

Charakterisierung von Effektormolekülen der antimikrobiellen Abwehr von *Ciona intestinalis*



Dissertation

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

vorgelegt von
Henning Fedders
aus Kiel

Kiel, April 2008

Referent:

Prof. Dr. Matthias Leippe

Korreferent:

Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch

Tag der mündlichen Prüfung:

05.06.2008

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation vorbereitet:

Fedders, H. und Leippe, M. (2008) A reverse search for antimicrobial peptides in *Ciona intestinalis*: Identification of a gene family expressed in hemocytes and evaluation of activity. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 286-298.

Fedders, H., Michalek, M., Grötzinger, J. und Leippe, M. (2008) An exceptional salt tolerant antimicrobial peptide derived from a novel gene family of hemocytes of the marine invertebrate *Ciona intestinalis*. *Biochem. J.*, *in revision*.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGEN	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Grundlagen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems.....	1
1.2 Pathogenerkennung durch das angeborene Immunsystem	3
1.2.1 Toll- / Toll- <i>like</i> Rezeptoren.....	3
1.2.2 NOD- <i>like</i> Rezeptoren.....	4
1.2.3 Lektine	5
1.2.3.1 Aktivierung des Komplementsystems durch Lektine	6
1.3 Klassen antimikrobieller Peptide	7
1.4 Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide	10
1.5 Antimikrobielle Peptide in der Antibiotikatherapie	13
1.6 Antimikrobielle Peptide bei Tunikaten.....	15
1.7 <i>Ciona intestinalis</i> – Systematik, Morphologie und Lebensweise	17
1.8 <i>Ciona intestinalis</i> als Modellorganismus	19
1.9 Zielsetzung	21
2 MATERIAL	22
2.1 Chemikalien	22
2.2 Farbstoffe und Substrate	24
2.3 Enzyme.....	25
2.4 Protein-Größenstandards.....	25
2.5 DNA-Längenstandards	25
2.6 Immunoreagenzien	25
2.7 Erythrozyten	26

2.8	Medien	26
2.9	Oligonukleotide	26
2.10	Geräte	28
2.10.1	Mikrotiterplatten-Photometer	28
2.10.2	Zentrifugen.....	28
2.11	Sonstige Materialien	29
2.12	Futter für <i>Ciona intestinalis</i>	29
3	METHODEN	30
3.1	Haltung von <i>Ciona intestinalis</i>	30
3.2	RNA-Isolierung	30
3.3	cDNA-Synthese durch reverse Transkription	30
3.4	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction, PCR</i>)	30
3.4.1	Semiquantitative reverse Transkriptions (RT)-PCR	31
3.5	Agarose-Gelelektrophorese	32
3.6	Reinigung von DNA aus Agarosegelen	32
3.7	Fällung von DNA	33
3.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
3.9	Ligation	33
3.10	Herstellung elektrisch kompetenter Zellen	33
3.11	Transformation über Elektroporation	34
3.12	Kolonie-PCR	34
3.13	Isolierung von Plasmid-DNA	34
3.14	DNA-Sequenzierung	35
3.15	<i>In situ</i> Hybridisierung	35
3.15.1	Herstellung der RNA-Sonden	35
3.15.2	Herstellung von Gewebeschnitten.....	36
3.15.3	<i>In situ</i> Hybridisierung an Gewebeschnitten	36

3.16	Präparation von Geweben aus <i>Ciona intestinalis</i>	37
3.17	Saure Extraktion von Proteinen und Peptiden	38
3.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.18.1	Gießen des Gels	39
3.18.2	Elektrophorese.....	40
3.18.3	Silberfärbung	40
3.19	Chromatographie	41
3.19.1	Proteinfractionierung über eine hydrophobe Interaktionsmatrix.....	41
3.19.2	Proteinreinigung mit einem FPLC (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>) System	41
3.19.2.1	Gelfiltrationschromatographie	41
3.19.2.2	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)	42
3.19.2.3	Kationenaustausch-Chromatographie.....	42
3.19.3	Immunoaffinitätschromatographie	43
3.19.3.1	Reinigung von Antikörpern	43
3.19.3.2	Kopplung von gereinigten Antikörpern an eine HiTrap™ NHS-aktivierte HP Säule	44
3.19.3.3	Immunoaffinitätschromatographie mit sauren Proteinextrakten.....	44
3.20	Gefriertrocknung	45
3.21	Western-Blot-Analyse direkt nach SDS-PAGE	45
3.21.1	Elektrotransfer von Proteinen auf eine Membran.....	45
3.21.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Membran	46
3.22	Immunozytochemie	46
3.23	Peptide	47
3.24	Immunisierung von Kaninchen	48
3.25	Identifizierung von Proteinen	48
3.25.1	Sequenzierung nach Edman	48
3.25.2	Massenspektrometrie	49
3.26	Aktivitätstests	49
3.26.1	Mikroorganismen	49
3.26.2	Tests auf antibakterielle Aktivität	50
3.26.2.1	Mikrosuszeptibilitätstest.....	50
3.26.2.2	Membranpermeabilisierungstest mit SYTOX Green	52
3.26.2.3	Membranpermeabilisierungstest mit <i>E. coli</i> ML-35p	53
3.26.3	Test auf antimykotische Aktivität	54
3.26.4	Test auf hämolytische Aktivität	54

3.26.5	Test auf porenbildende Aktivität	55
3.26.5.1	Liposomenpräparation.....	55
3.26.5.2	Aktivitätsmessung.....	55
3.27	Bioinformatik	56
4	ERGEBNISSE	58
4.1	Reinigung antimikrobieller Peptide.....	58
4.1.1	Reinigung antimikrobieller Peptide aus dem Mantel	59
4.1.2	Reinigung antimikrobieller Peptide aus dem Kiemendarm.....	60
4.1.3	Reinigung antimikrobieller Peptide aus zellfreier Hämolymphe	61
4.1.4	Reinigung antimikrobieller Peptide aus Hämozyten	61
4.2	BLAST-Suche nach Genen, die für Orthologe bekannter antimikrobieller Peptide codieren	62
4.3	<i>In silico</i> Identifizierung von Genen, die für neuartige antimikrobielle Peptide codieren	63
4.4	Klonierung der nordeuropäischen Varianten der <i>Ci-mam</i>- und <i>Ci-pap</i>-Genfamilien-Mitglieder ausgehend von Hämozyten-cDNA	68
4.5	Semiquantitative RT-PCR nach Immunstimulation	69
4.6	Herstellung synthetischer Peptide.....	71
4.7	Antimikrobielle Aktivität von <i>Ci-MAM-A24</i> und <i>Ci-PAP-A22</i>	73
4.7.1	Mikrosuszeptibilitätstest.....	73
4.7.2	Test auf Membranpermeabilisierung mit SYTOX Green	75
4.7.3	Test auf Membranpermeabilisierung mit <i>E. coli</i> ML-35p	76
4.8	Effekt von Salz auf die antibakterielle Aktivität von <i>Ci-MAM-A24</i> und <i>Ci-PAP-A22</i>.....	77
4.8.1	Mikrosuszeptibilitätstest mit Salz	77
4.8.2	Test auf Membranpermeabilisierung mit SYTOX Green und Salz	79
4.9	Test auf hämolytische Aktivität	79
4.10	Liposomendepolarisationstest	80
4.11	Versuche zur Reinigung der natürlichen Peptide <i>Ci-MAM-A</i> und <i>Ci-PAP-A</i>.....	81
4.12	Immunlokalisation von natürlichem <i>Ci-MAM-A</i> und <i>Ci-PAP-A</i>.....	83
4.13	<i>In situ</i> Hybridisierung	86

5	DISKUSSION	90
5.1	Reinigung natürlicher antimikrobieller Peptide aus Extrakten	91
5.2	BLAST-Suche nach Genen antimikrobieller Peptide	95
5.3	<i>In silico</i> Identifizierung mutmaßlicher antimikrobieller Peptide	98
5.4	Eigenschaften der synthetischen Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22	99
5.5	Synthese und Speicherung der Peptide Ci-MAM-A und Ci-PAP-A in definierten Hämozytentypen	103
5.6	Das mutmaßliche antimikrobielle Peptid Ci-META4.....	106
5.7	Mögliche Erklärung für die erfolglose Reinigung der natürlichen Peptide Ci-MAM-A und Ci-PAP-A.....	107
5.8	Haltung, Zucht und genetische Manipulation von <i>Ciona intestinalis</i>	107
6.A	ZUSAMMENFASSUNG	110
6.B	SUMMARY	112
7	LITERATUR	114
8	ANHANG	133
8.1	Reinigung antimikrobieller Peptide.....	133
8.1.1	Peptide 1 und 2.....	133
8.1.2	Peptid 3.....	136
8.1.3	Peptid 4.....	138
8.1.4	Peptid 5.....	140
8.1.5	Peptid 6.....	141
8.1.6	Peptid 7.....	142
8.2	<i>In silico</i> Identifizierung eines mutmaßlichen Prosaposins aus <i>Ciona intestinalis</i>	145
8.3	Sekundärstrukturvorhersagen für die pazifischen Varianten von Ci-MAM-A bis -G und Ci-PAP-A bis -C mit dem Programm PSIPRED.....	146
8.4	Vergleiche der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der nordeuropäischen (NE) und pazifischen (P) Genvarianten der <i>Ci-mam</i> - und <i>Ci-pap</i> -Genfamilien.....	147

ERKLÄRUNG	162
DANKSAGUNG	163
LEBENS LAUF	164

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäurereste
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAH	Biologische Anstalt Helgoland
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAPS	Cyclohexylaminopropansulfonsäure
CCF2-FA	Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein <i>free-acid form</i> (freie Säure)
cDNA	komplementäre DNA
CFU	<i>Colony Forming Units</i> (Kolonie-bildende Einheiten)
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
<i>Ci-mam</i>	<i>Ciona - molecule against microbes</i>
CinGI	<i>Ciona intestinalis Gene Index</i>
<i>Ci-pap</i>	<i>Ciona - putative antimicrobial peptide</i>
Cy3	Cyanin-3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DFCI	Dana-Faber Cancer Institute
DiFMUG	6,8-Difluoro-4-Methylumbelliferyl-β-D-Galaktopyranosid
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTDC	3,3'-Diethylthiadicarbocyaniniiodid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>

EtOH	Ethanol
g	Gramm
<i>g</i>	<i>g-force</i> = <i>Relative Centrifugal Force</i> (RCF) (relative Zentrifugalkraft)
°C	Grad Celsius
h	Stunde
HRBC	<i>Human Red Blood Cells</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HS	<i>Hybridization Solution</i> (Hybridisierungslösung)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i> (Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke)
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	molar
MA	Marines Antikoagulans
MAB	<i>Maleic Acid Buffer</i> (Maleinsäurepuffer)
mcKLH	<i>Megathura crenulata</i> KLH
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MeOH	Methanol
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i> (minimale inhibitorische Konzentration)
MLC	<i>Minimal Lethal Concentration</i> (minimale letale Konzentration)
mA	Milliampere
mAU	<i>milli Absorbance Units</i> (Milli-Absorptionseinheiten)
mbar	Millibar
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	mikromolar
mOsm/kg	Milliosmol pro Kilogramm
MS	Marine Salzlösung bzw. Massenspektrometrie

N	Normal
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
nM	nanomolar
nmol	Nanomol
NTMT	NaCl-Tris-Magnesiumchlorid-Tween
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Phosphatpuffer mit Salz)
PBT	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> + Tween 20 (Phosphatpuffer mit Salz und Tween 20)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i> (Peptidmassen-Fingerabdruck)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
rUTP	Uridintriphosphat
s	Sekunde
SC	<i>Squibb Culture</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i> (Natriumdodecylsulfat)
SOC	<i>Salt-Optimized Broth + carbon</i> (Salz-optimiertes Medium mit Glukose)
SRBC	<i>Sheep Red Blood Cells</i>
SSC	<i>Sodium Salt Citrate</i> (Natriumcitratpuffer)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i> (Trispuffer mit Salz)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
tRNA	Transfer-RNA
TTBS	<i>Tween-Tris-Buffered Saline</i> (Trispuffer mit Salz und Tween 20)
U	<i>Units</i> (Einheiten)
UK	<i>United Kingdom</i>
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein

UNRG	<i>univacuolar non-refractile granulocyte</i> (univakuolärer nichtlichtbrechender Granulozyt)
URG	<i>univacuolar refractile granulocyte</i> (univakuolärer lichtbrechender Granulozyt)
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

1 EINLEITUNG

Jeder lebende Organismus ist permanent einer Vielzahl von Fremdstoffen und Keimen ausgesetzt, die ihn schädigen können. Um sich hiervor zu schützen, hat die Natur eine Menge unterschiedlicher Mechanismen zur Verteidigung entwickelt. Die Gesamtheit dieser körpereigenen Abwehrsysteme eines Organismus wird als Immunsystem bezeichnet. Dieses umfasst demnach ein komplexes Netzwerk aus Organen, Zellen und Molekülen, deren Funktion darin besteht, die individuelle Unversehrtheit des Organismus zu erhalten, indem körperfremde Substanzen und Krankheitserreger wie Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren oder auch sich fehlerhaft entwickelnde eigene Zellen unschädlich gemacht werden. Eine Grundvoraussetzung hierfür ist, dass zwischen körperfremden und körpereigenen bzw. entarteten Strukturen differenziert werden kann. Grundsätzlich wird bei der Immunabwehr zwischen zwei Hauptsystemen unterschieden, dem angeborenen und dem spezifischen bzw. adaptiven Immunsystem.

1.1 Grundlagen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch seine Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten körpereigenen Strukturen aus. Diese können spezifisch erkannt und durch gezielte zelluläre Abwehrmechanismen und die Bildung von Antikörpern neutralisiert werden. Nach der Infektion bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, die eine schnelle und gezielte Reaktion des Immunsystems bei einem erneuten Kontakt mit dem Erreger ermöglichen. Wesentliche Bestandteile dieses adaptiven Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten, Antigenrezeptoren (T-Zell-Rezeptoren und Immunglobuline) und die Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) I und II. Die hohe Anpassungsfähigkeit des Systems beruht auf den Mechanismen der somatischen Hypermutation und der V(D)J Rekombination durch die RAG-Enzyme (*Recombination Activating Genes*), die es dem Organismus ermöglichen, aus einer kleinen Anzahl von Genen eine extrem große Anzahl unterschiedlicher Antigenrezeptoren zu generieren (Schatz *et al.*, 1992). Diese Form des Immunsystems ist phylogenetisch relativ jung und findet sich nur bei den Kiefermäulern (Gnathostomata), also bei allen Wirbeltieren von den Knorpelfischen (Chondrichthyes = Haie und Rochen) bis zum Menschen. Die klassischen Komponenten des adaptiven Immunsystems der Gnathostomata fehlen den Vertretern des ältesten Vertebraten-Taxons, den kieferlosen Fischen (Agnatha). Jedoch haben diese ein anderes System entwickelt, das ebenfalls auf dem Prinzip der genetischen Rekombination beruht. Die so genannten variablen Lymphozytenrezeptoren (VLR) der Agnatha werden im Gegensatz zu den Antigenrezeptoren der Gnathostomata nicht aus unterschiedlichen Immunglobulin-Domänen

sondern aus LRR-Modulen (*Leucin-Rich Repeat*) zusammengesetzt. Es wird vermutet, dass die VLR pathogene Antigene in einer ähnlichen Weise und mit gleicher Spezifität erkennen, wie die Antikörper der höheren Vertebraten (Pancer *et al.*, 2004; Alder *et al.*, 2005). Die Analyse der Genomsequenzdaten verschiedenster Invertebraten, wie des Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*), der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), der Seescheide (*Ciona intestinalis*) und des Seeigels (*Strongylocentrotus purpuratus*), lassen darauf schließen, dass diese kein adaptives Immunsystem besitzen, wie es bei den Wirbeltieren zu finden ist (*Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium, 1998; Adams *et al.*, 2000; Azumi *et al.*, 2003; Sodergren *et al.*, 2006; Rast *et al.*, 2006).

Die hochspezifische adaptive Immunantwort hat einen wesentlichen Nachteil. Zwischen dem ersten Kontakt mit einem Antigen und der Verfügbarkeit von Antikörpern verstreicht eine relativ große Zeitspanne von mehreren Tagen. Hier kommen die Mechanismen des unspezifischen oder angeborenen Immunsystems ins Spiel, das in allen Klassen des tierischen und pflanzlichen Lebens eine schnelle Verteidigung gegen Infektionen bietet (Nürnberg *et al.*, 2004).

