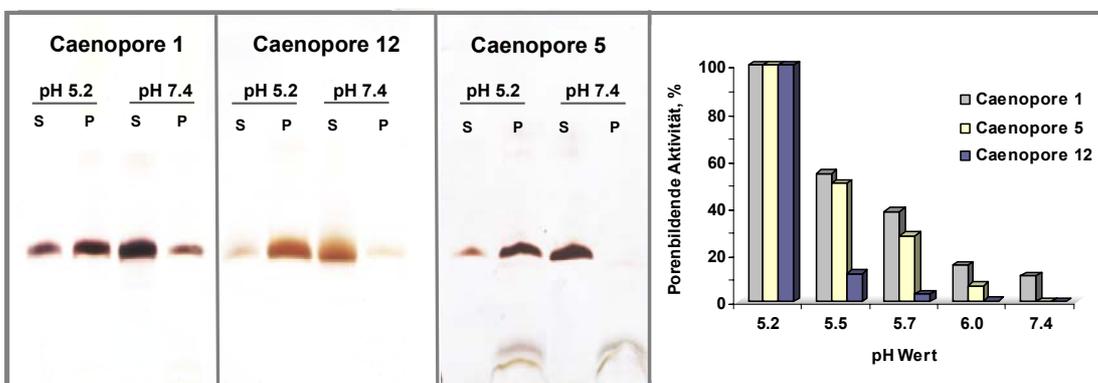


Abb. 50: Auswirkungen des pH-Wertes auf die Assoziation der Caenopores mit liposomalen Membranen und auf ihre porenbildende Aktivität. (linke Seite) Darstellung der Peptid-Liposomen-Assoziation unter sauren und neutralen Bedingungen. Gebundene Peptide (P) wurden von den ungebundenen Peptiden im Überstand (S) durch Ultrazentrifugation getrennt (~ 100.000 x g). Die Ansätze wurden reduziert (50 mM DTT). Die Darstellung der Proteine erfolgte über SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung. (rechte Seite) Porenbildende Aktivität der Caenopores. Die Messwerte bei pH 5,2 wurden als 100 % Werte eingesetzt. Die Experimente wurden in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

2.7.7 Einfluss des *HisTag* auf die porenbildende Aktivität der Caenopores

Der Liposomen-Depolarisationstest wurde des Weiteren herangezogen, um einen evtl. vorhandenen Einfluss des *HisTag* auf die Aktivität der Caenopores zu untersuchen. Um die Ansätze vergleichen zu können, wurde jeweils die gleiche Menge Peptid mit und ohne *HisTag* eingesetzt (z. B. 100 ng Caenopore 1 und 100 ng 6xHis-Caenopore 1).

Interessanterweise besaßen die sechs Histidinreste des *HisTag* einen verstärkenden Effekt auf die Aktivität von Caenopore 12, während sie bei Caenopore 1 und 5 keinen Einfluss zeigten.

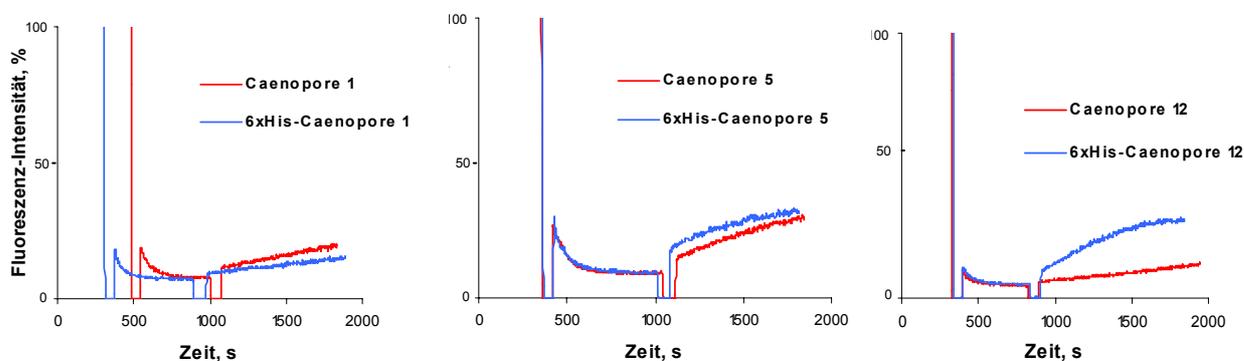


Abb. 51: Porenbildende Aktivität der Caenopores mit und ohne *HisTag*. Für die Messung der porenbildenden Aktivität wurden jeweils gleiche Mengen der geschnittenen und ungeschnittenen rekombinant synthetisierten Caenopores eingesetzt. Die Messungen wurden in zwei unabhängigen Experimenten und jeweils bei pH 5,2 durchgeführt.

2.7.8 Analyse der Primärstruktur der Caenopores in Bezug auf die pH-abhängige Aktivität

Die Analyse der Primärstruktur der Caenopores ergab, wie bereits angesprochen, das Bild hydrophiler Peptide mit relativ vielen geladenen, mehr oder weniger gleich verteilten Aminosäureresten. Caenopore 12 besitzt im Vergleich zu Caenopore 1 und 5 einen erhöhten Anteil negativ geladener Aminosäurereste, welche gleichmäßig über das Peptid verteilt sind. Basierend auf der Primärstruktur und mit Hilfe des Programms *ProtParam* (Gasteiger *et al.*, 2003) konnte für *spp-12* ein pI-Wert berechnet werden, der mit 4,46 deutlich geringer war, als die pI-Werte der anderen Caenopores. Während Caenopore 5 einen Wert von 5,88 aufweist, liegt der pI-Wert von Caenopore 1 mit 5,09 ungefähr zwischen den beiden anderen Caenopores.

Abbildung 52 zeigt einen Sequenz-Vergleich der Primärstrukturen der Caenopores und ausgewählter Saposine bzw. Saposin-ähnlicher Proteine anderer Tierstämme. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm *ClustalW* durchgeführt.

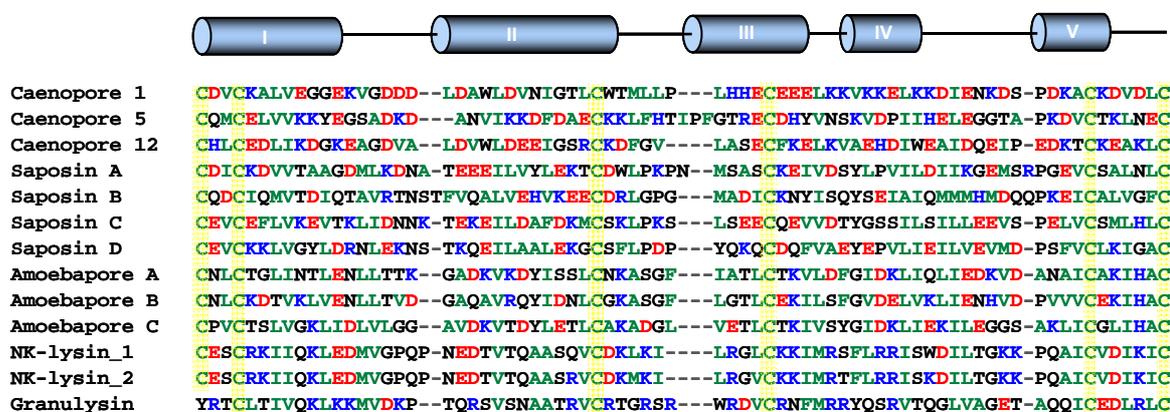


Abb. 52: Sequenzvergleich der Primärstrukturen ausgewählter Caenopores und anderer Saposin-ähnlicher Proteine. Oben: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur mit den fünf α -Helices (I-V). Unten: Sequenzvergleich der Primärstruktur: Die sechs konservierten Cysteinreste wurden gelb hinterlegt. Anionische, negativ geladene Aminosäurereste wurden in rot, kationische, positiv geladene Aminosäurereste in blau und hydrophobe Aminosäurereste in grün dargestellt.

Caenopore 5 zeigt ähnlich wie Caenopore 12, eine relativ gleichmäßige Verteilung positiv oder negativ geladener Aminosäurereste, ohne einzelne, geladene Regionen auszubilden. Allerdings ist die Verteilung der positiv bzw. negativ geladenen Aminosäuren, verglichen mit Caenopore 12, ausgeglichener. Caenopore 5 weist in etwa dieselbe Anzahl positiv und negativ geladener Aminosäurereste auf und ähnelt damit dem Amoebapore A, das ebenfalls eine ausgeglichene Ladungsverteilung aufweist.

In der Primärstruktur von Caenopore 1 wechseln sich stark geladene Regionen mit jeweils negativer oder positiver Ladung ab. Die N-terminale Hälfte des Peptids ist bis auf eine Häufung positiv geladener Aminosäurereste - je zwei Histidin- und Lysinreste liegen N-terminal des ersten Cysteinrestes - relativ negativ geladen. Sie verfügt über eine erhöhte Anzahl von Asparaginsäureresten, während sich in der C-terminalen Hälfte des Peptids Aminosäurereste mit positiver und negativer Ladung abwechseln. In Helix III, um den vierten der konservierten Cysteinreste herum und direkt C-terminal eines hydrophoben Bereiches, liegen in einer kurzen aber sehr negativ geladenen Region vier Glutaminsäurereste direkt hintereinander. Über solche Anhäufungen von Glutaminsäureresten, die mit der Assoziation an die Membran in Verbindung gebracht werden, verfügt auch Saposin C (deAlba *et al.*, 2003). Dieser negativ geladenen Region schließt sich eine Folge von sechs Lysinresten an (-KKVKKELKK-), welche Helix IV zu einer sehr positiven Ladung verhelfen.

Die eingangs erwähnte hydrophobe Region im Mittelteil des Peptids unterscheidet den Charakter von Caenopore 1 deutlich von Caenopore 5 und 12 (Abb. 53), aber auch von anderen SAPLIPs wie Amoebapore A oder Granulysin.

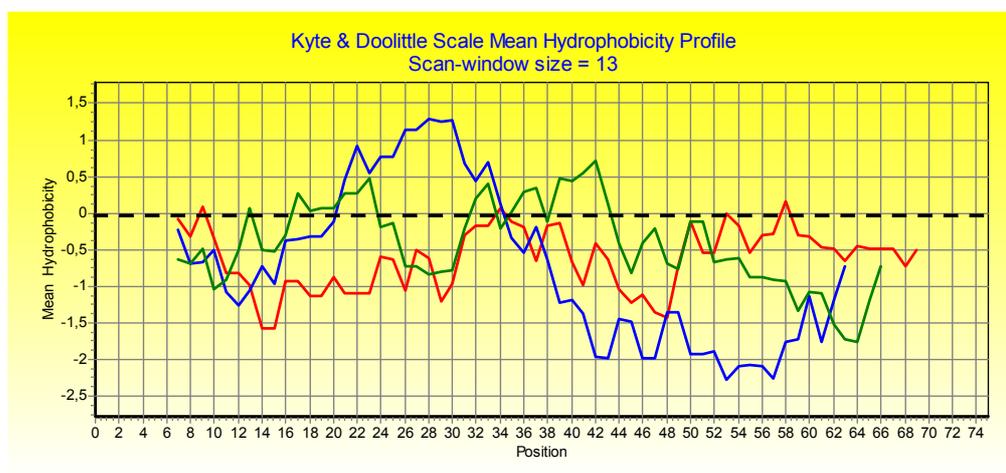


Abb. 53: Hydrophobizitäts-Profil von Caenopore 1, 5 und 12. Das Profil wurde nach Kyte und Doolittle (1982) erstellt. Dargestellt ist jeweils der gesamte Bereich der SAPLIP-Domäne. Die Werte der Ordinate stellen die hydrophoben Bereiche dar (positive Werte = hydrophobe Bereiche, negative Werte = hydrophile Bereiche). Die Abszisse zeigt die Position der Aminosäurereste an. Caenopore 1 (blau), Caenopore 5 (rot), Caenopore 12 (grün).

2.7.9 Darstellung oligomerer Formen von Caenopore 1 und 5

Während rekombinant synthetisierte Caenopore 5-Peptide ausschließlich in rein monomerer Form vorlag, wiesen die rekombinant synthetisierten Peptide Caenopore 1 und 12 sogar stabile Di- und Oligomere auf. Diese höhermolekularen Aggregate, die während der SDS-PAGE stabil blieben, widerstanden auch der Inkubation mit Harnstoff oder Guanidin-Hydrochlorid sowie der Denaturierung durch Hitze (Abschnitt 7.11.3). Um die Frage zu beantworten, ob Caenopore 5 in Lösung ebenfalls Aggregate ausbildet, die dann während der SDS-PAGE zerfallen, wurden die Peptide mit EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] Carbodiimid) unter sauren Bedingungen chemisch kreuz vernetzt.

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE zeigte sich, dass Caenopore 5 in Lösung keine Aggregate ausbildete, während Caenopore 1 weiterhin Di- und Oligomere aufwies (Abb. 54).

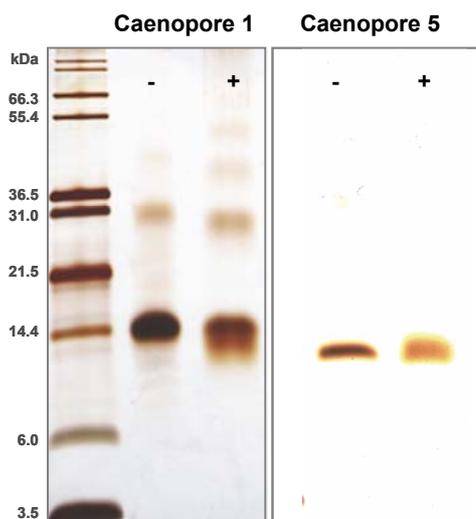


Abb. 54: Oligomerisierung von Caenopore 1 und Caenopore 5 in Lösung. In jedem Ansatz wurden jeweils 0,5 µg Peptid (+) mit und (-) ohne EDC bei pH 5,2 behandelt und anschließend in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Silberfärbung). Protein-Größenstandard: Mark12 unstained standard (Invitrogen). Die molekularen Massen der Eichproteine (links) sind in kDa dargestellt.

Um zu analysieren, ob Caenopore 5 in Anwesenheit liposomaler Membranen zur Aggregation fähig ist, wurden die Peptide zusammen mit Liposomen inkubiert. Im Anschluss daran wurden sie mittels DSP (Dithiobis-(succinylpropional)) chemisch kreuzvernetzt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Inkubation der Peptide zusammen mit den Membranen wurde unter sauren sowie unter neutralen Bedingungen durchgeführt. Die Annahme, dass Caenopore 1-Peptide an liposomalen Membranen Aggregate bildete, wurde bestätigt (Abb. 55). Die Aggregation fand sowohl unter sauren als auch unter neutralen Bedingungen statt, wobei die Bindung von Caenopore 1 an die Liposomen bei pH 7,4 reduziert war (Abb. 55).

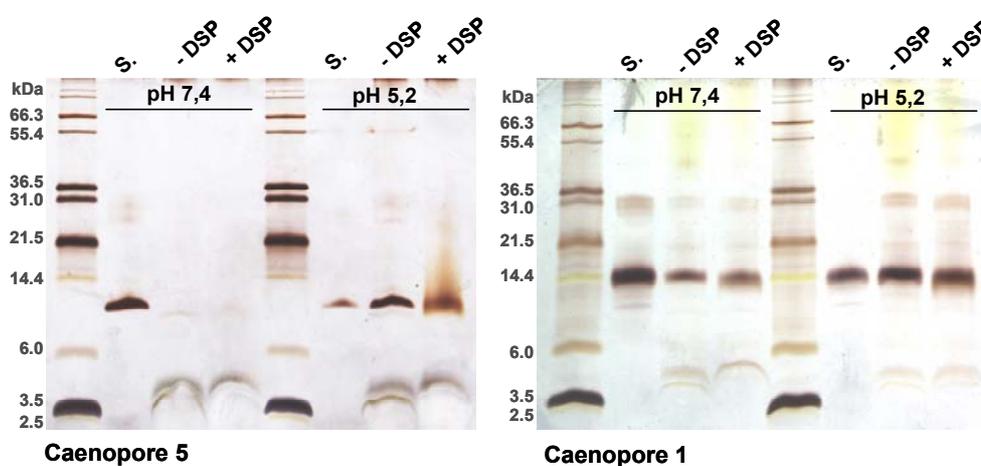


Abb. 55: (S.) ungebundene Peptide, (-DSP/+DSP) membrangebundene Peptide mit (+) oder ohne (-) Kreuzvernetzung mit DSP. Vor der Analyse mittels SDS-PAGE und Silberfärbung wurden die Caenopore 1 enthaltenden Ansätze mit DTT reduziert, während die Caenopore 5-Fractionen nicht reduziert wurden.

Während Caenopore 1 auch in Anwesenheit der liposomalen Membranen Aggregate bildete, konnte bei Caenopore 5 keine Oligomerisierung beobachtet werden (Abb. 55). Unter neutralen Bedingungen (pH 7,4) blieb die Bindung von Caenopore 5 an die Membranen vollständig aus, während die Membran-Assoziation bei pH 5,2 sehr ausgeprägt war. Die pH-abhängige Bindung an Membranen wurde in diesen Experimenten bestätigt.

3 DISKUSSION

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren ist in *C. elegans* noch immer wenig über Rezeptoren und Signaltransduktionswege bekannt, die in seinem Immunsystem eine Rolle spielen könnten. Unzweifelhaft ist, dass *C. elegans* trotz des Fehlens von Faktoren, die in der Immunantwort anderer Tiere eine überaus wichtige Rolle spielen, ein effektives Immunsystem besitzt. Zu diesen Faktoren zählt auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B (Pujol *et al.*, 2001), der durch seine Aktivität eine Schlüsselposition innerhalb des Immunsystems der meisten Vielzeller besitzt und u. a. die zelluläre Antwort auf Kontakt zu Bakterien vermittelt. Obwohl dieser Faktor in den meisten Organismen eine sehr wichtige Rolle spielt scheinen einige Tiere, wie eben *C. elegans* oder auch der Süßwasserpolyt *Hydra*, eine Möglichkeit gefunden zu haben ohne ihn ein funktionierendes Immunsystem aufrecht-erhalten zu können (Miller und Hemmrich, 2007). Ebenso herrscht immer noch weitestgehende Unklarheit darüber, wie *C. elegans* pathogene Mikroorganismen wahrnimmt. So gibt es Hinweise darauf, dass der in anderen Organismen so wichtige TOL-1-Rezeptor in *C. elegans* bei der Abwehr von Bakterien und Pilzen keine direkte Rolle spielt, sondern dass er Verhaltensweisen vermittelt, die es *C. elegans* ermöglichen den Kontakt zu Pathogenen zu vermeiden (Pujol *et al.*, 2001; Aballay *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu den Rezeptoren, über die nur wenig bekannt ist, verfügt *C. elegans* vermutlich über eine Reihe verschiedener Effektoren, darunter sog. antimikrobielle Peptide, die für die Abwehr von Pathogenen zuständig sind. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, besitzt *C. elegans* eine, im Vergleich zu anderen Organismen, sehr umfangreiche Familie antimikrobieller Peptide, die aus mindestens 23 Mitgliedern besteht. Die Gene, die für diese Peptide kodieren werden als *spp* (*Saposin-like protein*) bzw. als Caenopore-kodierende Gene, die Peptide selbst werden hier als Caenopores bezeichnet. Wie *C. elegans* verfügen auch die *C. elegans*-Schwesterarten *Caenorhabditis briggsae* und *Caenorhabditis remanei* über orthologe Gene und damit wahrscheinlich über ein vergleichbar umfangreiches Arsenal Caenopore-ähnlicher Peptide. Die Caenopores können aufgrund ihrer Struktur den Saposin-ähnlichen Proteinen zugeordnet werden, die sich durch sechs Cysteinreste an konservierten Positionen sowie eine rein α -helicale Sekundärstruktur mit fünf α -Helices auszeichnen. Prominente Mitglieder dieser Proteinfamilie sind u. a. die *Amoebapores* aus *Entamoeba histolytica*, das NK-lysin des Schweins und das humane Granulysin, welche sich jeweils durch eine potente antimikrobielle und cytolytische Aktivität ausweisen.

Nicht alle Gene der *spp*-Genfamilie kodieren für Peptide, die der „klassischen“ Struktur der SAPLIP-Domäne entsprechen. Zu diesen „klassischen“ SAPLIPs können die Caenopores gezählt werden, die der Amöbapore-ähnlichen Struktur entsprechend eine SAPLIP-Domäne besitzen, die direkt auf ein N-terminales Signalpeptid folgt. Dazu zählen auch die fünf Peptide, die „noch“ nicht der Genfamilie zugerechnet werden und somit nicht den Gennamen *spp* tragen (Tabelle 1). Eine andere Struktur weisen die Caenopore-Peptide auf, die Ähnlichkeit zu den Naegleriapores aus *Naegleria fowleri* zeigen. Diese Peptide verfügen über mehr als eine SAPLIP-Domäne, wobei die einzelnen Domänen nur über kurze Proteinsequenzen voneinander getrennt sind. Es ist nicht auszuschließen, dass die entsprechenden Gene für Propeptide kodieren, die, ähnlich den Naegleriapores, posttranslational gespalten werden, sodass mehrere einzelne Peptide entstehen (Herbst *et al.*, 2002). Ein vergleichbarer Vorgang wurde ebenfalls für die antimikrobiell aktiven Magainin-Peptide von *Xenopus laevis* gezeigt. Aus einem Vorläufermolekül entstehen hier durch Prozessierung insgesamt sechs Magainin-Peptide, die auf der Haut des Frosches antibakterielle Aktivität aufweisen und Infektionen verhindern (Terry *et al.*, 1988; Ludtke *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997). Ob die entsprechenden Caenopores ihre Funktion als unprozessierte Proteine ausüben oder ob die einzelnen SAPLIP-Domänen voneinander getrennt werden und ob diese so entstandenen Peptide *in vivo* über antimikrobielle Aktivität verfügen ist nicht bekannt. Diejenigen Caenopore-Peptide, die neben den SAPLIP-Domänen zusätzliche, umfangreiche Abschnitte aufweisen, können schwerlich als „klassische“ Saposin-ähnliche Peptide bezeichnet werden, da entsprechende Peptide in anderen Tierarten bis heute nicht identifiziert wurden. Des Weiteren ist unbekannt, ob die SAPLIP-Domänen dieser Caenopores posttranslational abgespalten werden und ob sie eine Funktion in *C. elegans* besitzen, die der Abwehr von Pathogenen zuzuordnen ist. Ein gutes Beispiel für Proteine, die große strukturelle Übereinstimmungen zu den antimikrobiellen SAPLIPs aufweisen und doch anderweitige Funktionen ausüben sind die namensgebenden Saposine. Sie spielen als Kofaktoren im Sphingolipid-Stoffwechsel von Eukaryoten eine bedeutende Rolle, verfügen aber über keinerlei antimikrobielle Aktivität (Tamaru *et al.*, 1986; Paton *et al.*, 1990; O'Brian und Kishimoto, 1991).

Addiert man die SAPLIP-Domänen der Caenopore-Peptide mit „klassischer“, Amöbapore-ähnlichen Struktur, kommt man auf eine Anzahl von 15 SAPLIPs, wobei die Naegleriapore-ähnlichen Peptide zusätzlich neun SAPLIP-Domänen aufweisen, die ebenfalls über antimikrobielle Aktivität verfügen könnten. Damit ergäbe sich ein Arsenal von 24 einzelnen Peptiden, wobei bis heute unbekannt ist, ob jedes der Peptide über antimikrobielle Aktivität verfügt. Geht man davon aus, dass auch die Gene dazu zu zählen sind, die bis heute nicht als SAPLIP-kodierende Gene definiert wurden, erhöht sich die Zahl auf 29 Peptide. Dabei

wurden die fünf Caenopore-kodierenden Gene, deren primäre Translationsprodukte vom „klassischen“ Schema der SAPLIPs abweichen, nicht berücksichtigt. Es ist des Weiteren nicht bekannt, ob jede der SAPLIP-Domänen antimikrobielle Aktivität bzw. ein spezifisches Zielzellspektrum besitzt oder ob die Caenopores sich gegenseitig ergänzen und so einen Teil des Immunsystems von *C. elegans* darstellen.

Da die meisten anderen Organismen über weit weniger umfangreiche Genfamilien verfügen, die für Saposin-ähnliche Proteine kodieren, war anzunehmen, dass die Gene von einem oder wenigen phylogenetisch ursprünglichen Genen abstammen und sich im Laufe der Evolution über Duplikation vermehrt haben. Eine phylogenetische Analyse der Gene stellte sich aufgrund der großen Heterogenität der Nukleotidsequenzen als schwierig heraus und auch die Promotoren gaben aufgrund geringer Konservierung keinen weiteren Aufschluss über die Phylogenie der Gene. Obwohl einige Gene, die in *clustern* im Genom vorliegen, über relativ kurze, konservierte Promotor-Abschnitte verfügen, war die Diversität insgesamt doch erstaunlich groß. Vor dem Hintergrund aber, dass die Caenopore-kodierenden Gene sehr unterschiedlich reguliert (Murphy *et al.*, 2003; Kurz und Tan, 2004) bzw. einige von ihnen vermutlich konstitutiv exprimiert werden, schien diese Heterogenität weniger beachtlich. Analysen der Promotoren hinsichtlich konservierter Transkriptionsfaktorbindungsstellen ergaben aber, dass die meisten der Gene in ihrer Promotorregion eine kurze, für den Transkriptionsfaktor ELT-2 spezifische Sequenz aufweisen. Diese Sequenz wurde von McGhee *et al.* 2007 bei der Analyse darmspezifisch exprimierter Gene in einem Großteil aller analysierten Gene nachgewiesen und somit liegt die Vermutung nahe, dass auch die Caenopore-kodierenden Gene für darmspezifische bzw. im Darmepithel angereicherte Peptide kodieren. Interessanterweise verfügen die Promotoren einiger Gene, zu denen auch *spp-12* zählt, nicht über eine entsprechende ELT-2-Bindungssequenz und so bleibt die Frage nach der Regulation dieser Gene sowie nach der Lokalisation und der Funktion der entsprechenden Genprodukte in *C. elegans* offen.