Die ersten Barrieren für Krankheitserreger sind in der Regel anatomischer oder physiologischer Natur, z. B. in Form einer kompakten Epidermis, die den Organismus vor schädigenden Einflüssen und Eindringlingen von außen schützt, oder eines sauren pH-Wertes wie z. B. auf der Haut oder im Magen des Menschen, der die Lebensbedingungen für Mikroorganismen zumindest erschwert. Zudem ist das angeborene Immunsystem für die frühe Erkennung eindringender Mikroorganismen verantwortlich und leitet eine umfassende Immunantwort gegen Infektionen ein. Dabei werden konservierte mikrobielle Strukturen, die so genannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), durch einen Satz definierter Rezeptoren detektiert, die allgemein als PRRs (*pathogen- oder pattern-recognition receptors*) bezeichnet werden. Im Gegensatz zu den durch Genrekombination und klonale Selektion von Lymphozyten entstehenden antigenspezifischen Rezeptoren des adaptiven Immunsystems handelt es sich bei den PRRs um in der Keimbahn codierte Proteine, die eine Reihe von PAMPs diverser Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten, erkennen. Auf die Detektion solcher PAMPs wird durch verschiedene Zelltypen eine Immunantwort ausgelöst, die unter anderem die Rekrutierung von phagozytischen Zellen und die Sekretion antimikrobieller Peptide einschließt. Bei Wirbeltieren wird außerdem durch die Stimulation dendritischer Zellen die adaptive Immunantwort eingeleitet (Janeway und Medzhitov, 2002).

1.2 Pathogenerkennung durch das angeborene Immunsystem

Auf der Basis ihrer Funktion können bei der angeborenen Immunantwort die Rezeptoren zur Pathogenerkennung grob in zwei Typen unterteilt werden. Zum einen gibt es PRRs, die Signaltransduktionskaskaden einleiten und dadurch eine Immunantwort auslösen, wie die transmembranen Toll- bzw. Toll-*like* Rezeptoren und die zytoplasmatischen NOD-*like* Rezeptoren. Bei der anderen Gruppe handelt es sich um PRRs, die die Anhaftung, die Aufnahme und die Zerstörung von Mikroorganismen durch Phagozyten induzieren ohne intrazelluläre Signale zu vermitteln. Diese PRRs erkennen Kohlenhydrate. Hierzu gehören auch die Mannose-bindenden Lektine (MLBs) und die Ficoline, die bei der Aktivierung des Komplementsystems eine entscheidende Rolle spielen. Nachfolgend soll auf die genannten Beispiele genauer eingegangen werden.

1.2.1 Toll- / Toll-*like* Rezeptoren

1996 konnte gezeigt werden, dass für die Induktion des antimykotischen Peptids Drosomycin in *Drosophila* ein Toll-Transmembranrezeptor und diverse andere Komponenten des Toll-Signaltransduktionsweges erforderlich sind (Lemaitre *et al.*, 1996). Dieser wurde ursprünglich als essentiell für die dorso-ventrale Achsenbildung im *Drosophila*-Embryo beschrieben (Hashimoto *et al.*, 1988; Belvin und Anderson, 1996). Heute weiß man, dass der Toll-Signaltransduktionsweg neben der Bedeutung in der Embryonalentwicklung von *Drosophila* eine zentrale Rolle bei der Erkennung von PAMPs spielt und in dieser Funktion bei Insekten und Säugetieren konserviert ist. Neben dem Toll-Rezeptor, der für die Induktion von Peptiden mit Aktivität gegen Pilze und grampositive Bakterien verantwortlich ist, finden sich im Genom von *Drosophila* acht weitere Toll-Rezeptoren (18 Wheeler/Toll-2 bis Toll-9), für die jedoch keine Funktion in der Immunabwehr nachgewiesen werden konnte (Hoffmann, 2003). Dagegen hat man im Genom des Menschen elf und bei der Maus 13 verschiedene Toll-*like* Rezeptoren (TLR) identifiziert (Medzhitov *et al.*, 1997; Kawai und Akira, 2007). Bei den Toll- und Toll-*like* Rezeptoren handelt es sich um Transmembranrezeptoren, die sich durch eine extrazelluläre LRR- (*Leucine-rich repeat*) Domäne und eine zytoplasmatische TIR- (Toll/Interleukin-1 Rezeptor) Domäne auszeichnen, die für das Weiterleiten von Signalen in die Zelle erforderlich ist. Im Gegensatz zum Toll-Rezeptor in *Drosophila*, der indirekt über das Spaltprodukt eines Zytokin-ähnlichen Polypeptids aktiviert wird (Hoffmann, 2003), binden die TLR der Säugetiere ihre von pathogenen Viren, Bakterien, Protozoen oder Pilzen stammenden mikrobiellen Liganden direkt oder im Zusammenspiel mit extrazellulären Komponenten an der LRR-Domäne. Für die meisten dieser TLR konnten mittlerweile spezifische PAMPs als Liganden nachgewiesen werden, wie bakterielle Lipopolysaccharide, Lipopeptide, Lipoproteine, Flagellin und Peptidoglykan, Lipopeptide von Mycoplasmen und

mykotisches Zymosan (Kawai und Akira, 2007 a). Einige TLR finden sich intrazellulär in der Membran von Endosomen bzw. Lysosomen und dienen hauptsächlich der Erkennung viraler und bakterieller Nukleinsäuren, die sich innerhalb dieser Kompartimente befinden, wie einzel- und doppelsträngige RNA, polyG-enthaltende DNA-Oligonukleotide und CpG DNA-Motive (Kawai und Akira, 2007 a). Am Ende der Toll-Signaltransduktionskaskaden steht die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, hauptsächlich NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), und die folgende Induktion pro-inflammatorischer Zytokine und co-stimulatorischer Moleküle sowie antimikrobieller Peptide (Birchler *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2003). Ferner wird bei Säugetieren die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort eingeleitet (Kawai und Akira, 2007 b).

Inzwischen wurden Gene, die für Toll-*like* Rezeptoren codieren, auch im Schwamm (Wiens *et al.*, 2007), im Pfeilschwanzkrebs (Inamori *et al.*, 2004), im Fadenwurm (Tenor und Aballay, 2008), in sehr hoher Anzahl von über 200 Varianten im Seeigel (Hibino *et al.*, 2006; Rast *et al.*, 2006), in Amphibien (Ishii *et al.*, 2007) und in Fischen (Oshiumu, 2003) gefunden. Auch im Genom der Seescheide *Ciona intestinalis* wurden drei Gene identifiziert, die für Toll-*like* Rezeptoren codieren (Azumi *et al.*, 2003). Die Funktion der Toll-*like* Rezeptoren in allen diesen Organismen ist noch weitgehend ungeklärt, doch gibt es Hinweise, dass es sich zumindest bei einigen ebenfalls um PRRs handeln könnte (Purcell, 2006; Tenor und Aballay, 2008).

1.2.2 NOD-*like* Rezeptoren

Die Toll-*like* Rezeptoren erkennen Pathogene entweder an der Zelloberfläche oder in Endosomen bzw. Lysosomen. Pathogene, die bis in das Zytosol einer Zelle vorgedrungen sind, werden dagegen von einer Reihe zytoplasmatischer PRRs erkannt, die wiederum Signaltransduktionswege aktivieren. Eine entscheidende Rolle bei der Erkennung intrazellulärer PAMPs kommt bei den Vertebraten der großen Familie der NOD-*like* Rezeptoren (NLR) zu. Alle Mitglieder der NLR-Proteinfamilie haben eine charakteristische, dreigeteilte Domänenstruktur gemeinsam. Die C-terminale LRR-Domäne ist vermutlich in die Erkennung konservierter mikrobieller Moleküle oder anderer Liganden involviert, während die zentrale *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD) für die Selbstoligomerisierung des Rezeptors notwendig ist, was zu dessen Aktivierung führt. Die N-terminale Effektor-domäne ist schließlich verantwortlich für die Protein-Protein-Interaktion mit Adaptermolekülen und damit für die Signaltransduktion. Bei der Effektor-domäne kann es sich wiederum um eine Pyrin-Domäne (PYD), eine Caspase-Aktivierungs- und Rekrutierungsdomäne „*caspase activation and recruitment domain*“ (CARD) oder eine *baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat* (BIR) Domäne handeln (Carneiro *et al.*, 2008).

Wie die TLR erkennen die NLR charakteristische mikrobielle Produkte, von denen jedoch nur wenige bekannt sind. Die Mechanismen der PAMP-Erkennung durch NLR sind allerdings unbekannt und es konnte noch keine direkte Interaktion gezeigt werden. Möglicherweise verläuft die Erkennung indirekt über die Beteiligung anderer Proteine (Carneiro *et al.*, 2008). Für NOD1 und NOD2 konnte gezeigt werden, dass deren Aktivierung in dendritischen Zellen, Makrophagen und Monozyten schließlich zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, Stickoxid (NO), co-stimulatorischen Faktoren und Adhäsionsmolekülen führt (Carneiro *et al.*, 2008). Besonders in Epithelzellen kommt es nach Aktivierung von NOD1 und NOD2 zur Produktion antimikrobieller Peptide (Voss *et al.*, 2006; Uehara *et al.*, 2007).

Der evolutionäre Ursprung der NLR-Proteine ist weitgehend unklar. Eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zu den NLR weisen die R-Proteine auf, die eine Immunantwort in Pflanzen vermitteln (Ting und Davis, 2005). Ob die R- und NLR-Gene phylogenetisch einen gemeinsamen Vorfahren haben, oder sich zweimal unabhängig während der Evolution in Pflanzen und Tieren entwickelten, ist ungewiss (Rosenstiel *et al.*, 2008). In den genomischen Datenbanken der Invertebraten *Drosophila* und *Caenorhabditis* wurden Gene identifiziert, deren Produkte nur geringe Ähnlichkeiten zu den NLR zeigen, indem sie zwar einzelne Domänen der NLR-Proteine aber nicht deren charakteristische, dreigeteilte Struktur aufweisen (Ting und Davis, 2005). Wie schon bei den TLR konnten im Genom des Seeigels über 200 Gene beschrieben werden, die für Proteine mit Ähnlichkeiten zu NLR codieren. Über deren Funktion ist allerdings nichts bekannt (Hibino *et al.*, 2006; Rast *et al.*, 2006).

1.2.3 Lektine

Eine wichtige Klasse von Adhäsions- und Mustererkennungsrezeptoren ist die große Familie der Ca^{2+} -abhängigen (C-Typ) Lektine. Dabei handelt es sich um lösliche und transmembranäre Proteine oder Glykoproteine, die durch das Vorhandensein einer oder mehrerer C-Typ-Lektin-Domänen zur Erkennung von Kohlenhydratstrukturen charakterisiert sind (Cambi *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2006). Viele dieser Proteine haben vielfältige Funktionen in der angeborenen wie auch in der adaptiven Immunantwort. Sie umfassen die Vermittlung von Zelladhäsion und Migration, die Erkennung, Opsonierung und Phagozytose von Pathogenen, das direkte Töten von Mikroorganismen sowie die Internalisierung von Antigenen zur späteren Präsentation für T-Lymphozyten (Cambi *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2006).

1.2.3.1 Aktivierung des Komplementsystems durch Lektine

Eine wichtige Gruppe löslicher C-Typ-Lektine sind die Mitglieder der Collectin-Familie wie die Mannose-bindenden Lektine (MBL). Diese erkennen unterschiedliche Zuckerreste wie N-Acetyl-D-Glukosamin, Mannose, N-Acetyl-Mannosamin, Fukose und Glukose auf der Oberfläche von Mikroorganismen und aktivieren daraufhin MBL-assoziierte Serin-Proteasen (MASP) (Robinson *et al.*, 2006; Thiel, 2007). Durch diese wird wiederum die proteolytische Kaskade des Komplementsystems eingeleitet, was schließlich zur Phagozytose der Mikroorganismen führt. Die Ficoline sind ebenfalls Lektine, die im Gegensatz zu den C-Typ-Lektinen eine Fibrinogen-ähnliche Domäne zur Erkennung von Kohlenhydratstrukturen aufweisen (Thiel, 2007). Wie bei den MBL führt auch die Bindung von mikrobiellen Zuckermolekülen durch Ficoline zur Aktivierung des Komplementsystems über MASP. Bei der Auslösung der Komplementkaskade durch MBL oder Ficoline spricht man von dem so genannten Lektin-Weg des Komplementsystems (Thiel, 2007). Bei den Knorpelfischen und höheren Wirbeltieren kann die Aktivierung des Systems außerdem auf dem zuerst beschriebenen und deshalb als „klassisch“ bezeichneten Weg eingeleitet werden. Dieser basiert auf der Ausbildung von Antikörper-Antigen-Komplexen und stellt somit eine Verknüpfung des adaptiven mit dem angeborenen Immunsystem dar. Ein dritter alternativer Weg benötigt keine spezifischen Erkennungsmoleküle (Fujita *et al.*, 2004).

Das eigentliche Komplementsystem besteht aus einer Reihe von Proteinen und Proteinfragmenten in den Körperflüssigkeiten und auf den Oberflächen von Zellen des Organismus. Eine große Anzahl der Komplementproteine sind Zymogene, Vorläufermoleküle von Proteasen, die wiederum durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Im Falle einer Infektion wird lokal eine Kaskade von Zymogenaktivierungen ausgelöst, bei der ein aktives Komplementenzym durch die Spaltung seines Vorläufers entsteht, welches dann wiederum ein anderes Komplementzymogen zu seiner enzymatisch aktiven Form spaltet usw. Auf diese Weise wird die zunächst kleine Anzahl aktivierter Komplementproteine mit jeder folgenden enzymatischen Reaktion stark vervielfacht. Dies führt schließlich zur proteolytischen Aktivierung von C3, der zentralen Komponente des Systems. Aktiviertes C3b bindet kovalent auf der Oberfläche pathogener Mikroorganismen und bewirkt eine effiziente Phagozytose der Zellen durch C3-Rezeptor tragende Makrophagen. Die Fragmente einiger Komplementproteine wirken zudem als Chemokine, die weitere Phagozyten zum Infektionsherd locken. Weiterhin werden durch C3 die späten Komponenten des Systems, C5-C9, aktiviert, was zur Ausbildung eines zytolytischen Komplexes auf der Membran der Zielzelle führt (*membrane attack complex* (MAC)) (Esser, 1994). Die meisten Bestandteile des insbesondere bei Säugern gut erforschten Komplementsystems finden sich sowohl bei niederen Deuterostomiern, als auch bei Protostomiern wieder (Zhu *et al.*, 2005). Allerdings konnte hier bisher nur die Opsonierung und Phagozytose von Zielzellen und keine

Ausbildung des MAC festgestellt werden. Ein auf einem Lektin-Protease-Komplex und C3 basierendes Komplementsystem, ähnlich komplex wie das der Säugetiere, wurde auch für Tunikaten beschrieben (Sekine *et al.*, 2001; Endo *et al.*, 2006).

1.3 Klassen antimikrobieller Peptide

Antimikrobielle Peptide sind ursprüngliche Effektormoleküle der angeborenen Immunantwort, die bei der Verteidigung des Wirtsorganismus gegen Mikroorganismen eine Schlüsselrolle spielen. Sie sind typischerweise relativ klein (etwa zwölf bis 100 Aminosäurereste) und können sowohl konstitutiv oder als Antwort auf eine mikrobielle Infektion produziert werden (Jenssen *et al.*, 2006). Die induzierte Produktion stützt sich dabei auf die vorangehende Pathogenerkennung durch die PRRs und die Auslösung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden, die schließlich lokal oder systemisch zur Synthese der Peptide führen.

Antimikrobielle Peptide wurden aus den verschiedensten Geweben und Zelltypen aus nahezu allen Organismen des Pflanzen- und des Tierreichs und selbst aus Prokaryoten isoliert und charakterisiert. Die Datenbank für antimikrobielle Peptide von Alessandro Tossi (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/amsdb.html>) umfasste im November 2004 895 Einträge isolierter oder anhand von Nukleotidsequenzen vorhergesagter eukaryotischer Peptide, jedoch dürfte die aktuelle Zahl bekannter Peptide mittlerweile deutlich höher liegen. Das grundlegende Prinzip fast aller antimikrobiellen Peptide ist deren Fähigkeit eine amphipathische Konformation anzunehmen, indem Gruppen von hydrophoben und kationischen Aminosäureresten in räumlich voneinander getrennten Bereichen des Moleküls organisiert sind (Zasloff, 2002). Trotz der enormen Vielfalt unterschiedlicher Aminosäuresequenzen können die meisten Peptide aufgrund ihrer Sekundärstruktur und Aminosäurezusammensetzung grob in vier Klassen eingeteilt werden.

Ein weit verbreiteter und häufiger Typ sind die alpha-helikalen Peptide (Abb. 1 A). Für eine Reihe dieser Moleküle wurde gezeigt, dass sie zwar in wässriger Lösung linear vorliegen aber in Gegenwart hydrophober Lösungsmittel oder bei der Interaktion mit Membranen ganz oder teilweise eine amphipathische alpha-helikale Sekundärstruktur annehmen (Maloy und Kari, 1995). Klassische Beispiele hierfür sind die Cecropine des Seidenspinners (*Hyalophora cecropia*) (Steiner *et al.*, 1981; Merrifield *et al.*, 1982), die Magainine (Abb. 1 A) aus der Haut des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) (Zasloff, 1987; Chen *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1990) und das antimikrobielle und zytotoxische Peptid Melittin aus dem Gift der Biene (*Apis mellifera*) (Dempsey und Butler, 1992; Ladokhin *et al.*, 1999).