Die im Zuge dieser Arbeit durchgeführten Transkriptionsanalysen ergaben, dass die Transkription der drei ausgewählten Gene *spp-1*, *spp-5* und *spp-12* zwar in Darmzellen stattfindet, aber nicht ausschließlich auf die Darmzellen beschränkt ist. Während die Transkriptionsrate von *spp-1* und *spp-5* in Darm- und „Nicht-Darmzellen“ in etwa gleich verteilt ist, überwiegt die Anzahl der Transkripte von *spp-12* in den „Nicht-Darmzellen“ deutlich. Neben dem Darm stehen auch andere Organe und Strukturen von *C. elegans*, wie z. B. der Pharynx oder die von der Cuticula bedeckte Hypodermis, in engem Kontakt zu den Mikroorganismen der Umgebung und nicht immer gelingt es den Tieren eine Infektion mit potentiellen Pathogenen zu vermeiden. Ein Beispiel dafür ist die Infektionen

mit den pathogenen Bakterien der Spezies *Yersinia pestis*, die um den Kopf der Nematoden einen Biofilm ausbilden und somit die Nahrungsaufnahme unterbinden (Darby *et al.*, 2002). Ein anderes Beispiel ist das Nematoden-spezifische bakterielle Pathogen *Microbacterium nematophilum*, welches das Rektum der Würmer kolonisiert und dort eine Infektion verursacht (Yook und Hodgkin, 2006). Die Gegenwart und die Wirkung antimikrobieller Peptide ist also auch in anderen Geweben als dem Darmepithel von *C. elegans* von großer Bedeutung.

Es bleibt die Frage, wie *C. elegans* auf potentielle Pathogene reagiert und ob er in der Lage ist, eingedrungene Bakterien zu erkennen und zu eliminieren, bevor sie eine Infektion verursachen. Experimente, die von Dr. T. Roeder (jetzt Zool. Institut, CAU Kiel) durchgeführt wurden, wiesen jedoch darauf hin, dass *C. elegans* in der Lage ist, eingedrungene Bakterien zu erkennen und auf sie zu reagieren. Dafür wurden inaktivierte *gfp*-exprimierende *E. coli*-Bakterien mittels Mikroinjektion in den anterioren Teil der Leibeshöhle injiziert. Die Injektion der Bakterien führte in keinem Fall zum Tod eines Tieres und darüber hinaus waren an der Einstichstelle nach 24 Stunden keine Bakterien mehr zu erkennen, während die Fluoreszenz der *gfp*-exprimierenden Bakterien sich an einigen distinkten Stellen sammelte (T. Roeder, pers. Kommunikation). Anhand vergleichender Analysen hinsichtlich der Anatomie von *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass an den beobachteten Stellen die sog. Coelomocyten lokalisiert sind. Wie schon in Abschnitt 1.4 erwähnt, besitzt jeder adulte Hermaphrodit sechs dieser Zellen, die locker im umliegenden Gewebe positioniert sind. Da ihre Funktion weitgehend unbekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Coelomocyten von *C. elegans* u. a. als phagocytotisch aktive Zellen tätig sind, wie es bereits für die Coelomocyten anderer Nematoden-Spezies vorgeschlagen wurde (Chitwood und Chitwood, 1950; Bolla *et al.*, 1972; Fares und Greenwald, 2001). Eine solche phagocytotische Aktivität erforderte die Existenz spezifischer Faktoren wie z. B. Proteasen, Lysozyme oder antimikrobielle Peptide in den Zellen, die das Abtöten und den Abbau der phagocytierten Bakterien vermitteln. Die Möglichkeit, dass auch Caenopore-Peptide in den Coelomocyten lokalisiert sind kann somit nicht ausgeschlossen werden und böte eine Erklärung für die nachgewiesene Transkription der Caenopore-kodierenden Gene außerhalb der Zellen des Darmepithels.

Während die Transkription von *spp-1* und *spp-12* über einen spezifischen Signaltransduktionsweg reguliert wird (Murphy *et al.*, 2003), ist die Transkription von *spp-5* in den Zellen des Darmepithels konstitutiv und auch nicht durch den Kontakt zu pathogenen Bakterien induzierbar. Zu diesem Ergebnis führten Virtual-Northern-blot-Experimente nach der Methode von Franz *et al.*, 1999, die von Dr. I. Bruchhaus am Bernhard-Nocht-Institut,

Hamburg durchgeführt wurden. Andere Experimente, in denen sowohl inaktivierte *E. coli*-Bakterien als auch gereinigtes LPS direkt in die Würmer injiziert wurden, wiesen dagegen darauf hin, dass die Transkription des Caenopore 5-kodierenden Gens induziert werden kann. Es ist somit nicht auszuschließen, dass das Gen durch das Eindringen pathogener Mikroorganismen oder deren Bestandteile in die Körperhöhle von *C. elegans* aktiviert wird, während ein Kontakt zu dem gleichen Pathogen ohne nachfolgende Infektion keine Erhöhung der Transkriptionsrate nach sich zieht. Die Beobachtung, dass ältere *C. elegans*-Stadien eine geringere Resistenz gegen bakterielle Infektionen aufweisen als jüngere Tiere (Kurz *et al.*, 2003; Kurz und Tan, 2004; Laws *et al.*, 2004) und dass der Anteil überlebender und proliferierender Bakterien im Darm sowie im Pharynx bei älteren Tieren zunimmt (Garigan *et al.*, 2002), wirft die Frage auf, ob die Expression antimikrobieller Peptide mit fortschreitendem Alter der Tiere abnimmt. Die Ergebnisse der Transkriptionsanalyse in verschiedenen Entwicklungs-Stadien von *C. elegans* zeigten aber, dass die Transkriptionsrate der getesteten Gene in allen Stadien relativ gleich verteilt und in adulten Tieren nicht erhöht war. Die verringerte Resistenz älterer Tiere könnte so, wie vielfach beschrieben, auf die Abnutzung des *grinders* zurückzuführen sein (Albertson und Thomson, 1976; Labrousse *et al.*, 2000), so dass mehr Bakterien lebend den Darm erreichen, oder *C. elegans* verfügt über andere antimikrobielle Peptide, deren altersabhängiger Rückgang die erhöhte Anfälligkeit erklären könnte.

Die bereits erwähnte Induzierbarkeit der Gene *spp-1* und *spp-12* über den Transkriptionsfaktor DAF-16 (Murphy *et al.*, 2003) ließ auf einen gewissen Konservierungsgrad der Promotoren in beiden Genen schließen, was aber mit den verwendeten Analyse-Methoden nicht nachweisbar war. Die Aktivierung der Gene durch den Transkriptionsfaktor DAF-16, der u. a. in der Regulation der Lebenslänge von *C. elegans* eine entscheidende Rolle spielt, führte zu der Annahme, dass antimikrobielle Peptide wie Caenopores oder Lysozyme – die Transkription der Gene *lys-7* und *lys-8* wird ebenfalls durch die Bindung von DAF-16 aktiviert - im Alterungsprozess der Nematoden eingebunden sind. Schon länger ist bekannt, dass sich der Alterungsprozess von *C. elegans* durch den Verlust des *daf-2*-Gens verlangsamt wird (Guarente und Kenyon, 2000), indem die Aktivierung DAF-16-abhängiger Gene ermöglicht wird. Tiere, denen der DAF-2-Rezeptor fehlt, weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber vielfältigen äußeren Einflüssen wie Hitze, UV-Licht oder Schwermetall-Belastung (Dorman *et al.*, 1995; Guarente und Kenyon, 2000; Finch und Ruvkun, 2001; Nelson und Padgett, 2003; Tatar *et al.*, 2003) sowie gegen bakterielle Infektionen durch *P. aeruginosa*, *E. faecalis* oder *S. aureus* auf (Garsin *et al.*, 2003). Ergebnisse von Mallo *et al.*, 2002 und Murphy *et al.*, 2003 unterstützen die Hypothese, dass der IGF-(insulin-like receptor)-Signal-

transduktionsweg, in dem sowohl der DAF-2-Rezeptor als auch der Transkriptionsfaktor DAF-16 jeweils eine entscheidende Position einnehmen, ein Bestandteil des Immunsystems von *C. elegans* sein muss. Diese Arbeiten zeigten, dass die Transkription der Lysozym-kodierenden Gene *lys-7* und *lys-8* sowohl durch DAF-16 als auch durch den Kontakt zu dem Pathogen *S. marcescens* induziert wurde. Ähnliches könnte somit auch für die Caenopore-kodierenden Gene gelten. Die antimikrobiellen Peptide Caenopore 1 und 12 könnten somit die Resistenz gegenüber Pathogenen steigern und dadurch, in Kombination mit anderen Stress vermindernenden Faktoren, ebenfalls zu einer längeren Lebensdauer beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Caenopore 1, 5 und 12, Vertreter der „klassischen“ Amoebapore-ähnlichen Struktur, ausgewählt und hinsichtlich ihrer Aktivität charakterisiert. Die Möglichkeit, die Caenopore-Peptide rekombinant in *E. coli*-Bakterien zu synthetisieren, ließ die detaillierte Aktivitäts-Analyse der Caenopores in *In-vitro*-Experimenten zu. Mit der Untersuchung der Aktivität gegen unterschiedliche Organismen wie Bakterien, Pilze und Amöben wurde das Zielzellspektrum der Caenopores charakterisiert. Die Untersuchungen sollte Aufschluss darüber geben, ob die Caenopore-Peptide ausschließlich bei der Ernährung von *C. elegans* eine Rolle spielen oder ob sie ebenso an der Abwehr von Pathogenen und damit an seiner Immunität beteiligt sind. Mit Hilfe der Aktivitätsmessung konnte eine membranpermeabilisierende Aktivität sowohl gegen Bakterien, gegen frei im Boden lebende Amöben des Stammes *Dictyostelium discoideum* als auch gegen die harmlosen bzw. potentiell pathogenen Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* nachgewiesen werden. Die Aktivität gegen *C. albicans* könnte dafür sprechen, dass *C. elegans* nicht nur harmlose Organismen, sondern auch potentiell pathogene Mikroorganismen abtöten kann und sich so vor einer Infektion schützt. Dieses könnte also, dafür sprechen, dass die Caenopores nicht nur der Futtermittelverwertung dienen, sondern ebenso an der Immunabwehr von *C. elegans* beteiligt sind. Um zusätzlich zu den Amöben noch weitere eukaryotische Zellen hinsichtlich einer cytotoxischen Aktivität zu testen, wurden die humanen Jurkat T-Zellen eingesetzt. Eine cytotoxische Aktivität der Caenopores gegen diese Säugerzellen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Da die Caenopores sowohl gegen Bakterien und Amöben als auch gegen Hefezellen aktiv sind, während die Zellen der humanen Jurkat T-Zelllinie nicht beeinträchtigt wurden, ist von einer gewissen Präferenz für bestimmte Phospholipidzusammensetzungen der Zielzellmembranen auszugehen, die allerdings in dieser Arbeit nicht näher charakterisiert wurde. Wie erwartet basierte die membranpermeabilisierende Aktivität der Caenopores auf dem Mechanismus der Porenbildung, auf den im weiteren Verlauf noch detailliert eingegangen werden soll.

Durch einen direkten Vergleich in *In-vitro*-Experimenten sollte gezeigt werden, ob die antimikrobielle Aktivität der natürlichen Caenopores aus *C. elegans* mit der Aktivität der rekombinant synthetisierten Caenopores vergleichbar ist. Der Ansatz, natürliche Caenopores über verschiedene chromatographische Systeme in Kombination mit Aktivitätsmessungen und immunologischen Methoden aus *C. elegans* zu isolieren, blieb aber ergebnislos, obwohl porenbildende Aktivität direkt im *C. elegans*-Extrakt sowie nach der Reinigung auch in einzelnen Proteinfractionen nachgewiesen werden konnte. In den anschließenden Immunoblots, in denen anti-Caenopore-Antiseren eingesetzt wurden, konnte kein Protein der entsprechenden molekularen Masse nachgewiesen werden. Dabei ist nicht auszuschließen, dass die verwendeten Antiseren nicht über die Kapazität zur Bindung der natürlichen Caenopores verfügten, obwohl die Antigenität der zwei ausgewählten Caenopores sich stark unterschied und das entsprechende Antiserum sehr spezifisch nur das jeweilige rekombinant synthetisierte Caenopore band, das als Antigen während der Immunisierung der Kaninchen eingesetzt wurde. Eine weitere Erklärung wäre, dass die Konzentration der natürlichen Caenopore-Peptide in *C. elegans* sehr gering ist, und so die Peptide mit den verwendeten Methoden nicht identifiziert werden konnten. Für diese Überlegung sprächen auch die Ergebnisse der Aktivitätstests, in denen jeweils schon eine sehr geringe Peptid-Konzentration ausreicht, um die entsprechenden bakteriellen oder eukaryotischen Zellen zu permeabilisieren.

Durch die Möglichkeit, die Caenopore-Peptide rekombinant zu synthetisieren konnte nicht nur die antimikrobielle Aktivität nachgewiesen werden, sondern es war möglich Informationen über die Tertiärstruktur von Caenopore 5 zu erhalten. Erste Hinweise darauf wurden durch den Einsatz von 15 mg Caenopore 5-Fusionsprotein ermöglicht, welches im Zuge meiner Arbeit in *E. coli*-Bakterien rekombinant synthetisiert wurde. Diese ersten NMR-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit J. Grötzinger (Biochem. Inst. CAU Kiel) durchgeführt. Basierend auf den ersten Vorversuchen, dem spp-5/pIVEX2.4a-Expressionsvektor und dem in Abschnitt 7.9.1 dargestellten Protokoll zur Caenopore 5-Synthese konnte schließlich die Caenopore 5-Tertiärstruktur von Dr. J. Myśliwy (Biochemisches Institut, CAU Kiel) über NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden (Myśliwy, 2007). Wie erwartet werden die charakteristischen fünf α -Helices über drei Disulfidbrücken stabilisiert, die jeweils zwischen den sechs konservierten Cysteinresten der SAPLIP-Domäne ausgebildet werden.

Die fünf α -Helices sind meist durch kurze Schlaufen (*loops*) miteinander verbunden und beziehen die Aminosäurereste an folgenden Positionen mit ein: Helix I (Ser₅ - Gly₁₈), Helix II (Ala₂₄ - Lys₃₇), Helix III (Gly₄₅ - Val₅₃), Helix IV (Lys₅₆ - His₆₂), Helix V (Asp₇₂ - Leu₇₇). Ein Schema der Tertiärstruktur von Caenopore 5 ist in Abbildung 56 dargestellt.

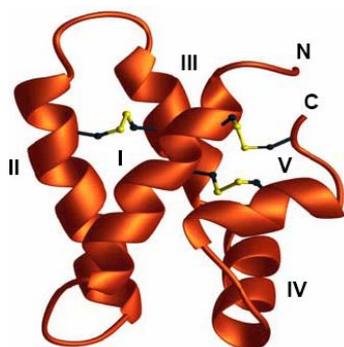


Abb. 56: Darstellung der Tertiärstruktur von Caenopore 5. Die fünf α -Helices (rot) werden über die drei Disulfidbrückenbindungen (gelb) stabilisiert. N und C bezeichnen den N- bzw. C-Terminus, die Nummern I bis V kennzeichnen die fünf α -Helices. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Justyna Myśliwy (Biochemisches Institut, CAU Kiel) zur Verfügung gestellt (Myśliwy, 2007).

Die Struktur weist einen hohen Konservierungsgrad zu den in Abbildung 57 dargestellten Tertiärstrukturen anderer bekannter SAPLIPs wie Amoebapore A, NK-lysin und Granulysin auf (Liepinsh *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2003; Hecht *et al.*, 2004).

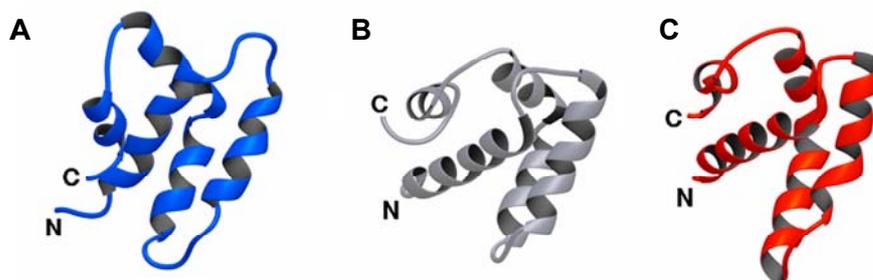


Abb. 57: Schematische Darstellung der Tertiärstruktur von Amoebapore A, NK-lysin und Granulysin. N und C bezeichnen den N- bzw. C-Terminus, die Nummern I bis V kennzeichnen die fünf α -Helices. Die Disulfidbrücken wurden nicht dargestellt. (A) Amoebapore A, (B) NK-lysin, (C) Granulysin. Abbildung nach Hecht *et al.* 2004

Die in Abbildung 58 gezeigte relativ schwache aber gleichmäßige Ladungsverteilung auf der dem Lösungsmittel zugewandten Oberfläche von Caenopore 5 erinnert ebenfalls an Amoebapore A. Im Gegensatz dazu wird die Oberflächen-Ladung von Granulysin und NK-lysin stark von positiven und die des Saposin A von negativen Ladungen dominiert (Abb. 58).

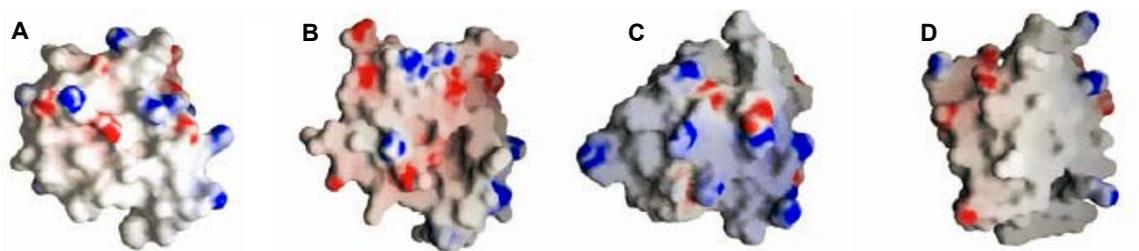


Abb. 58: Darstellung der Ladungsverteilung ausgewählter SAPLIPs. Darstellung des elektrostatischen Potentials auf der Oberfläche. Positiv geladene Bereiche wurden in blau, negative Bereiche in rot dargestellt. (A) Caenopore 5 (B) Saposin A (C) NK-lysin (D) Amoebapore A. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Justyna Myśliwy (CAU Kiel) zur Verfügung gestellt (Myśliwy, 2007).

Hinsichtlich der Ladungsverteilung oberflächennaher Aminosäurereste weist Caenopore 5 also die stärkste Ähnlichkeit zum antimikrobiellen Amoebapore A auf. Vergleicht man aber innerhalb der Tertiärstruktur die Ausrichtung der α -Helices von Caenopore 5 mit NK-lysin, Granulysin, Amoebapore A, Saposin A, B und C ergibt sich die größte Übereinstimmung zwischen Caenopore 5 und Saposin A und C. Sowohl zu Saposin B (hier nicht dargestellt) als auch zu Amoebapore A, NK-lysin und ebenso zu Granulysin ergeben sich größere Abweichungen (Abb. 59 A-C).

Trotz dieser Ähnlichkeit zu Saposin A und C verfügt Caenopore 5, wie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, über antimikrobielle Aktivität, die mit der von Amoebapore A, NK-lysin und Granulysin vergleichbar ist.

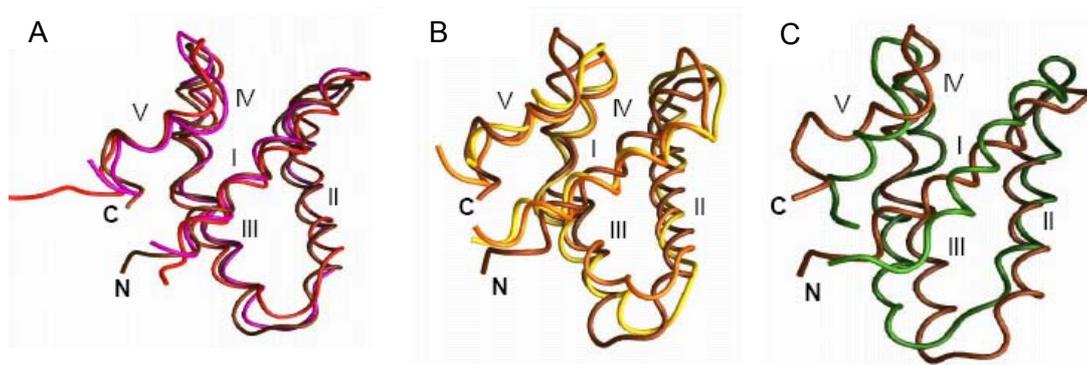


Abb. 59: Überlagerte Darstellung der Tertiärstrukturen verschiedener Saposin-ähnlicher Proteine. (A) Caenopore 5 (braun), Saposin A (rosa), Saposin C (rot) (B) Caenopore 5 (braun), NK-lysin (orange), Granulysin (gelb) (C) Caenopore 5 (braun), Amoebapore A (grün). N und C bezeichnen den N- bzw. C-Terminus, die römischen Ziffern I bis V kennzeichnen die fünf α -Helices. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Justyna Myśliwy (Biochem. Institut, CAU Kiel) zur Verfügung gestellt.

Caenopore 5 verfügt also neben den sechs konservierten Cysteinresten auch über die für die SAPLIPs charakteristische Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur, eine Oberflächenladung, die mit der von *Amoebapore* vergleichbar ist und eine Ausrichtung der α -Helices, die sie den Saposinen ähneln lässt. Es stellt damit keine Kopie der phylogenetisch ursprünglicheren *Amoebapores* dar, sondern besitzt eine eigene Struktur, die sich vermutlich im Laufe der Evolution an die jeweiligen Erfordernisse angepasst hat und die zur Aktivität des Peptids beiträgt. So verfügt Caenopore 5, anders als z. B. *Amoebapore A*, z. B. nicht über cytotoxische Aktivität gegenüber Zellen der humanen Jurkat T-Zelllinie. Während *E. histolytica* sich durch ihre Membranzusammensetzung vor der Aktivität von *Amoebapore A* schützt (Andrä *et al.*, 2004) stellt die Anwesenheit der Caenopores, aufgrund der mangelnden cytotoxischen Aktivität, für *C. elegans* kein Problem dar, zumal die Darmzellen von einer Glykokalyx bedeckt sind, die die Zellen schützt (Sulston und Horvitz, 1977).

Schon während der Durchführung der rekombinanten Expression und der anschließenden Reinigung der Peptide wurden Unterschiede zwischen Caenopore 1, 5 und 12 deutlich. So war es annähernd unmöglich, das Caenopore 5-Fusionsprotein von dem artifiziellen N-terminalen *HisTag* durch die proteolytische Aktivität der Protease *Factor Xa* zu trennen, während dieselbe Reaktion weder bei Caenopore 1 noch bei Caenopore 12 Probleme bereitete. Welche Besonderheiten der Caenopore 5-Struktur für diesen Effekt ausschlaggebend waren, konnte nicht abschließend aufgeklärt werden. Möglicherweise verhindert die Tertiärstruktur von Caenopore 5 die Bindung des Enzyms, so dass dieses nicht oder nur unzureichend proteolytisch aktiv werden kann. Unter bestimmten Voraussetzungen deuteten Beobachtungen dahingehend auch bei Caenopore 1 und 12 auf eine eingeschränkte proteolytische Aktivität von *Factor Xa* hin. Während die Spaltung des jeweiligen Monomers mittels *Factor Xa* keine Probleme bereitete, wiesen die stabilen Dimere eine erhöhte Resistenz gegen die Aktivität des Enzyms auf. Auch hier schien also die Bindung des *Factor Xa* durch die räumliche Anordnung der Peptide gestört zu sein.

Eine weitere Besonderheit weist Caenopore 5 dahingehend auf, dass es im Gegensatz zu Caenopore 1 und 12, aber auch zum Beispiel zu *Amoebapore* oder NK-lysin, in Lösung keine Di- oder Oligomere ausbildet. Es ist dagegen denkbar, dass die Aggregation der Caenopore 5-Monomere erst durch den Kontakt zur Membran induziert wird. Dabei wurde der Mechanismus der Membranbindung, der Aggregation und der Porenbildung nicht detailliert aufgeklärt, da eine Aggregation von Caenopore 5-Monomeren auch bei Kontakt zu Membranen und nachfolgender chemischer Kreuzvernetzung nicht nachgewiesen werden konnte.

Trotz der nicht nachweisbaren Aggregation könnten die Amoebapore-ähnliche, relativ hydrophobe Oberfläche und die starke pH-Abhängigkeit auf einen Porenbildungs-Mechanismus hinweisen, der dem von Amoebapore ähnlich ist. Die Fähigkeit von Caenopore 5 zur Ausbildung von Poren wurde dabei sowohl über den Liposomen-Depolarisationstest (Abschnitt 2.7.5) als auch über den Einsatz planarer Membranen (*Planar-lipid bilayer*) nachgewiesen, indem asymmetrische Doppelmembranen, die z. B. der Membran Gram-negativer Bakterien ähneln, eingesetzt wurden (Seydel *et al.*, 1989). Die Analysen wurden im Forschungszentrum Borstel von Dr. J. Andrä durchgeführt wurde (unveröffentlichte Ergebnisse). Dabei wurde festgestellt, dass Caenopore 5 schon bei einer Konzentration von 0,01 μM zur Ausbildung relativ stabiler kleiner Poren mit einem Durchmesser von ca. 0,3 nm fähig ist. Die Porenbildung konnte dabei sowohl in Phospholipid-Membranen (PL) als auch in Membranen nachgewiesen werden, die aus einem LPS/PL-Gemisch bestanden, das der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien ähnelte.

Es existieren verschiedene Mechanismen der Porenbildung durch amphipathische, α -helicale Peptide, die für einige Proteine detailliert aufgeklärt wurden. Zwei der postulierten Porenbildungs-Modelle wurden für Peptide mit kationischem Charakter beschrieben. Resultiert die Membranzerstörung aus einer desorganisierten Auflösung der Membran, ohne dass sich die Peptide in die Membran einlagern, spricht man vom sog. „carpet“ Modell. Dabei lagern sich viele Peptide mit basischem Charakter wie ein Teppich auf der Membran zusammen, wobei die positiven Seitenketten mit den negativen Lipid-Kopfgruppen interagieren. Peptide, auf die dieser Mechanismus zutrifft sind vor z. B. die Cecropine oder die Dermaseptine (Shai, 1995). Ein alternatives Modell ist die Ausbildung von sog. „torodialen“ Poren, wobei in Bereichen mit hoher Peptidkonzentration transiente Poren entstehen. Nach diesem Mechanismus könnten die bereits erwähnten Magainin-Peptide wirken (Ludtke *et al.*, 1996; Matsuzaki *et al.*, 1996).

Nach einem anderen Mechanismus, dem sog. „barrel stave“-Modell, inserieren monomere Peptide zunächst in die Membran, bevor sie sich zu Oligomeren zusammen lagern (Ehrenstein und Lecar, 1977). Dabei sind die Helices so zueinander positioniert, dass die polaren Aminosäurereste in das Innere der Pore gerichtet sind, während die hydrophoben Seitenketten in direktem Kontakt zu den Lipiden der Membran stehen. Dieser Mechanismus wird z. B. für Alamethicin favorisiert (Baumann und Müller, 1974; Sansom, 1993), welches in dieser Arbeit als Kontrollpeptid in den Liposomen-Depolarisationstests eingesetzt wurde.

Aufgrund der bereits erwähnten Unfähigkeit von Caenopore 5 in Lösung Aggregate auszubilden, könnte dieses zuletzt genannte Modell möglicherweise Hinweise auf seine Wirkungsweise geben. Die strukturelle Ähnlichkeit von Caenopore 5 zu Amoebapore A könnte dieses unterstützen, da ein ähnliches Modell auch für dieses Peptid vorgeschlagen wurde (Andrä und Leippe, 1994). In dieser Arbeit wurde ein Porenbildungsmechanismus vorgeschlagen, nachdem i) Amoebapore mit seinen protonierten Lysinresten an die negativ geladenen Phospholipide der Membran bindet, ii) das Peptid aufgrund des negativen Membranpotentials in die Lipid-Doppelschicht eindringt, und iii) die Peptide innerhalb der Membran aggregieren und eine Pore ausbilden. Anders als bei Caenopore 5 konnten aber bei Amoebapore A, pH-abhängig stabile Dimere sowie Oligomere nachgewiesen werden (Andrä und Leippe, 1994; Hecht *et al.*, 2004).

Anders als Caenopore 5 neigt Caenopore 1, wie Caenopore 12, auch zur Ausbildung stabiler Di- und Oligomere, die in Lösung sowie in Kontakt zu Membranen ausgebildet werden. Die Aggregate blieben die auch unter extremen denaturierenden Bedingungen erhalten, während sie unter reduzierenden Bedingungen destabilisiert wurden. Die Fähigkeit bzw. Unfähigkeit zur Ausbildung stabiler Aggregate muss auf Unterschiede in der Primärstruktur der Caenopores zurückzuführen sein.

Die drei analysierten Caenopores unterscheiden sich also aufgrund ihrer Primärstruktur nicht nur hinsichtlich der Fähigkeit zur Aggregation, sondern sie scheinen auch über unterschiedliche Mechanismen der Membranassoziation zu verfügen. Dagegen steht, dass sie unter sauren Bedingungen im Liposomen-Depolarisationstest nahezu identische Aktivität aufweisen. Caenopore 1 verfügt, im Gegensatz zu den anderen beiden Caenopores, über geladene Abschnitte sowie über eine kurze hydrophobe Region. Das Peptid weist unter anderem auch eine Region mit ausgeprägtem kationischem Charakter auf, welche die Bindung an Membranen, wie zuvor auch für andere antimikrobielle Peptide beschrieben, begünstigen könnte (Andrä und Leippe, 1994; Kini und Evans, 1989; Miteva *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu weist Caenopore 12 einen vergleichsweise starken, anionischen Charakter auf, der für die strikte pH-Abhängigkeit des Peptids verantwortlich sein könnte.

Im Gegensatz zu den Caenopores, deren Aktivität, wie bereits erwähnt, auf einen niedrigen pH-Wert beschränkt ist, weisen andere bekannte antimikrobielle Peptide, wie Alamethicin oder NK-lysin bzw. Granulysin, keine Abhängigkeit vom pH-Wert auf (Andrä *et al.*, 2003). Der im Liposomen-Depolarisationstest beobachtete starke Einfluss des pH-Wertes auf die Aktivität der vergleichsweise negativ geladenen Caenopores könnte daher darauf zurückzuführen sein, dass bei einem niedrigen pH-Wert die negativ geladenen

Aminosäurereste protoniert und somit neutralisiert werden, während die positive Ladung der Histidineseite zusätzlich verstärkt wird. Die negative Ladung der Caenopores, welche die Interaktion der Peptide mit den ebenfalls negativ geladenen Lipiden der Membran beeinträchtigt, weicht bei einem niedrigen pH-Wert einer zunehmend positiven Ladung, welche die Assoziation mit der Membran begünstigen könnte. Der vergleichsweise anionische Charakter von Caenopore 12 könnte somit eine Erklärung für seine starke pH-Abhängigkeit bieten, da sich ein hoher oder auch neutraler pH-Wert auf die Ladung des Peptids in einem stärkeren Maß auswirkt als bei den beiden anderen Caenopores. Auf diese Charakteristika könnte die Beobachtung zurückzuführen sein, dass der *HisTag*, mit seinen sechs zusätzlichen Histidinresten, bei pH 5,2 einen verstärkenden Einfluss auf die Aktivität von Caenopore 12 zeigt. Er trägt, unter den gegebenen Voraussetzungen, zur Verstärkung der positiven Gesamtladung des Peptids bei, so dass die Assoziation mit der anionischen Membran erleichtert bzw. verstärkt wird. Weshalb die verstärkende Wirkung des *HisTag* weder im Mikrosuszeptibilitätstest noch im Membranen-Depolarisationstest beobachtet werden konnte, wurde nicht geklärt, möglicherweise aber wird der Effekt durch die vergleichsweise hohen Peptidkonzentrationen, die in den entsprechenden Tests eingesetzt werden, kompensiert.

Die membranpermeabilisierende Aktivität von Caenopore 1 bei pH 7,4 könnte auf mehrere Aspekte seiner Primärstruktur zurückzuführen sein. So könnten sowohl die kationisch geladenen Aminosäure-Seitenketten als auch die relativ stark ausgeprägte hydrophobe Region die Interaktion mit einer Membran trotz des höheren pH-Wertes ermöglichen. Außerdem könnte die Anhäufung der anionischen Glutaminsäurereste in Helix III, ähnlich wie bei Saposin C, an der Bindung an die Membran beteiligt sein (deAlba *et al.*, 2003).

Durch RNA-Interferenzversuche konnte ein Hinweis auf die Funktion von Caenopore 5 erhalten werden, da die Tiere durch den Verlust von Caenopore 5 die Fähigkeit verloren, die in den Darm aufgenommenen lebenden *E. coli*-Bakterien zu töten. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass Caenopore 5 für das Überleben von *C. elegans* auf *E. coli*-Bakterien, die potentielle Pathogene für ihn bilden eine entscheidende Rolle spielt und eine konstitutive, gleichmäßig hohe Expressionsrate des Gens daher eine Notwendigkeit darstellt. Im Sinne dieses Modells könnten Caenopore 1 und 12, deren Expression durch bestimmte Signale aktiviert werden kann, in bestimmten Gefahren-Situationen eine zusätzliche antimikrobielle Funktion vermitteln, um drohende Infektionen abzuwenden. Ob Caenopore 1 und 12 eine Membranpräferenz besitzen, die es ihnen erlaubt, bevorzugt und sehr effektiv bestimmte Mikroorganismen zu töten, während sie gegen andere keine oder nur geringe Aktivität besitzen, konnte nicht abschließend geklärt

werden. Da sie aber in *In-vitro*-Experimenten keine Aktivität gegen *E. coli*-Bakterien aufwiesen, die wiederum von Caenopore 5 getötet werden konnten, ist von einer gewissen Präferenz auszugehen. Weitere Tests, wie z. B. das Ausbringen von Tieren auf definierte Bakterienstämme, denen das entsprechende Gen, *spp-1* bzw. *spp-12*, fehlt könnten Hinweise darauf geben, ob die Abwehr einzelner Bakterien-Spezies spezifisch von Caenopore 1 und 12 übernommen wird, und ob sie über eine ähnliche biologische Signifikanz verfügen wie Caenopore 5. Die transiente Stilllegung über die RNA-Interferenz stellte sich für diese Tests als ungeeignet heraus, da die Methode auf die Anwesenheit von dsRNA-exprimierenden *E. coli*-Bakterien angewiesen ist. Der Effekt der RNA-Interferenz ist zeitlich beschränkt und lässt relativ schnell nach, wenn die entsprechenden *E. coli*-Bakterien und damit die dsRNA fehlt. Eine Möglichkeit besteht aber in der Verwendung entsprechender *Knock-out*-Mutanten, da die Stilllegung der Gene in diesen Tieren nicht temporär sondern permanent ist. Mit ihrer Hilfe könnte geklärt werden, ob die Würmer, denen das eine oder das andere Peptid fehlt, auf bestimmten Bakterienspezies sterben oder anderweitige Phänotypen aufweisen würden.

Die spezielle Funktion von Caenopore 12 in *C. elegans* bleibt auch deshalb besonders unklar, weil der Ort seiner Genexpression nicht definiert wurde bzw. das Darmepithel als Haupt-Expressionsort ausgeschlossen werden konnte. Die Aufklärung seiner Lokalisation und die genaue Funktion von Caenopore 12 in *C. elegans* könnten gegebenenfalls auch einen Hinweis auf die Funktionen anderer Mitglieder der Caenopore-Peptid-Familie geben.

Aufgrund des Signalpeptids in den meisten der primären Translationsprodukten der Caenopore-kodierenden Gene, ist davon auszugehen, dass die Caenopore-Peptide in das Lumen des Darms sezerniert werden und dort ihre antimikrobielle Funktion ausüben. Da *C. elegans* über Lysozym-kodierende Gene verfügt – die mindestens zehn kodierenden Gene stellen wiederum eine ungewöhnlich große Genfamilie dar - ist ein Zusammenspiel oder sogar ein synergistischer Effekt dieser Lysozyme mit den Caenopores durchaus denkbar (Nickel *et al.* 1998; Leippe, 1999). Die Lysozyme von *C. elegans* lassen sich in zwei Klassen einteilen, von denen die eine große Ähnlichkeit zu den Lysozymen von *E. histolytica* besitzt. Die Lysozyme von *E. histolytica* weisen sich dadurch aus, dass sie über membran-permeabilisierende Aktivität gegen Gram-negative Bakterien verfügen, wenn die äußere Membran der Bakterien vorher beeinträchtigt wurde (Leippe, 1999). Es wäre daher möglich, dass einige der *C. elegans*-Lysozyme ebenfalls über eine ähnliche Aktivität verfügen. In diesem Fall könnten die Caenopore-Peptide, und insbesondere das Caenopore 5, die aufgenommenen Bakterien, die die Aktivität des *grinders* überlebt haben, im Darm töten, während die Lysozyme die vollständige Auflösung der bereits beschädigten

bakteriellen Zellen beschleunigen, so dass diese resorbiert werden können. Durch den Ausfall der Caenopore 5-Synthese könnte dieser erste wichtige Schritt fehlen. Da die Zellen daraufhin nicht lysiert und dementsprechend nicht resorbiert werden könnten, käme es zum beobachteten Phänotyp mit entsprechend reduziertem Metabolismus und reduzierter Wachstumsrate. Wie sich das Fehlen anderer Caenopores oder aber das der Lysozyme auf *C. elegans* auswirkt, ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei den Caenopores um eine Familie von antimikrobiellen Peptiden handelt, die im Immunsystem von *C. elegans* eine bedeutende Rolle übernehmen könnten. Aufgrund der Ergebnisse und der großen Anzahl kodierender Gene und der entsprechenden Peptide ist es denkbar, dass die Caenopores *in vivo* in verschiedenen Geweben synthetisiert werden und damit an unterschiedlichen exponierten Oberflächen in *C. elegans* die Abwehr von Pathogenen vermitteln. Unter anderem ist nicht auszuschließen, dass die Peptide jeweils eine Präferenz für verschiedene Bakterienspezies besitzen, die es *C. elegans* erlaubt, das jeweilige Pathogen gezielt zu deaktivieren.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Über den Aufbau des Immunsystems von *Caenorhabditis elegans* ist bisher wenig bekannt, u. a. da ihm Faktoren fehlen, die in der Immunantwort anderer Organismen eine wichtige Rolle spielen. Dennoch verfügt *C. elegans* über Mechanismen, die es ihm erlauben, pathogene Mikroorganismen zu erkennen, zu eliminieren und so Infektionen zu vermeiden. Eine wichtige Funktion bei der Abwehr von Pathogenen übernehmen dabei antimikrobielle Peptide. RNA-Interferenz-Experimente wiesen bereits darauf hin, dass zumindest eines dieser antimikrobiellen Peptide, namentlich Caenopore 5, eine spezifische Funktion und physiologische Signifikanz in *C. elegans* besitzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Caenopores, potentiell antimikrobielle Peptide aus *C. elegans*, untersucht, welche durch die Gene der umfangreichen *spp*-Genfamilie (*Saposin-like protein genes*) kodiert werden. Gene, die ebenfalls für Saposin-ähnliche Proteine kodieren, wurden in den verschiedensten Organismen, von der Amöbe bis zum Säugetier, identifiziert. Die Mitglieder der Familie der Saposin-ähnlichen Proteine lassen sich über sechs Cysteinreste an konservierten Positionen sowie über eine rein α -helicale Struktur charakterisieren. Um die Caenopore-Peptide funktionell und strukturell näher zu charakterisieren und *In-vitro*-Aktivitätstests mit ihnen durchführen zu können, wurden ausgewählte Vertreter der Peptid-Familie, Caenopore 1, 5 und 12, in bakteriellen Expressionssystemen rekombinant synthetisiert und anschließend gereinigt. Die Untersuchung dieser drei Caenopores ergab, dass sie sowohl über antimikrobielle als auch über porenbildende Aktivität verfügen. Die antimikrobielle Aktivität richtete sich dabei sowohl gegen Bakterien als auch gegen eukaryotische Zellen wie Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans*). Des Weiteren waren die Caenopores in der Lage, cytotoxische Aktivität gegen Amöben des Stammes *Dictyostelium discoideum* zu vermitteln. Die einzelnen Caenopore-Peptide besaßen dabei offensichtlich eine Präferenz für unterschiedlich zusammengesetzte Membranen, was sich in ihrer Aktivität gegen Gram-positive (*Bacillus megaterium*) und Gram-negative (*Escherichia coli*) Bakterien äußerte. Danach wies nur Caenopore 5 bakterizide Aktivität gegen *E. coli* auf, während sich Aktivität der anderen beiden Caenopores unter den gegebenen Bedingungen gegen *E. coli* nicht nachweisen ließ. Dahingegen waren alle getesteten Caenopores in der Lage, bakterizid auf *B. megaterium* zu wirken. Eine cytotoxische Aktivität gegen die humane Jurkat T-Zelllinie konnte unter den gewählten Bedingungen bei keinem der Caenopores festgestellt werden.

Die antimikrobielle Aktivität gegen die verschiedenen getesteten Zellen ist auf den Prozess der Membranpermeabilisierung zurückzuführen, wobei diese Permeabilisierung auf dem

Mechanismus der Porenbildung basiert. Die Aktivität der Caenopores war mit der Wirkung anderer bekannter antimikrobieller Peptide wie Melittin, Cecropin P1 oder Magainin vergleichbar. Dabei war u. U. sowohl die antimikrobielle als auch die porenbildende Aktivität der Caenopore-Peptide, bedingt durch ihren tendenziell anionischen Charakter, auf einen niedrigen pH-Wert um pH 5,2 begrenzt.

Transkriptions- und Promotoranalysen ließen darauf schließen, dass die Transkription der Caenopore-kodierenden Gene vorwiegend in den Zellen des Darmepithels erfolgt, wobei die Synthese der Caenopores in anderen Geweben, die in dieser Arbeit nicht näher charakterisiert werden konnten, nicht ausgeschlossen werden kann. Vor allem bei Caenopore 12 deuteten die Ergebnisse verschiedener Analysen darauf hin, dass der Großteil der Peptide nicht im Darmepithel sondern in anderen Zellen oder Geweben zu erwarten ist.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung ausgewählter Vertreter der Caenopores weist darauf hin, dass die Peptidfamilie als Bestandteil des Immunsystems von *C. elegans* angesehen werden kann. Einen unterstützenden Hinweis darauf bietet die Beobachtung anderer Arbeitsgruppen, dass die Transkription der Caenopore 1 und 12-kodierenden Gene durch den Transkriptionsfaktor DAF-16 induziert wird, welcher in Zusammenhang mit Langlebigkeit und der Resistenz gegen bakterielle Infektionen gebracht wird. Die *In-vivo*-Funktion der Caenopores konnte nicht abschließend geklärt werden. Davon ausgehend, dass alle Caenopores antimikrobielle Aktivität aufweisen, könnten die Caenopores als Gesamtheit einen wichtigen Bestandteil des Immunsystems von *C. elegans* bilden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise zum besseren Verständnis des Immunsystems von *C. elegans* und sie bieten gleichzeitig eine Grundlage für weitere diesbezügliche Fragestellungen.

5 SUMMARY

The immune system of *Caenorhabditis elegans* is still a poorly understood issue and it remains unclear, how immune responses function considering the lack of conserved factors that play key roles in the immune responses of other organisms. Nevertheless, *C. elegans* possesses mechanisms, which enable the detection and defence of pathogenic microorganisms. RNAi experiments already gave evidence, that at least one of the antimicrobial peptides, the so-called caenopore 5, mediates a specific function and, thus, might be of physiological significance in *C. elegans*.

Within this thesis, the caenopores, potential antimicrobial peptides from *C. elegans*, were characterized. These peptides are encoded by genes called *Saposin-like protein genes, spp*, belonging to a large gene family. Until today, genes encoding Saposin-like proteins have been identified in a variety of different organisms, from amoebae to mammals. The encoded peptides are characterized by six cysteine residues and an all α -helical secondary structure. To characterize the function, the structure and the biological activity of selected members of the caenopores in more detail, caenopore 1, 5 and 12 were recombinantly synthesized in bacterial expression systems, purified and subsequently subjected to *in vitro* activity essays. For all three caenopores these tests revealed both antimicrobial and pore-forming activity. The antimicrobial activity was directed against bacteria and yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*). Additionally the Caenopores showed cytotoxic activity against amoebae (*Dictyostelium discoideum*). The individual caenopores displayed a membrane preference, which was reflected in their activity against Gram-positive (*Bacillus megaterium*) and Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria. Exclusively caenopore 5 exhibited bactericidal activity against *E. coli* and *B. megaterium*, while the activity of the others was restricted to *B. megaterium*. Cytotoxic activity against the human Jurkat T cells was not detected. The antimicrobial activity bases on membrane permeabilization and pore formation and is comparable to the activity of other well characterized antimicrobial peptides such as melittin, cecropin P1 or magainin. Both, the antimicrobial and the pore-forming activity were clearly restricted to acidic pH around pH 5.2.

Expression profiling and promoter analysis indicated that the *spp* genes were predominantly transcribed in cells of the intestinal epithelium, whereas the expression in different, not yet identified tissues remains speculative. Especially in the case of caenopore 12, the expression of the major part of the peptides was anticipated to take place in tissues and cells different from the intestinal epithelium.

Characterization and verification of the antimicrobial activity of some representatives of the caenopore-peptide family indicated that they could represent at least a part of the immune system of *C. elegans*. Earlier findings indicated that the transcription of caenopore 1 and 12 encoding genes is up regulated by the DAF-16-transcription factor, which is thought to play a role in longevity and resistance toward bacterial infections. The *in vivo* function of the caenopores remains unknown but assuming that all peptides exhibit a comparable function, the caenopores may constitute an important part of the worms' immune system.

Taken together, the results presented in this thesis offer new perspectives for a better understanding of the immune system of this popular model nematode.

6 MATERIAL

6.1 Chemikalien

Acetonitril (ACN)	Roth
Acrylamid 32:1	Applichem
Acrylamid 49:1	Roth
Agar	Roth
Agarose	Applichem
Ameisensäure (HCOOH)	Roth
Ammoniumacetat	Applichem
Ammoniumpersulfat (APS)	Applichem
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat)	Applichem / Roth
Blotting-Papier (330 g/m ²)	Hartenstein
Bovines Rinderserum Albumin Fraktion V (BSA)	Sigma / Applichem
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Applichem
CAPS (Cyclohexylaminopropan-sulfonsäure)	Applichem
Chloroform	Applichem
Citronensäure (<i>Citric acid</i>)	Roth
Cholesterin	Sigma
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche Applied Science, Mannheim
L-Cystein	Sigma
Dimethylformamid (DMF)	Applichem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
DSP (Dithiobis-(succinylpropionat))	Pierce
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylamino- propyl]Carbodiimid)	Sigma
Essigsäure	Roth
EDTA Dinatriumsalz	VWR Merck
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Serva
Ethanol (unvergällt)	Roth
Ethidiumbromid (EtBr)	Applichem
Formaldehyd	Applichem
Formamid	Applichem
Glukose	Applichem

Glutaraldehyd	Roth
Glutathion (oxidiert)	Boehringer Mannheim
Glutathion (reduziert)	Roth
Glycerin 86 %	Roth
Glycin	VWR Merck
Guanidin-Hydrochlorid	Roth
Harnstoff (Urea)	Roth
Hefe- (<i>Yeast</i> -) Extrakt	Roth
HEPES	Roth
Imidazol	Sigma
Isopropanol	VWR Merck
Iodacetamid (IAA)	Sigma
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	Applichem
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Applichem
LB Broth Base	Roth
Lektin (Erdnuss-Lektin)	Sigma
MES	Roth
Methanol	Roth
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Sigma
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Applichem
Manganchlorid ($MnCl_2$)	Applichem
Monobromobimane (mBBBr) (4-bromomethyl-3,6,7-trimethyl-1,5-diazabicyclo [3.3.0]octa-3,6-diene-2,8-dion)	Sigma
Natriumacetat	Applichem
Natriumchlorid (NaCl)	MP-Biomedicals
Natriumhypochlorid (NaOCl)	Roth
Natriumcitrat	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	MP-Biomedicals
Natronlauge (NaOH)	VWR Merck
Nickel-NTA His-Bind Superflow	Novagen

Nickelsulfat-Heptahydrat (NiSO ₄ x 7H ₂ O)	Roth
NBT (Nitrotetrazoliumblauschlorid)	Sigma
PVDF-Membran Immun-Blot™	Roth
RNAmagic	BioBudget, Krefeld
RNase-Inhibitor	Invitrogen
Saccharose	Roth
Sabouraud-Medium	Sigma
Salzsäure (HCL) 37 % (w/v)	Roth
SDS (Na-Dodecylsulfat)	Amersham Bioscience
Sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz)	Sigma
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethyl-methyldiamin)	Applichem
Triethanolamin	Boehringer Mannheim
Trifluoressigsäure (TFA)	Applichem
Tris	Roth
Tricin	Roth / Applichem
Trypton	Roth
Triton X-100	Applichem

6.1.1 Enzyme

<i>Cfr421 / Ksp-1</i>	Fermentas
<i>Pst-1</i>	Fermentas
<i>EcoRI</i>	Fermentas
Taq-Polymerase	Fermentas
T4-DNA-Ligase	Fermentas
<i>Thermoskript</i> Reverse Transkriptase	Invitrogen
<i>Factor Xa</i>	Roche
Chitinase (<i>Streptomyces griseus</i>)	Fluka
Collagenase	Sigma
Trypsin	Roche

6.1.2 Protein-Größenstandard

Mark12 <i>unstained standard</i>	Invitrogen
SeeBlue Plus2 <i>Prestained standard</i>	Invitrogen
Multimark <i>multicolored standard</i>	Invitrogen

Marker #SM0431 <i>Unstained Protein Molecular Weight</i>	Fermentas
<i>Molecular weight marker</i> range 2,5 – 16,9 Da	BDH Laboratory supplies, Poole, GB

6.1.3 DNA-Längenstandard

GeneRuler™ DNA Ladder Mix 100 – 10000 bp	Fermentas
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas

6.1.4 Kontrollpeptide

Die Kontroll-Peptide (Melittin, Cecropin A, B und P1, Alamethicin und Magainin) wurden von Sigma bezogen (Abschnitt 7.10).

6.1.5 Farbstoffe

SYTOX Green®	Molecular probes, Leiden, Niederlande
Alamar Blue®	Alamar Bioscience, Sacramento, USA
3,3'-Diethylthiadicarboniodid	Kodak
Bromphenolblau	Applichem
Xylencyanol	Applichem
Trypanblau	Sigma

6.1.6 Antibiotika

Ampicillin-Natriumsalz (amp)	Applichem	(100 mg/ml)
Carbenicillin (carb)	Applichem	(50 mg/ml)
Tetracyclin (tet)	Applichem	(12,5 mg/ml)
Kanamycin (kan)	Roth	(20 mg/ml)
Penicillin (pen)	Sigma	(10.000 U/ml)
Streptomycin (strep)	Sigma	(10 mg/ml)
Valinomycin	Sigma	(0,5 µM in EtOH _{absol.})

6.1.7 Immunoreagenzien

Maus-Penta-His IgG	Qiagen
Ziege-anti-Kaninchen Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Sigma
Ziege-anti-Maus Alkalische-Phosphatase-Konjugat	Sigma
Kaninchen-anti-Caenopore 1 (SA4945)	Eurogentec
Kaninchen-anti-Caenopore 5 (SA4946)	Eurogentec

6.1.8 Vektoren

pIVEX2.4a	Roche
pDrive	Qiagen
pSport I	Invitrogen
pPD95.77	A. Fire

6.1.9 Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide wurde durch die Firmen MWG bzw. Biomers übernommen (Liste der Oligonukleotide siehe Anhang, Abschnitt 9.3).

6.2 Geräte

6.2.1 Mikroskope

Konfokales Laserscanning Mikroskop Leica TCS SP	Leica
Lichtmikroskop, Axioskop 40	Eppendorf
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axiovert 200M mit Apotome und MRm Rev. 2D Kamera	Zeiss
Software für Konfokal-Mikroskopie Leica TCS NT V 1.5.541	Leica
Software für Axiovert 200M und Axioskop 40: Axiovision Rel 4.5	Zeiss

6.2.2 Zentrifugen

Kühlzentrifuge Centrikon H-401	Kontron, München
Zentrifuge Rotanta, 460R	Hettich
Airfuge™, Air Driven Ultracentrifuge AB901	Beckman
Laborzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Tischzentrifuge, Minispin	Eppendorf
Ultrazentrifuge L7-65	Beckman
Vakuum-Zentrifuge <i>SpeedVac</i> UVS400A	Thermo Electron Corporation

6.2.3 Sonstige Geräte

Ultraschallbad Sonorex Super RK 106	Bandelin Sonorex, Berlin
Sonotrode MS73 Sonoplus	Bandelin HD 2070, Berlin
MALDI-TOF Massenspektrometer Voyager DE STR Biospectrometry Workstation	Perspective Biosystems, Framingham, USA
Semi-Dry-Blotting Apparatur 22x20 cm	PHASE, Lübeck
Fluoroskan II	Labsystems, Merkin, Bornheim-Hersel
Luminescence Spectrometer LS 50 B	Perkin Elmer, Fremont, USA
TECAN Spectra Flour	TECAN, Salzburg, Austria
Photometer Ultraspec 1100 pro	Amersham Biosciences
Transluminator	Phase, Lübeck
Gefriertrocknungs-Anlage Alpha 2-4 LSC	<i>Christ</i> , Osterode/Harz
MegaBACE 1000 48-Caillaries Sequencer	Global Medical Instrumentation, Minnesota
Thermocycler, Mastercycler <i>EPGradient</i>	Eppendorf
<i>Easyject Prima</i> Elektroporator	Equibio
PAGE-Gelkammer (Modell: 45-1010-i)	PeqLab, Erlangen
Elektrophorese-Netzgerät E835	Consort
Millipore-Anlage, Milli-Q Academic System	Millipore

6.2.4 Plastikmaterial

Alle Plastikmaterialien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Sarstedt, Nürnberg bezogen.