Eine nächste große Kategorie stellen Peptide dar, die durch die Struktur eines anti-parallelen beta-Faltblatts und die Ausbildung von zwei bis vier stabilisierenden Disulfidbrücken

charakterisiert sind (Abb. 1 B und C). Auch bei diesen resultiert die spezielle Anordnung der kationischen und hydrophoben Aminosäurereste in einer amphipathischen Gesamtstruktur des Moleküls. Zu den bekanntesten Vertretern dieses Typs gehören das Tachyplesin und das Polyphemusin (Abb. 1 B) aus den Hämocyten der Pfeilschwanzkrebse *Tachypleus tridentatus* und *Limulus polyphemus* (Nakamura, 1988; Powers *et al.*, 2004) sowie etliche Peptide, die insbesondere aus Leukozyten der Säugetiere inklusive des Menschen isoliert wurden, wie die α - und β -Defensine (Selsted *et al.*, 1985 und 1993; McManus *et al.*, 2000; Sawai *et al.*, 2001) (Abb. 1 C und D) und die Protegrine (Kakryakov *et al.*, 1993).

Das aus der Blattwanze *Podisus maculiventris* isolierte Thanatin weist auch die Organisation eines beta-Faltblatts auf und liegt aufgrund der Ausbildung nur einer Disulfidbrücke in einer als Schleifenstruktur oder auch beta-Haarnadel bezeichneten Form vor (Mandard *et al.*, 1998) (Abb. 1 E). Aus der Froschgattung *Rana* wurden mehrere lineare antimikrobielle Peptide beschrieben, die ebenfalls durch die Bildung einer Disulfidbrücke eine Schleifenstruktur aufweisen und erst in einer hydrophoben Umgebung in eine alpha-helikale Konformation übergehen (Vignal *et al.*, 1998; Simmaco *et al.*, 1998).

In einer weiteren sehr heterogenen Gruppe wird im Allgemeinen eine Vielzahl kationischer Peptide zusammengefasst, die sich durch das Vorherrschen einzelner oder die Kombination zweier bestimmter Aminosäurereste auszeichnen. So gibt es beispielsweise Peptide reich an Prolin (Otvos, 2002), Prolin und Arginin (Stensvåg *et al.*, 2008), Glycin (Lorenzini *et al.*, 2003), Glycin und Prolin (Bulet *et al.*, 1991), Tryptophan (Selsted *et al.*, 1992) (Abb. 1 F), oder Histidin (Kavanagh und Dowd, 2004). Vertreter dieser Gruppen besitzen in der Regel keine Cysteinreste und ihre Sekundärstruktur ist überwiegend linear (Abb. 1 F), jedoch gibt es einige Ausnahmen durch die Kombination mit Eigenschaften der vorher genannten Klassen.

Daneben existieren diverse antimikrobielle Peptide, die keiner der klassischen Kategorien zuzuordnen sind, darunter Moleküle wie die zyklischen Theta-Defensine, die durch die posttranslationale Prozessierung und Verbindung zweier den α -Defensinen ähnelnden Vorläufermolekülen entstehen (Tang *et al.*, 1999; Selsted, 2004), sowie wenige anionische Peptide (Brogden *et al.*, 1996; Schitteck *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2002) und die Lantibiotics (*lanthionine-containing peptide antibiotics*) aus grampositiven Bakterien. Bei letztgenannten handelt es sich um Peptide mit intramolekularen Ringstrukturen, die aus posttranslational modifizierten Serin- (oder Threonin-) und Cysteinresten gebildet werden (McAuliffe *et al.*, 2001).

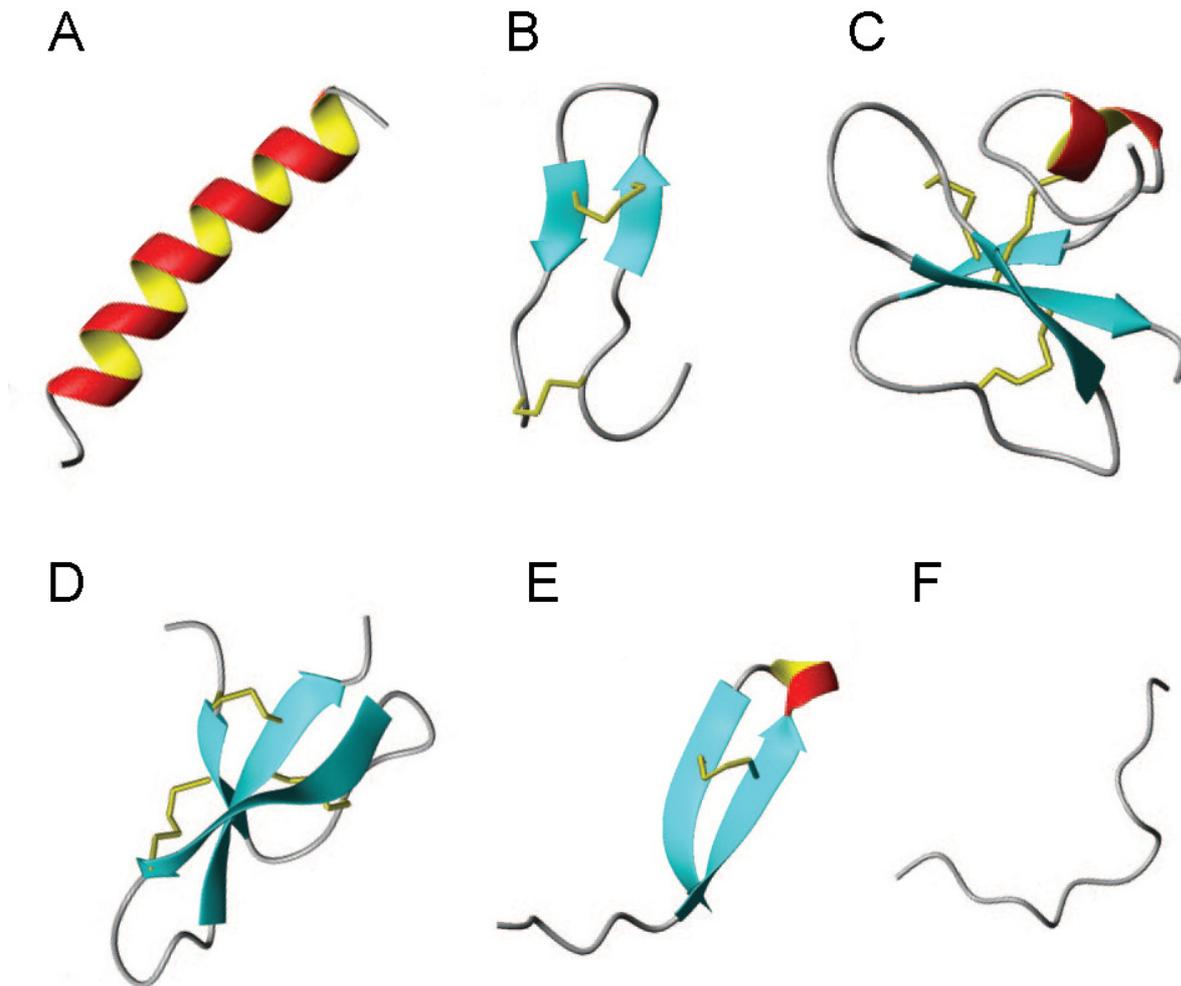


Abb. 1: Beispiele für antimikrobielle Peptide unterschiedlicher struktureller Klassen. Beta-Faltblattstrukturen sind blau und alpha-Helices rot dargestellt. Disulfidbrücken sind durch eine gelbe Linie gekennzeichnet. (A) Alpha-helikales Magainin-2; (B) durch zwei Disulfidbrücken stabilisierte, anti-parallele beta-Faltblattstruktur von Polyphemusin; (C) Struktur des humanen beta-Defensin-2; (D) durch drei Disulfidbrücken stabilisierte beta-Faltblattstruktur eines α -Defensins aus dem Kaninchen (rabbit kidney defensin-1); (E) Schleifenstruktur des Thanatins mit einer Disulfidbrücke; (F) lineare Struktur des Indolicidins. (Abb. verändert nach Jenssen *et al.*, 2006)

Eine Gemeinsamkeit nahezu aller eukaryotischen antimikrobiellen Peptide ist, dass sie zunächst in größeren Vorläufermolekülen als so genanntes Präpropeptid synthetisiert werden. Nach Abspaltung des Signalpeptids liegen sie als inaktive Propeptide vor. Das mature aktive antimikrobielle Peptid wird dann erst durch eine weitere proteolytische Prozessierung freigesetzt, bei der sowohl N- als auch C-terminale Fragmente abgespalten werden können (Shinnar *et al.*, 2003; Pillai *et al.*, 2005). Einige dieser Vorläufer wie die der Naegleriapores aus der Amöbe *Naegleria fowleri* und der bereits erwähnten Magainine sind in der Form von Präpro-Polypeptiden organisiert. Hier werden durch die proteolytische Prozessierung nur eines großen Vorgängermoleküls gleich mehrere aktive Peptide freigesetzt (Terry *et al.*, 1988; Herbst *et al.*, 2004).

1.4 Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide

Im Allgemeinen unterscheidet man die Wirkung antimikrobieller Peptide danach, ob das Töten der Zielzelle durch die Perforation ihrer Membran oder durch die Inhibition lebenswichtiger intrazellulärer Prozesse erreicht wird. Voraussetzung beider Mechanismen ist die Interaktion des Peptids mit der zytoplasmatischen Membran der Zelle, sei es, um sie zu schädigen oder durch sie hindurch ins Innere der Zelle zu gelangen. Die Selektivität der Peptide beruht auf der unterschiedlichen Zusammensetzung der Membran zwischen mehrzelligen Organismen und Mikroorganismen, was am besten für bakterielle Zielzellen verstanden wird. Während die Außenseite der Zellmembran mehrzelliger Organismen ausschließlich aus neutralen zwitterionischen Phospholipiden, hauptsächlich Phosphatidylcholin und Sphingomyelin, zusammengesetzt ist, enthalten bakterielle zytoplasmatische Membranen große Mengen negativ geladener Phospholipide wie Phosphatidylglycerol und Cardiolipin (Matsuzaki, 1999). Folglich steht die Aktivität antimikrobieller Peptide in einem direkten Zusammenhang mit deren kationischen und amphipathischen Struktur. Die positive Netto-Ladung der Peptide führt dazu, dass diese an negativ geladenen Polymeren auf der Oberfläche von Mikroorganismen binden wie den Lipopolysacchariden der gramnegativen oder den Teichonsäuren der grampositiven Bakterien. Das Durchdringen der äußeren Membran der gramnegativen Bakterien wird mit dem Mechanismus des „*self-promoted uptake*“ erklärt (Hancock, 1984 und 1997). Kationische Peptide verdrängen und ersetzen die zweiwertigen Ionen Mg^{2+} und Ca^{2+} von ihren Bindungsstellen an den Lipopolysacchariden der Zelloberfläche. Dadurch wird deren stabilisierende Wirkung auf benachbarte Lipopolysaccharid-Moleküle aufgehoben und aufgrund der Größe der Peptide und hydrophober Wechselwirkungen die Barrierefunktion der äußeren Membran gestört. Es entstehen kurzlebige Risse, die die Passage des Peptids selbst („*self-promoted uptake*“) und anderer antimikrobiell wirksamer Substanzen erlauben (Hancock, 1984 und 1997).

Allerdings töten membranolytische Peptide sowohl gramnegative wie grampositive Bakterien erst durch die Perforation der zytoplasmatischen Membran. Die Peptide binden zunächst an die Kopfgruppen anionischer Phospholipide und tauchen dann aufgrund elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkungen in die Membran ein. Hierbei kommt es durch unterschiedliche Mechanismen zu einer massiven Störung der physikalischen Integrität und zur Permeabilisierung der Doppelschicht. Dieses Ereignis kann durch mehrere komplexe und teils kontrovers diskutierte Modelle beschrieben werden.

Das Modell der ringförmigen Pore („*toroidal pore model*“) geht davon aus, dass sich Aggregate von Peptiden senkrecht zur Oberfläche in der Membran orientieren und eine Pore bilden. Die Membran krümmt sich dabei nach innen und beteiligt sich an deren Ausbildung, indem die hydrophilen Kopfgruppen der Phospholipide mit den hydrophilen Bereichen der

Peptide assoziieren und in Richtung des Zentrums der Pore zeigen. Die hydrophoben Bereiche der Peptide zeigen in Richtung der Kohlenwasserstoffschwänze der Phospholipide (Abb. 2 B). Es wird vermutet, dass unter anderem Melittin und die Magainine eine derartige transmembrane Pore ausbilden (Matsuzaki *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2001).

Das „*barrel-stave model*“ beschreibt ebenfalls die Formierung einer Pore. Die Peptide stehen hier wie die Dauben eines Fasses senkrecht in der Membran, so dass ihre hydrophilen Bereiche in das Lumen der Pore zeigen. Im Gegensatz zum vorherigen Modell sind die Phospholipide der Membran nicht in die Auskleidung der Pore involviert (Abb. 2 C). Dieses Modell geht von einer stabilen Pore mit beständigem Durchmesser aus, was bisher nur für sehr wenige Peptide nachgewiesen werden konnte. Hierzu gehören das aus dem Pilz *Trichoderma viride* stammende Alamethicin (Fox und Richards, 1982; Hall *et al.*, 1984; He *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 2008) und die Amoebapores aus *Entamoeba histolytica*, antimikrobielle und zytolytische Polypeptide aus der Familie der saposinähnlichen Proteine (Keller *et al.*, 1989; Leippe *et al.*, 1994). Für Amoebapore A wurde gezeigt, dass es zunächst Dimere bildet, die sich wiederum zu einem Hexamer zusammenlagern, um in Membranen eine stabile Pore mit einem Durchmesser von etwa 2 nm auszubilden (Leippe *et al.*, 1991; Gutschmann *et al.*, 2003; Hecht *et al.*, 2004).

Anders als das „*toroidal pore*“ und das „*barrel-stave model*“ geht das „*carpet model*“ davon aus, dass sich Peptidaggregate parallel zur Lipiddoppelschicht anlagern und diese lokal wie ein Teppich bedecken. Bei ausreichend hohen Peptidkonzentrationen können Teile der Membran detergenzartig in Mizellen heraus gebrochen werden. Dies führt zu einer lokalen Zerstörung und der Ausbildung von Löchern in der Membran (Abb. 2 D). Zwar glaubt man, dass viele kationische Peptide in sehr hohen Konzentrationen auf diese Weise agieren können. Deren Wirksamkeit bei minimalen effektiven Konzentrationen kann mit diesem Modell aber wahrscheinlich nicht erklärt werden (Jenssen *et al.*, 2006).

Im „*aggregate model*“ umspannen die Peptide die Membran in Form eines Aggregats und es bilden sich Mizellen-ähnliche Komplexe aus Peptiden und Lipiden, jedoch ohne eine bestimmte Orientierung anzunehmen. Mit diesem Modell kann sowohl die Perforation der Membran durch undefinierte Kanäle völlig unterschiedlicher Größe, Gestalt und Beständigkeit erklärt werden (Wu *et al.*, 1999), als auch die Translokation antimikrobieller Peptide ins Zellinnere wie bei dem beta-Faltblatt-Peptid Polyphemusin I aus dem Pfeilschwanzkrebs (Powers *et al.*, 2005 und 2006) (Abb. 2 A).