7 METHODEN

7.1 Haltung und Zucht von *C. elegans*

NGM-Agar 17 g Agar-Agar, 2,5 g Trypton, 3 g NaCl, mit ddH₂O auf 975 ml auffüllen, autoklavieren. 1 ml Cholesterin (5 mg/ml in 99 % Ethanol), 1 ml 1 M CaCl₂, 1 ml 1 M MgSO₄, 25 ml 1 M KPO₄-Puffer pH 6,0 addieren

KPO₄-Puffer, pH 6,0 95 ml 1 M K₂HPO₄, 5 ml 1 M KH₂PO₄, pH-Wert mit KOH einstellen

Die Zucht der Nematoden erfolgte wie 1974 von Brenner beschrieben (Brenner, 1974). Der *C. elegans* Wildtyp-Stamm N2 wurde ursprünglich in Bristol (Großbritannien) von L. N. Staniland isoliert und durch W. L. Nicholas kultiviert (Nicholas *et al.*, 1959).

NGM-Agar (*Nematode Growth Medium*) enthaltende Kulturschalen wurden mit *E. coli* OP50 angeimpft. *E. coli* OP50 dient als Standard-Futterbakterium in der *C. elegans*-Zucht (Brenner, 1974; Andrew und Nicholas, 1976) und wurde vom CGC (*Caenorhabditis Genetic Center*, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) bezogen.

Das Umsetzen der Würmer auf diese NGM-Kulturplatten erfolgte einmal wöchentlich, wobei jeweils ein ca. 1 cm² großes Stück NGM-Agar aus der Originalplatte entnommen und mit den Nematoden auf die neue NGM-Platte überführt wurde. Alternativ konnten die Würmer auch einzeln, mittels einer Wimper oder eines Platindrahtes, auf den frischen Bakterienrasen umgesetzt werden. Letztere Methode wurde angewendet, um Würmer mit spezifischen Phänotypen von anderen zu selektieren. Diese Tiere trugen in den meisten Fällen einen Selektionsmarker, der eine Veränderung im Phänotyp der Würmer hervorruft. Die Haltung der Nematoden erfolgte bei Raumtemperatur.

7.1.1 Gefrierlagerung von *C. elegans*

M9-Puffer 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 5 g NaCl, mit ddH₂O auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren, 0,25 g MgSO₄ * 7 H₂O (sterilfiltriert)

Gefrierlösung 20 ml 1 M NaCl, 10 ml 1 M KPO₄-Puffer, pH 6,0, 60 ml Glycerin (86 %), auf 200 ml mit ddH₂O auffüllen und autoklavieren, 60 µl 1 M MgSO₄, steril

Eine Alternative zur *C. elegans*-Kultur auf NGM-Platten bot die Langzeitlagerung bei -80 °C (Stiernagle, 2006). Dafür wurden die Würmer 2 min bei 1500 rpm zentrifugiert, nachdem sie mit M9-Puffer von der NGM-Agar Platte gespült wurden. Das Sediment wurde noch einmal mit 10 ml M9-Puffer gewaschen, bevor die Ansätze 1:1 mit

Gefrierlösung versetzt wurden. Dieser Ansatz wurde in Schraubdeckel-Gefriergefäßen in einem Styropor-Behälter langsam auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ heruntergekühlt. Die Würmer können auf diese Weise über sehr lange Zeiträume (bis zu mehreren Jahren) eingelagert werden.

7.1.2 Synchronisation der *C. elegans*-Kulturen

Egg-Buffer, pH 7,3 118 mM NaCl, 48 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 ,
25 mM HEPES, autoklavieren

Um *C. elegans*-Kulturen zu synchronisieren, Kontaminationen zu beseitigen oder Eier zu isolieren, wurden adulte Hermaphroditen mit *Egg-Buffer* von der Platte gespült und mehrmals gewaschen. Zu 4 ml verbleibendem Restpuffer wurden 0,5 ml 5 M Natronlauge (NaOH) und 0,5 ml 12 % Natriumhypochlorid (NaOCl) gegeben und 10 - 20 min rotierend inkubiert. Wenn alle Würmer dissoziiert waren, wurde die Reaktion durch die Zugabe von 10 ml *Egg-Buffer* gestoppt. Die sedimentierten, durch ihre Chitin-Außenhülle geschützten Eier, wurden nach mehreren Waschschrritten entweder direkt auf eine frische NGM-Agar Platte mit *E. coli* OP50 gegeben oder, bei Bedarf, über einen Saccharose-Gradienten weitergehend gereinigt. Dazu wurden die Eier in 50 μl M9-Puffer vorsichtig auf 1 ml 60 % Saccharose-Lösung in ddH_2O gegeben und bei $5000 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Die Schicht der isolierten Eier konnte abgenommen, mit Wasser und M9-Puffer gewaschen und auf Kulturplatten gegeben oder anderweitig verwendet werden.

7.1.3 Flüssig-Massenkultur mit *C. elegans*

S-Basal 5,9 g NaCl, 50 ml 1 M KH_2PO_4 , pH 6,0 mit ddH_2O auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren

S-Complete zu 1 Liter S-Basal: 1 ml Cholesterin (5 mg/ml in 99 % Ethanol), 3 ml 1 M MgSO_4 , 3 ml 1 M CaCl_2 , 10 ml *Trace metal solution*, 10 ml 1 M K-Citrat, pH 6,0

Trace metal solution 2,5 mM $\text{Fe-II-SO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 5 mM EDTA, 0,04 mM $\text{Mn-II-Cl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$, 0,1 mM $\text{Cu-II-SO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$. Mit ddH_2O auf 10 ml auffüllen, autoklavieren und lichtgeschützt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern.

Um eine große Anzahl der Nematoden zu erhalten wurde eine Flüssig-Massenkultur etabliert, die von S. Fuchs durchgeführt wurde. Dafür wurden *E. coli* OP50-Bakterien in 100 ml 2xYT-Medium über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ angezogen und bei 3500 rpm für 15 min

zentrifugiert. Das Sediment wurde in 500 ml *S-complete*-Medium resuspendiert und auf zwei Erlenmeyerkolben aufgeteilt.

Die *C. elegans*-Ausgangspopulation bestand aus sechs voll bewachsenen NGM-Agar-Kulturplatten. Die Würmer wurden mit M9-Puffer ab gespült, zentrifugiert (2 min, 1500 rpm), in M9-Puffer resuspendiert und je zur Hälfte in die zwei vorbereiteten Kulturkolben überführt. Die Tiere wurden bei RT und 50 rpm auf einem Horizontalschüttler (IKA® KS 260 basic) für vier Tage kultiviert bevor sie geerntet wurden. Dafür wurde der Kulturansatz in 50 ml-Zentrifugenröhrchen für 4 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Sedimente wurden vereinigt und solange mit M9-Puffer gewaschen, bis der Überstand klar war. Die sedimentierten Würmer wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingelagert.

7.2 Präparation und Fraktionierung von *C. elegans*-Extrakten

7.2.1 Präparation von Protein-Extrakten von *C. elegans*

Die bei -80 °C eingelagerten Würmer der Massenkultur wurden in saurem Extraktionsmedium (mind. 2-faches Volumen) resuspendiert und für 24 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Lösung wurde für 1 h bei 40.000 rpm in einer Beckmann Ultrazentrifuge (Modell L7-65) zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut in saurem Extraktionsmedium aufgenommen und wie bereits beschrieben weiter verarbeitet.

Saures Extraktionsmedium 1 M HCl, 5 % HCOOH, 1 % TFA, 1 % NaCl

Eine zweite Möglichkeit der Proteinextraktion war der Aufschluss der Würmer in Essigsäure. Diese Extraktion wurde von S. Fuchs durchgeführt. Dafür wurden die Würmer der Flüssigmassenkultur zunächst in zweifachem Volumen Extraktionsmedium aufgenommen und dann nach der sog. „freeze & thaw-Methode“ in flüssigem Stickstoff wiederholt aufgetaut und eingefroren. Anschließend erfolgte eine weitere Extraktion durch Beschallung mit einer Sonotrode (MS73). Der Extraktionsansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und nachfolgend für 15 min bei 3500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 3 M Natriumacetat auf pH 3-4 eingestellt.

Extraktionsmedium 10 % Essigsäure
Protease-Inhibitoren (*Complete*™, Roche)

7.2.2 Proteinfraktionierung an einer hydrophoben Matrix (SepPak)

Die Proteinlösung wurde auf eine vorbereitete hydrophobe Matrix (SepPak, 500 mg, Waters, Eschborn) gegeben (Abschnitt 7.9.5). Die Proteine wurden, nachdem schwach gebundene Proteine und Salze mittels 20 % Acetonitril (ACN) in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) entfernt wurden, entsprechend ihrer Bindungsstärke über einen ansteigenden Acetonitril-Stufengradienten eluiert (30 - 84 % ACN in 0,1 % TFA), der jeweils in 10 % Schritten anstieg. Die Lösungsmittel wurden durch Gefriertrocknung entfernt.

7.2.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HPLC)

Puffer A 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)

Puffer B 84 % Acetonitril (ACN) in 0,1 % TFA

Die hydrophobe Interaktions-Chromatographie (HPLC, Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie) wurde am System *Äkta-Purifier* durchgeführt. Die HPLC-Säule wurde mit Puffer A äquilibriert. Nach Beladen der Säule mit Protein wurde diese mit Puffer A gewaschen. Das gebundene Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 2 bis 100 % Puffer B bei einer Flussrate von 0,25 ml/min von der Säule eluiert. Das Volumen der gesammelten Fraktionen betrug 0,5 ml.

- HPLC-Säule: C18 SC-02 (125 x 2,1mm), Polyencap 300, 5,0 µm (Bischoff Chromatography, Leonberg)

7.2.4 Ionenaustausch-Chromatographie

Die Ionenaustausch-Chromatographie wurde mit einer „MiniH“ Säule der Firma Vivascience (Vivapure Minispin Columns) durchgeführt. Der *C. elegans*-Extrakt wurde zuvor über eine hydrophobe Matrix (SepPak) entsalzt und gefriergetrocknet, bevor er in 25 mM Na-Acetatpuffer pH 5,5 aufgenommen wurde. Der Ansatz wurde für 20 min bei 20.000 rpm zentrifugiert, bevor der Überstand auf die äquilibrierte „MiniH“-Säule gegeben wurde. Die Säule wurde nach Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min einmal mit 25 mM Na-Acetatpuffer pH 5,5, gewaschen bevor die Proteine durch einen NaCl-Stufengradienten eluiert wurden (30, 60, 125, 250, 500, 1000 mM NaCl in Na-Acetatpuffer). Die Fraktionen wurden über eine SepPak-Säule entsalzt und gefriergetrocknet.

7.3 Analyse mittels Immunoblot

10 x CAPS-Puffer (Bindungspuffer)	100 mM 3-Cyclohexylamino-1-propanol-sulfonicacid (CAPS) mit ddH ₂ O auf 900 ml auffüllen und mit 5 N NaOH auf pH 11,0 einstellen. Mit ddH ₂ O auf 1 Liter auffüllen.
CAPS-Gebrauchslösung	100 ml 10 x CAPS, 100 ml Methanol, 800 ml ddH ₂ O
AP-Puffer, pH 9,5	100 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , pH-Wert mit 5 N HCl einstellen
10 x TBS, pH 7,2	200 mM Tris, 1,5 M NaCl
NBT	50 mg/ml in 70 % DMF (Dimethylformamid)
BCIP	50 mg/ml in 100 % DMF

Aliquots der einzelnen Fraktionen wurden eingesetzt, um die enthaltenen Proteine mittels SDS/Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS/Tricin-PAGE) entsprechend ihrer Größe aufzutrennen (Abschnitt 7.9.10). Vor Beginn der SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Dithiothreitol (DTT) reduziert (Abschnitt 7.9.12).

Der Immunoblot wurde im Anschluss an die SDS-PAGE nach dem „semidry Blotsystem“ durchgeführt. Die eingesetzten Antiseren wurden, wie in Abschnitt 7.3.1 beschrieben, durch die Immunisierung von Kaninchen gewonnen.

Auf die Graphitplatte der Blotting-Apparatur wurden drei Lagen des in Bindungspuffer getränkten Blotting-Papiers gelegt, deren Kantenlängen exakt mit denen des Polyacrylamidgels übereinstimmten. Darauf wurde eine PVDF-Membran identischer Größe platziert, die vorher mit Methanol angefeuchtet und mit Bindungspuffer äquilibriert wurde. Das Gel wurde auf die PVDF-Membran gelegt und mit drei weiteren Lagen Blotting-Papier bedeckt, bevor die Platinplatte der Blottingkammer darauf fixiert wurde.

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte für 45 Minuten bei einer konstanten Stromstärke von 2 mA pro cm² Membran. Die PVDF-Membran wurde für 30 min blockiert (3 % BSA-Lösung in 1 x TBS). Prä-Immun - und Antiserum wurden, jeweils 1:100 in 1 x TBS verdünnt, hinzugegeben und mit der Membran über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Die primären Antiseren wurden nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBS durch sekundäre Antikörper (*Alkalische-Phosphatase*-gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG) ersetzt, die 1:15.000 in 1 x TBS verdünnt wurden. Nach Inkubation für 2 h bei RT und dreimaligem Waschen mit 1 x TBS wurden die Membranen mit AP-Puffer äquilibriert. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 66 µl NBT und 33 µl BCIP in 10 ml AP-Puffer

gestartet und durch die Zugabe von ddH₂O gestoppt. Die molare Masse der aufgetrennten Proteine konnte über einen Vergleich mit dem vorgefärbten Protein-Größenstandard (SeaBlue 2, Invitrogen) abgeschätzt werden, dessen farbige Referenzproteine ebenfalls auf die Membran transferiert wurden.

In einigen Ansätzen wurden zwei PVDF-Membranen übereinander gelegt, um auch kleine Peptide, die ggf. während des *blotting*-Vorgangs durch die erste Membran hindurch wanderten, nachzuweisen.

7.3.1 Immunisierung von Kaninchen

Um polyklonale Antikörper aus Kaninchen zu gewinnen, wurden die rekombinant synthetisierten Peptide Caenopore 1 und 5 gereinigt (Abschnitt 7.9.4 und 7.9.5), in 4 Aliquots aufgeteilt und gefriergetrocknet. Für die Injektionen wurden 3,2 mg Caenopore 5 sowie 6 mg Caenopore 1 bereitgestellt. Vor der Reinigung von Caenopore 1 wurde das N-terminale Fusionspeptid und damit der *HisTag* entfernt. Demgegenüber wurde Caenopore 5 mit Fusionspeptid, also mit *HisTag* eingesetzt. Die Immunisierung der Kaninchen übernahm die Firma *Eurogentec* (Seraing, Belgien). Den Kaninchen wurde vor der Injektion der Peptide Prä-Immuns serum entnommen. Die ersten beiden Injektionen wurden im Abstand von je 2 Wochen und die dritte nach 4 Wochen durchgeführt. Das Prä-Immuns serum, das Serum nach den ersten beiden Injektionen und das finale Serum nach drei Injektionen wurden auf Trockeneis versandt und teilweise aliquotiert bei -80 °C eingelagert.

7.3.2 Reinigung der IgGs aus Antiseren mittels Protein-G-gekoppelten Dynabeads

Na-Citratpuffer, pH 5,0 25 mM Citronensäure (C₆H₈O₇), 50 mM Na₂HPO₄ in ddH₂O

Um die unspezifische Hintergrundfärbung der Immunoblots zu minimieren, wurden die IgGs der Antiseren zunächst über Protein-G-gekoppelte *Dynabeads* (*Dynabeads*[®] Protein-G; Prod. Nr. 100.03, 1 ml, Invitrogen) isoliert. Dafür wurden 30 µl der *Dynabeads* dreimal mit 0,5 ml Na-Citratpuffer pH 5,0 gewaschen. Der Überstand konnte entnommen werden, indem die paramagnetischen *Dynabeads* durch einen Magneten im Magnetständer an den Rand des Reaktionsgefäßes gezogen wurden. Die *Dynabeads* wurden in Na-Citratpuffer Puffer pH 5,0 resuspendiert.

Zu den gewaschenen *Dynabeads* wurden 50 µl des Antiserums gegeben und für 40 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde entfernt (s.o.) und die *Dynabeads* wurden zweimal

mit je 0,5 ml Na-Citratpuffer, pH 5,0 gewaschen. Für die Elution der IgGs von den *Dynabeads* wurden diese für 2 min mit 100 µl 0,1 M Citronensäure, pH 2 - 3 inkubiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, die Überstände wurden vereinigt und im Immunoblot eingesetzt.

7.3.3 Absorption der Antiseren mit *E. coli*-Extrakt

E. coli BL21(DE3)[pAPlacI^Q]-Bakterien wurden in 400 ml LB-Flüssigmedium angezogen. Die erste Hälfte des Ansatzes wurde autoklaviert, die zweite Hälfte wurde nach Zugabe von 2,7 ml 37 % Formaldehyd (final 0,5 %) für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden vereinigt und 10 min bei 5000 x g zentrifugiert. Die Sedimente wurden zweimal mit 1 x TBS gewaschen und aliquotiert, bevor sie den anti-Caenopore-Antiseren zugesetzt wurden, die zuvor in 1 x TBS verdünnt wurden. Die Ansätze wurden jeweils über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert, bevor sie bei 3550 x g für 10 min zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden auf frische *E. coli*-Extrakt-Aliquots verteilt und für 2 h rotierend inkubiert. Dies wurde insgesamt viermal wiederholt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 20.000 x g wurden die Überstände, die die absorbierten Antikörper enthielten, im Immunoblot eingesetzt.

7.4 Isolierung von RNA aus *C. elegans*

Für die Gewinnung von RNA aus *C. elegans* wurden Tiere des gewünschten Stadiums mit 5-10 ml M9-Puffer von der NGM-Agar-Platte gespült und dreimal mit M9-Puffer gewaschen (1500 rpm, 2 min). Um die Würmer zu extrahieren, wurde zu diesem Ansatz das zweifache Volumen TRIzol[®] (Invitrogen) oder RNAmagic[®] (Bio-Budget Technologies, Krefeld) gegeben. Als effektiv erwies sich weiterhin der Einsatz eines vorgekühlten Ultraschallbades (*Bandelin Sonorex* RK 106, Berlin), in dem die Ansätze 15 min beschallt wurden sowie das wiederholte Einfrieren in flüssigem Stickstoff (*freeze & thaw*-Methode). Um die RNA zu extrahieren, wurde dem Ansatz 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat, pH 5,2 und 1/5 Volumen Chloroform hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen und 20 min Inkubation auf Eis wurden die Ansätze für 20 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde entnommen und die darin enthaltene RNA, nach Zugabe von einem Volumen Isopropanol, für mehrere Stunden bei 4 °C oder über Nacht bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation bei 20.000 x g für 15 min wurde die sedimentierten RNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10-20 µl Millipore-H₂O resuspendiert.

7.5 Reverse Transkription der RNA

Die RNA wurde in der folgenden Reaktion durch Reverse-Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (Frohman, Dush & Martin, 1988). Die Reaktion erfolgte für 1 h bei 40 °C im PCR-Cycler.

Reaktionsansatz der cDNA-Erststrangsynthese (30 µl)

- 4 µl ddH₂O
- 10 µl RNA
- 6 µl 5 x cDNA-Synthesepuffer (*Thermoskript RT*, Invitrogen)
- 2 µl 0,1 M DTT
- 2 µl 10 mM dNTP-Mix (Fermentas)
- 1 µl 10 µM Oligonukleotid A (Capfinder B1rG)
- 1 µl 10 µM Oligonukleotid B (OligodT-T7 I)
- 1 µl 40 mM MnCl₂ (Fermentas)
- 1 µl BSA (1 mg/ml)
- 1 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl) (Invitrogen)
- 1 µl *Thermoskript* Reverse Transkriptase (Invitrogen)

7.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die einzelsträngige cDNA wurde im Anschluss in einer PCR eingesetzt. Die PCR wurde nach Saiki *et al.*, 1988 durchgeführt und ermöglichte die Amplifikation der cDNA sowie die Amplifikation und Quantifizierung teilweise seltener Transkripte.

Reaktionsansatz der PCR (50 µl)

- 5 µl 10 x Taq-Polymerase-Puffer (- MgCl₂) (Fermentas)
- 3 µl 25 mM MgCl₂ (Fermentas)
- 1 µl 10 mM dNTP-Mix (Fermentas)
- 1 µl 10 µM Oligonukleotid A (Capfinder B2)
- 1 µl 10 µM Oligonukleotid B (OligodT-T7 II)
- 2 µl einzelsträngige cDNA
- 0,5 µl Taq-Polymerase (Units/µl) (Fermentas)
- 36,5 µl ddH₂O

Für die Amplifikation einzelner Transkripte aus der cDNA, um sie z. B. im Anschluss in einen Vektor zu klonieren, wurden spezifische Oligonukleotide eingesetzt (Abschnitt 9.3).

Um die Transkripte anschließend in einen Vektor klonieren zu können, waren die Oligonukleotide so konstruiert, dass sie jeweils eine zusätzliche Restriktionsenzym-spezifische Nukleotidsequenz aufwiesen.

7.6 Analyse von DNA

7.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

10x TAE-Puffer, pH 8,0	2 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA
6x DNA-Ladepuffer, pH 8,0	50 % Glycerin, 10 mM EDTA, 0,1 % SDS, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol

Die Apparatur bestand aus einer horizontalen Gelkammer, in der, je nach Anwendungsbereich, ein 1-2 % Agarose/TAE-Gel nach Zugabe von Ethidiumbromid (EtBr) gegossen wurde. Die Proben wurden mit 6xDNA-Ladepuffer versetzt bevor sie auf das Agarosegel aufgetragen wurden. Zu Beginn der Elektrophorese wurde je nach Größe des Gels eine Spannung von 30 bis 50 Volt (V) angelegt, die nach ca. einer halben Stunde auf 80 V bis 100 V erhöht wurde. Die Darstellung der Ethidiumbromid-gebundenen DNA im Gel erfolgte mittels eines Transluminators der Firma *Phase* (Lübeck). Durch die parallele Auftrennung eines DNA-Größenstandards konnte die Größe der DNA-Fragmente abgeschätzt werden.

7.6.2 Reinigung von DNA nach PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung der PCR-Produkte von Oligonukleotiden, Salzen und Proteinen erfolgte über Kits der Firma Macherey & Nagel. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

Eine weitere Methode, um Nukleinsäuren zu konzentrieren und sie von Salzen, dNTPs und anderen Verunreinigungen zu trennen, war die Ethanol-Präzipitation, in der die DNA mit Alkohol gefällt wurde. Dem DNA enthaltenden Ansatz wurden dazu 2 µM Ammoniumacetat und das 2,5-fache Volumen 99 % Ethanol zugesetzt. Nach einer Inkubation bei 4 °C, die um so länger andauerte, je geringer die Konzentration der DNA in der Lösung war, wurde die sedimentierte DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, für 20 min bei 20.000 x g zentrifugiert, getrocknet und in Millipore-H₂O resuspendiert.

Die DNA-Gelextraktion gab die Möglichkeit, DNA aus einem Agarose-Gel zu reinigen, nachdem diese entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurde. Dazu wurde die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem E.Z.N.A. Gelextraktion-Kit der Firma Peqlab gereinigt.

7.6.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm mit einem *Ultraspec 1100 pro* Photometer der Firma Amersham Biosciences.

7.6.4 Konzentrierung von Nukleinsäuren

Durch das Anlegen eines Vakuums an die Probe und die dadurch resultierende Sublimation der Flüssigkeit wurde die DNA-Konzentration in der Lösung erhöht. Es wurde die Vakuum-Zentrifuge (*SpeedVac UVS400A*) der Firma *Thermo Electron corporation* verwendet.

7.7 Synthese und Amplifikation von Expressionsvektoren

7.7.1 Klonierung in den pDrive-Vektor

Die amplifizierten und gereinigten DNA-Fragmente wurden eingangs in den pDrive-Vektor kloniert. Bei der Ligation eines PCR-Produktes in den pDrive-Vektor (Qiagen) wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen (Qiagen *kloning kit*).

7.7.2 Ligation in den pIVEX2.4a-Expressionsvektor

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in den pIVEX2.4a-Expressionsvektor wurde das entsprechende DNA-Fragment aus dem pDrive-Vektor mit spezifischen Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten, während das Plasmid mit den selben Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Für die Restriktionsreaktion wurden 0,2 bis 1 µg DNA, 5 bis 10 Units Restriktionsenzym und 2 µl des empfohlenen 10 x Puffers mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für einige Stunden bei Temperaturoptimum, meist 37 °C, inkubiert. Wenn die DNA mit mehr als einem Enzym geschnitten werden sollte, wurden Doppelrestriktions-Ansätze durchgeführt, in denen beide Restriktionsendonukleasen gleichzeitig eingesetzt wurden.

Für die Ligation wurde 1 µg linearisiertes Plasmid mit 1 µg DNA-Fragment, 2 µl 10 x T4-DNA Ligase-Puffer und 2 µl T4-DNA Ligase gemischt und mit der entsprechenden Menge ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte für einige Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C.

7.7.3 Transformation über das Hitzeschock-Verfahren

TfB I-Puffer, pH 5,8:	30 mM Kaliumacetat, 50 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 100 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 15 % Glycerin, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C
TfB II- Puffer, pH 7,0:	10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 15 % Glycerin, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C
LB-Medium	5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl, auf ddH ₂ O auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren
LB-Agar	15 g Agar-Agar, mit LB-Medium auf 1 Liter auffüllen und autoklavieren
SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 auf 1 Liter mit ddH ₂ O auffüllen und autoklavieren, 20 mM Glukose (sterilfiltriert)

Für die Vermehrung der Plasmide wurden die *E. coli* Stämme *XL1-Blue* (Stratagene, La Jolla, CA, USA) oder *DH5 α* (Invitrogen) eingesetzt.