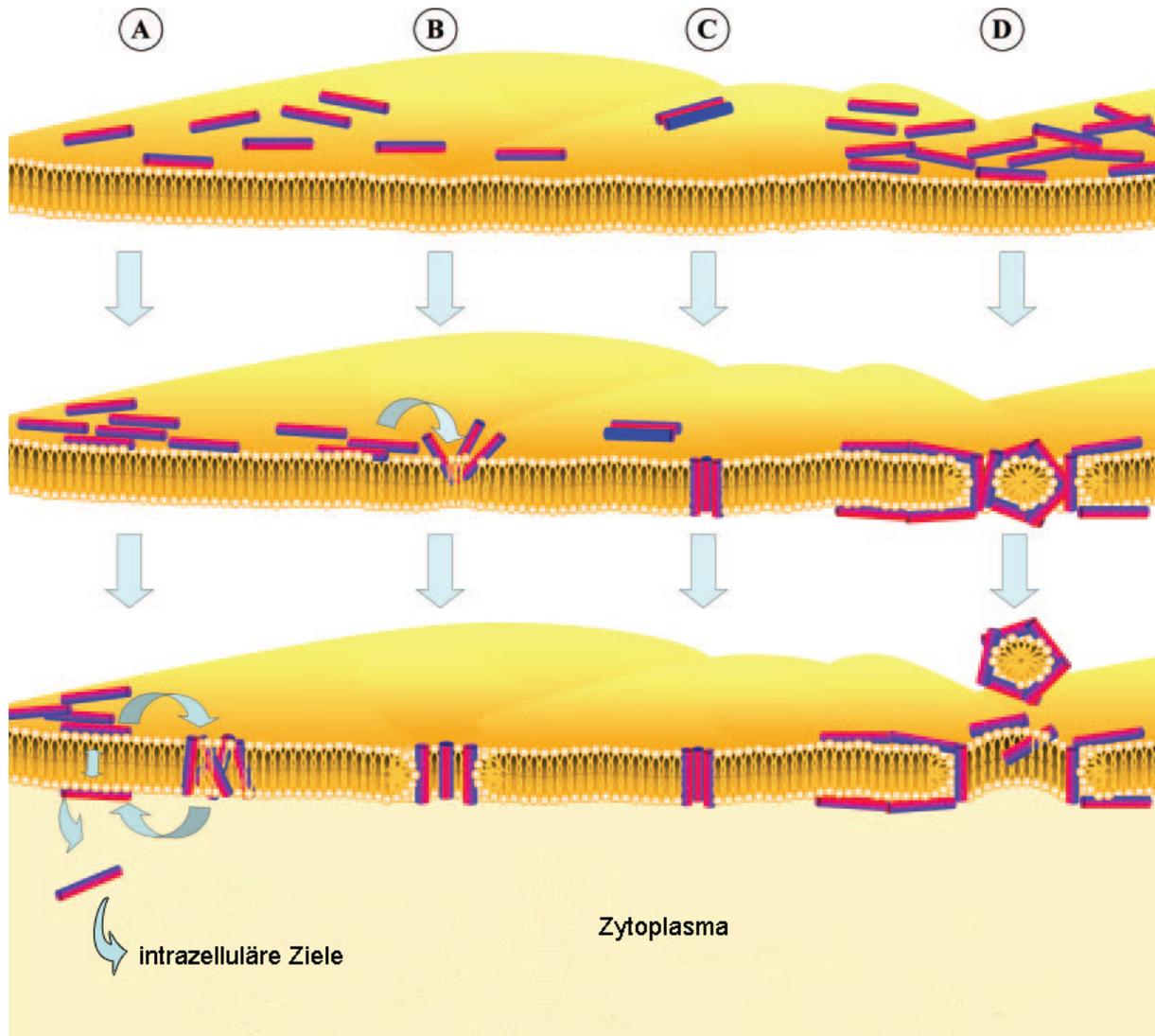


Abb. 2: Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide. Die bakterielle Membran ist als gelbe Lipiddoppelschicht abgebildet. Peptide sind als Zylinder dargestellt, deren hydrophile Region rot und hydrophobe Region blau gefärbt ist. Die verschiedenen Modelle zur Erklärung der Mechanismen der Membranpermeabilisierung werden mit (A) bis (D) angezeigt. (A) Im „*aggregate model*“ umspannen die Peptide die Membran in Form eines Aggregats, so dass es zur Ausbildung Mizellen-ähnlicher Komplexe aus Peptiden und Lipiden kommt. Die Peptide nehmen dabei keine bestimmte Orientierung an. (B) Im „*toroidal pore model*“ inserieren die Peptide senkrecht zur Oberfläche in der Membran, wobei deren hydrophile Regionen mit den Phospholipidkopfgruppen und die hydrophoben Regionen mit dem Lipidkern assoziieren. Die Membran krümmt sich dabei nach innen, so dass die Doppelschicht die entstandene Pore mit auskleidet. (C) Im „*barrel-stave model*“ orientieren sich die Peptide ebenfalls senkrecht zur Oberfläche in der Membran und bilden eine stabile Pore aus. Die hydrophoben Regionen interagieren mit der Lipiddoppelschicht und die hydrophilen Regionen zeigen in das Lumen der Pore, wobei die Phospholipide der Membran in diesem Fall nicht an der Auskleidung derselben beteiligt sind. (D) Das „*carpet model*“ geht davon aus, dass die Peptide parallel zur Lipiddoppelschicht aggregieren und diese lokal wie ein Teppich bedecken. Wenn die Peptidkonzentration ausreichend hoch ist, können dann Teile der Membran detergenzartig als Mizellen heraus gebrochen werden. (Abb. verändert nach Jenssen *et al.*, 2006)

Eine Translokation ohne Schädigung der bakteriellen Membran konnte auch für Peptide anderer struktureller Klassen nachgewiesen werden. Das Ziel dieser Moleküle ist die Inhibition wichtiger intrazellulärer Prozesse. Genannt seien hier das überwiegend alpha-helikale Buforin II, für das eine Bindung an DNA und RNA im Zytoplasma von *E. coli* gezeigt werden konnte (Park *et al.*, 1998 und 2000) und das Prolin-reiche Pyrrhocoricin, das an DnaK bindet, ein Hitzeschockprotein, das in die Chaperon-unterstützte Proteinfaltung involviert ist (Kragol *et al.*, 2002). Als weitere Wirkmechanismen intrazellulär agierender antimikrobieller Peptide wurden die Inhibition der Proteinsynthese und -faltung und der Zellwandsynthese nachgewiesen (Brogden, 2005; Jenssen *et al.*, 2006).

1.5 Antimikrobielle Peptide in der Antibiotikatherapie

Eine der bedeutendsten Entwicklungen für die Behandlung bakterieller Infektionen war die Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming (Fleming, 1929) und dessen späterer erfolgreicher Einsatz als Antibiotikum (Chain *et al.*, 1940), wofür Fleming, Chain und Florey 1945 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen bekamen. Penicillin wurde ursprünglich aus dem Schimmelpilz *Penicillium chrysogenum* isoliert und gehört zur Gruppe der β -Lactam-Antibiotika. Es wirkt abtötend auf grampositive Bakterien wie Staphylokokken, Streptokokken und Pneumokokken, indem es deren Zellwandsynthese bei der Quervernetzung der Peptidoglykane behindert. Im Zuge der erfolgreichen Anwendung des Penicillins wurden in den folgenden Jahren diverse weitere Antibiotika unterschiedlicher Substanzklassen entdeckt wie Streptomycin (Waksman und Schatz, 1945), Tetracyclin, Chloramphenicol, Erythromycin, Vancomycin und viele andere (von Nussbaum *et al.*, 2006). Dabei kommen bei der Behandlung von Infektionen sowohl die Naturstoffe, als auch davon abgeleitete hochwirksame semisynthetische Varianten zum Einsatz. Die Mortalitätsrate bei bakteriellen Infektionskrankheiten ist dadurch drastisch gesunken. Die Notwendigkeit neuer Antibiotika wurde daraufhin zum Teil infrage gestellt und die Unterstützung der antibakteriellen Forschung durch die Industrie ließ nach (Leeb, 2004), so dass in jüngerer Zeit nur zwei Vertreter neuer Strukturklassen für die Therapie am Menschen zugelassen wurden, Oxazolidinon und Daptomycin (Barbachyn und Ford, 2003; Raja *et al.*, 2003; Alder, 2005). Dies erweist sich heute als fatale Fehleinschätzung. Laut Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) stellen Infektionskrankheiten weltweit immer noch die zweithäufigste Todesursache dar (WHO, 2004). Insbesondere in den Entwicklungsländern sterben jährlich Millionen Menschen an den Folgen von Durchfallerkrankungen, Tuberkulose, Malaria, HIV und anderen Infektionen. Dagegen dominieren in den Industrieländern Herz-Kreislaufkrankungen als häufigste Todesursache (WHO, 2004). Zwar hat der umfangreiche Einsatz von Antibiotika in der

Medizin in der westlichen Welt zu einem starken Rückgang bakterieller Infektionen geführt. Hier erlangt jedoch eine andere Problematik immer mehr Bedeutung. Eine stetig wachsende Anzahl von Keimen entwickelt zunehmend Resistenzen gegenüber gängigen Antibiotika (Clark *et al.*, 2003). Besonders in Krankenhäusern kommt es zur Entstehung und Verbreitung resistenter und multiresistenter Keime, da die Mikroflora dort einem konstanten Selektionsdruck durch Antibiotika ausgesetzt ist (Leeb, 2004). In Anbetracht dieser Situation ist es dringend notwendig, neue antimikrobiell wirksame Substanzen zu identifizieren und auf ihre klinische Anwendbarkeit zu überprüfen.

Dabei gilt das Interesse bei der Entwicklung neuartiger therapeutischer Ansätze zur Behandlung von Infektionen zunehmend auch den antimikrobiellen Peptiden. Diese sind deshalb viel versprechende Kandidaten, weil sie gegenüber den klassischen Antibiotika einen entscheidenden Vorteil bieten. Im Gegensatz zu konventionellen Antibiotika, die sich eher gegen spezifische molekulare Ziele richten wie der bakteriellen Zellwandsynthese, den Nukleotidstoffwechsel oder die Proteinsynthese, beruht der Wirkmechanismus der meisten antimikrobiellen Peptide auf grundlegenden strukturellen Eigenschaften der Zielzelle, wie der bakteriellen Zellmembran. Intrazelluläre Ziele kommen in vielen Fällen noch hinzu. Man geht davon aus, dass dadurch die Wahrscheinlichkeit Resistenzen zu entwickeln deutlich geringer ist. Diese Annahme wird durch mehrere Studien gestützt, in denen sich trotz des vielfach wiederholten Aussetzens subinhibitorischer Peptidkonzentrationen keine resistenten Bakterien entwickelten (Steinberg *et al.*, 1997; Ge *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005), jedoch gibt es auch gegenteilige Beobachtungen (Perron *et al.*, 2006). Um die Entstehung von Resistenzen zu vermeiden, ist zudem der Einsatz von antimikrobiellen Peptiden in der Kombinationstherapie mit herkömmlichen Antibiotika denkbar, wodurch der Selektionsdruck von einem spezifischen molekularen Angriffspunkt abgelenkt wird. Eine besonders attraktive Vorstellung ist die Möglichkeit, aus Peptiden mit einem großen Wirkspektrum Antibiotika zu entwickeln, die gleichzeitig antibakterielle, antimykotische und antivirale Aktivität besitzen. So könnte eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogene mit nur einer Behandlungsmethode erreicht werden.

Ein weiterer Vorteil endogener antimikrobieller Peptide eukaryotischer Organismen ist, dass sie im Gegensatz zu den konventionellen Antibiotika der Prokaryoten gencodiert sind. Sie bieten daher interessante Möglichkeiten wie z. B. deren rekombinante Produktion und die transgene Expression ihrer Gene in Nutzpflanzen (Lehrer *et al.*, 2004).

Trotz dieser viel versprechenden Eigenschaften gibt es einige Hürden bei der klinischen Anwendung von Kandidaten-Peptiden. Hierzu gehören die Anfälligkeit für proteolytische Degradation, was insbesondere bei systemischer Applikation problematisch ist, toxisches Potential von relativ großen und stark geladenen Peptiden, nicht konstante antimikrobielle Aktivität bei physiologischen Salz-, pH- und Serumbedingungen und die relativ hohen Kosten

bei der Entwicklung und synthetischen Herstellung der Peptide im großen Maßstab (Jenssen *et al.*, 2006).

Dennoch befindet sich eine Reihe von Peptiden bereits in unterschiedlichen Phasen der kommerziellen Entwicklung von der Optimierung bis hin zu vorklinischen und fortgeschrittenen klinischen Studien. Bis heute haben vier kationische Peptide oder Proteine die dritte klinische Studienphase erreicht. Dabei handelt es sich um Pexiganan (Magainin-Derivat MSI-78) zur Behandlung von Impetigo und diabetischem Fußgeschwür, Isegran gegen orale Mukositis (Schweine-Protegrin-Derivat IB-367), Neuprex gegen Sepsis (Derivat des humanen *bactericidal permeability protein*, rBPI₂₃) und Omiganan gegen Katheter assoziierte Infektionen (Rinder-Indolcidin-Variante CPI-226) (Hancock und Sahl, 2006; Melo *et al.*, 2006; Fritsche *et al.*, 2008 a + b). Von diesen vier Peptiden zeigten jedoch nur Pexiganan und Omiganan Effektivität in den Studien und nur für Omiganan besteht derzeit noch Hoffnung auf eine Markteinführung. Viel versprechende Ergebnisse gibt es unter anderem für eine weitere Rinder-Indolcidin-Variante (MX-594AN), die sich in Phase zwei der klinischen Prüfung befindet und gegen Rosacea, eine chronische entzündliche Hautkrankheit, eingesetzt werden soll (Jenssen *et al.*, 2006).

1.6 Antimikrobielle Peptide bei Tunikaten

Marine Organismen spielen eine bedeutende Rolle bei der Suche nach neuartigen Substanzen mit pharmakologisch interessanten biologischen Aktivitäten (Blunden, 2001). Auch Tunikaten haben sich als reichhaltige Quelle für etliche neue Substanzen unterschiedlichster Stoffklassen erwiesen. Neben Alkaloiden (Uddin *et al.*, 2001; Chill *et al.*, 2003), Alkanen und Alkenen (Tsukamoto *et al.*, 1994; Aiello *et al.*, 2000) und anderen (Davies-Coleman *et al.*, 2000) sind die meisten dieser Moleküle Verbindungen aus Aminosäurederivaten, bei denen es sich um Sekundärmetabolite handelt (Rinehart *et al.*, 1981; Azumi *et al.*, 1990; Davidson, 1993). Ein mikrobieller Ursprung dieser Stoffe aus bakteriellen Symbionten kann dabei häufig nicht ausgeschlossen werden (Davidson, 1993). Die unterschiedlichen Substanzen weisen antibakterielle, antimykotische, antivirale und zytotoxische Aktivitäten auf.

Die ersten gencodierten antimikrobiellen Peptide aus Tunikaten wurden aus den Hämocyten der Seescheide *Styela clava* isoliert. Bei den Clavaninen und Styelinen handelt es sich jeweils um Genfamilien mit mehreren Mitgliedern, die für Vorläufermoleküle alpha-helikaler antimikrobieller Peptide codieren (Lee *et al.*, 1997 a und b; Zhao *et al.*, 1997 a und b). Eine Besonderheit der maturen Clavanin-Peptide ist deren hoher Anteil an Histidinresten und eine daraus resultierende pH-abhängige Aktivität. Da Histidin nur in saurer Umgebung positiv

geladen ist, ermöglicht erst ein niedriger pH-Wert den Peptiden eine verstärkte Bindung an die negativ geladene Oberfläche von Bakterien (Lee *et al.*, 1997 c; van Kan *et al.*, 2002).

Für die Styeline konnte man zeigen, dass diese posttranslational stark modifiziert werden. Vollständig identifiziert hat man allerdings nur das Styelin D, bei dem zwölf von 32 Aminosäureresten Modifikationen aufweisen. Neben 5-Hydroxylysin enthält Styelin D zwei sehr ungewöhnliche, 6-Bromotryptophan und 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA), und zwei bis dahin nur aus Sekundärmetaboliten bekannte Aminosäurereste, Dihydroxyarginin und Dihydroxylysin (Taylor *et al.*, 2000). Man nimmt an, dass durch die Modifikationen die biologische Aktivität des Peptids auch bei hohen Salzkonzentrationen und niedrigem pH-Wert gewährleistet wird, da das natürliche Peptid unter diesen Bedingungen deutlich aktiver ist als das nicht modifizierte synthetische Analogon (Taylor *et al.*, 2000). Eines der kleinsten bekannten antimikrobiellen Peptide, das Octapeptide Plicatamide aus *Styela plicata*, besitzt ebenfalls einen ungewöhnlich modifizierten Aminosäurerest, ein C-terminales decarboxy-(E)- α,β -dehydro-3,4-Dihydroxyphenylalanin (dc Δ DOPA) (Tincu *et al.*, 2000 und 2003). Für die antimikrobielle Aktivität von Plicatamide scheint die elektrostatische Interaktion mit anionischen Phospholipiden der Zielmembran eine untergeordnete Rolle zu spielen. Vielmehr wurde gezeigt, dass dieses unkonventionelle Peptid einen massiven Kaliumausfluß bei *Staphylococcus aureus* induziert und für Kationen spezifische Kanäle in aus bakteriellen Lipiden bestehenden Lipiddoppelschichtmodellen ausbildet (Tincu *et al.*, 2003).

Zwei weitere antimikrobielle Peptide des alpha-helikalen Typs wurden aus *Halocynthia aurantium* beschrieben. Bei beiden handelt es sich um Dimere, deren Untereinheiten jeweils über eine aus Cysteinresten gebildete Disulfidbrücke verbunden sind. Während das Dicynthaurin als Heterodimer vorliegt, ist das Halocidin ein aus zwei identischen Untereinheiten bestehendes Homodimer (Lee *et al.*, 2001 a, Jang *et al.*, 2002 und 2005).