Die Transformation wurde leicht modifiziert nach Cohen *et al.*, 1972 durchgeführt. Den Bakterien wurden 3-5 μl plasmidäre-DNA bzw. Ligationsansatz zugesetzt, worauf eine Inkubation für 20 min auf Eis erfolgte. Die Aufnahme der DNA in die Bakterien wurde durch einen Hitzeschock induziert (42 °C, 90 sec). Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien mit 200 μl SOC-Medium versehen, in welchem sie für 30 min bei 37 °C und 220 rpm regenerieren konnten, bevor sie auf eine LB-Agar amp^+ Platte gegeben und über Nacht bei 37 °C angezogen wurden.

Um kompetente Bakterien zu generieren, wurden 500 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Bakterienstamm angeimpft und für 2 h bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Die Kulturen wurden für 15 min auf Eis heruntergekühlt und 5 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 15 ml eiskaltem TfB I-Puffer resuspendiert. Die Schritte wurden wiederholt, die Bakterien in 4 ml TfB II-Puffer aufgenommen und 15 min auf Eis gehalten. Es wurden 200 μl -Aliquots angelegt, die bei -80 °C eingelagert wurden.

7.7.4 Transformation über Elektroporation

Eine weitere Methode, Plasmide in *E. coli*-Bakterien zu transfizieren, ist die Elektroporation. Die Bakterien wurden mit 0,1- 0,5 µl des jeweiligen Plasmids vermischt, in eine Elektroporationsküvette gegeben und im *Easyject Prima* Elektroporator der Firma Equibio einem kurzen elektrischen Impuls von 1,8 V ausgesetzt. Unmittelbar danach wurden die Bakterien in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 30-40 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Zellen auf LB-Agar amp⁺ Platten gegeben und über Nacht wiederum bei 37 °C inkubiert wurden.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden die Bakterien in 500 ml LB-Flüssigmedium für 2-6 h bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 herangezogen und bei 3500 rpm und 4 °C für 7 Minuten zentrifugiert. Die Sedimente wurden in eiskaltem ddH₂O vorsichtig resuspendiert. Diese Schritte wurden zweimal wiederholt, die Sedimente in 10 ml ddH₂O vereinigt, 5 min zentrifugiert und in einem Sediment-Volumen 10 % Glycerin resuspendiert. Die Bakterien wurden zu je 50 µl aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Nach der Transformation wurde, nach Inkubation über Nacht bei 37 °C, jeweils eine der bakteriellen Kolonien in einer PCR mit spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt um zu überprüfen, ob die Bakterien ein Plasmid trugen, welches ein DNA-Fragment der entsprechenden Größe besaß. Die ligierten DNA-Fragmente konnten auf diese Weise analysiert werden, bevor das entsprechende Plasmid isoliert wurde.

7.7.5 Amplifikation und Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Amplifikation der Plasmide wurden diese in kompetente *E. coli* transfiziert (Abschnitte 7.7.3 und 7.7.4). Eine der bakteriellen Kolonien wurde in 3 ml LB-amp⁺ übertragen und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm angezogen. Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde das Plasmid-Präparations-Kit der Firma Macherey & Nagel verwendet. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen.

7.7.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurden nach Sanger *et al.* (1980) durchgeführt. Die Plasmide wurden entweder der Firma SeqLab (Göttingen) zur Bearbeitung zugeschickt oder sie wurden am *MegaBACE 1000 48-Caillaries Sequencer* der Firma *Global Medical Instrumentation* (Minnesota) nach den Angaben des Herstellers sequenziert, wobei der *DYEnamic ET Terminator sequencing reagent premix* verwendet wurde.

7.7.7 Bakterien-Dauerkulturen

Um Bakterien dauerhaft zu erhalten, wurden Gefrierstocks hergestellt, die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingelagert wurden. Dafür wurden die Bakterien-Übernacht-Kulturen zu gleichen Teilen mit 86 % Glycerin versetzt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

7.8 Zielgerichtete Mutagenese

Die unterschiedliche *codon usage* von *E. coli* und *C. elegans* erforderte teilweise den zielgerichteten Austausch einzelner Nucleinsäuren in der DNA-Sequenz. Die problematischen Kodons wurden mit dem Programm *Graphical codon usage analyser 2.0* identifiziert (Fuhrmann *et al.*, 2004).

Um zielgerichtet einzelne Nucleotide auszutauschen wurde nach der *overlap-extension PCR* Methode (OE-PCR) nach Urban *et al.*, 1997 vorgegangen. Dazu wurden zwei zusätzliche Oligonukleotide eingesetzt, die das entsprechende, neue Nucleotid trugen und einander komplementär waren. In den ersten zwei von insgesamt drei PCR-Reaktionen wurde je eines der beiden Oligonukleotide mit einem der flankierenden Oligonukleotide eingesetzt, so dass diese die Enden der neu synthetisierten DNA markieren. In der dritten PCR werden die Produkte der ersten beiden Reaktionen zusammengegeben, die dann im Bereich der mutagenen Oligonukleotide hybridisieren. Die noch bestehenden Lücken können dann von einer Polymerase aufgefüllt werden.

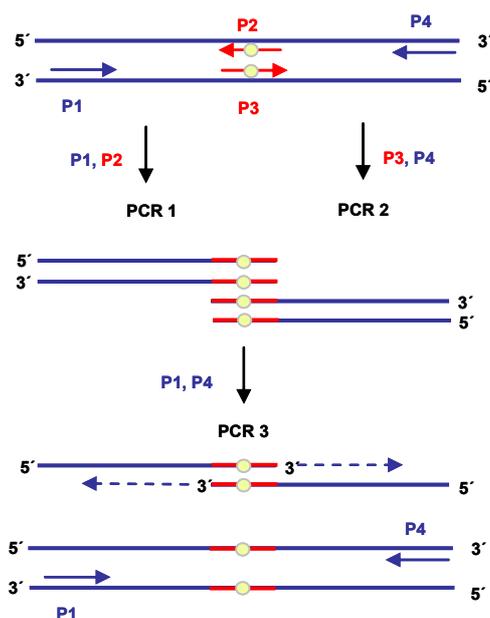


Abb. 60: Schema der Overlap-Extension-PCR zur zielgerichteten Mutagenese von DNA-Molekülen. P2, P3 mutagene Oligonukleotide, P1, P4 flankierende Oligonukleotide. Abbildung verändert nach Laborjournal, 12/2006, Urban *et al.*, 1997)

7.9 Synthese rekombinanter Caenopore-Peptide in *E. coli*

Folgende *E. coli*-Stämme wurden für die rekombinante Expression der Caenopores eingesetzt.

- **BL21(DE3)[pAPIacl^Q]** Dr. J. Clos, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg. Kanamycin-Resistenz.
- **BL21TrxB(DE3)** BL21 *trxB* Mutante; erleichtert die cytoplasmatische Bildung von Disulfidbrücken. Kanamycin-Resistenz (Novagen)

Für die rekombinante Expression wurden die mittels PCR amplifizierten, kodierenden Sequenzen der Gene *spp-1*, *spp-5* und *spp-12* in den pIVEX2.4a-Expressionsvektor kloniert. Dies erfolgte innerhalb der Restriktionsschnittstellen *Pst-1* und *Cfr421*. Die Transformation der expressionskompetenten Zellen (BL21(DE3)[pAPIacl^Q]) erfolgte mittels Elektroporation. Die Durchführung der rekombinanten Expression wurde für jedes der Caenopore-Peptide optimiert.

7.9.1 Synthese und Reinigung von Caenopore 5

10 x TBS, pH 7,2 3 g Tris, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, mit ddH₂O auf 1 Liter auffüllen, pH 7,2 einstellen mit HCl

Eine Kolonie der transfizierten Bakterien wurde in 3 ml LB amp⁺/kan^{*} Flüssigkulturmedium inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm angezogen. Diese Übernachtskultur wurde 1:100 in 20-25 ml LB amp⁺ verdünnt und in einem Erlenmeyerkolben bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,6 wurde die Expression der rekombinanten Peptide durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Translation der Fusionsproteine erfolgte über Nacht bei 37 °C und 220 rpm.

Die Bakterien wurden in 25 ml-Aliquots durch Zentrifugation sedimentiert (20 min, 3500 rpm) und in 1 x TBS, pH 7,2 resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterien in jedem der Aliquots erfolgte über Sonifikation (Abschnitt 7.9.2). Wasserunlösliche Proteine, Einschlusskörperchen und bakterielle Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (20 min, 20.000 x g) vom wasserlöslichen Proteinextrakt abgetrennt. Die Zentrifugation wurde in 2 ml Reaktionsgefäßen in einer Laborzentrifuge (Eppendorf) durchgeführt. Für die anschließende SDS/Tricin-PAGE wurde das oben gewonnene Sediment in 8 M Harnstoff resuspendiert und mit DTT reduziert, während der wässrige Überstand nach Reduktion mit 50 mM DTT direkt eingesetzt werden konnte.

7.9.2 Aufschluss der bakteriellen Zellen mittels Ultraschall (Sonifikation)

Es wurde die Sonotrode MS73 Sonoplus (Bandelin Homogenisatoren HD 2070, Berlin) eingesetzt. Die Beschallung erfolgte jeweils für 0,7 s über eine Gesamtdauer von 30 Sekunden bei 10 % Leistung. Die Beschallung wurde je nach Volumen der Ansätze 2- bis 10-mal wiederholt.

7.9.3 Glutathion-Redoxsystem

Die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten von Proteinen wurde durch das Glutathion-Redoxsystem unterstützt. Der wässrige Überstand (Abschnitt 7.9.1) wurde auf pH 8,0 eingestellt und mit 1 mM oxidiertem sowie 10 mM reduziertem Glutathion ergänzt. Die Reaktion erfolgte bei 4 °C über Nacht.

7.9.4 Immobilisierte-Metal-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Äquilibrierungspuffer	10 mM Imidazol, 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 8,0, 300 mM NaCl,
Waschpuffer 1	25 mM Imidazol, 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 8,0, 300 mM NaCl
Waschpuffer 2	50 mM Imidazol, 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 8,0, 300 mM NaCl
Elutionspuffer	250 mM Imidazol, 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 8,0, 300 mM NaCl

Die Abtrennung der Caenopore-Peptide von den *E. coli* spezifischen Proteinen wurde über die Immobilisierte-Metal-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) durchgeführt. Je 4 ml des wasserlöslichen Proteinextraktes wurden auf eine mit Äquilibrierungspuffer vorbehandelte IMAC-Säule gegeben, die aus einer mit 2 ml „Nickel-NTA His Bind Superflow“ beladenen Polypropylen-Säule (Qiagen) bestand. Die hohe Affinität der sechs Histidinreste des *HisTag* zu den NTA-immobilisierten Ni²⁺-Kationen führte zu einer reversiblen Bindung der Fusions-Proteine. Mit 8 ml Waschpuffer (25 mM Imidazol) wurden schwach gebundene Proteine entfernt, bevor die Fusions-Proteine mit 4 ml Elutionspuffer (250 mM Imidazol) eluiert wurden.

7.9.5 Reinigung über eine hydrophobe Matrix (SepPak)

Ein weiterer Reinigungseffekt wurde erzielt, in dem die IMAC-Elutionsansätze auf eine hydrophobe Matrix gegeben wurden (SepPak, 500 mg, Waters, Eschborn). Die hydrophobe Matrix der SepPak-Säule wurde mit drei Säulenvolumen 84 % Acetonitril (ACN) in 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) angefeuchtet und anschließend mit demselben Volumen 0,1 % TFA äquilibriert.

Der Elutionsansatz der IMAC-Reinigung wurde 1:1 mit 0,1 % TFA versetzt, auf die äquilibrierte SepPak-Säule geladen und mit mindestens einem Säulenvolumen (CV, *column volume*) 0,1 % TFA gewaschen. Schwach bindende Proteine wurden mit 30 % ACN entfernt, bevor die Fusionsproteine mit 84 % ACN eluiert wurden. Die Elutionsansätze wurden lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

7.9.6 Gefriertrocknung

Die Proteine wurden bei -80 °C für 1 Stunde eingefroren und in der Gefriertrocknungs-Anlage Alpha 2-4 LSC der Firma *Christ* (Osterode/Harz) bei -90 °C und in einem Vakuum 0,1 bis 0,2 mbar lyophilisiert. Dadurch wurden flüchtige Lösungsmittel wie ACN oder TFA entfernt.

7.9.7 Generierung von Caenopore 5 II

Unter der Verwendung der Oligonukleotide „CP5_ohne Arg_for“ und „T08A9.9_rev“ wurde die kodierende Nukleotidsequenz von *spp-5* so um drei Nukleotide verkürzt, dass die Aminosäuresequenz des resultierenden Caenopore 5 II-Peptids ist im Vergleich zu Caenopore 5 um den N-terminalen Argininrest verkürzt war.

7.9.8 Synthese von Caenopore 1 und 12

Die Synthese von Caenopore 1 und 12 in bakteriellen Expressionssystemen wurde mit einigen Modifikationen entsprechend Abschnitt 7.9.1 durchgeführt.

Die Expression von Caenopore 1 wurde in BL21(DE3)[pAPIacI^Q] durchgeführt, während Caenopore 12 in BL21TrxB(DE3) synthetisiert wurde. Im Unterschied zu Caenopore 5 stellte es kein Problem dar, eine *E. coli*-Expressions-Kultur in größerem Maßstab (250-500 ml) anzusetzen, so dass in einem Ansatz größere Peptidmengen gewonnen werden konnten. Die Expressions-Kulturen wurden in 50 ml-Aliquots bei 3500 rpm für

20 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes konnten die Zentrifugenröhrchen erneut befüllt und zentrifugiert werden, so dass es möglich war, einen 500 ml-Kulturansatz in 1 bis 2 50 ml-Zentrifugenröhrchen zu sedimentieren. Die Sedimente wurden in 1 x TBS pH 7,2 resuspendiert und, je nach Volumen des Sediments, auf 200-400 ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden nach der Ultraschallbehandlung (Sonotrode MS73) in 40 ml-Aliquots bei 20.000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert (Centrikon H-401 Kühlzentrifuge, Kontron, München). Glutathion wurden den Ansätzen nicht zugesetzt.

Zur Isolierung von Caenopores 1 und 12 mittels der IMAC-Chromatographie wurden 8 ml Proteinlösung auf die Nickel-NTA-Säule gegeben, bevor die Säule einmal mit 8 ml Waschpuffer I (25 mM Imidazol) gewaschen wurde. Caenopore 1 konnte zusätzlich noch einmal mit 4 ml Waschpuffer II (50 mM Imidazol) gewaschen werden. Die Elution der Peptide von der Nickel-NTA-Säule wurde mit 4 ml Elutionspuffer (250 mM Imidazol) durchgeführt.

Die Reinigung erfolgte über eine hydrophobe Matrix (SepPak), die anschließende Gefriertrocknung der Peptide wurde entsprechend Abschnitt 7.9.6 durchgeführt.

7.9.9 Abspaltung des *HisTag* mittels *Factor Xa*

10 x <i>Factor Xa</i>-Reaktionspuffer, pH 8,0	500 mM Tris, 1 M NaCl, 50 mM CaCl ₂
1 x <i>Factor Xa</i> Lagerungspuffer, pH 8,0	20 mM Tris, 500 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂ , 50 % Glycerin

Zur Abtrennung des artifiziellen N-terminalen *HisTags* vom Fusionsprotein wurde die Endoprotease *Factor Xa* eingesetzt, die C-terminal einer spezifischen Erkennungssequenz schneidet. Dazu wurde das gefriergetrocknete Fusionsprotein erst in 10 µl 10 mM HCl und dann in 1 x *Factor-Xa*-Reaktionspuffer aufgenommen, woraufhin der *Factor Xa* im Verhältnis 6:1 zugesetzt wurde. Die Reaktion wurde bei 37 °C durchgeführt und nahm, je nach Peptid, mehrere Stunden Zeit in Anspruch.

Das Fortschreiten der Restriktionsreaktion wurde über eine SDS-PAGE verfolgt. Um den *HisTag* vom Peptid zu isolieren, wurde eine IMAC-Affinitätschromatographie durchgeführt, bei der das Peptid, wegen des Verlustes der zusätzlichen Histidinreste, im Durchfluss zu erwarten war, während sowohl der isolierte *HisTag* als auch der *Factor Xa* an die Nickel-Ionen der Matrix gebunden wurden und erst durch den Einsatz von Elutionspuffer eluiert werden konnten. Die Entsalzung der Proteinlösung wurde wiederum mittels einer hydrophoben Matrix (SepPak) durchgeführt, bevor die Peptide gefriergetrocknet wurden.

7.9.10 SDS/Tricin-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

30 % Acrylamid-Lösung (Verhältnis 32 :1)

30 % Acrylamid-Lösung (Verhältnis 49 :1)

N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Ammoniumpersulfat (APS) (40 %) 400 mg APS in 1 ml ddH₂O

Anodenpuffer, pH 8,9 200 mM Tris, mit HCl auf pH 8,9 eingestellt

Kathodenpuffer, pH 8,4 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % SDS (w/v),
mit HCl auf pH 8,25 eingestellt

3 x Gelpuffer, pH 8,45 36,3 g Tris, 0,3 g SDS, mit ddH₂O auf 80 ml
auffüllen, mit 12,5 N HCl auf pH 6,8 einstellen,
mit ddH₂O auf 100 ml auffüllen

2 x Probenpuffer, pH 6,8 1,2 g Tris, 28 ml Glycerin (86 %), 8 g SDS,
0,01 % Bromphenolblau, 0,01 % Orange G, mit
ddH₂O auf 100 ml auffüllen, pH mit HCl einstellen

Trenngel (13 %) 6,5 ml 30 % Acrylamid-Lösung (49 :1), 3 ml Glycerin (87 %),
4,5 ml 3 x Gelpuffer, 1 ml ddH₂O, 7,5 µl TEMED, 16 µl 40 % APS

Sammelgel (4 %) 1,3 ml 30 % Acrylamid-Lösung (32 :1), 2,25 ml 3 x Gelpuffer,
6,45 ml ddH₂O, 10 µl TEMED, 18 µl 40 % APS

Um Peptide mit geringem Molekulargewicht im Bereich von 1 bis 100 kDa aufzutrennen, wurde das Tricin-Gelsystem nach Schagger und v. Jagow (1987) eingesetzt. Das Gel-System bestand aus einem 4 % Sammel- und einem 13 % Trenngel. Das Tricin im Kathodenpuffer diente als Folge-Ion.

Grundsätzlich wurde die SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli *et al.* 1970 durchgeführt. Die Gelplatten wurden zunächst mit je 4,5 ml Trenngel versehen bevor das Sammelgel bis zur oberen Kante der Gelplatte gegossen wurde.

Die Proteinansätze, die ggf. entsprechend Abschnitt 7.9.12 mittels DTT reduziert wurden, wurden mit einem Volumen 2 x Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde für 20 min bei 25 mA und dann bei 50 mA durchgeführt, bis die farbige Lauffront des Probenpuffers den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Zudem wurde jeweils ein Protein-Größenstandard (Abschnitt 6.1.2) mit verschiedenen Eichproteinen parallel zu den Ansätzen aufgetragen, um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können.

7.9.11 Silbernitratfärbung von Polyacrylamidgelen

- Lösung 1:** 40 % Ethanol (v/v), 10 % Essigsäure (v/v)
- 2:** 30 % Ethanol (v/v), 6,8 % Natriumacetat, 0,125 % Glutardialdehyd,
0,2 % Na₂S₂O₃ (Natriumthiosulfat-pentahydrat) (w/v)
- 3:** ddH₂O
- 4:** 0,25 % AgNO₃ (Silbernitrat) (w/v), 0,015 % Formaldehyd (v/v)
- 5:** 2,5 % Na₂CO₃ (Natriumcarbonat) (w/v), 0,0074 % Formaldehyd (v/v),
pH 11,5
- 6:** 1,5 % EDTA

Um die aufgetrennten Proteine nach der Elektrophorese darzustellen, wurde eine Silbernitratfärbung durchgeführt (Heukeshofen und Dernick, 1986).

Dafür wurde das Gel für 10 min in Lösung 1 inkubiert und anschließend in Lösung 2 für 10 min fixiert. Um die Lösung 2 vollständig zu entfernen, wurde das Gel 3 x 10 min in ddH₂O gewaschen und anschließend für 15 min in Lösung 4 inkubiert. Die Entwicklung erfolgte durch die Zugabe der Lösung 5. Wenn die Proteinbanden deutlich auf dem Gel zu erkennen waren, wurde die Reaktion durch die Lösung 6 gestoppt.

7.9.12 Reduktion mittels Dithiothreitol (DTT)

Die Proteine wurden ggf. vor ihrem Einsatz in der SDS-PAGE mit 50 mM DTT versehen und bei 70 °C für 20 min inkubiert.

7.9.13 Markierung von Cysteinresten mit Monobromobimane

Reduktionspuffer, pH 8,0 200 mM Tris, 1 % SDS, 3 mM EDTA, 3 mM DTT

Mit dieser Methode ist es möglich, quantitativ reduzierte Cysteinreste und damit nicht geschlossene Disulfidbrücken in Proteinen nachzuweisen (O'Keefe, 1994). Dafür wurden die Proteine vor der Durchführung einer SDS-PAGE mit dem Thiol-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Monobromobimane (mBBr) markiert.

Die Proteine wurden in einer Vakuum-Zentrifuge eingetrocknet, in 10 µl Reduktionspuffer aufgenommen und für 20 min bei 70 °C inkubiert. Dabei erfolgte die Reduktion der Disulfidbrücken. Die Markierung der freien Cysteinreste wurde durch die Zugabe von 6 mM mBBr gestartet und der Ansatz für 2 min in Dunkelheit inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch die Zugabe von 10 mM Cystein wurden die markierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert. Das Gel wurde für 1-2 h in 50 % Methanol gewaschen, um unspezifisch gebundenes mBBr zu entfernen und die fluoreszierenden Proteinbanden zu verdeutlichen. Im Anschluss wurde das Gel silbergefärbt.

7.9.14 Bestimmung von Peptidkonzentrationen in Lösung

Die Konzentration von gelösten Peptiden wurde photometrisch ermittelt. Dabei wurde die Absorption der Proteine bei einer Wellenlänge von 214 nm gemessen, wobei galt: $A = \epsilon_{214} \times c \times d$ mit ϵ_{214} = molarer Extinktionskoeffizient der Probe [$M^{-1}cm^{-1}$], c = Konzentration der Probe [mol/l], d = Schichtdicke der Küvette [1 cm].

Der spezifische Extinktionskoeffizient ϵ wurde, für jedes Peptid abhängig von dessen Primärstruktur, nach der folgenden Formel bestimmt (Buck *et al.*, 1989).

$$\epsilon = \frac{\{(n-1 + n_{Asn} + n_{Gln}) \times \epsilon_{Pep} + (n_{Trp} \times \epsilon_{Trp}) + (n_{Phe} \times \epsilon_{Phe}) + (n_{His} \times \epsilon_{His}) + (n_{Tyr} \times \epsilon_{Tyr})\}}{MW}$$

$n-1$ Anzahl der Peptidbindungen

n Anzahl der Aminosäurereste

ϵ Extinktionskoeffizient der jeweiligen Aminosäure bzw. der Peptidbindung

	ϵ_{Pep}	2846 [$M^{-1}cm^{-1}$]
n_{Asn}	Anzahl der Asparaginreste	
n_{Gln}	Anzahl der Glutaminreste	
n_{Phe}	Anzahl der Phenylalaninreste	ϵ_{Phe} 7208 [$M^{-1}cm^{-1}$]
n_{His}	Anzahl der Histidinreste	ϵ_{His} 6309 [$M^{-1}cm^{-1}$]
n_{Trp}	Anzahl der Tryptophanreste	ϵ_{Trp} 22735 [$M^{-1}cm^{-1}$]
n_{Tyr}	Anzahl der Tyrosinreste	ϵ_{Tyr} 5755 [$M^{-1}cm^{-1}$]

7.9.15 MALDI-TOF-Analyse

Um die exakte molekulare Masse der rekombinanten Peptide zu bestimmen und damit ihre Identität sicherzustellen, wurde eine MALDI-TOF-Analyse durchgeführt. Die über eine hydrophobe Matrix gereinigten und gefriergetrockneten Peptide wurden dafür in 0,01 % TFA resuspendiert. Die Analyse konnte aufgrund der geringen Masse der Peptide ohne vorhergehenden Trypsin-Verdau durchgeführt werden. Die Analysen wurden von Dr. Christoph Gelhaus (Zool. Institut, CAU Kiel) durchgeführt.

7.10 Aktivitätstests

In den Aktivitätstests wurden die folgenden Kontroll-Peptide eingesetzt:

- Melittin** Hauptpeptid des Bienengiftes der Honigbiene (*Apis mellifera*).
NH₂-GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-COOH
(Habermann und Jentsch, 1967; Kreil, 1973;
Tosteson und Tosteson, 1981)
- Cecropin A und B** aus der Motte *Hyalophora cecropia*.
Cecropin A: NH₂-KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAG-
PAVAVVGQATQIAK-COOH (Boman und Hultmark, 1987)
- Cecropin P1** aus dem Nematoden *Ascaris suum*.
NH₂-SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQGGPR-COOH
(Andersson *et al.*, 2003; Pillai *et al.* 2005)
- Alamethicin** aus dem Schimmelpilz *Trichoderma viride*.
NH₂-UPUUAUQUVUGLUPVUUEQF-COOH
(U : α -Methylalanin, O : Hydroxyprolin) (Sansom, 1993)
- Magainin I** aus der Haut des Krallenfrosches *Xenopus laevis*.
NH₂-GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS-COOH
(Ludtke *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997)

7.10.1 Antibakterielle Aktivitätstests

Für den Test der antibakteriellen Aktivität wurden die folgenden Bakterienstämme eingesetzt:

- Bacillus megaterium*** ATCC 14581, DSM Nr. 32 (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)
- Escherichia coli* K-12** ATCC 23716, Botanisches Institut, Universität Hamburg
- Escherichia coli* K-12 D31** Institut für Zoologie, FU Berlin, (Boman *et al.*, 1974)
- Escherichia coli* OP50** CGC (*Caenorhabditis Genetic Center*), University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA

Mikrosuszeptibilitätstest

Inkubationspuffer 10 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH auf 5,2 bzw. 7,4 einstellen

Mit diesem Test sollte die Minimal-Konzentration ermittelt werden, in der die Caenopore-Peptide noch antibakterielle Aktivität aufweisen. Aus einer 3 ml Übernachtskultur in LB-Flüssigmedium wurden 100 µl in 30 ml LB-Medium angesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 - 0,2 und damit bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 37 °C inkubiert. Die Bakterienzahl wurde in einer Formel ermittelt, die für jeden Bakterienstamm spezifische Parameter aufwies (s.u.).

Für den Test wurde eine Rundboden-Mikrotiterplatte (Sarstedt; Mikrotiterplatte 96-well R) eingesetzt, die vor Beginn des Experiments mit 0,1 % BSA für 15 min blockiert wurde, um die Adhärenz der Peptide an die Oberfläche zu verringern. In jede der 96 Vertiefungen wurden 90 µl Inkubationspuffer vorgelegt, ehe 90 µl der verdünnten Peptidlösung in die erste Reihe gegeben und in 1:2 Schritten durch verdünnt wurde. Als Positivkontrolle diente Melittin, welches mit einer Endkonzentration von 2 µM eingesetzt wurde, als Sterilkontrolle wurden 20 µl Inkubationspuffer verwendet. In einer weiteren Spalte wurde das Lösungsmittel des Peptids, meist 0,01 % TFA, entsprechend dem Volumen der eingesetzten Peptidlösung durch verdünnt.

Die Bakterienkulturen wurden mit LB-Flüssigmedium auf 10.000 CFU / ml (CFU, *colony forming units*) verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden in jede Vertiefung 10 µl, also 100 CFU gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Für die Verdünnung der Bakterien wurden die folgenden Formeln verwendet:

B. megaterium: OD₆₀₀ = 0,1 entspricht $2,2 \times 10^6$ CFU / ml

E. coli : OD₆₀₀ = 0,1 entspricht $2,5 \times 10^7$ CFU / ml

Die Proteinkonzentration, bei der kein Bakterienwachstum nachgewiesen werden konnte, wurde als MIC-Wert (minimale inhibitorische Konzentration) bezeichnet.

Um auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten Aktivität um einen rein bakteriostatischen Effekt handelte, wurde aus den Vertiefungen der Mikrotiterplatte, in denen gerade kein Bakteriensediment mehr zu erkennen, war ein Aliquot entnommen, auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die minimale bakterizide Konzentration (MBC) wurde als die Konzentration definiert, bei der keine Kolonienbildung auszumachen war.

Test auf membranpermeabilisierende Aktivität

Inkubationspuffer 1 20 mM MES, pH 5,2, 25 mM NaCl

Inkubationspuffer 2 20 mM HEPES, pH 7,4, 25 ml NaCl

Die membranpermeabilisierende Aktivität von Proteinen wurde über den Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green® (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) nachgewiesen. Durch die Schädigung der Membran, hervorgerufen durch die Wirkung der membranpermeabilisierenden Peptide, kann der Farbstoff in die Zelle eindringen und dort mit der DNA interkalieren. Diese Bindung führt zur Steigerung der Fluoreszenz-Emission, deren Zunahme im Fluoroskan II (Labsystems, Merlin, Bornheim-Hersel) bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und einer Emission von 538 nm verfolgt werden kann. Übernachtskulturen wurden 1:500 in 25 ml LB-Medium verdünnt und weitere 2-4 h bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 0,4$ inkubiert. Durch Zentrifugation für 5 min bei 2000 x g wurden die Bakterien sedimentiert und mit Inkubationspuffer gewaschen, bevor die Ansätze aufgeteilt wurden. Der erste Teil wurde erneut zentrifugiert und in 4 ml Inkubationspuffer resuspendiert, während der zweite Teil die spätere Positivkontrolle (F_{tot}) ausmachte. Dafür wurden die Bakterien in 1 ml 70 % EtOH resuspendiert, 10 min inkubiert und vor ihrem Einsatz im Test wieder in Inkubationspuffer aufgenommen.

Die Testbakterien werden nach der Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm auf die gewünschte Zelldichte verdünnt, wobei dieselbe Umrechnungsformel wie im Mikrosuszeptibilitätstest verwendet wurde. Die Konzentration der eingesetzten *B. megaterium*-Bakterien betrug 4×10^6 CFU/ml, die der *E. coli* K-12 D31 4×10^7 CFU/ml. In der ersten Reihe einer BSA-blockierten (Sigma) Flachboden-Mikrotiterplatte wurden 25 µl MES-Puffer, 100 µl 2 µM SYTOX Green® in MES-Puffer, 25 µl verdünntes Peptid sowie 50 µl Bakterien der entsprechenden Konzentration vorgelegt, in den Vertiefungen der nachfolgenden Reihen 25 µl MES-Puffer, 50 µl SYTOX Green® in MES-Puffer und 25 µl Bakterien. In jeder Reihe werden dann, ausgehend von der ersten Vertiefung, je 100 µl auf die nachfolgenden Vertiefungen übertragen, so dass eine durchgehende 1:2-Verdünnungsreihe der Probe entstand. Für die Lebendkontrolle (F_{lebend}) wurden die Bakterien lediglich mit dem Lösungsmittel der Peptide, meist 0,01 % TFA, und dem Farbstoff versetzt. Die Messungen erfolgten alle 10 Minuten für mindestens zwei Stunden. Die membranpermeabilisierende Aktivität wird durch den Prozentsatz der permeabilisierten Bakterien definiert, der sich aus der folgenden Formel ergibt:

$$\% \text{ getötete Bakterien} = ((F_{\text{Probe}} - F_{\text{lebend}}) / (F_{\text{tot}} - F_{\text{lebend}})) \times 100$$

7.10.2 Test der membranpermeabilisierenden Aktivität gegen *D. discoideum*

Inkubationspuffer	20 mM MES, pH 5,2, 150 mM NaCl, 320 mosmol/kg
Ax-Medium, pH 6,5	2,5 g „Oxoid“ Fleischpepton (tryptisch verdaut, L34), 2,5 g Pepton aus Casein, 5 g „Oxoid“ Proteose Pepton (L85), Hefe-Extrakt (Gibco BRL), 1,2 g KH ₂ PO ₄ , 0,45 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 970 ml ddH ₂ O, autoklavieren, 22,2 ml 2 M Glukose in ddH ₂ O (sterilfiltriert), 10 ml Penicillin/ Streptomycin (Stammlösung 10.000 U/ml / 10 mg/ml)

Die Aktivität gegen Amöben wurde am *Dictyostelium discoideum* Stamm „Ax3-Orf“ getestet. Die Amöben wurden axenisch in Petrischalen mit 10-20 ml Ax-Medium bei RT angezogen, in Schikanekolben mit Ax-Medium übertragen und bis zu einer Dichte von 10⁵ bis 10⁶ Zellen/ml herangezogen, wobei die Zellzahl mit Hilfe einer Thoma-Kammer bestimmt wurde. Für den Test wurden die Amöben in Inkubationspuffer gewaschen und auf eine Dichte von 1 x 10⁶ Zellen/ml verdünnt. Aus diesem Ansatz wurden je 50 µl, also 5 x 10⁴ Zellen entnommen und in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten eingesetzt. Der Test wurde entsprechend Abschnitt 7.10.1 durchgeführt.

Als Kontrollpeptide dienten die antimikrobiellen Peptide Melittin und Cecropin P1.

7.10.3 Test der membranpermeabilisierenden Aktivität gegen Hefen

In dem Test der fungiziden Aktivität fanden die folgenden Hefe-Stämme Verwendung:

<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S150 Wildstamm (F. Kempken, Inst. Botanik, CAU Kiel)
Sabouraud-Medium	30 g / l in ddH ₂ O, autoklavieren
Sabouraud-Dextrose Agar	Sabouraud-Medium, 4 % Glukose, 1 % Pepton, 1,5 % Agar
YPD-Medium	10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Pepton, 20 g/l Glukose, autoklavieren
YPD-Agar	YPD-Medium, 2 % Agar

Mit diesem Test wurde die fungizide Aktivität der Peptide ermittelt. Einerseits wurde die minimale wachstumshemmende Konzentration definiert (Mikrosuszeptibilitätstest), andererseits wurde die membranpermeabilisierende Aktivität gegen die Hefezellen mit Hilfe des Farbstoffs SYTOX Green® demonstriert.

Die Tests wurden an den Zellen der Hefepilze *Candida albicans* (ATCC 10231) und *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt, die in Sabouraud-Flüssigmedium bzw. in YPD-Medium kultiviert wurden.

Mikrosuszeptibilitätstest

Inkubationspuffer I 10 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 5,2

Um die Mindestkonzentration der Peptide, bei der noch wachstumshemmende Aktivität nachzuweisen war, zu ermitteln, wurde entsprechend Andrä *et al.*, 2001 vorgegangen. Die Hefekulturen wurden bei 28 °C bis zu einer Dichte von $3 - 4 \times 10^3$ CFU / ml angezogen und fünffach in Inkubationspuffer verdünnt. Zu 50 µl Peptidlösung, die 1:2 verdünnt in Inkubationspuffer I in jeder Vertiefung einer Rundboden-Mikrotiterplatte vorlag, wurden 50 µl der Zellsuspension (ca. 30 - 40 CFU / Vertiefung) gegeben. Die Ansätze wurden bei 28 °C für 48 h inkubiert.

Um die minimale letale Konzentration (MLC) zu ermitteln, wurden 20 µl-Aliquots aus den Vertiefungen entnommen und auf entsprechende Agar-Kulturplatten ausplattiert. Der MLC-Wert wurde als die Konzentration definiert, bei der kein Kolonienwachstum mehr beobachtet werden konnte.

Membranpermeabilisierungstest

Inkubationspuffer II 20 mM MES, pH 5,2, 25 mM NaCl

Für den Membranpermeabilisierungstest wurde eine Kolonie der Hefezellen im entsprechenden Flüssigmedium für ca. 3 h bei RT bis zu einer Konzentration von $3 - 4 \times 10^3$ CFU/ml angezogen, wobei zur Bestimmung der Zellzahl eine Thoma-Zählkammer verwendet wurde. Die Hefezellen wurden für 5 min bei 1000 x g sedimentiert, mit Inkubationspuffer II gewaschen und in 4 ml Inkubationspuffer II resuspendiert. Je 25 µl der auf eine Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml eingestellten Zellsuspension wurden zusammen mit 25 µl der Peptidlösung und 50 µl Inkubationspuffer in die erste Spalte einer BSA-blockierten Mikrotiterplatte gegeben und mit 50 µl in 1:2 Schritten über die folgenden Spalten verdünnt. In jede Vertiefung, in der sich dementsprechend 1×10^4 Zellen

befanden, wurden 50 μ l einer 2 μ M SYTOX Green[®]-Lösung in Inkubationspuffer gegeben und die Messung entsprechend Abschnitt 7.10.1 durchgeführt.

Die membranpermeabilisierende Aktivität wird durch den Prozentsatz der permeabilisierten Zellen definiert, der entsprechend Abschnitt 7.10.1 ermittelt wurde. Als F_{tot} wurde der Wert festgelegt, der sich aus der Fluoreszenz des Kontrollpeptids Melittin bei einer Konzentration von 1 μ M ergab, da sich die Hefezellen weder durch eine 15 Minuten andauernde Inkubation mit 70 % Ethanol noch durch Detergenzien wie TritonX-100 (finale Konz. 1 %) oder Essigsäure (finale Konz. 1,5 %) lysieren ließen.

7.10.4 Cytotoxizitätstest

Inkubationspuffer 20 mM MES, pH 5,5, 150 mM NaCl, 320 mosmol/kg

RPMI-Medium RPMI 1640 2 mM L-Glutamin, 2 g/l NaHCO₃,
10 % fötales Kälberserum (inaktiviert und sterilfiltriert), 100 U/ml
Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin

Die Aktivität gegen eukaryotische Zellen wurde durch den Cytotoxizitätstest überprüft. Die dafür verwendeten die humanen Jurkat T-Zellen (ATCC, Rockville, MD, USA) wurden in RPMI-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, wobei die Zelldichte ständig bei 10⁵ bis 10⁶ Zellen/ml gehalten wurde.

In diesem Test wurde die Cytotoxizität eines Proteins anhand der abnehmenden metabolischen Aktivität der Zellen gemessen (Bruhn *et al.*, 2003). Durch die metabolische Aktivität lebender Zellen wird der Oxidations-Reduktions-Indikator Alamar Blue[®] (Alamar Bioscience, Sacramento, CA, USA) reduziert, wodurch der bis dahin blaue, nicht-fluoreszierende Farbstoff einen starken Fluoreszenzanstieg und einen Farbumschlag nach rosa erfährt (O'Brien *et al.*, 2000).

Die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden mit BSA (Sigma) blockiert und mit 20 μ l Peptid der gewünschten Konzentration sowie 80 μ l Puffer befüllt, woraufhin die Verdünnung der Peptide in 1:2-Schritten erfolgte. Als Positivkontrolle (F_{Triton}) dienten Zellen, denen 50 μ l einer 0,1 % Triton X-100-Lösung zugegeben wurde, für die Negativkontrolle (F_{Puffer}) wurden die Zellen mit 50 μ l des Lösungsmittels, in dem die Peptide vorlagen (meist 0,01 % TFA) inkubiert.

Die Zellen wurden bei 150 x g für 5 min zentrifugiert und zweimal mit Inkubationspuffer gewaschen, bevor sie auf eine Zelldichte von 1,25 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt wurden. Jeweils 40 μ l dieser Zellsuspension und damit 5 x 10⁴ Zellen/Vertiefung wurden zu den

verdünnten Peptiden gegeben (t_0) und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 30 min inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden jeweils 10 µl der gebrauchsfertigen Alamar Blue®-Lösung zugegeben. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde nach weiteren 30 min der Inkubation alle 30 min am TECAN SpectraFlour gemessen, wobei die Anregungswellenlänge 538 nm und die Emissionswellenlänge 590 nm betrug. Als Kontrollpeptide wurden die antimikrobiellen Peptide Melittin und Alamethicin eingesetzt.

Die Cytotoxizität wurde mit der folgenden Formel errechnet:

$$\% \text{ Cytotoxizität} = \frac{F_{\text{Puffer}} - F_{\text{Probe}}}{F_{\text{Puffer}} - F_{\text{Triton}}} \times 100$$

7.10.5 Viabilitätstest mit Trypanblau

10 x PBS, pH 7,4 80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na₂HPO₄ * 2 H₂O, 2,4 g KH₂PO₄,
auf 1 Liter auffüllen

Die Konzentration toter Zellen wurde durch Trypanblau-Färbung überprüft. Dafür wurden die Zellen sedimentiert, mit 1x PBS gewaschen, für 5 min bei RT mit einer Trypanblau-Lösung (0,4 %) inkubiert und anschließend vorsichtig mit 1x PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen in einer Zählkammer ausgezählt. Geschädigte oder tote Zellen waren blau angefärbt, da der Farbstoff in sie eindringen konnte, während lebende Zellen ungefärbt blieben.

7.10.6 Liposomendepolarisationstest

Liposomenpuffer	50 mM Tris-Maleat, 50 mM K_2SO_4 , 0,5 mM EDTA- Na_2 , 0,02 % Natriumacid, pH mit KOH eingestellt
Küvettenpuffer	50 mM Tris-Maleat, 50 mM Na_2SO_4 , 0,5 mM EDTA- Na_2 , 0,02 % Natriumacid, pH mit NaOH eingestellt

Mit Hilfe dieses Tests wurde die porenbildende Aktivität der Caenopores an liposomalen Membranen gemessen. Für den Test wurde die Membran-Depolarisation von Liposomen mit Hilfe des potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes 3,3'-Diethylthiadicarbocyaniniodid (DTDC = diS-C2-(5), Kodak) in einem Lumineszenzspektrometer (Luminescence Spectrometer LS 50 B, Perkin Elmer, Fremont, USA) gemessen und dargestellt (Loew *et al.* 1983). Die Anregungswellenlänge für den Farbstoff betrug 620 nm und die Emissionswellenlänge 670 nm.

Die Liposomen wurden nach Pick, 1981 erzeugt, indem 60 mg eines Phospholipidgemisches aus Sojabohnen (Phosphatidylcholin, Typ II S) in 1,5 ml Chloroform gelöst wurden. Die Lösung wurde in einem Rundkolben angesetzt und durch vorsichtiges Drehen des Kolbens eingetrocknet, so dass ein dünner Lipidfilm an der Wand des Kolbens entstand. Reste des Chloroforms wurden mit einem Exsikkator unter Vakuum entfernt. Der Lipidfilm wurde in 1,5 ml Liposomenpuffer gelöst. Die Suspension wurde auf Eis 15 min mit Ultraschall beschallt. Anschließend wurde die Suspension fünfmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C wieder aufgetaut, bevor sie final noch dreimal für je 5 Sekunden beschallt wurde.

Für die Messung wurden 2 µl Liposomen (40 mg/ml) und 1 µM (8 µl) Fluoreszenzfarbstoff (Stock-Lösung.: 1 mM in $EtOH_{absol}$) mit 8 ml Küvettenpuffer gemischt. Die resultierende Fluoreszenz (100 %) wurde durch die Zugabe von 1 nM (2 µl) Valinomycin (Stock-Lösung.: 0,5 µM in $EtOH_{absol}$) zu 1 ml Reaktionsansatz um 90 % abgeschwächt. Valinomycin katalysiert den Kaliumionen-Transport über die Membran, wodurch ein K^+ -Diffusionspotential über der Membran entsteht. Die Suppression der Fluoreszenz wird durch dieses K^+ -Diffusionspotential induziert, da der Farbstoff an die Liposomen bindet und seine fluoreszierende Eigenschaft verliert.

Durch die Zugabe eines Moleküls mit porenbildender Aktivität bricht das Membranpotential zusammen, der Farbstoff wird freigesetzt und die Fluoreszenz steigt an. Ein Anstieg um 5 % innerhalb einer Minute bei 28 °C wurde als eine Aktivitätseinheit (Unit) definiert (Leippe *et al.* 1991). Als Positivkontrolle wurde das antimikrobielle Peptid Alamethicin eingesetzt, welches eine Aktivität von ca. 100 U/nmol aufweist (Andrä *et al.*, 2003).

7.11 Darstellung von Oligomeren

Die Methode der chemischen Kreuzvernetzung von Proteinen und damit die Darstellung oligomerer Strukturen wurde nach Hoare und Koshland, 1966 und Carraway und Koshland, 1972 durchgeführt.

7.11.1 Chemisches Kreuzvernetzen von Oligomeren in Lösung

Je 0,5 µg Peptid in 0,01 % TFA wurden mit 4 mM EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] Carbodiimid) und 10 mM Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimid) über Nacht bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 mM Glycin gestoppt. Die Peptide wurden reduziert und mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt.

7.11.2 Chemisches Kreuzvernetzen von Oligomeren an Liposomen

Um die Oligomerisierung von Peptiden an liposomalen Membranen darzustellen, wurden je 0,5 µg Peptid mit 1 mg/ml Liposomen und Küvettenpuffer pH 5,2 bzw. pH 7,4 auf ein Volumen von 20 µl eingestellt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 4 °C wurden die Liposomen für 30 min bei 24 Psi (*pounds per square inch*), ungefähr 100.000 x g, in einer Airfuge-Ultrazentrifuge (Beckmann, Palo Alto, CA USA) sedimentiert. Das Sediment wurde einmal mit Küvettenpuffer gespült (pH 5,2 bzw. pH 7,4) und in 25 µl 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0 resuspendiert. Für die chemische Kreuzvernetzung der Oligomere wurden 0,2 mM DSP (Stammlösung: 25 mM Dithiobis-(succinylpropionat) in DMSO) addiert und 20 min bei RT inkubiert (Lomant und Fairbanks, 1976). Die Reaktion wurde durch einen 200-fachen Überschuss Tris-Puffer gestoppt. Sowohl der Überstand als auch das resuspendierte Sediment wurde mit DTT reduziert und elektrophoretisch aufgetrennt.

7.11.3 Auflösung oligomerer Protein-Strukturen

Die Stabilität von Protein-Aggregaten wurde definiert, in dem die rekombinant synthetisierten Caenopore 1 und 12-Peptide mit stark denaturierenden bzw. reduzierenden Chemikalien inkubiert wurden (Podack und Tschopp, 1982). Dazu wurden je 0,5 µg Peptid mit 2 % SDS, 8 M Harnstoff und 20 mM Iodacetamid (IAA) versetzt und bei 37 °C für 16 Stunden oder bei 99 °C für 5 bzw. 60 min inkubiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

In einem zweiten Ansatz wurde je 1 µg der Peptide mit 10 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,4 bzw. mit 8 M Guanidin-Hydrochlorid und 20 mM IAA oder 8 M Guanidin-Hydrochlorid und 20 mM DTT für 3 h bei 60 °C inkubiert. Die Ansätze wurden 24 h gegen 20 mM Tris pH 8,0 dialysiert und nach Denaturierung bei 60 °C für 10 min mittels SDS-PAGE analysiert.

7.12 Analyse der Caenopore-Expression

7.12.1 Nachweis der Caenopore-Transkription in verschiedenen Entwicklungsstadien von *C. elegans*

Aus embryonalen und adulten Tieren sowie aus verschiedenen Larvenstadien von *C. elegans* wurde RNA isoliert, welche anschließend in cDNA umgeschrieben wurde. Für die Gewinnung embryonaler RNA wurden *C. elegans*-Eier verwendet, die aus einer synchronisierten *C. elegans*-Kultur isoliert und über einen Saccharose-Gradienten gereinigt wurden. Die Larvenstadien wurden 21, 41 und 64 Stunden nach der Synchronisation entnommen. Als Positivkontrolle wurden Oligonukleotide für das ribosomale Gen *rpl-29* eingesetzt. Die PCR wurde entsprechend Abschnitt 7.5.1 durchgeführt.

7.12.2 Primäre embryonale Zellkultur mit *C. elegans*

L-15 Medium 50 ml L-15 Medium, 10 % FKS (Fetales Kälberserum), 50 U/ml Penicillin (Stammlösung 10.000 U/ml), 50 µg/ml Streptomycin (Stammlösung 10 mg/ml)

Für die Etablierung einer primären, embryonalen *C. elegans*-Zellkultur, die nach Christensen *et al.*, 2002 durchgeführt wurde, wurden Nematoden des Stammes JR1838 wls84 eingesetzt (Estevez *et al.* 2003, Clucas *et al.* 2002). Diese Würmer tragen ein *elt-2::gfp*-Fusionskonstrukt, welches bereits in sehr frühen Larvalstadien zur dauerhaften Synthese von GFP in den Zellkernen der Darmzellen führt. Das Gen *elt-2* kodiert für einen autoregulatorischen GATA-Transkriptionsfaktor, der für die Differenzierung des Darmepithels von großer Bedeutung ist (Fukushige *et al.* 1998).

Gläserne Deckgläschen (24 x 24 mm) wurden in einer sterilen Petrischale (65 x 15 mm) gestapelt, wobei auf jedes Deckglas zwei Tropfen einer Lektin-Lösung (Erdnuss-Lektin: 0,5 mg/ml in sterilem ddH₂O) gegeben wurden, bevor es durch das nachfolgende Glas bedeckt wurde. Nach einer Inkubation für 20 min wurden die Gläschen getrennt und

schräg liegend 30 min unter UV-Licht getrocknet. Die beschichteten Deckgläschen wurden steril gelagert.

Die Eier adulter Hermaphroditen wurden, wie in Abschnitt 7.1.2 dargestellt, isoliert und mittels eines Saccharose-Gradienten gereinigt. Die isolierten Eier wurden in 50 µl *Egg-Buffer* aufgenommen, bevor die chitinhaltigen Eihüllen durch Zugabe von 100 µl *Chitinase*-Lösung (Stammlösung: 1 U/ml) und Inkubation von 30-40 min bei RT entfernt wurden. Wenn mindestens 80 % der Eihüllen entfernt waren, wurde die Reaktion gestoppt. In diesem Zustand glichen die Embryonen unter dem Mikroskop kleinen Beeren und die stark lichtbrechende ovale Eihülle war verschwunden. Die Embryonen wurden 1 min bei 50 x g zentrifugiert und die *Chitinase*-Lösung wurde möglichst vollständig entfernt, bevor die Embryonen unter sterilen Bedingungen in 800 µl L-15-Medium aufgenommen wurden. Mit einer sterilen 18G-Kanüle (Neoject, Dispomed®) und einer sterilen 1 ml-Einmalspritze (Dispomed) wurden die embryonalen Zellen durch vorsichtiges auf- und abziehen vereinzelt. Der Dissoziationsgrad der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Zellsuspension wurde vorsichtig mit der Spritze aufgenommen und auf die Lektin-beschichteten Deckgläschen verteilt. Nach 2-3 Stunden, nachdem der Großteil der Zellen sedimentiert war, konnte das L-15-Medium vorsichtig entfernt und durch einige Milliliter frisches L-15-Medium ersetzt werden. Dieser Medienwechsel ermöglichte zusätzlich die Abtrennung nicht dissoziierter Embryonen und nicht sedimentierter Zellen.

Nach jeweils 24, 48, 96 und 120 Stunden wurde das L-15-Medium gewechselt und Differenzierung sowie Viabilität der Zellen (Trypanblau) überprüft (Abschnitt 7.10.5)

7.12.3 Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS)

Die FACS-Analyse der Zellen wurde am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg, von Dr. Thomas Jakobs durchgeführt. Die Zellen wurden durch Trypsinbehandlung von der lektinbeschichteten Glasoberfläche gelöst, entnommen und 10 min bei 350 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml L-15-Medium resuspendiert, gefiltert (40 µm Porengröße, Falcon) und mittels Durchflusszytometrie in einem *Fluoreszenz Activated Cell Sorter* nach Größe, Granularität und Fluoreszenzstärke sortiert. Dabei wurden sowohl die Darmzellen als auch die „Nicht-Darmzellen“ getrennt voneinander sortiert. Die Zellen wurden, nachdem sie einer erneuten Analyse unterzogen wurden, in TRizol® aufgenommen und bei -20 °C bis zur Isolierung der RNA gelagert. Die darmspezifische RNA sowie die RNA der Kontrollzellen wurden mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und in einer quantitativen PCR eingesetzt.

7.13 Stilllegung von Genen über die RNA-Interferenz-Methode (RNAi)

2xYT-Medium 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, pH auf 7,0 einstellen, mit ddH₂O auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren

Die Stilllegung der ausgewählten Gene mittels RNAi erfolgte nach der Methode von Timmons *et al.*, 2001. Die Plasmide wurden entsprechend der gängigen Klonierungsmethodik erzeugt, wobei für alle Zwischenschritte kompetente DH5 α -Bakterien verwendet wurden.