Eine Gemeinsamkeit aller bisher aus Tunikaten isolierten antimikrobiellen Peptide ist, dass sie aus sauren Hämocyten-Extrakten gereinigt wurden. Für die Clavanine konnte genauer mittels immunozytochemischer Methoden eine Lokalisation der Peptide in Granula bestimmter Hämocytentypen gezeigt werden (Menzel *et al.*, 2002). Eine Ausnahme stellt das zu den Clavaninen ähnliche und ebenfalls histidinreiche Clavaspirin dar, dessen Transkript in einer von Kiemendarmgewebe generierten cDNA-Bank identifiziert wurde. Ein von der Nukleotidsequenz abgeleitetes synthetisches Peptid zeigt eine mit den Clavaninen vergleichbare antibakterielle Aktivität (Lee *et al.*, 2001 b).

1.7 *Ciona intestinalis* – Systematik, Morphologie und Lebensweise

Neben den Wirbeltieren (Vertebrata oder Craniota) und den Schädellosen (Cephalochordata oder Acrania) stellen die rein marinen Manteltiere (Tunicata oder Urochordata) einen der drei Unterstämme der Chordatiere (Chordata). Dabei werden nach neuesten Erkenntnissen die Manteltiere und nicht wie bisher die Schädellosen als die nächsten Verwandten der Wirbeltiere angesehen (Delsuc *et al.*, 2006). Die Manteltiere besitzen, wenn auch meist nur im Larvalstadium, alle für Chordaten charakteristischen Merkmale: Chorda dorsalis (auch Notochord genannt), Neuralrohr, Kiemendarm und Ruderschwanz. Bei den adulten Tieren ist allerdings oft nur noch der Kiemendarm als typisches Chordatenmerkmal vorhanden, der als NahrungsfILTER und Respirationsorgan fungiert. Der Körper aller Tunikaten ist von einem namengebenden Mantel (Tunika) aus Proteinen, Wasser, verschiedenen Kohlenhydraten und Cellulose umgeben (Kunike, 1925), die sie als einzige Vertreter des Tierreichs selbst synthetisieren können (Matthysse *et al.*, 2004; Nakashima *et al.*, 2004). Der Unterstamm Tunicata wird traditionell in die Ascidiacea (Seescheiden), Thaliacea (Salpen), Sorberacea und die Appendicularia oder Larvacea unterteilt. Letztere weisen als einzige Vertreter auch im adulten Stadium eine Chorda dorsalis auf.

Ciona intestinalis gehört zu den Seescheiden (Ascidiacea), die mit über 2000 Arten die mit Abstand größte Gruppe innerhalb der Tunicata darstellen. Innerhalb der Seescheiden unterscheidet man zwischen einzeln lebenden Solitärascidien, sozialen Ascidien, bei denen einzelne Tiere über Ausläufer verbunden sind, und koloniale Ascidien, bei denen sich eine Kolonie Mantel, Gefäßsystem und Egestionsöffnung teilt. *C. intestinalis*, auch Schlauchseescheide genannt, ist eine solitäre Ascidie. Die adulten Tiere werden bis zu 15 cm groß und sind wie alle Seescheiden sessil, während die Larve pelagisch lebt. Die Art ist kosmopolitisch verbreitet und epibenthisch auf festem Untergrund wie Felsen oder Muschelbänken aber auch auf Algen zu finden (Dybern, 1963). Die Schlauchseescheide ernährt sich, indem sie Mikroplankton aus dem umgebenden Meerwasser filtriert. Dazu wird von den Wimpern an der Innenfläche des Kiemendarms ein ständiger durch die Ingestionsöffnung eintretender Wasserstrom erzeugt, der durch die Kiemenspalten in den Peribranchialraum gelangt und den Körper durch die Egestionsöffnung wieder verlässt. Die Nahrungspartikel werden dabei in einem Schleimteppich abgefangen, der vom Wimperepithel an der Innenwand des Kiemendarms entlang befördert wird und sich schließlich im Dorsalorgan des Kiemendarms sammelt. Von dort wird der mit Nahrungspartikeln vermischte Schleim in den Oesophagus befördert. Die Produktion des Schleimes findet in den Drüsenzellen des Endostyls, einer achsenparallel verlaufenden offenen Rinne gegenüber dem Dorsalorgan im Kiemendarm, statt (Storch und Welsch, 1996). Das Endostyl der Tunikaten ist homolog zur Schilddrüse der Vertebraten (Ogasawara *et al.*, 1999).

Das Gefäßsystem aller Tunikaten ist offen und lakunär mit einem Herz, das rhythmisch seine Kontraktionsrichtung wechselt und somit abwechselnd dem Kiemendarm und dem Körper Hämolymphe zutreibt. Die Hämolymphe von *C. intestinalis* enthält acht morphologisch unterscheidbare Typen von Hämozyten, die zum Teil in weitere Subtypen unterteilt werden können (Rowley, 1981 und 1982 a + b).

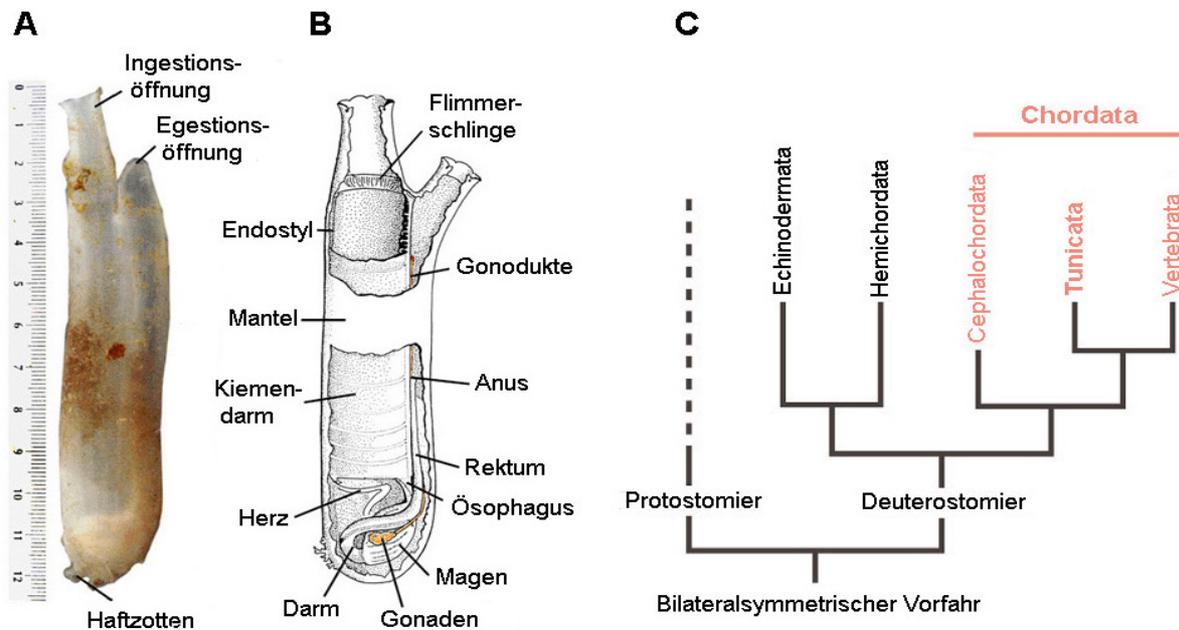


Abb. 3: Morphologie von *Ciona intestinalis* und phylogenetische Einordnung der Tunicata. (A) Seitliche Ansicht eines adulten Individuums von *C. intestinalis*. Erkennbare morphologische Strukturen sind die Siphone der Ingestions- und der Egestionsöffnung sowie die Haftzotten, mit denen sich das Tier am Untergrund verankert. Die Oberfläche des Mantels weist bei dem abgebildeten Exemplar einen teilweisen Bewuchs mit Algen auf. Der Maßstab ist in cm angegeben. (B) Schematische Darstellung einer präparierten adulten *Ciona*, nach partieller Entfernung des Mantels. Folgende anatomische Strukturen sind erkennbar: Die Flimmerschlinge als ringförmige Verdickung im Siphon der Ingestionsöffnung, der Kiemendarm mit dem Endostyl, der Verdauungstrakt mit Ösophagus, Darm, Magen, Rektum und Anus, die Gonaden mit den Gonodukten und das Herz. (C) Phylogenetische Beziehung der Deuterostomier. Seescheiden (Ascidiacea) gehören innerhalb der Chordatiere zu dem Unterstamm der Tunicata. (Abb. (A) und (B) verändert nach Cirino *et al.*, 2002; Abb. (C) verändert nach Sasakura *et al.*, 2007)

C. intestinalis ist hermaphroditisch mit getrennten Ovarien und Hoden. Die Eier und Spermien werden durch die Egestionsöffnung in das Meerwasser abgegeben. Dabei ist Fremdbefruchtung die Regel, obwohl zu einem gewissen Prozentsatz auch Selbstbefruchtung möglich ist (Morgan, 1940; Rosati und de Santis, 1978). Die sich aus den befruchteten Eiern entwickelnden mobilen Larven nehmen keine Nahrung auf und ähneln äußerlich einer Kaulquappe mit einem anterioren Teil aus Kopf und Rumpf und einem posterioren Schwanz. Etwa einen Tag nach der Befruchtung setzt sich die Larve mit der Mundöffnung fest und vollzieht daraufhin eine umfassende Metamorphose zu einem

filtrierenden, festsitzenden Jungtier. Dabei werden larvale Strukturen wie Chorda dorsalis, Neuralrohr und Schwanz resorbiert und der Körper um 90° gedreht, so dass die Mundöffnung zur Ingestionsöffnung wird. In einer längerfristigen Entwicklungsphase differenzieren sich dann adulte Gewebe wie Kiemendarmspalten, Endostyl, Herz und Hämocyten (Cloney, 1982; Passamaneck und Di Gregorio, 2005).

1.8 *Ciona intestinalis* als Modellorganismus

Dank ihrer interessanten phylogenetischen Position innerhalb der Chordata und ihres transparenten und sich schnell entwickelnden Mosaikembryos sind Seescheiden schon seit mehr als einem Jahrhundert ein beliebter Forschungsorganismus in der Embryologie. Bis heute haben sie sich als einfaches experimentelles System insbesondere zur molekularen Untersuchung der Spezifizierung des Zellschicksals während der Chordatenentwicklung erwiesen (Corbo *et al.*, 2001; Jeffery, 2001). Die Seescheidenlarve besteht aus nur 2.500 Zellen, und es gibt umfangreiche Informationen über die Zelllinien der meisten Gewebe und Organe (Nishida, 1987). Die Blastomere der frühen Embryonen sind groß und erlauben die detaillierte Darstellung differentieller Genexpression während der Entwicklung (Corbo *et al.*, 2001; Jeffery, 2001). Außerdem verläuft die Embryogenese sehr zügig innerhalb von 18 Stunden von der Befruchtung bis zur frei schwimmenden Larve und der gesamte Lebenszyklus beträgt weniger als drei Monate.

Die Aufnahme der Seescheiden in die Reihe der modernen Modellorganismen wurde schließlich mit der Veröffentlichung der Genomsequenz von *Ciona intestinalis* eingeleitet (Dehal *et al.*, 2002). Das Genom von *C. intestinalis* ist mit einer Größe von 160 Megabasen etwa 20 mal kleiner als das menschliche Genom und enthält etwa 16.000 Protein-codierende Gene, die im Wesentlichen das basale Set der Chordatengene repräsentieren. Dabei zeigt es nicht die umfangreichen Genduplikationen wie sie bei den Vertebraten zu finden sind. Eine physikalische Genkarte deckt bereits mehr als die Hälfte des gesamten Genoms ab. Hinzu kommt eine große *expressed sequence tag* (EST) Datenbank, die mittlerweile fast 700.000 Sequenzen umfasst (Satou *et al.*, 2005). Die meisten der Genmodelle in *C. intestinalis* werden deshalb durch identifizierte cDNA-Sequenzen unterstützt. Für nahezu ein Viertel der vorhergesagten Gene existieren zudem bereits gewebespezifische und zeitliche Expressionsprofile (Satoh und Levine, 2005).

Neben der zunehmenden Verfügbarkeit umfangreicher Nukleotidsequenzdaten von *C. intestinalis* ist es parallel zu beeindruckenden Fortschritten bei der Anwendung moderner molekularbiologischer Methoden zur genetischen Manipulation gekommen. Mikroinjektion und Elektroporation ermöglichen, DNA, RNA und Oligonukleotide in Embryonen einzuführen. So lassen sich durch die Injektion von mRNA bzw. *Antisense*-Morpholino-Oligonukleotiden in

Embryonen die Auswirkungen so genannter *loss* und *gain of function* Experimente auf die Frühentwicklung beobachten (Satou *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2003). Die Elektroporation erlaubt sogar die gleichzeitige Transformation hunderter sich synchron entwickelnder Embryonen. Diese Methode wurde erfolgreich zur Charakterisierung cis-regulatorischer DNA und zur Produktion von Mutantenphänotypen durch Fehl- oder Überexpression regulatorischer Gene in Embryonen eingesetzt (Di Gregorio und Levine, 2002).

Die Generierung stabiler transgener Linien gelang bei *C. intestinalis* erstmals im Jahre 2003 mit der Minos-Transposon-Technik (Sasakura *et al.*, 2003). Diese ermöglicht die Herstellung von stabilen Linien mit Reporterexpression in spezifischen Geweben oder Organen, die Durchführung von *Enhancer-Trap*-Experimenten und die Mutagenese durch Insertion (Matsuoka *et al.*, 2005; Saskura *et al.*, 2007).

1.9 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Effektormoleküle der antimikrobiellen Abwehr in der Schlauchseescheide *Ciona intestinalis* zu identifizieren und zu charakterisieren. Der Fokus lag dabei auf der Substanzklasse der antimikrobiellen Peptide, die bei allen mehrzelligen Organismen als gencodierte Abwehrmoleküle des angeborenen Immunsystems eine Schlüsselrolle bei der Verteidigung gegen pathogene Mikroorganismen spielen.

Die Schlauchseescheide wurde als Forschungsobjekt gewählt, da sie als Modellorganismus und durch die Verfügbarkeit umfangreicher Nukleotidsequenzdaten vielfältige Vorteile bei der Identifizierung und Analyse gencodierter Proteine und Peptide bietet. Zudem ist aufgrund der Lebensweise als Filtrierer auf dem Meeresgrund mit einer intensiven und permanenten Konfrontation mit potentiellen Krankheitserregern zu rechnen, was eine schnelle und effiziente Verteidigung durch Effektormoleküle vermuten lässt.

Zum einen sollte versucht werden, natürliche antimikrobielle Peptide aus solchen Geweben von *C. intestinalis* zu isolieren, bei denen von einer besonderen Barrierefunktion gegen Krankheitserreger auszugehen ist. Hierzu zählen der Mantel, der Kiemendarm als Filtrationsorgan und die Hämocyten als klassische Abwehrzellen der Hämolymphe von Invertebraten. Zum anderen sollte mithilfe der Daten aus den EST- und Genomprojekten eine *in silico* Suche nach Nukleotidsequenzen durchgeführt werden, die für antimikrobielle Peptide codieren. Dazu sollte sowohl die einfache BLAST-Suche nach Sequenzen mit Homologie zu bekannten antimikrobiellen Peptiden anderer Organismen zählen, als auch die mögliche Identifizierung neuartiger Peptide über die systematische Suche nach Sequenzen, die typische Charakteristika für antimikrobielle Peptide aufweisen.