Die pSport1-Plasmide sowie die über eine PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden mit *EcoRI* und *Pst-1* Restriktionsenzymen geschnitten und ligiert. Zusätzlich zum klonierten DNA-Fragment besitzt der pSport-Vektor zwei flankierende konvergente T7-Promotoren, welche die Transkription zweier einzelsträngiger, einander revers komplementärer RNA-Moleküle und damit die Synthese eines doppelsträngigen RNA-Moleküls ermöglichen (Abb. 20).

Die pSport-1-Vektoren wurden entsprechend Abschnitt 7.7.3 in kompetente HT115(DE3) *E. coli*-Bakterien transformiert, die vom *Caenorhabditis genetic center* (CGC) bezogen wurden. Die Bakterien wurden auf LB-Agar amp⁺ Platten (100 μ g/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C angezogen. Eine Kolonie wurde in 2 ml 2xYT-Medium (amp⁺/tet⁺) (100 μ g/ml Ampicillin, 12,5 μ g/ml Tetracyclin) übertragen und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Diese Kultur wurde 100-fach in 3 ml 2xYT-Medium (carb⁺/tet⁺) (50 μ g/ml Carbenicillin) verdünnt und für 2 - 3 h bei 37 °C und 220 rpm angezogen, bis eine OD₆₀₀ = 0,4 erreicht war. Die Transkription der klonierten DNA-Fragmente wurde durch die Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Die Inkubation wurde für 2 - 4 Stunden fortgesetzt bevor die Bakterien auf Antibiotika / IPTG versetzte NGM-Agar-Platten überführt wurden (50 μ g/ml Carbenicillin, 12,5 μ g/ml Tetracyclin, 0,4 mM IPTG).

Auf diese Bakterien wurden 5 - 10 Larven des N2 Wildtypstammes von *C. elegans* bzw. Larven des Stammes *rrf-3*, einer RNAi-sensitiven Mutante gesetzt, die ebenfalls vom CGC bezogen wurden. Das Gen *rrf-3* kodiert für eine RNA-spezifische RNA-Polymerase, die den Effekt somatischer RNA-Interferenz inhibiert. Tiere, denen dieses Gen fehlt, weisen daher eine verstärkte Empfindlichkeit für dsRNA und den RNAi-Effekt auf und ermöglichen die verstärkte Ausprägung der Phänotypen (Simmer *et al.*, 2002). Nach zwei Tagen wurden einige Larven der F1-Generation auf frisch angezogene Bakterien gesetzt. Die Ausbildung der Phänotypen wurde an den folgenden fünf Tagen beobachtet. Es war darauf zu achten, dass zu keinem Zeitpunkt Nahrungsmangel herrschte, um den RNAi-Effekt nicht zu gefährden.

Die im Vorfeld der Arbeit durchgeführten RNAi-Experimente wurden von Dr. T. Roeder (jetzt Zool. Institut, CAU Kiel) nach Angaben von Wang und Barr durchgeführt (Wang und Barr, 2005). Dafür wurde die kodierende Sequenz der ausgewählten Gene entsprechend der *EcoRI*-Schnittstelle zwischen die beiden T7-Promotor-Regionen des pSport I Vektors kloniert und die Konstrukte in *E. coli* HT115(DE3) transformiert. Für die Experimente wurde jeweils die gleiche Anzahl *C. elegans*-Eier auf entsprechend vorbereitete Kulturplatten gegeben, woraufhin zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Nachkommen, die das adulte Stadium erreichten, ausgezählt wurden. Die Zahl der im Darm überlebenden *E. coli*-Bakterien wurde ermittelt, indem die Würmer für 30 min auf Ampicillinresistenten *E. coli*-Bakterien gehalten, zweimal mit M9-Puffer gewaschen, für 30 min auf frische NGM-Platten überführt und anschließend homogenisiert wurden. Die homogenisierten Tiere wurden auf LB amp⁺-Agar Platten ausgebracht und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zahl der entstandenen Kolonien wurde am nächsten Tag ausgezählt. Der Fettgehalt der Würmer wurde mittels Nil-Rot dargestellt. Die Färbung erfolgte nach dem Protokoll von Ashrafi *et al.*, 2003. Die Fotos der Würmer wurden unter identischen Bedingungen mit einem Leica Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen.

Alle Werte wurden unter denselben Bedingungen auch für Tiere des Wildtyps bzw. für Tiere erhoben, die mit der doppelsträngigen RNA des GFP-kodierenden Gens behandelt wurden.

7.14 Programme für *In-silico*-Sequenzanalysen

Für die Sequenzanalyse der Gene und Proteine wurden die folgenden Software-Programme verwendet:

ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/
BioEdit 7.0.5.3	http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html
Mega 3.1	http://www.megasoftware.net/index.html
Consite	http://mordor.cgb.ki.se/cgi-bin/CONSITE/consite
Vista	http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
SignalP 3.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
ExPASy	http://us.expasy.org/tools/protparam.html
MS-Digest	http://vigen.biochem.vt.edu/protein_prospector/ucsfhtml4.0/msdigest.htm
GCUA 2.0	http://gcu.schoedl.de/

8 LITERATUR

- Aballay, A., Yorgey, P. und Ausubel, F. M. (2000)** *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 10:1539–1542
- Aballay, A. und Ausubel, F. M. (2001)** Programmed cell death mediated by *ced-3* and *ced-4* protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium* mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 2735–2739
- Aballay, A., Drenkard, E., Hilbun, L. R. und Ausubel, F. M. (2003)** *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signalling pathway. *Curr. Biol.* 13: 47–52
- Aderem, A. und Ulevitch, R. (2000)** Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406:782–787
- Albert, P. S. und Riddle, D. L. (1988)** Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae. *Dev. Biol.* 126: 270–293
- Albertson, D.G. und Thomson, J.N. (1976)** The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans. R. Soc Lond. B. Biol. Sci.* 275: 299–325.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990)** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–10.
- Anderson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jörnvall, H., Mutt, V., Olsson, B., Wigzell, H., Dagerlind, A., Boman, H. G. und Gudmundsson, G. H. (1995)** NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumor activity. *EMBO J.*14:1615–1625
- Anderson, D. H., Sawaya, M. R., Cascio, D., Ernst, W., Modlin, R., Krensky, A. und Eisenberg, D. (2003)** Granulysin crystal structure and a structure-derived lytic mechanism. *J. Mol. Biol.* 325: 355–365
- Andersson, M., Boman, A. und Boman, H. G. (2003)** *Ascaris* nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 599–606
- Andrä, J. und Leippe, M. (1994)** Pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. Significance of positively charged amino acid residues for its mode of action. *FEBS Lett.* 354: 97–102
- Andrä, J., Berninghausen, O. und Leippe, M. (2001)** Cecropins, antibacterial peptides from insects and mammals, are potently fungicidal against *Candida albicans*. *Med. Microbiol. Immunol.* 189: 169–173
- Andrä, J., Herbst, R. und Leippe, M. (2003)** Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev. Comp. Immunol.* 27: 291–304
- Andrä, J., Berninghausen, O. und Leippe, M. (2004)** Membrane lipid composition protects *Entamoeba histolytica* from self-destruction by its pore-forming toxins. *FEBS Lett.* 564: 109–115

- Andrew, A. P. und Nicholas, W. L. (1976)** Effect of bacteria on dispersal of *Caenorhabditis elegans* (Rhabditidae). *Nematologica* 22: 451-561
- Asai, T., Tena, G., Plonikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M. und Sheen, J. (2002)** MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977–983
- Ashrafi, K., Chang, F. Y., Watts, J. L., Frasser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J. und Ruvkun, G. (2003)** Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*, 421: 268-272
- Azumi, K., Yokosawa, H. und Ishii, S. (1989)** Halocyclins: novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochemistry*, 29: 159-165
- Bányai, L. und Patthy, L. (1998)** Amoebapore homologs of *Caenorhabditis elegans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1429: 259-264
- Baumann, G. und Müller, P. (1974)** A molecular model of membrane excitability. *J. Supramol. Struct.* 2: 538-557
- Barrière, A. und Félix, M. A. (2005)** High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. *Curr. Biol.* 15: 1176–1184
- Bolla, R. I., Weinstein, P. P. und Cain, G. D. (1972)** Fine structure of the coelomocyte of adult *Ascaris suum*. *J. Parasitol.* 58: 1025-1036
- Boman, H. G., Nilsson-Faye, I., Paul, K. und Rasmuson, T., Jr. (1974)** Insect immunity. I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infect. Immun.* 10: 136-145
- Boman, H.G. und Hultmark, D. (1987)** Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 103-126
- Borgonie, G., Claeys, M., Vanfleteren, L., De Waele, D. und Coomans, A. (1995)** Presence of peritrophic-like membranes in the intestine of three bacteriophagous nematodes (Nematoda: Rhabditida). *Fundam. Appl. Nematol.* 18: 227-233
- Brenner, S. (1974)** The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77: 71-74
- Brenner, S. (2002)** Nature's gift to science. *Nobel Lecture*, December 8
- Britton, C., McKerrow, J. H. und Johnstone, I. L. (1998)** Regulation of the *Caenorhabditis elegans* gut cysteine protease gene *cpr-1*: Requirement for GATA motifs. *J Mol Biol.* 283: 15-27
- Bruhn, H., Riekens, B., Berninghausen, O. und Leippe, M. (2003)** Amoebapores and NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. *Biochem. J.* 375: 737–744
- Bruhn, H. (2005)** A short guided tour through functional and structural features of Saposin-like proteins. *Biochem. J.* 389: 249-257
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L. und Hoffmann, D. (1999)** Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol.* 23: 329-344

- Bulet, P., Stöcklin, R. und Menin, L. (2004)** Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.* 198: 169–184
- Buck, M. A., Olah, T. A., Weitzmann, C. J. und Cooperman, B. S. (1989)** Protein estimation by the product of integrated peak area and flow rate. *Anal. Biochem.* 166: 368-379
- Byerly, L., Scherer, S. und Russell, R. L. (1976)** The life cycle of the nematode *C. elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Dev. Biol.* 51: 23–33
- Carraway, K. L., und Koshland Jr. D. E. (1972)** Carbodiimide modification of proteins. *Meth. Enzymol.* 25: 616-623
- Cassada, R. C. und Russell, R. L. (1975)** The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 46: 326–342
- C. elegans sequencing consortium (1998)** Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012-2018
- Chitwood, B. G. und Chitwood, M. B. (1974)** Introduction to Nematology. *University Park Press*, Baltimore, USA
- Clucas, C., Cabello, J., Büssing, I., Schnabel, R. und Johnstone, L. (2002)** Oncogenic potential of a *C. elegans cdc-25* gene is demonstrated by a gain-of-function allele. *EMBO J.* 21: 665–674
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. und Hsu, L. (1972)** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2110-2114
- Cohn, J., Sessa, G. und Martin, G. B. (2001)** Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 55–62
- Couillault, C., Pujol, N., Reboul, J., Sabatier, L., Guichou, F.-F., Kohara, Y. und Ewbank, J. J. (2004)** TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat. Immunol.* 5: 488 - 494
- Christensen, M., Estevez, A., Yin, X., Fox, R., Morrison, R., McDonnell, M., Gleason, C., Miller, D. M. und Strange, K. (2002)** A Primary Culture System for Functional Analysis of *C. elegans* Neurons and Muscle Cells. *Neuron* 33: 503–514
- Dangl, J. L. und Jones J. D. G. (2001)** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826–833
- Darby, C., Hsu, J. W., Ghori, N. und Falkow, S. (2002)** Plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature* 417: 243-244
- deAlba, E., Weiler, S. und Tjandra, N. (2003)** Solution structure of human saposin C: pH-dependent interaction with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 42: 14729-14740
- Dorman, J. B., Albinder, B., Shroyer, T. und Kenyon, C. (1995)** The *age-1* and *daf-2* genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 141: 1399-1406
- Ehrenstein, G. und Lecar, H. (1977)** Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q. Rev. Biophys.* 19: 1-34

- Ernst, W. A., Thoma-Uszynski, S., Teitelbaum, R., Ko, C., Hanson, D. A., Clayberger, C., Krensky, A. M., Leippe, M., Bloom, B. R., Ganz, T. und Modlin, R. L. (2000)** Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J. Immunol.* 165: 7102–7108
- Espino, A. M. and Hillyer, G. V. (2003)** Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saposin-like protein family. *J. Parasitol.* 89: 545–552
- Estevez, A. Y., Roberts, R. K. und Strange, K. (2003)** Identification of Store-independent and Store-operated Ca^{2+} Conductances in *Caenorhabditis elegans* Intestinal Epithelial Cells. *J. Gen. Physiol.* 122: 207–223
- Fahrner, R. L., Dieckmann, T., Harwig, S. S., Lehrer, R. I., Eisenberg, D. und Feigon, J. (1996)** Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem. Biol.* 3: 543-550
- Fares, H. und Greenwald, I. (2001)** Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: coelomocyte uptake defective mutants. *Genetics* 159: 133-145
- Farouk, S. E., Mincheva-Nilsson, L., Krensky, A. M., Dieli, F. und Troye-Blomberg, M. (2004)** γ δ T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. *Eur. J. Immunol.* 34: 2248–2256
- Finch, C. E. und Ruvkun, G. (2001)** The genetics of aging. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2: 435–462
- Fire, A., SiQun, X., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello C. C. (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811
- Fleming, A. (1922)** One remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. London, Series B*, 93: 306-317
- Franz, O., Bruchhaus, I. und Roeder, T. (1999)** Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic Acids Res.* 27
- Frazer, K. A., Pachter, L., Poliakov, A., Rubin, E. M., und Dubchak, I. (2004)** VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* 32, W273-9.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. und Martin, G. R. (1988)** Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002
- Fukushige, T., Hawkins, M. G. und McGhee, J. D. (1998)** The GATA-Factor *elt-2* is essential for formation of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev. Biol.* 198: 286-302
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schödl, T., Heitzer, M. und Hegemann, P. (2004)** Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol. Biol.* 55: 869-881

- Garigan, D., Hsu, A.-L., Andrew, G. Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J., und Kenyon, C. (2002)** Genetic Analysis of Tissue Aging in *Caenorhabditis elegans*: A Role for Heat-Shock Factor and Bacterial Proliferation. *Genetics* 161: 1101-1112
- Garsin, D. A., Sifri, C. D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K. V., Murray, B. E., Calderwood, S. B. und Ausubel, F. M. (2001) A simple model host for identifying gram-positive virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10892–10897
- Garsin, D. A., Villanueva, J. M., Begun, J., Kim, D. H., Sifri, C. D., Calderwood, S. B., Ruvkun, G. und Ausubel, F. M. (2003)** Long-lived *C. elegans daf-2* mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science* 300: 1921
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D. und Bairoch, A. (2003)** ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-3788
- Gravato-Nobre, M. J. und Hodgkin, J. (2005)** *Caenorhabditis elegans* as a model for innate immunity to pathogens. *Cell Microbiol.* 7: 741–751
- Guarente, L. und Kenyon, C. (2000)** Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408: 255–262
- Gutsmann, T., Riekens, B., Bruhn, H., Wiese, H., Seydel, U. und Leippe, M. (2003)** Interaction of Amoebapores and NK-lysin with Symmetric Phospholipid and Asymmetric Lipopolysaccharide/Phospholipid Bilayers. *Biochemistry* 42: 9804-9812
- Habermann, E., und Jentsch, J. (1967)** Sequenzanalyse des Melittins aus den tryptischen und peptischen Spaltstücken. *Hope-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 348:37-50.
- Hall, D. H. und Russel, R. L. (1991)** The posterior nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*: Serial reconstruction of identified neurons and complete pattern of synaptic interactions. *J. Neurosci.* 11: 1-22
- Hallick, R. B., Chelm, B. K., Gray, P. W. und Orozco, Jr. E. M. (1977)** Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation. *Nucleic. Acids Res.* 4: 3055-3064
- Hancock, K., Mohamed, Y. B., Haichou, X., Noh, J., Dotson, E. M. und Tsang, V. C. (1997)** A recombinant protein from *Schistosoma mansoni* useful for the detection of *S. mansoni* and *Schistosoma haematobium* antibodies. *J. Parasitol.* 83: 612-618
- Hasnain, S. E., Begum, R., Ramaiah, K. V. A., Sahdev, S., Shajil, E. M., Taneja, T. K., Mohan, M., Athar, M., Sah, N. K. und Krishnaveni, M. (2003)** Host–pathogen interactions during apoptosis. *J. Biosci.* 28: 349–358
- Hecht, O., van Nuland, N. A., Schleinkofer, K., Dingley, A. J., Bruhn, H., Leippe, M. und Grötzinger, J. (2004)** Solution structure of the pore-forming protein of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 279: 17834-17841
- Hedgecock, E. M. und White, J. G. (1985)** Polyploid tissues in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 107:128-33
- Herbst, R., Ott, C. und Leippe, M. (2002)** Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J. Biol. Chem.* 277: 22353-22360

- Heukeshofen, J. und Dernick, R. (1986)** Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamid: Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. LKB-Application Note RE-034
- Hoare, D. G. und Koshland Jr., D. E. (1966)** A procedure for the selective modification of carboxyl groups in proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 88: 2057-2058
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C.A. und Ezekovitz, R. A. B. (1999)** Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313–1318
- Holt, B. F., Hubert, D. A., Dangl, J. L. (2003)** Resistance gene signalling in plants – complex similarities to animal innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 20–25
- Horvitz, H. R. (2002)** Worms, life and death. *Nobel Lecture*, December 8
- Hsin, H. und Kenyon, C. (1999)** Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* 399: 362–366
- Imler, J.- L. und Hoffmann, J. A. (2001)** Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell. Biol.* 11: 304–311
- Inoue, H., Tateno, M., Fujimura-Kamada, K., Takaesu, G., Adachi-Yamada, T. Ninomiya-Tsuji, J., Irie, K., Nishida, Y. und Matsumoto, K. (2001)** A *Drosophila* MAPKKK, D-MEKK1, mediates stress responses through activation of p38 MAPK. *EMBO J.* 20: 5421–5430
- Izadpanah, A. und Gallo, R. L. (2005)** Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol.* 52: 381-390
- Jacobs, T., Bruhn, H., Gaworski, I., Fleischer, B. und Leippe, M. (2003)** NK-lysin and its shortened analog NK-2 exhibit potent activities against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 607-613
- Jollès, P. und Jollès, J. (1984)** What's new in lysozyme research? *Mol. and Cell. Biochemistry* 63: 165-189
- Kato, Y., Aizawa, T., Hoshino, H., Kawano, K., Nitta, K. und Zhang, H. (2002)** Abf-1 and abf-2, ASABF-type antimicrobial peptide genes in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 361: 221–230
- Khush, R. S. und Lemaitre, B. (2000)** Genes that fight infection – what the *Drosophila* genome says about animal immunity. *Trends Genet.* 16: 442–449
- Kim, D. H., Feinbaum, R., Alloing, G., Emerson, F. E., Garsin, D. A., Inoue, H., Tanaka-Hino, M., Hisamoto, N., Matsumoto, K., Tan, M.-W. und Ausubel, F. M. (2002)** A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* 297 :623–626
- Kini, R. M. und Evans H. J. (1989)** A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. *Int. J. Pept. Protein. Res.* 34: 277-286
- Kiontke, K., Hironaka, M., und Sudhaus, W. (2002).** Description of *Caenorhabditis japonica* n. sp. (Nematoda: Rhabditida) associated with the burrower bug *Parastrachia japonensis* (Heteroptera: Cydnidae) in Japan. *Nematology* 4: 933–941.
- Kiontke, K., Gavin, N. P., Raynes, Y., Roehrig, C., Piano, F. und Fitch, D. H. A. (2004)** *Caenorhabditis* phylogeny predicts convergence of hermaphroditism and extensive intron loss. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9003-9008

- Koch, R. van Luenen, H. G. A. M., van der Horst, M., Thijssen, K. L. und Plasterk, R. H. A. (2000)** Single nucleotide polymorphism in wild isolates of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res.* 10: 1690-1696
- Kreil, G. (1973)** Structure of melittin isolated from two species of honey bees. *FEBS Lett.* 33: 241-244
- Kumar, S., Tamura, K., und Nei, M. (2004)** MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150- 163
- Kunitomo, H., Uesugi, H., Kohara, Y. und Iino, Y. (2005)** Identification of ciliated sensory neuron-expressed genes in *Caenorhabditis elegans* using targeted pull-down of poly(A) tails. *Genome Biol.* 6: R17
- Kurz, C. L. und Ewbank, J. J. (2003)** *Caenorhabditis elegans*: An emerging genetic model for the study of innate immunity. *Nat Rev Genet* 4: 380–390
- Kurz, C. L., Chauvet, S., Andres, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, G. P. F., Uh, M., Celli, J., Filloux, A., de Bentzmann, S., Steinmetz, I., Hoffmann, J. A., Finlay, B. B., Gorvel, J.-P., Ferrandon, D. und Ewbank, J. J. (2003)** Virulence factors of the opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by *in vivo* screening. *EMBO J.* 22: 1451-1460
- Kurz, C. L. und Tan, M.-W. (2004)** Regulation of aging and innate immunity in *C. elegans*. *Aging Cell* 3: 185–193
- Kyriakis, J. M. und Avruch, J. (2001)** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81: 807–869
- Kyte, J. und Doolittle, R. F. (1982)** A simple method for display the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132
- Labrousse, A., Chauvet, S., Couillault, C., Kurz, C. L. und Ewbank, J. J. (2000)** *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr. Biol.* 10: 1543–1545
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Laws, T.R., Harding, S.V., Smith, M.P., Atkins, T.P. und Titball, R.W. (2004)** Age influences resistance of *Caenorhabditis elegans* to killing by pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 234: 281–287
- Lee, I. H., Cho, Y. und Lehrer, R. I. (1997)** Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect Immun.* 65: 2898–2903
- Lee, J. Y., Cho, P. Y., Kim, T. Y., Kang, S. Y., Song, K. Y. und Hong, S. J. (2002)** Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide, clonorin. *Biochem Biophys Res Commun.* 296: 1238–1244
- Leippe, M., Ebel, S., Schoenberger, O. L., Horstmann, R. D. und Müller-Eberhard, H. J. (1991)** Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7659-7663

- Leippe, M., Tannich, E., Nickel, R., van der Goot, G., Pattus, F. Horstmann, R. D. und Müller-Eberhard, H. J. (1992)** Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.* 11: 3501 – 3506
- Leippe, M., Andrä, J. und Muller-Eberhard, H. J. (1993)** Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from Amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2602-2606
- Leippe, M., Andrä, J., Nickel, R., Tannich, E. und Müller-Eberhard, H. J. (1994)** Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol. Microbiol.* 14: 895-904
- Leippe, M. (1995)** Ancient Weapons: NK-lysin is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell* 83: 17-18
- Leung, B., Hermann, G. J. und Priess, J. R. (1999)** Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* Intestine. *Dev. Biol.* 216: 114-134
- Liepinsh, E., Andersson, M., Ruyschaert, J. M. und Otting, G. (1997)** Saposin fold revealed by the NMR structure of NK-lysin. *Nat. Struct. Biol.* 4: 793-795
- Loew, L. M., Rosenberg, I., Bridge, M. und Gitler, C. (1983)** Diffusion potential cascade. Convenient detection of transferable membrane pores. *Biochemistry* 22: 837-844
- Lomant, A. J. und Fairbanks, G. (1976)** Chemical probes of extended biological structures: synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). *J. Mol. Biol.* 104: 243-261
- Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L. und Huang, H. W. (1996)** Membrane Pores Induced by Magainin. *Biochemistry* 35: 13723-13728
- Mahajan-Miklos S., Tan M. W., Rahme L. G. und Ausubel F. M. (1999)** Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96: 47–56
- Mallo, G. V., Kurz, C. L., Couillault, C., Pujol, N., Granjeaud, S., Kohara, Y. und Ewbank, J. J. (2002)** Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 12: 1209–1214
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N. und Miyajima, K. (1996)** An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* 35: 11361-11368
- McGhee, J. D., Sleumer, M. C., Bilenky, M., Wong, K., McKay, S. J., Goszczynski, B., Tian, H., Krich, N. D., Khattra, J., Holt, R. A., Baillie, D. L., Kohara, Y., Marra, M. A., Jones, S. J. M., Moerman, D. G. und Robertson, A. G. (2007)** The ELT-2 GATA-factor and the global regulation of transcription in the *C. elegans* intestine. *Dev. Biol.* 302: 627-645
- Medzhitov, R. und Janeway, C. (1997)** Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295–298
- Mehlhorn, H. und Piekarski, G. (2002)** Grundriss der Parasitenkunde. *Spektrum Akademischer Verlag*, 6. Aufl., Heidelberg

- Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D. und Ambros, V. (1991)** Efficient gene transfer in *C.elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* 10: 3959-3970
- Meister, M., Lemaitre, B. und Hoffmann, J. A. (1997)** Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *Bioessays* 19: 1019-1026
- Miller, D. J., Hemmrich, G., Ball, E. E., Hayward, D. C., Khalturin, K., Funayamas, N., Agata, K. und Bosch, T. C. G. (2007)** The innate immune repertoire in Cnidaria - ancestral complexity and stochastic gene loss. *Genome Biol.* 8: R59
- Millet, A. C. M. und Ewbank, J. J (2004)** Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Immunol.* 16: 4-9
- Miteva, M., Andersson, M., Karshikoff, A. und Otting, G. (1999)** Molecular electroporation: a unifying concept for the description of membrane pore formation by antibacterial peptides, exemplified with NK-lysin. *FEBS Lett.* 462: 155–158
- Mochii, M., Yoshida, S., Morita, K., Kohara, Y. und Ueno, N., (1999)** Identification of transforming growth factor- β -regulated genes in *Caenorhabditis elegans* by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 15020–15025.
- Munford, R. S., Sheppard, P. O. und O'Hara, P. J. (1995)** Saposin-like proteins (SAPLIP) carry out diverse functions on a common backbone structure. *J. Lipid Res.* 36: 1653–1663
- Murphy, C. T., McCarroll, S. A., Bargmann, C. I., Fraser, A., Kamath, R. S., Ahringer, J., Li, H. und Kenyon, C. (2003)** Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424: 277–283
- Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Perfect, J. R., Heitman, J. und Calderwood, S. B. (2002)** Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci* 98: 10892–10897
- Mysliwy, J. (2007)** The three-dimensional structure of caenopore-5 from *Caenorhabditis elegans* determined by means of NMR spectroscopy. Dissertation, CAU Kiel.
- Nagai, K., Perutz, M.F. und Poyart, C. (1985)** Oxygen binding properties of human mutant hemoglobins synthesized in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 7252–7255.
- Nelson, F. K., Albert, P. S. und Riddle, D. L. (1983)** Fine structure of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system. *J. Ultrastruc. Res.* 82:156-171
- Nelson, D. W. und Padgett, R. W. (2003)** Insulin worms its way into the spotlight. *Genes Dev.* 17: 813–818.
- Nicholas W. L., Dougherty, E. C. und Hansen, E. L. (1959)** Axenic cultivation of *C. briggsae* (Nematoda: Rhabditidae) with chemically undefined supplements; comparative studies with related nematodes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 77: 218-236
- Nicholas, H. und Hodgkin, J. (2004)** Responses to infection and possible recognition strategies in the innate immune system of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Immunol.* 41: 479–493
- Nickel, R., Jacobs, T. und Leippe, M. (1998)** Molecular characterization of an exceptionally acidic lysozyme-like protein from the protozoon *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett.* 437: 153-157