Im Anschluss sollte die antimikrobielle Aktivität der so identifizierten Peptide hinsichtlich ihres Zielzellspektrums, der zugrunde liegenden Wirkmechanismen und ihrer biologischen Bedeutung intensiv charakterisiert werden. Zudem sollte vor dem Hintergrund des zunehmenden Interesses für den Einsatz antimikrobieller Peptide in der Antibiotikatherapie eine vorläufige Überprüfung anwendungsrelevanter Kriterien vorgenommen werden.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

Acetonitril (ACN)	Roth
Acrylamid-Lösungen	Applichem
Agar-Agar	Roth
Agarose (low EEO)	Applichem
Ameisensäure	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Applichem
Ampicillin Natriumsalz	Applichem
Benzol	Merck
β -Mercaptoethanol	Applichem
Borsäure (H_3BO_3)	Applichem
Bovines Serumalbumin (A2153)	Sigma
Bovines Serumalbumin Fraktion V	Applichem
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Applichem
CAPS	Applichem
CHAPS	Calbiochem
Chloroform	Applichem
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Applichem
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Applichem
dNTPs	Fermentas
Essigsäure	Roth
Essigsäureanhydrid	Sigma
Ethanolamin	Roth
Euparal	Roth
EDTA, di-Natriumsalz	Roth
Ethanol ($\geq 99,8$ % p. a.)	Roth
Ethidiumbromid	Applichem
Ficoll	Pharmacia Fine Chemicals
Fleischextrakt (<i>meat extract</i>)	Sigma
Formaldehyd	Applichem
Formamid	Applichem
Gentamicinsulfat	Invitrogen
Glukose	Applichem
Glutardialdehyd	Roth

Glycerin (≥ 86 % p. a.)	Roth
Glycin	Merck
Glykogen	Boehringer Mannheim
Hefeextrakt	Roth
Heparin Natriumsalz	Roth
HEPES	Roth
HPLC-Wasser	Roth
Isopropanol	Merck
IPTG	Applichem
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem
Kaliumsulfat (K_2SO_4)	Applichem
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Applichem
LB Broth Base	Roth
Maleinsäure	Applichem
MES	Roth
Methanol	Roth
Methylbenzoat	Fluka
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Sigma
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Applichem
Mowiol 4-88	Calbiochem
Natriumacetat	Applichem
Natriumazid (NaN_3)	Applichem
Natriumcarbonat	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	MP Biomedicals
Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Applichem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem
Natriumhydrogencarbonat	Sigma
Natriumsulfat (Na_2SO_4)	Applichem
Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$)	Roth
Natronlauge (NaOH)	Merck
Paraffin (Paraplast plus, X881.1)	Roth
Paraformaldehyd	Applichem
L- α -Phosphatidylcholin Typ II S <i>from soy bean</i> (P5638)	Sigma
Poly-L-Lysin 0,1 % (P8920)	Sigma
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
<i>Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i> , Complete EDTA-free	Roche

Proteose-Pepton	Oxoid
RNase-Inhibitor	Invitrogen
Sabouraud Dextrose Broth	Sigma
Salzsäure (HCl) 37 % (w/v)	Roth
Schafserum	Sigma
Silbernitrat	Merck, Sigma
TEMED	Applichem
Triethanolamin	Boehringer Mannheim
Trifluoressigsäure (TFA)	Applichem
Tris	Roth
Tris-maleat	Applichem
Tricin	Roth
tRNA, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (R-8508)	Sigma
Trypton (Pepton aus Casein, tryptisch geschnitten)	Roth
Tween 20	Applichem
Valinomycin (≥ 90 % HPLC, V0627)	Sigma
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Roth
Xylol	Rudolf Walter K.G., Kiel
Zitronensäure (Citrat)	Roth

2.2 Farbstoffe und Substrate

BCIP	Promega, Mannheim
Bromphenolblau (BPB)	Merck
CCF2-FA	Invitrogen
DiFMUG	Molecular Probes
DTDC (diS-C ₂ -(5))	Kodak
Hoechst 33258	Sigma
NBT	Sigma
Phenolrot	Sigma
Sytox Green	Molecular Probes
X-Gal	Applichem
Xylencyanol	Applichem

2.3 Enzyme

SP6 RNA Polymerase	Fermentas
T7 RNA Polymerase	Fermentas
Taq DNA Polymerase	Fermentas
SuperScriptIII RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen
DNase I	Fermentas
Proteinase K	Fermentas

2.4 Protein-Größenstandards

Mark12	Invitrogen
<i>SeeBlue plus2, Pre-stained Standard</i>	Invitrogen
Marker #SM0431	Fermentas
<i>Molecular weight marker (2,5-19,9 kDa)</i>	BDH, Laboratory supplies, Poole, UK

2.5 DNA-Längenstandards

GeneRuler™ DNA Ladder Mix 100-10000 bp	Fermentas
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus	Fermentas

2.6 Immunoreagenzien

Anti-DIG-Fab-Fragmente Alkalische-Phosphatase(AP)-Konjugat	Roche Diagnostics
Anti-Kaninchen-IgG (Ziege) Alkalische-Phosphatase(AP)-Konjugat	Sigma
Anti-Kaninchen-IgG (Ziege) Meerrettich-Peroxidase(HRP)-Konjugat	DAKO, Dänemark
Anti-Kaninchen-IgG (Ziege) Cy3-Konjugat	Jackson
	ImmunoResearch
	Laboratories, USA
Anti-Ci-MAM-A24 (Kaninchen) 1 (SA5429)	Eurogentec
Anti-Ci-MAM-A24 (Kaninchen) 2 (SA5430)	Eurogentec
Anti-Ci-PAP-A22 (Kaninchen) 1 (SA5078)	Eurogentec
Anti-Ci-PAP-A22 (Kaninchen) 2 (SA5079)	Eurogentec

2.7 Erythrozyten

Erythrozyten, Hammel (50 %)	Virion\Serion, Würzburg
Erythrozyten-Konzentrat, human, (Blutgruppe A; Rhesus (D)-positiv)	UKSH Kiel, Institut für Transfusionsmedizin

2.8 Medien

LB-Medium	1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
LB-Amp-Medium	LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin (nach dem Autoklavieren zugegeben)
LB-Agar	LB-Medium, 1,5 % (w/v) Agar-Agar
Nordsee-Agar	3 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Proteose-Pepton, 0,3 % (w/v) Fleischextrakt, 1,5 % (w/v) Agar-Agar, pH 7,5
Sabouraud-Dextrose-Medium	Sabouraud Dextrose Broth 30 g/l
Sabouraud-Dextrose-Agar	Sabouraud Dextrose Broth 30 g/l, 1,5 % (w/v) Agar-Agar
SOC-Medium	2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose (100 µl 2 M Glukose (sterilfiltriert) auf 1 l, nach dem Autoklavieren zugegeben)

2.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) bezogen. Die Schmelztemperaturen wurden mit dem Programm Oligo Calculator (<http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>) berechnet.

Verwendete Oligonukleotide:

<i>Ci-Actin_F1</i>	5' GCATCACACTTTCTACAACG 3'
<i>Ci-Actin_R1</i>	5' TCAAGATCTTCATCAAGTAATCG 3'
<i>Ci-mam-A_F1</i>	5' GCTCTTCTTCTCTTGGTGTC 3'
<i>Ci-mam-A_R1</i>	5' CACTTTGTTTCGTTCAATGACAAG 3'
<i>Ci-mam-A_F5'</i>	5' GGCACGAGGATCTCAACG 3'

<i>Ci-mam-B_F1</i>	5' CTGTTTCGTGATTCTTCAAGTTAC 3'
<i>Ci-mam-B_R1</i>	5' TCCGTTTCTAATGACTCCTTTAC 3'
<i>Ci-mam-B_F2</i>	5' GCCTTCGCTTTTCTGTTTCG 3'
<i>Ci-mam-B_R2</i>	5' TGGTATTTCTTATTCAATCCATGC 3'
<i>Ci-mam-B_F5'</i>	5' CGGCACGAGGACGAAATG 3'
<i>Ci-mam-C_F1</i>	5' TTCTTGGTGTTTCTCCACATATC 3'
<i>Ci-mam-C_R1</i>	5' GCAAATCACAGCTTAGCCATG 3'
<i>Ci-mam-C_F5'</i>	5' CTCGAGACGAAACTCAACG 3'
<i>Ci-mam-D_F1</i>	5' CTCGTTTCACAAGCGACG 3'
<i>Ci-mam-D_R1</i>	5' GTTCACTGAATGGTTGACTC 3'
<i>Ci-mam-D_F5'</i>	5' CAGTTGGTAGATCGCAACG 3'
<i>Ci-mam-E_F5'</i>	5' GGCCGCTGACAAATATCAACG 3'
<i>Ci-mam-F_F5'</i>	5' GCATTCCAGACAAATATTAACGAAATG 3'
<i>Ci-mam-E/F_R1</i>	5' GTTGACTIONTATTCCACCCGC 3'
<i>Ci-mam-G_F1</i>	5' TGCTTCTGCATATCACTGCAG 3'
<i>Ci-mam-G_R1</i>	5' CAAGTTCACTGAATGGTTGACTC 3'
<i>Ci-mam-G_F5'</i>	5' CGGCACGAGGCAAATATTAAC 3'
<i>Ci-meta4_F1</i>	5' GCAGTGTTTCGTAATTGCAGTC 3'
<i>Ci-meta4_R1</i>	5' GTTGGATGCATAAAGTACCCG 3'
<i>Ci-pap-A_F1</i>	5' GATGCTGCTCTAAGAAGTGC 3'
<i>Ci-pap-A_R1</i>	5' CTACGATAAACGAGTTTCGTTC 3'
<i>Ci-pap-A_F2</i>	5' GTTCTCGTGATCTGCTTAGC 3'
<i>Ci-pap-A_F3</i>	5' GTTGTTCCTTAACAAACAAAGATG 3'
<i>Ci-pap-A_F4</i>	5' GATCTGCTTAGCTGTATCTGC 3'
<i>Ci-pap-B_F1</i>	5' GATGCTGCTGCAAGAGCTC 3'
<i>Ci-pap-B_R1</i>	5' CGAGTATTTGGTTATTCATCCCG 3'
<i>Ci-pap-B_R2</i>	5' AGAGCTTCGATGGCTTCGG 3'
<i>Ci-pap-C_R1</i>	5' CTTATCGTTTATTAATCTTGCAG 3'
<i>Ci-pap-C_F2</i>	5' AATCTGTAGTTGCCGTTATC 3'
M13 vorwärts (-20)	5' GTAAAACGACGGCCAGTG 3'
M13 rückwärts	5' AACAGCTATGACCATG 3'
Oligo-dT ₁₇	5' GACTCGAGTCGACATCGAT ₁₇ 3'
SP6 Promotor	5' GATTTAGGTGACACTATA 3'
T7 Promotor	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

2.10 Geräte

ÄKTA purifier-900	Amersham-Bioscience
<i>Easyject Prima</i> Elektroporator	Equibio
Elektrophorese Spannungsgeber, E835/E861	Consort
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M mit Apotome und MRm Rev. 2D Kamera	Zeiss
Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LSC	Christ, Osterode, Harz
Lichtmikroskop, Axioskop 40 mit Kamera AxioCam MRc	Zeiss
Luminescence Spectrometer LS 50 B	Perkin Elmer, USA
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin S	Peqlab
PerfectBlue Gelsystem Mini S	Peqlab
PerfectBlue Gelsystem Mini L	Peqlab
PerfectBlue 'Semi-Dry' Elektrobloetter, Sedec M	Peqlab
Peristaltikpumpe	Pharmacia
Photometer Ultraspec 1100 pro	Amersham Bioscience
Serienschnittmikrotom, Modell 1130	Jung AG, Heidelberg
Software für Axiovert 200M & Axioskop 40: Axiovision Rel 4.5	Zeiss
Thermocycler, Mastercycler <i>EPGradient</i>	Eppendorf
Transilluminator	PHASE, Lübeck
Ultraschallbad Sonorex Super RK106	Bandelin Sonorex, Berlin

2.10.1 Mikrotiterplatten-Photometer

Fluoroskan II	Labsystems
Tecan Spectrafluor	Tecan, Österreich
Titertek Multiskan MCC/340 MKII	Flow Laboratories

2.10.2 Zentrifugen

Tischzentrifuge Minispin	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Centrikon H-401	Kontron, München
Kühlzentrifuge Rotanta 460R	Hettich
Ultrazentrifuge L7-65	Beckmann
Vakuum-Zentrifuge <i>SpeedVac</i> Savant SPD131DDA	Thermo Electron, USA

2.11 Sonstige Materialien

Blotting-Papier (Whatman 3MM Chr, GB33)	Hartenstein
Elektroporationsküvetten (1 mm)	Peqlab
Kammerobjektträger	Lab-Tek; Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
Kunststoffküvetten	Sarstedt
Membranadsorber-Zentrifugensäulen	
Vivapure S Mini H	Vivascience, Hannover
Mikrokonzentratoren (Centricon)	Amicon, Inc., Beverly, MA, USA
Nitrocellulose-Membran (Protran)	Schleicher und Schuell
Thoma-Kammer	Assistent
PD-10 Säule (Sephadex G-25M)	Pharmacia
PVDF-Membran Immun-Blot™	Roth
UV-Küvetten, mikro	Brand

2.12 Futter für *Ciona intestinalis*

Baby-Star II (50-100 µ)	Inter Ryba GmbH, Zeven
Korall Fluid	JBL GmbH, Neuhofen
Spirulina	HS-Products, NL

3 METHODEN

3.1 Haltung von *Ciona intestinalis*

Lebende *C. intestinalis* wurden von der Biologischen Anstalt Helgoland (Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, AWI) bezogen und bis zu vier Wochen in Aquarien mit zirkulierendem Meerwasser (950-1000 mOsm/kg; 15 °C) gehalten. Die Fütterung der Tiere erfolgte alle 1 bis 2 Tage über mehrere Stunden bei ausgeschalteter Filteranlage mit Fertignahrung für Jungfische und marine Invertebraten (siehe 2.12).

3.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus dem Kiemendarmgewebe und den Hämocyten von *C. intestinalis* erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben unter Verwendung der Protokolle „Isolation of total RNA from animal tissue“ für das Kiemendarmgewebe bzw. „Isolation of cytoplasmic RNA from animal cells“ für Hämocyten.

3.3 cDNA-Synthese durch reverse Transkription

Die reverse Transkription ist der erste Schritt bei der Durchführung einer RT-PCR (3.4.1). In ihr wird mRNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die dann als Matrize für eine PCR dienen kann. Die Synthese des zur RNA komplementären DNA-Stranges durch die Reverse Transkriptase geschieht durch die Elongation eines oligo-dT-Nukleotids, das mit dem Poly-A-Schwanz der mRNA hybridisiert. Die Zugabe des Reduktionsmittels DTT dient der Zerstörung von Wasserstoffbrückenbindungen und damit der Auflösung von Sekundärstrukturen der RNA. Die cDNA-Synthese erfolgte unter Verwendung eines Anker-oligo-dT-Nukleotids (5'-GACTCGAGTCGACATCGAT₁₇-3'), dNTPs und „SuperScriptIII RNase H⁻ Reverse Transcriptase“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Für die cDNA-Synthese wurden 200 ng bis 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

3.4 Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction, PCR*)

Das Prinzip der PCR beruht auf der wiederholten Denaturierung einer DNA-Matrize, spezifische Bindung zweier in entgegengesetzter Richtung zeigender Oligonukleotide an ihre komplementäre Sequenz und deren Elongation durch eine thermostabile Polymerase und dNTPs (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987). In einer Kettenreaktion wird das DNA-

Fragment zwischen den Oligonukleotiden exponentiell vermehrt. Die Reaktion wird in Thermocyclern durchgeführt.

Tabelle 1 Pipettierschema für eine Standard-PCR

	Volumen
Taq DNA-Polymerase Puffer (10 x) (-MgCl ₂) (Fermentas)	2 µl
MgCl ₂ 25 mM (Fermentas)	1,6 µl
dNTP-Mix 10 mM (Fermentas)	2 µl
Oligonukleotid (vorwärts) 10 µM	2 µl
Oligonukleotid (rückwärts) 10 µM	2 µl
Taq DNA-Polymerase (Fermentas)	0,1 µl
DNA-Matrize	*
ddH ₂ O	*

* Das Volumen der eingesetzten DNA-Matrize richtet sich nach der Konzentration der DNA. Das Endvolumen des Reaktionsansatzes wird mit ddH₂O auf 20 µl gebracht.

Für die Amplifikation galten folgende Reaktionsbedingungen: Initiale Denaturierung der Matrizen-DNA für 3 min bei 95 °C, 1 Zyklus. Denaturierung für 40 s bei 95 °C, Hybridisierung der Oligonukleotide für 30 s bei Oligonukleotid-spezifischer Schmelztemperatur, Elongation der Oligonukleotide bei 72 °C, je nach Häufigkeit der DNA-Matrize bis zu 40 Zyklen. Die Dauer der Elongation richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes, wobei 1 min für 1000 Basen als Richtwert galt. Abschließend wurden die Proben für 3 min bei 72 °C inkubiert, um die vollständige Synthese aller DNA-Stränge sicherzustellen.

3.4.1 Semiquantitative reverse Transkriptions (RT)-PCR

Die Methode der RT-PCR bietet die Möglichkeit, Transkripte exprimierter Gene zu amplifizieren. Hierzu wird mRNA isoliert und durch Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA dient als Matrize für die folgende PCR.

Die RT-PCR wurde zur semiquantitativen Expressionsanalyse von Genen unterschiedlicher Proben herangezogen. Zu diesem Zweck wurden zunächst gleiche Mengen mRNA, deren Konzentration zuvor photometrisch bestimmt wurde, in cDNA umgeschrieben. Um sicherzugehen, dass bei der vergleichenden Analyse auch gleiche Mengen cDNA als Matrize eingesetzt wurden, erfolgte zur Equilibrierung zunächst eine PCR mit einem Haushaltsgen (*β-aktin*), das in beiden Proben in gleicher Stärke exprimiert sein sollte. Die eingesetzte

Menge der Matrizen-DNA wurde gegebenenfalls so lange variiert, bis die Bandenstärke des *β-aktins* nach der Gelelektrophorese in den zu vergleichenden Proben identisch war. Mit den so ermittelten Mengen einzusetzender cDNA wurde die PCR mit den für das zu untersuchende Gen spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Unterschiede in der Bandenstärke bei verschiedenen Proben wiesen auf eine differentielle Expression des Gens hin. Dies gilt jedoch nur, solange die Amplifikation des DNA-Fragmentes durch die PCR in ihrer exponentiellen Phase war. Um diesen Bereich zu ermitteln, wurden Parallelreaktionen mit unterschiedlichen Zyklenzahlen durchgeführt.

3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Puffer:

DNA-Ladepuffer (6 ×)	50 % (v/v) Glycerin (87 %), 10 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, 0,025 % (w/v) Xylencyanol, pH 8,0
TAE (50 ×)	2 M Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0 mit 100 % Essigsäure eingestellt

PCR-Produkte wurden in 1,5 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 × TAE Puffer aufgeköcht, nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit 1,5 µl Ethidiumbromid pro 20 ml versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit Kamm gegossen. Als Elektrophorese-Laufpuffer wurde 1 × TAE Puffer verwendet. Nach Zusatz von 6 × DNA-Ladepuffer zu den Proben wurden diese in die Taschen des Agarosegels gegeben und die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach Größe des Gels wurde zunächst eine Spannung von 30 V bzw. 50 V angelegt, die auf 80 V bzw. 100 V erhöht wurde, sobald die Proben aus den Taschen in das Gel eingewandert waren. Die DNA-Banden konnten aufgrund des eingelagerten Ethidiumbromids mit einem Transilluminator unter UV-Licht identifiziert und fotografiert werden. Die Größe der Fragmente wurde anhand eines mitaufgetrennten DNA-Längenstandards identifiziert.

3.6 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Banden aus dem Gel erfolgte unter UV-Licht mit einem Skalpell. Zur Reinigung der DNA wurde das Gelstück auf eine „Spin Column“ (Ambion) gegeben und für 5 min bei 12.000 × g zentrifugiert. Das Eluat enthielt die DNA, während die Agarose zurückgehalten wurde. Für weitere Anwendungen musste die DNA je nach benötigter

Konzentration gegebenenfalls gefällt und in einem kleineren Volumen wiederaufgenommen werden.

3.7 Fällung von DNA

Zur Fällung wurde die eluierte DNA mit 10 % (v/v) Natrium-Acetat (3 M) versetzt und anschließend das 2,5 fache Volumen 100 % EtOH hinzugegeben. Je nach zu erwartender DNA-Menge wurden zur besseren Sichtbarkeit der später sedimentierten DNA 0,5 µl Glykogen (35 mg/ml) hinzugefügt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20 °C. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 16.000 × *g* sedimentiert, zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und im gewünschten Volumen ddH₂O gelöst.

3.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA erfolgte photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm mit einem Ultrospec 1100 pro Photometer (Amersham Bioscience).

3.9 Ligation

Die Ligation von gereinigten PCR-Produkten in den „pDrive Cloning Vector“ erfolgte mit dem „Qiagen PCR Cloning Kit“ nach Herstellerangaben. Nach der Ligation wurde die Ligase durch Erhitzen auf 70 °C für 10 min inaktiviert.

3.10 Herstellung elektrisch kompetenter Zellen

Bakterien des Stammes *E. coli* DH5-α wurden in 500 ml LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 kultiviert und anschließend bei 2.700 × *g* und 4 °C für 7 min zentrifugiert. Die Sedimente wurden in eiskaltem ddH₂O vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Schließlich wurden die Sedimente in 10 ml ddH₂O vereinigt, 5 min zentrifugiert und in einem Sediment-Volumen 10 % Glycerol resuspendiert. Die Bakterien wurden in Aliquots zu je 50 µl fraktioniert und bei -80 °C eingefroren.

3.11 Transformation über Elektroporation

Zur Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien wurden 50 μl elektrisch kompetente *E. coli* DH5- α Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut, mit 0,5 μl des hitzeinaktivierten Ligationsansatzes (3.9) vermischt, in eine Elektroporationsküvette (Peglab) gegeben und im Easyject Prima Elektroporator (Equibio) einem kurzen elektrischen Puls von 1,8 V ausgesetzt. Die Bakterien wurden anschließend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 40 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert wurden. Da der „pDrive Cloning Vector“ eine Ampicillinresistenz trägt, sollten nur solche Bakterien auf den LB-Amp-Agar-Platten wachsen, die ein Plasmid erhalten haben. Für die so genannte Blau-Weiß-Selektion wurden vorher pro LB-Amp-Agar-Platte 40 μl X-Gal (20 mg/ml) und 4 μl IPTG (1 M) ausgestrichen. Durch das IPTG wird die Expression des auf dem Plasmid befindlichen LacZ Gens induziert, das für eine β -Galaktosidase codiert. Durch die Umsetzung des für die Bakterien unphysiologischen Substrates X-Gal durch die β -Galaktosidase kommt es zu einer blauen Farbreaktion. Wird der für die β -Galaktosidase codierende Bereich durch Insertion von Fremd-DNA unterbrochen, kann keine Farbreaktion erfolgen. Kolonien von Bakterien, die ein Plasmid mit Fremd-DNA tragen erscheinen daher weiß, andere blau.

3.12 Kolonie-PCR

Um herauszufinden, ob die Bakterien einer Kolonie nach der Transformation das Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment tragen, wurde eine so genannte Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine bei Standardbedingungen ausgeführte PCR unter Verwendung von entweder genspezifischen oder plasmidspezifischen Oligonukleotiden (z. B. die Kombination der Oligonukleotide SP6 mit T7 oder M13 vorwärts mit M13 rückwärts). Als Matrize dient dabei das Plasmid aus Bakterien einer positiven Kolonie, indem der PCR-Ansatz direkt mit einer Pipettenspitze mit den Bakterien von der Agarplatte beimpft wird.

3.13 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Amplifikation der Plasmide wurden 3 ml LB-Amp-Medium mit einer Kolonie transformierter Bakterien beimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem Kit „NucleoSpin Plasmid QuickPure“ von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben.

3.14 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Hierzu wurden gereinigte Plasmide benötigt, die das entsprechende DNA-Fragment enthielten. Das DNA-Fragment wurde jeweils von beiden Seiten sequenziert, indem für den Start der Reaktion entweder ein Plasmid-spezifisches Oligonukleotid vor (SP6) oder hinter (M13 rückwärts) der „Cloning site“ verwendet wurde. Diese wurden bei der Sequenzierung jeweils in Richtung des eingebauten DNA-Fragmentes verlängert.

3.15 *In situ* Hybridisierung

Lösungen:

Denhardt's (50 ×)	1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1 % (w/v) Ficoll, 1 % (w/v) BSA Fraktion V, sterilfiltrieren (Lagerung bei -20 °C)
Hybridisierungslösung (HS)	50 % (v/v) Formamid, 5 × SSC, 100 mg/ml Heparin, 1 × Denhardt's, 0,1 % (v/v) Tween 20, and 0,1 % (w/v) CHAPS (jeweils frisch angesetzt)
Maleinsäurepuffer (MAB)	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5
NTMT	100 mM NaCl, 100 mM Tris, 50 mM MgCl ₂ , 0,1 % (v/v) Tween 20, pH 9,5
PBT	20 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20, pH 7,4
SSC (20 ×)	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0

3.15.1 Herstellung der RNA-Sonden

DNA-Fragmente der zu untersuchenden Gene wurden mittels PCR und genspezifischen *Sense*- und *Antisense*-Oligonukleotiden von einzelsträngiger cDNA amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde nach Agarosegelelektrophorese mit Spin Columns (Ambion) aus dem Gelfragment gereinigt, in einen Klonierungsvektor (pDrive, Qiagen) ligiert und sequenziert. Der Vektor wurde dann als Matrize für die Amplifikation von zwei DNA-Fragmenten mittels PCR verwendet. Hierfür wurde einerseits ein genspezifisches Oligonukleotid mit einem SP6-Oligonukleotid und andererseits ein gegenläufiges genspezifisches Oligonukleotid mit einem M13-rückwärts-Oligonukleotid kombiniert. Jeweils 1 µg des PCR-Produkts wurde als Matrize benutzt, um Digoxigenin-rUTP markierte *Sense*- und *Antisense*-RNA-Sonden mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase (Fermentas) und dem „DIG-RNA-labelling Mix“ (Roche, Diagnostics) nach Herstellerangaben zu synthetisieren.

Nach dem Abbau der DNA-Matrize mit DNase I wurde die Synthese der Sonde überprüft, indem 1 µl des Reaktionsansatzes elektrophoretisch auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt wurde. Zudem wurde mittels Dot-Blot-Analyse der Einbau markierter Nukleotide überprüft. Hierzu wurden jeweils 2 µl der Sonde in unterschiedlichen Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) auf eine Nitrocellulosemembran getropft, getrocknet und durch Backen bei 80 °C für 30 min mit der Membran vernetzt. Nach dreimaligem Waschen für 5 min mit MAB + 0,3 % (v/v) Tween 20 wurde die Membran in einer 1:2.000 Verdünnung von Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten gekoppelt an Alkalische Phosphatase (Roche Diagnostics) in MAB + 0,3 % (v/v) Tween 20 inkubiert. Daraufhin erfolgte erneutes Waschen mit MAB + 0,3 % (v/v) Tween 20 (3 × 5 min) und NTMT (1 × 2 min). Die Farbreaktion wurde mit je 150 mM NBT und BCIP in NTMT durchgeführt und schließlich mit Wasser gestoppt.

3.15.2 Herstellung von Gewebeschnitten

Mägen von *C. intestinalis* wurden mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in 75 % (v/v) steril filtriertem Meerwasser bei 4 °C über Nacht fixiert. Nach der Fixierung wurden die Mägen mehrfach mit H₂O gewaschen und anschließend in aufeinander folgenden Schritten mit 20 %, 50 %, 70 % und 100 % MeOH dehydriert und bei -20 °C in 100 % MeOH gelagert. Die Gewebe wurden dann mit 70 %, 80 %, 90 % und zweimal mit 100 % EtOH für jeweils eine Stunde gewaschen. Darauf folgte zweimaliges Waschen mit Methylbenzoat für jeweils zwei Stunden und zweimaliges Waschen mit Benzol für jeweils 10 min. Nach einmaligem Waschen mit 50 % Benzol/50 % Paraffin bei 30 °C wurden die Mägen dreimal für ein bis drei Stunden bei 56 °C in Paraffin inkubiert und schließlich durch Erstarren in einem eiskalten Wasserbad in Paraffin eingebettet. Mit einem Serienschnittmikrotom (Jung AG, Heidelberg) wurden Schnitte mit einer Dicke von 7 µm hergestellt und vorsichtig auf zuvor mit poly-L-Lysin behandelte, runde Deckgläser gelegt und getrocknet.

3.15.3 *In situ* Hybridisierung an Gewebeschnitten

Für die *in situ* Hybridisierung wurde zunächst das Paraffin aus den Schnitten durch zweimaliges Waschen mit 100 % Xylol für jeweils 10 min entfernt. Die Proben wurden dann jeweils zweimal für 3 min in 100 % EtOH, 75 % EtOH, 50 % EtOH/50 % PBT, 25 % EtOH/75 % PBT und dreimal für jeweils 5 min in PBT gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für 5 min in PBT mit 10 µg/ml Proteinase K inkubiert. Die Behandlung mit Proteinase K wurde durch zweimaliges Waschen für jeweils 5 min mit 4 mg/ml Glycin in PBT gestoppt und das Glycin anschließend durch fünfmaliges Waschen mit PBT entfernt. Die Proben wurden dann zweimal für jeweils 3 min mit 0,1 M Triethanolamin (pH 7,8) behandelt und durch zwei Behandlungen mit 0,25 % Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin für

jeweils 5 min acetyliert. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 5 min folgte eine Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd in PBT für 15 min und anschließendes fünfmaliges Waschen für jeweils 5 min in PBT.

Vor der Hybridisierung wurden die Schnitte für 5 min in 50 % PBT/50 % Hybridisierungslösung (HS) inkubiert und anschließend mit 100 % HS, die 200 µg/ml tRNA aus Hefe enthielt, für eine Stunde vorhybridisiert. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 55 °C mit 100 % HS statt, die 200 µg/ml tRNA aus Hefe und entweder die mit Digoxigenin markierte *Sense*- oder *Antisense*-Sonde in einer Verdünnung von 1:5.000 enthielt.

Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte bei 55 °C nacheinander für jeweils 10 min mit 75 % HS/25 % 2 × SSC, 50 % HS/50 % 2 × SSC, 25 % HS/75 % 2 × SSC und schließlich zweimal für jeweils 20 min mit 2 × SSC/0,1 % CHAPS gewaschen.

Die Schnitte wurden danach zweimal jeweils für 5 min in Maleinsäurepuffer (MAB) bei 20 °C gewaschen, 20 min mit MAB-BSA (MAB mit 1 % BSA) vorgeblockt und 20 min mit 80 % MAB-BSA/20 % hitzeinaktiviertes Schafserum (Sigma-Aldrich) geblockt. Danach erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C mit Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmenten gekoppelt an Alkalische Phosphatase (Roche Diagnostics) 1:2.000 verdünnt in 80 % MAB-BSA/20 % hitzeinaktiviertes Schafserum. Um nicht gebundene Anti-Digoxigenin-Fab-Fragmente zu entfernen, wurden die Schnitte achtmal für jeweils 15 min bei 20 °C gewaschen. Vor der Färbung wurden die Proben zweimal für jeweils 5 min mit NTMT, dem Puffer für die Alkalische Phosphatase, gewaschen. Die Färbung erfolgte bei Dunkelheit und 20 °C für 45 min bis 1,5 h in NTMT mit NBT/BCIP als Substrat für die Alkalische Phosphatase. Die Färbung wurde durch Waschen mit MeOH gestoppt. Die Schnitte wurden über Nacht bei -20 °C in MeOH gelagert und dann in Euparal (Asco Laboratories, Manchester, UK) eingebettet.

3.16 Präparation von Geweben aus *Ciona intestinalis*

Für die Präparation von Geweben wurden ausschließlich adulte und gesunde Tiere verwendet. Zunächst erfolgte die Gewinnung der Hämolymphe verändert nach Menzel *et al.*, (2002). Die Tiere wurden in 70 % EtOH getaucht und mit einem Zellstofftuch abgerieben, um Verschmutzungen und Bewuchs auf dem Mantel zu entfernen. Der Mantel wurde in der basalen Region des Tieres aufgeschnitten, ohne den darunter liegenden Hautmuskelschlauch zu beschädigen. Das Tier konnte dann vorsichtig aus dem Mantel herausgezogen werden. Der Hautmuskelschlauch wurde in Höhe der Eingeweide aufgeschnitten und die austretende Hämolymphe gesammelt. Durch einen weiteren Schnitt in den Herzbeutel wurde die restliche Hämolymphe gewonnen. Um ein Verklumpen der Hämozyten zu vermeiden wurde die Hämolymphe in einem Plastikröhrchen auf Eis

aufgefangen, in das Marines Antikoagulans (MA) vorgelegt worden war. Dabei wurde die Hämolymphe zuvor durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 74 μM (NetwellTM Inserts #3479, Corning) gefiltert, um Gewebebruchstücke zu entfernen. Durch wiederholte Zugabe von MA wurde ein Verhältnis Hämolymphe zu MA von 1:2 aufrechterhalten. Mit dieser Methode konnten je nach Größe der Tiere 0,5 bis 2 ml Hämolymphe pro Individuum geerntet werden. Die Hämozyten wurden durch Zentrifugation des Gemisches für 10 min bei $500 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sedimentiert und der Überstand, ein Gemisch aus nun zellfreier Hämolymphe und MA, abgenommen.

Das Tier wurde anschließend auf Eis weiter zerlegt, so dass schließlich die Gewebefractionen Mantel, Kiemendarm, Verdauungstrakt (Magen und Darm), Gonaden, Hämozyten und zellfreie Hämolymphe für die Gewinnung von Proteinextrakten zur Verfügung standen. Der Mantel konnte weiterhin in eine innere muköse und eine äußere derbe Schicht getrennt werden. Sofern keine sofortige Weiterverarbeitung der Gewebe stattfand, wurden diese bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.17 Saure Extraktion von Proteinen und Peptiden

Zur Extraktion von Proteinen und Peptiden wurden Gewebe unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser homogenisiert, anschließend mit einem etwa fünffachen Überschuss 10 % (v/v) Essigsäure oder eines speziellen sauren Extraktionsmediums aus 1 M HCl, 5 % (v/v) Ameisensäure, 1 % (v/v) TFA und 1 % (w/v) NaCl (Nickel *et al.*, 1999) versetzt und bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht auf einem Magnetrührer gerührt. Hämozyten wurden direkt im Extraktionsmedium aufgelöst. Das Gemisch aus Hämolymphe und MA wurde durch die Zugabe der entsprechenden Komponenten auf eine Endkonzentration von 10 % (v/v) Essigsäure bzw. des speziellen sauren Extraktionsmediums gebracht. Durch Zugabe von Protease-Inhibitoren (Complete EDTA-free, *Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche) wurde eine Spaltung von Proteinen und Peptiden durch bei der Extraktion frei werdende Proteasen verhindert. Danach wurden die Extrakte bei $150.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für eine Stunde ultrazentrifugiert. Anschließend wurden die im Überstand enthaltenen Proteine durch die schrittweise Elution von einer hydrophoben Interaktionsmatrix (Sep-Pak tC18) grob vorfraktioniert (3.19.1).