- Nielsen, H. und Engelbrecht, J. (1997)** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering and Design* 10: 1–6
- Nüsslein-Volhard, C. (1995)** The identification of genes controlling development in flies and fishes. *Nobel Lecture*, December 8.
- Nürnberger, T. und Brunner, F. (2002)** Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 5: 318–324
- O'Brien, J. S. und Kishimoto, Y. (1991)** Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J.* 5: 301-308.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. und Pognan, F. (2000)** Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267: 5421-5426
- O'Keefe, D. O. (1994)** Quantitative electrophoretic analysis of proteins labelled with Monobromobimane. *Anal. Biochem.* 222: 86-94
- Pauli, F., Liu, Y., Kim, Y. A., Chen, P.-J. und Kim, S. K. (2005)** Chromosomal clustering and GATA transcriptional regulation of intestine-expressed genes in *C. elegans*. *Development* 133: 287-295
- Paton, B. C., Hughes, J. L., Harzer, K. und Poulos, A. (1990)** Immunocytochemical localization of sphingolipid activator protein 2 (SAP-2) in normal and SAP-deficient fibroblasts. *Eur. J. Cell. Biol.* 51: 157-164
- Pena, S. V. und Krensky, A. M. (1997)** Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. *Semin. Immunol.* 9: 117–125
- Pena, S.V., Hansen, D.A., Car, B. A., Goralski, T.J. und Krensky, A.M. (1997)** Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J. Immunol.* 158: 2680-2688
- Pick, U. (1981)** Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipids mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* 212: 501-506
- Pillai, A., Ueno, S., Zhang, H., Lee, J. M. und Kato, Y. (2005)** Cecropin P1 and novel nematode cecropins: a bacteria-inducible antimicrobial peptide family in the nematode *Ascaris suum*. *Biochem. J.* 390: 207–214
- Ponting, C. P., und Russell, R. B. (1995)** Swaposins: Circular permutations within genes encoding saposin homologues, *Trends Biochem. Sci.* 20: 179–180.
- Popham, J. D. und Webster, J. M. (1979)** Aspects of the fine structure of the dauer larva of the nematode *C. elegans*. *Can J Zool.* 57: 794-800
- Podack, E. R. und Tschopp J. (1982)** Circular Polymerization of the ninth component of complement; Ring closure of the tubular complex confers resistance to detergent dissociation and to proteolytic degradation. *J. Biol. Chem.* 257: 15204-15212

- Pujol, N., Link, E. M., Liu, L. X., Kurz, C. L., Alloing, G. A., Tan, M.-W., Ray, K. P., Solari, R., Johnson, C. D. und Ewbank, J. J. (2001)** A reverse genetic analysis of components of the Toll signalling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 11: 809–821
- Reed, M. B., Strugnell, R. A., Panaccio, M. und Spithill, T. W. (2000)** A novel member of the NK-lysin protein family is developmentally regulated and secreted by *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 105: 297–303
- Roeder, T. und Leippe, M. (2004)** Abstracts of the 21st Annual Meeting of the German Parasitology Association. 17-20 March 2004, Würzburg, Germany. *Int. J. Med. Microbiol.* 293 Suppl. 38: 44-117.
- Roy, P. J., Stuart, J. M., Lund, J. und Kim, S. K. (2002)** Chromosomal clustering of muscle-expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 418: 975-979
- Saiki, R. K., Genfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988)** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 230: 487-491
- Sandelin, A., Wasserman, W. W., und Lenhard, B. (2004)** ConSite: web-based prediction of regulatory elements using cross-species comparison. *Nucleic Acids Res* 32 : 249-252.
- Sanger, F., Coulson, A.R., Barell, B.G., Smith, A.J. und Roe, B.A. (1980)** Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J. Mol. Biol.* 143: 161-178
- Sansom, M. S. (1993)** Alamethicin and related peptaibols—model ion channels. *Eur. Biophys. J.* 22: 105-124
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368–379
- Schröder-Borm, H., Bakalova, R. und Andrä, J. (2005)** The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged phosphatidylserine. *FEBS Lett.* 579: 6128–6134
- Schröder, J. M. und Harder, J. (2006)** Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 469-486
- Schulenburg, H., Kurz, C. L. und Ewbank, J. J. (2004)** Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunol Rev.* 198: 36–58
- Seydel, U., Schroeder, G. und Brandenburg, K. (1989)** Reconstitution of the lipid matrix of the outer membrane of Gram-negative bacteria as asymmetric planar bilayer, *J. Membr. Biol.* 109, 95-103
- Shai, Y. (1995)** Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem. Sci.* 29: 460-646
- Sifri, C. D., Begun, J. und Ausubel, F. M. (2005)** The worm has turned – microbial virulence modelled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol.* 13:119-127

- Simmer, F., Tijsterman, M., Parrish, S., Koushika, S. P., Nonet, M. L., Fire, A., Ahringer J., und Plasterk, R. H. (2002)** Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr. Biol.* 12: 1317-1319
- Sonnichsen, B., Koski, L. B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A. M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., Heinkel, R., Roder, M., Finell, J., Hantsch, H., Jones, S. J., Jones, M., Piano, F., Gunsalus, K. C., Oegema, K., Gonczy, P., Coulson, A., Hyman, A. A. und Echeverri, C. J. (2005)** Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 434: 462-469.
- Stein, L. D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M. R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., Coulson, A., D'Eustachio, P., Fitch, D. H., Fulton, L. A., Fulton, R. E., Griffiths-Jones, S., Harris, T. W., Hillier, L. W., Kamath, R., Kuwabara, P. E., Mardis, E. R., Marra, M. A., Miner, T. L., Minx, P., Mullikin, J. C., Plumb, R. W., Rogers, J., Schein, J. E., Sohrmann, M., Spieth, J., Stajich, J. E., wie, C., Willey, D., Wilson, R. K., Durbin, R. und Waterston, R. H. (2003)** The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biol.* 1: 166-192
- Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., Porcelli, S. A., Bloom, B. R., Krensky, A. M. und Modlin, R. L. (1998)** An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282: 121–125
- Stiernagle, T. (2006)** Maintenance of *C. elegans*. In: *C. elegans – a practical approach* (herausgegeben von Hope, I. A.): 51-67. *Oxford University Press*, NY, USA
- Sulston, J. E. und Horvitz, H. R. (1977)** Post-embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56: 110-156
- Sulston, J. E. und Hodgkin, J. (1988)** Methods In: *the nematode Caenorhabditis elegans* (herausgegeben von Wood, W.B. und der community of *C. elegans* Researchers): 587-606. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sulston, J. E. (2002)** *C. elegans*: The cell lineage and beyond. *Nobel Lecture*, December 8
- Tabara, H., Grishok, A. und Mello, C. C. (1998)** Reverse genetics: RNAi in *C. elegans*: Soaking in the Genome Sequence. *Science* 282: 430 - 431
- Tamaru, T., Fujibayashi, S., Brown, W. R. und Wenger, D. A. (1986)** Immunocytochemical localization of sphingolipid activator protein-1, the sulfatide/GM1 ganglioside activator, to lysosomes in human liver and colon. *Histochemistry* 86: 195-200
- Tan M. W., Mahajan-Miklos S. und Ausubel F. M. (1999)** Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 715–720
- Tan, M. W. (2001)** Genetic and genomic dissection of host–pathogen interactions using a *P. aeruginosa*-*C. elegans* pathogenesis model. *Pediatr. Pulmonol.* 32: 96–97.

- Tan, M. W. (2002)** Identification of host and pathogen factors involved in virulence using *Caenorhabditis elegans*. *Meth. Enzymol.* 358: 13-28
- Tatar, M., Bartke, A. und Antebi, A. (2003)** The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299: 1346–1351
- Terry, A.S., Poulter, L., Williams, D. H., Nutkins, J. C., Giovannini, M. G., Moore, C. H. und Gibson, B. W. (1988)** The cDNA sequence coding for prepro-PGS (prepro-magainins) and aspects of the processing of this prepro-polypeptide. *J. Biol. Chem.* 263: 5745-5751
- Timmons, L. und Fire, A. (1998)** Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854
- Timmons, L., Court, D. L. und Fire, A. (2001)** Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 263: 103-112
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., und Gibson, T. J. (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-80
- Tosteson, M. T. und Tosteson, D. C. (1981)** The sting, melittin forms channels in lipid bilayers. *Biophys. J.* 36: 109-116
- Underhill, D. M. und Ozinsky, A. (2002)** Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol.* 14:103–110
- Urban, A., Neukirchen, S. und Jaeger, K.- E. (1997)** A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res.* 25: 2227–2228
- Wang, J. und Barr, M. M. (2005)** RNA Interferenz in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol.* 392: 36-55
- Ware, R. W., Clark, D. Crossland, K. und Russel, R. L. (1975)** The nerve ring of the nematode *Caenorhabditis elegans*: Sensory input and motor output. *J. Comp. Neurol.* 62: 71-110
- Waterston, R.H. (1988)** Muscle. In: *the nematode Caenorhabditis elegans* (herausgegeben von Wood, W.B. und der community of *C. elegans* Researchers): 281-335. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, USA
- White, G., Southgate, E., Thomson, J. N. und Brenner, S. (1986)** The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 314: 1-340
- White J. (1988)** In: *The nematode Caenorhabditis elegans* (herausgegeben von Wood, W.B. und der Community of *C. elegans* Researchers): 81-122. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Wylie, T., Martin, J.C., Dante, M., Mitreva, M. D., Clifton, S. W., Chinwalla, A., Waterston, R. H., Wilson, R. K. und McCarterm J. P. (2004)** "Nematode.net: a Tool for Navigating Sequences from Parasitic and Free-living Nematodes". *Nucleic Acids Res.* 1: 32
- Yook, K. und Hodgkin, J. (2007)** Mos1 mutagenesis reveals a diversity of mechanisms affecting response of *C. elegans* to the bacterial pathogen *M. nematophilum*. *Genetics* 175: 681

- Zasloff, M. (1987)** Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus laevis* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5449-5453
- Zhang, Y, Ma, C., Delohery, T., Nasipak, B., Foat, B. C., Bounoutas, A., Bussemaker, H. J., Kim, S. K. und Chalfie, M. (2002)** Identification of genes expressed in *C. elegans* touch receptor neurons. *Nature* 418: 331-335

9 ANHANG

9.1 Liste bisher identifizierter Caenopores

>Caenopore 1

MTRILPCLFLVLLAAAPLLANPANPLNLKHHGVFCDVCKALVEGGEKVGDDDLDAWLVDNIGTLCWTMLLPLHHECEEEL
KKVKKELKKDIENKDSPKACKDVDLC*

>Caenopore 2

MKTVLVLAAVAVALCVVLPKERSLGCQMCELAVKTYDGSADKDVTSIKKDFDTECKKLFHAIPFAPQECEHYVNEKLDP
IIKELESGTAPKDVCKKLGECPK*

>Caenopore 3

MKTYILLAAVTLAVFFSSTEANGIECEMCKMSVKIVVPLMGEDTESIKKAVDAECKKEFHSPFPGTQECKKFIDTKLDPII
HELENGTAPSDVCTKLGMC*

>Caenopore 4

MKTLVLAVLVAVVAVVLPVLPQRNSLGCQMCELAVKKYDGSVDKDVNGIKKDFDTECKKLFHSPFAPQECEHYVNTKLDP
IIKELESGTAPKDVCTKLHECP*

>Caenopore 5

MKTLVLAVLVAVASGLAIPENRSALSCQMCELVVKKYEGSADKDANVIKDFDAECKKLFHTIPFGTREC DHYVNSKVDP
IIEHELEGGTAPKDVCTKLNECP*

>Caenopore 6

MTCMTGLRQRNALDCMCKLAVKSADGDADKDTNDIKKDFDAKCKKAFHSPFAPRECEHYVDKLDPIIKELESGTSPKD
VCTKLGECS*

>Caenopore 7

MRINLFFVFAVLGGQFQVTFYFWNEEPVVRERASPSPNGNTPSNLGCFMCTQLLSVTKHRVGLSENQLRNQLYEKRVLP
SVFKEQCFAFVETSLPEIYYSINYDISSKDVCMVMNFCDERNPFAIGGPLPSIEATTLYPEEEAEIELEPTTTTRRRTTTT
TTTTTPPTTTTTRVTTTALTRPNPSIEQVRRREHNDRIHGKNVLEIIIPPLRSKYMSRNTIVESSREKVPKEEIDEKR
LTCAFCEMLLENAKNYAVTSKTDITSFANTACASLAKGTTSDQCYQOMADKKIAELAKFVDQVVDALWCAELNRC*

>Caenopore 8

MKSIFVFAVLAALALGAQSAPSPCESCKSMVQNFIDASKDRMKMAQLKVSLSMLCVGTSHQSDCSKTLDKLDFIAYKLAPY
LADTSAVCSKLMCGESQFSPLARLAMLYLKKSEAIIVANDNIMRQEVCECQASTAQIGKLVGDEFTTYAVKSTLQRFVCK
SAGKAHKACNIFVSSVIPDLMTMKDMFTEKELMCSNMGLCSATSKPAAREAPKQPASEMWKSMGMVKTSNGEELMCSFEC
TLSADALLQEFIDKRQGTADDIQTVA CNKMWANWTDG CND FVHMYMSTVLF LTYNQFDGRGICTMMHSC EKKENALVEMAM
SEKVMLGCENCKAVEHFFAQNEALHSHAVDGLYSNVCQKLPALGTMCEASIRLSRKF FARTADLAASGAMCSQMC*

>Caenopore 9

MKTVLVLAVVAVTTALVFPEQRASAFDCFLCRLAVNTTDPVDNELHIVEDKFLAECKKELKGIPFLEQTCLNYAHSEFD
PIIKELESGTAPEDVCRAIEQC*

>Caenopore 10

MKYFILTLAVLGLSTLAYSQNLMDTNRVQAEVIENSSCEECENVIKRISEAAKDPKIEELKIVLGMCRETSYADECLRF
VSQDLKRFIDKLQPFLLKNPHAVCTRLHICSNKKIDSFRRI LLEFAKRAQKTFDAPAIVCDECQFVVKELKTVEDKKSQAEA
RDFLRENVCKSLGQYRGFCDLVDEYLPQFIQELDAILQDPHQVCVDIKACNSASAQGLKARKYVEASNEEKEKVENEVDA
FWNGAAMKNNKQTLAMSCFECKFVVEDMQTDMITNRKLSDDVRDFACYKIVTANMTDSCIDFLDLYLPTVIQMTVEQAT
POGVCLANKCCPASSVAPLRDFTFQEQIAEKCPKMELETYLSSNLVGSAMEKFFENSLTETFC SGLLSFFQPSCQOIMSS
VAPRFVSLTAVLASQNKFSQAMNC*

>Caenopore 11

MSVFRFLFLSLLVGSNAFVKPQYNVTGQIDSALQRFFGITLPSLKI PDLNPKKRNPPSVGQLKKT SFPLCNVNLPPIF
FTISLFRIKLPLNIPTALPVIKLP TIKIPNIPNLPTLPTIKVPTIKIPDIIPITLPTIKIPEVVPINLPTVEIPHFIPKTLPT
VKIPNIIPTNFPTIETPDIIPKILPTIKIPEIIPLTLP TVKIPDIIPITLPTIKIPEIVPTKLP TVEVPDTIPKTLPTTKI
PDIVPITSPTVKIPQIIP TIKIPDIIPKNLSTLGPIKLP TIKLP TLP HILPTKSPKPTPSHKGNMVC DICEKVI GVL TTRL
LEIIQKFRVEADKFLTKLCTSLTSNPKTLTVGTMVFMFGNIMDTIFKGF DGLKKNLEPV SFCKHVFPCK*

>Caenopore 12

MFSKTVVLLMVVPAISLAQPASPLVLKSHGAFCHLCEDLIKDGKEAGDVALDVWLDEEIGSRCKDFGLASECFKELKV
AEHDIWEAIDQEIPEDKTCKEAKLC*

>Caenopore 13

MQSLQLLTFVLIALMVSVTFAEIIQKGLAKHGMLKENKPNCLLTRSRLGCTCTTCKEIVNFTRMLILNHVPEEQEVMEKV
CYRIFGDDKKESFCEELIKEELPDI IKYVRNHLEPKQACAKFC*

>Caenopore 14

MKTTFCLLALVAVATALALPSQODNAMSCLMCEVGVRAAENPADREAHTVEDKFD AECKKELGIIPFAEKECEKYGNSKLD
PIINELEGGTAPEDVCKKLEK*

>Caenopore 15

MNYLILLAFLLAITLTVSNVEGAKKMHSDTSKPLCGLCVNVVKQLDQVLEHGGDIEAAVDKFKCEDVPSFMVDMCEKVIIEKN
LEYIINKLKDHEEADKICTDILLCRTPKQYYFLETQK*

>Caenopore 16

MKLIFILSIIFLSSLSVAQSPISCAFCMAGLAQINQOVISSPDMEAQMGIQASQGCQIPVKQTRRETGRSLNTNFNIFYS
NFTGQANNSTQMCINMGMC*

>Caenopore 17

MFVRTAVVLLLVAStayTFVAPPSQATLACITCVATVKGVEAKMLHEGGVNAKHVDVAICLKEVPTHSAEHLCEEYGEHEV
DVMVTLIKQDVPPKMICQELQKC*

>Caenopore 18

MKTSALAFLLALVCASSAFVVPQNADQCGAVDITKMAKRYVPSQNSDATCEICLDLVLIAETYAECDEAIVQHMDAYCVEH
VKNHASQALCKLLIDDIHAHAVIEDTDQNP TGVCQKVIHKTCPYNN*

>Caenopore 19

MIKGCVEKSMDEAFNLVTLCTSLDFSNIITDDALPGEIKCTCSRDFCNGSFENDPNTSSRIFSTIFGLIITIINPPNIVCQ
LCTSGLYLVQSQLLVLENEVKNNLKPFITNVQCQSAPTGIPVKALCDVLDKDDLLDAILTLINGIREQADPNTVCKYIRNCG
SDNNEDNKKYYL*

>Caenopore 20

MNNFVTFILVQFLFTIGFSTPLSTELPSSNCKMFCELCQDGFSLIHKNIEQFESVTNEEIVKFDHICQLAPKLDIINVVC
EVAKNDMIDGVNNYERHII SFHQLYNMLKTLFIFTLLAVTMQASPVVESGTLNIICTNCQSAVNAFLAPIKKVELITKTE
LTDVFNKCLHDPQLASFHFLCSMALDLALKFLDAVEGEVSERAICEAFHFCDKV*

>Caenopore 21

MKTVLFLVAVVAIATALVFPQASAFDCFLCRLAVKTADPFVDEEFHIAEDKFLAECKKELKGIPFLEQTCLNFAHSEFG
PIIMELESGTAPEDVCRAIEQC*

>Caenopore 22

MVQIINRILISVSI FYLCYAHYPYKTNADLEKDRMLTTNEYYVEKVNQMAGISCDLCMRAVYGVNYDFIQKKDFIEMIRL
DCEALFHERPEDISECIRFLT TKVEKYSKVSFLAAKSLMLLFLSQCISRFPPFSQTDLI*

>Caenopore 23

MFVRTAVVLLLVAStayTFVAPPSQATLACITCVATVKGLEPKVLAEGDAVAEKEVAALCMKEAPTAAEKDCEQYGDEEA
AIIIDLKQDVPPKTIQELKKC*

9.2 Liste potentieller Mitglieder der Caenopore-Peptidfamilie

>Y37F4.3

MKIVIFCLILGTIIQGYVAENFWETACSQCNVYVDMWL PENADSFVLSDLVIKNTCSKFPGNIDDP CYTLINLFPVRFTYN
TFWTFLSPFRELICVAFCSQ*

> Y116F11A.3

MKFSKLLILLVLTTPFCSAEWYNNQTDACNYCGQMVFGLLQNDVETLISTNRLVSKYNFCPNYAPGWQLDSCVAFLDYTF
SFFYRIYYAINFPIRDYICVPICGNSGENFEIIFKRR

> F30A10.11

MKLLFVFLFISALVIGSDAQLGNL CMFCSGLIQVDPNWNDAQSLLRTGCAQSGDAASACIGLVNAADLTSSYPKMPFIMD
IKKMACFKFC*

>K02A11.4

MQYICLVSAFLVLSRGIPTIPQPRIDVWSGPNCHMCEVILNVRVYEYRNNFTNVTPDQLRQSLYQQCDLNLNGFTDQEC
HKIAEDSADILQQLQEGTSSYRICQRELLC*

>F23F1.7

MLVKFLCLVLPVYSIPIAPSFKDLQTIKPYKLIKYTFSRDNEDVMSPDPPSLQLIPLDFLCEFCQVVILKLERQKTET
NFEETIKKECLNSTDDSSSLCDVINRVNLERLKKGDPKDICESQGMCGNSTGTTTKDNGPPGVSPNQSMGTPAKPANEIER
HLTIDEKSVNATLNVEDIAAPYN*

9.3 Liste der verwendeten Oligonukleotide

Allgemeine Oligonukleotide

M13 forward	5'- TGTA AACGACGGCCAGT
M13 reverse	5'- AACAGCTATGACCATG
T7 forward	5'- TAATACGACTCACTATGGG
T7 Terminator	5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Sp6	5'- CATTTAGGTGACACTATAG

Oligonukleotide zur rekombinanten Expression der Caenopores

T08A9.9_for	5'- gagaccgcggcAGAAGCGCATTGAGCT
T08A9.9_rev	5'- gagactgcagTTATGGGCATTTCGTTAAGC
CP5_ohne Arg_for	5'- gagaccgcggcAGCGCATTGAGCTG
Ce_Antisense_spp-1	5'- ggcctgcagTTAGCACAAATCAACATCCTT
Ce_sense_spp1_Patthy	5'- gaagccgcggcAATCCAGCTAACCCA
Ce_Sense_spp-1	5'- gaagccgcggcGGTGTCTTCTGTGATG
Ce_Antisense_spp-12	5'- ggcctgcagTCAACAGAGTTTGGCTTCTTTGC
Ce_Sense_spp-12	5'- cacgccgcggcTCTCACGGAGCATTTTGTC

Oligonukleotide für zielgerichtete Mutagenese von *spp-12*

CP12_sense2_mutagenese	5'- cacgccgcggcTCTCACGGAGCATTTTGTCTCTGCGAG
CP12_sense2_short	5'- CACGGAGCATTTTGTCTCTC

Oligonukleotide zum Klonieren des *spp-12*-pSport I-Vektors

Spp-12_pSport_sense	5'- gagagaattcTCTCACGGAGC
Spp-12_pSport_antisense	5'- gagactgcagTCAACAGAGTTTGGCTTCTTTGC

Oligonukleotide zur cDNA-Synthese und -Amplifikation

CapFinder B1rG	5'- GAGAGAACGCGTGACGAGAGAGACTGACArGrGrG
CapFinder B2	5'- GAGAGAACGCGTGACGAGAGAGACTGACAG
OligodT-T7 I	5'- GAGAGAGGATCCAAGTACTAATACGACTCAC- TATAGGGAGA (T) ₂₅ A/C/G
OligodT-T7 II	5'- GAGAGAGGATCCAAGTACTAATACGACTCACTATAGG

Expressionsanalyse

rpl-29 for	5'- TCCAAGAACCACACCAATCA
rpl-29 rev	5'- CGACGGACTTGTTGATCTGA
T08A9.9_for	5'- gagaccgcggcAGAAGCGCATTGAGCT
T08A9.9_rev	5'- gagactgcagTTATGGGCATTTCGTTAAGC
Ce_Antisense_spp-1	5'- ggcctgcagTTAGCACAAATCAACATCCTT
Ce_sense_spp1_Patthy	5'- gaagccgcggcAATCCAGCTAACCCA
Ce_Antisense_spp-12	5'- ggcctgcagTCAACAGAGTTTGGCTTCTTTGC
Ce_Sense_spp-12	5'- cacgccgcggcTCTCACGGAGCATTTTGTC

10 ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Kiel, den 26.09.2007

Mareike Stanisak

11 DANKSAGUNG

Bei Prof. Dr. Matthias Leippe möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit sowie für die Überlassung des Themas und das konstruktive Arbeitsklima bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die unentwegte Unterstützung und für die hilfsbereite Arbeitsatmosphäre bedanken.

Heidrun Ließegang möchte ich ganz besonders danken, da sie mir mit ihrer tatkräftigen Hilfe bei vielen der durchgeführten Experimente zur Seite gestanden hat.

Bei Dr. Christoph Gelhaus möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bedanken und dafür, dass er mir oft mit seiner Erfahrung und mit guten Ratsschlägen weitergeholfen hat.

Prof. Dr. Thomas Roeder und Dr. Kerstin Isermann möchte ich dafür danken, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und damit maßgeblichen Einfluss auf das Gelingen meiner Arbeit genommen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und dabei vor allem Georg Hemmrich. Sie alle haben mich mit ihrem positiven Denken und auch mit ihrer konstruktiven Kritik immer unterstützt.

12 LEBENS LAUF

Name: Mareike Stanisak

Geburtsdatum: 1. Oktober 1976

Geburtsort: Rendsburg

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1983 bis 1993 Waldorfschule Rendsburg
1993 bis 1997 Helene-Lange-Gymnasium Rendsburg

Studium: 04/1998 bis 10/2000 Biologiestudium, FU Berlin
11/2000 bis 04/2003 Biologiestudium, CAU Kiel

Diplomarbeit: 05/2003 bis 01/2004 CAU Kiel, Inst. für Zoologie,
Abt. allgemeine Zoologie bei Prof. Dr. T.C.G. Bosch

Doktorarbeit: 02/2004 bis 09/2007 CAU Kiel, Inst. für Zoologie,
Abt. Zoophysiologie