3.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde das Tricin-Gelsystem nach Schägger und v. Jagow (1987) verwendet, das besonders geeignet ist, um Proteine mit niedrigem Molekulargewicht im Bereich von 1 bis 100 kDa aufzutrennen. Dabei dient in diesem System das Tricin im Kathodenpuffer als Folgeion. Das modifizierte Gelsystem bestand aus einem 4%igen Sammelgel und einem 13%igen Trenngel.

3.18.1 Gießen des Gels

Lösungen:

30 % Acrylamid-Lösung (Verhältnis 32:1)

30 % Acrylamid-Lösung (Verhältnis 49:1)

Ammoniumpersulfat (APS) (40 % (w/v))

400 mg in 1 ml ddH₂O

Gelpuffer (3 ×)

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

Probenpuffer (5 ×)

3,125 ml Tris (1M) (pH 6,8 mit HCl einstellen), 5 ml Glycerin (86 %), 1 g SDS, 1 mg Bromphenolblau, 1 mg Phenolrot, mit ddH₂O auf 10 ml

N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
(TEMED)

Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel:

Trenngel (13%ig)

6,5 ml 30 % Acrylamid-Lösung (49:1), 3 ml Glycerin (86 %), 4,5 ml Gelpuffer (3 ×), 1 ml ddH₂O, 7,5 µl TEMED, 16 µl 40 % (w/v) APS

Sammelgel (4%ig)

1,3 ml 30 % Acrylamid-Lösung (32:1), 2,25 ml Gelpuffer (3 ×), 6,45 ml ddH₂O, 10 µl TEMED, 18 µl 40 % (w/v) APS

Zum Gießen der Gele wurden in der Regel kleine Glasplatten mit einer Fläche von 10 cm × 10 cm verwendet. Zunächst wurde das Trenngel bis zu einer Höhe von 6 cm gegossen, mit Isopropanol überschichtet und für ca. eine Stunde zum Polymerisieren bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Entfernen des Isopropanols wurde das Trenngel anschließend mit dem Sammelgel überschichtet und das noch flüssige Gel mit einem Probenkamm versehen.

Die Polymerisation war erneut nach ca. einer Stunde abgeschlossen. Die Lagerung der Gele erfolgte bei 4 °C.

3.18.2 Elektrophorese

Anodenpuffer	200 mM Tris, pH 8,9 mit HCl eingestellt
Kathodenpuffer	100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,4

Die Proteinproben wurden mit 1/5 Volumen 5 × Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und dann in die Geltaschen gegeben. Als Vergleich wurde pro Gel jeweils ein Protein-Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 30 min bei 20 mA und anschließend bei 40 mA durchgeführt, bis die farbige Lauffront des Probenpuffers den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

3.18.3 Silberfärbung

Lösungen:

Lösung 0	5 % (v/v) Glutardialdehyd, 0,16 M Borsäure, pH 8,2 eingestellt mit NaOH
Lösung 1	40 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) Essigsäure
Lösung 2	30 % (v/v) EtOH, 6,8 % (w/v) Natriumacetat, 0,125 % (v/v) Glutardialdehyd, 0,2 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ (Natriumthiosulfat)
Lösung 3	ddH ₂ O
Lösung 4	0,25 % (w/v) AgNO ₃ (Silbernitrat), 0,015 % (v/v) Formaldehyd
Lösung 5	2,5 % (w/v) Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat), 0,0074 % (v/v) Formaldehyd, pH 11,5
Lösung 6	1,5 % (w/v) EDTA

Um die aufgetrennten Proteine nach der Elektrophorese im Gel darzustellen wurde eine Silbernitratfärbung modifiziert nach Heukeshoven und Dernick (1986) durchgeführt. Zunächst erfolgte zur Quervernetzung der Proteine eine Inkubation in Lösung 0 für 10 min, anschließend zur Fixierung eine Inkubation in Lösung 1 für 10 min und eine Inkubation in Lösung 2 für ebenfalls 10 min. Nach fünfmaligem Waschen für 5 min in ddH₂O, wurde das Gel 20 min in Lösung 4 inkubiert und in Lösung 5 entwickelt, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Mit Lösung 6 wurde die Entwicklung gestoppt.

3.19 Chromatographie

3.19.1 Proteinfraktionierung über eine hydrophobe Interaktionsmatrix

Die grobe Fraktionierung von Extrakten wurde je nach zu erwartender Proteinmenge mit hydrophoben Interaktionsmatrices (Sep-Pak tC18, Waters Corporation) unterschiedlicher Proteinbindungskapazität (Matrix-Mengen: 100 mg, 200 mg, 500 mg) durchgeführt. Die stationäre Phase besteht dabei aus einer Trägermatrix, an die hydrophobe $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{17}$ -Reste gekoppelt sind. Die Säulen wurden zunächst mit 84 % ACN/0,1 % TFA und dann mit 0,1 % TFA equilibriert. Anschließend wurde die Säule mit Proteinextrakt beladen. Nach einem Waschschrift mit 0,1 % TFA erfolgte die schrittweise Elution mit unterschiedlichen ACN-Konzentrationen (z. B. 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 84 % ACN in 0,1 % TFA). Alle Lösungen wurden in einem Volumen auf die Säule gegeben, das mindestens dem fünffachen Volumen des Säulenbettes entsprach. Die gesammelten Fraktionen wurden gefriergetrocknet und die Proteine in 0,01 % TFA gelöst.

3.19.2 Proteinreinigung mit einem FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) System

Mit dem Gerät ÄKTA purifier-900 (Amersham-Bioscience) konnten unterschiedliche Chromatographieverfahren durchgeführt werden. Alle verwendeten Lösungen wurden mit HPLC- H_2O (Roth) angesetzt und im Ultraschallbad entgast um Luftblasen im Leitungssystem des Gerätes zu vermeiden. Die Proben wurden grundsätzlich für 20 min bei $20.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert und nur der Überstand in der Chromatographie eingesetzt, damit eventuelle unlösliche Proteine nicht die Chromatographie-Säulen verstopfen. Mit dem Computerprogramm Unicorn 5.0 wurden das Gerät ÄKTA purifier-900 gesteuert und die Chromatogramme aufgezeichnet. Die Extinktion wurde zum Nachweis von Peptidbindungen bei 214 nm und zum Nachweis aromatischer Aminosäuren bei 280 nm in mAU (*milli Absorbance Units*) registriert. Die einzelnen Fraktionen nach der Chromatographie wurden mit einem Fraktionssammler (Frac-950) im gewünschten Volumen aufgefangen.

3.19.2.1 Gelfiltrationschromatographie

Die Gelfiltration erlaubt das Trennen von Proteinen nach ihrer räumlichen Größe. Die Matrix der Gelfiltrationssäulen besteht aus einem Gerüst stark vernetzter Agarose, an das Dextranketten kovalent gebunden sind. Dieses Material bildet kleine kugelförmige Sphären mit unzähligen Poren verschiedener Größen aus. Die Gelfiltrationssäulen unterscheiden sich in der Sphären- und Porengröße ihrer Matrix und damit in dem Größenspektrum trennbarer

Proteine. Für die Gelfiltration wurden zwei Säulen mit folgenden Größenspektra für die Trennung globulärer Proteine und Peptide verwendet:

HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75 prep grade (Superdex™ 75 pg): 3.000 bis 70.000 Da
Superdex™ Peptide 10/300GL (Superdex™ Peptide): 100 bis 7.000 Da

Für die Chromatographie wurde eine Lösung aus 20 % ACN in 0,1 % TFA bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet.

3.19.2.2 Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Bei der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) erfolgt eine Trennung der Proteine nach ihren hydrophoben Eigenschaften. Die Matrix der RP-HPLC-Säulen besteht aus einer Trägersubstanz, an der Alkyl-Reste gebunden sind, die je nach Säule eine unterschiedliche Länge haben. In wässriger Lösung vorliegende Proteine lagern sich mit ihren hydrophoben Strukturen an diesen hydrophoben Seitenketten der Säule an. Die Elution erfolgt mit einem hydrophoben Lösungsmittel, das in einem steigenden Gradienten über die Säule gegeben wird und die angelagerten Proteine wieder verdrängt.

Die Proben wurden mit 0,1 % TFA (Lösung A) auf die Säule geladen, die Säule mit 0,1 % TFA gewaschen und anschließend die Proteine mit einem linearen Gradienten ansteigender ACN-Konzentration von der Säule eluiert (Lösung B: 84 % ACN, 0,1 % TFA). Der Gradient (% ACN pro min), die Flussrate und das Säulenmodell wurden je nach Probe variiert.

Folgende Säulen wurden für die RP-HPLC verwendet:

PRP-3	(79392, Hamilton)
Polyencap 300 C18	(1202 61 B5, Bischoff)
HAIsil 300 C8	(HS-2530-WO85, Higgins Analytical Incorporated)
VYDAC™ Protein C4	(214TP53, Grace GmbH & Co.)

3.19.2.3 Kationenaustausch-Chromatographie

Diese Art der Chromatographie ermöglicht eine Trennung von Proteinen und Peptiden nach ihren hydrophilen Eigenschaften. An der Matrix einer Kationenaustauscher-Säule befinden sich negativ geladene Gruppen, an denen sich polare oder positiv geladene Substanzen anlagern können. Die Elution erfolgt mit einem Gradienten einer hochmolaren Salzlösung. Die Kationen des Salzes verdrängen dabei die angelagerten Substanzen wieder von der Matrix der Säule. Für die Kationenaustausch-Chromatographie am FPLC-System wurde eine

Resource S 1ml Säule von Pharmacia verwendet. Proteinproben wurden mit Lösung A (20 mM MES-Puffer) auf die Säule geladen und mit einem Gradienten von Lösung B (20 mM MES-Puffer mit 0,5 M NaCl) wieder eluiert. Der pH-Wert des Puffers wurde von 5,0 bis 7,0 variiert. Die Nettoladung der Proteine ist von deren jeweiligen isoelektrischen Punkt (pI) und dem pH-Wert des umgebenden Mediums abhängig. Mit der Erhöhung des pH-Wertes wird somit die Anlagerung kationischer Proteine an die Säulenmatrix bevorzugt, da neutrale und anionische Proteine vermindert binden.

Für einige Anwendungen wurde die Kationenaustausch-Chromatographie mit Membranadsorber-Zentrifugensäulen (Vivapure S Mini H) von Vivascience durchgeführt. Dabei wurde ein 10 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer (pH 8,0) für das Beladen der Säule verwendet und mit demselben Puffer, der zusätzlich 0,5 M, 1 M oder 2 M NaCl enthielt, stufenweise eluiert.

3.19.3 Immunoaffinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wurden zunächst Säulen hergestellt, an deren Matrix spezifische Antikörper kovalent gebunden sind. Eine derartige Säule sollte dazu dienen, das Protein aus Extrakten zu reinigen, das von den an die Säule gekoppelten Antikörpern erkannt wird. Hierzu mussten die IgG vorher aus dem Antiserum gereinigt werden.

3.19.3.1 Reinigung von Antikörpern

Lösungen:

Bindungspuffer	20 mM Na-Phosphat, pH 7,0
Elutionspuffer	100 mM Zitronensäure, pH 3,5
Tris-Puffer	1 M Tris, pH 9,0
Kopplungspuffer	0,2 M NaHCO ₃ , 0,5 M NaCl, pH 8,3

Für die Anreicherung von IgG-Molekülen aus Kaninchenserum wurde eine 1 ml HiTrap Protein A-Säule (Amersham Bioscience) verwendet, die an eine Peristaltikpumpe (Pharmacia) angeschlossen war. Bei der Reinigung wurde genau nach Herstellerangaben vorgegangen. Es wurden zunächst 6 ml Kaninchenserum (Gemisch aus je 3 ml Serum von der Immunisierung zweier Kaninchen mit dem gleichen Antigen) für 30 min bei 20.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Das Serum ohne das Sediment und den auf der Oberfläche befindlichen Fettfilm wurde abgenommen, mit dem dreifachen Volumen 20 mM Na-Phosphat (pH 7,0) verdünnt und insgesamt dreimal hintereinander mit einer Flussrate von 1 ml/min über die Protein A-Säule gegeben. Das verdünnte Serum stand dabei auf Eis. Nach der Elution mit 0,1 M Zitronensäure (pH 3,5) wurden Fraktionen von 1 ml in Eppendorfgefäßen

mit 200 µl vorgelegtem 1 M Tris (pH 9,0) aufgefangen und deren Absorption bei 280 nm gemessen. Die Fraktionen, in denen sich Proteine (IgG) befanden, wurden mit einer PD-10-Säule in 20 mM Na-Phosphat (pH 7,0) umgepuffert. Es wurde wiederum die Absorption der eluierten Fraktionen bei 280 nm gemessen, alle proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und erneut dreimal über die Protein A-Säule gegeben. Nach erneuter Elution wurden die IgG mit einer PD-10-Säule in Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) umgepuffert. Die Reinheit der IgG wurde per SDS-PAGE überprüft.

3.19.3.2 Kopplung von gereinigten Antikörpern an eine HiTrap™ NHS-aktivierte HP Säule

Lösungen:

1 mM HCl (bei 4 °C gelagert)

Puffer A 0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3

Puffer B 0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0

Kopplungspuffer 0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3

PBS 0,1 M Na-Phosphat, 0,15 M NaCl, pH 7,0

Die gereinigten und bereits in Kopplungspuffer gelösten Antikörper (3.19.3.1) wurden an eine 1 ml HiTrap™ NHS-aktivierte HP-Säule (Amersham Bioscience) gekoppelt, die hierzu an eine Peristaltikpumpe (Pharmacia) angeschlossen wurde. Nach dem Waschen der Säule mit eiskaltem 1 mM HCl wurden die Antikörper in Kopplungspuffer dreimal nacheinander und dann für drei Stunden zirkulierend über die Säule gegeben, die Antikörperlösung stand währenddessen auf Eis. Das Kopplungsverfahren wurde nach Angaben des Herstellers durch abwechselndes Waschen mit den Puffern A und B durchgeführt. Anschließend wurde die Kopplungseffizienz nach Protokoll des Herstellers bestimmt. Hierzu wurde die Absorption der Antikörperlösung bei 280 nm vor und nach dem Kopplungsverfahren bestimmt. Da die N-hydroxysuccinimidgruppen, die bei der Kopplungsreaktion frei werden, starke Absorption bei 280 nm zeigen, wurden 0,5 ml der Antikörperlösung nach dem Kopplungsverfahren für die Absorptionsmessung mit einer PD-10-Säule in PBS umgepuffert. Die Kopplungseffizienz lag jeweils bei 80 % bis 85 %. Die Lagerung der Säule erfolgte in 50 mM Na-Phosphat (pH 7,4) versetzt mit 50 µg/ml Gentamycin oder 0,1 % (w/v) NaN₃ bei 4 °C.

3.19.3.3 Immunoaffinitätschromatographie mit sauren Proteinextrakten

Lösungen:

TBS 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2

Elutionspuffer 0,5 M Glycin, 0,5 M NaCl, pH 3,0

Die mit spezifischen Antikörpern gekoppelten HiTrap-Säulen (3.19.3.2) sollten für die Reinigung des jeweiligen Peptid-Antigens aus Proteinextrakten genutzt werden. Die Säule wurde zunächst nach Herstellerangaben mit TBS und Elutionspuffer equilibriert. Nach Gefriertrocknung und Rücklösen konzentrierte saure Proteinextrakte wurden etwa zehnfach mit TBS verdünnt und für 30 min bei $20.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde zirkulierend über Nacht bei $10 \text{ }^\circ\text{C}$ auf die HiTrap-Säule gegeben. Nach intensivem Waschen der HiTrap-Säule mit 10 bis 20 ml TBS wurde mit 10 ml Elutionspuffer in Fraktionen von 1 ml eluiert. Die Fraktionen wurden dann direkt oder nach einer RP-HPLC mittels Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein des Zielpeptids untersucht.

3.20 Gefriertrocknung

Zur Gefriertrocknung wurden Proteine in Lösung zunächst für eine Stunde bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren und anschließend in der Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LSC von Christ (Osterode, Harz) in einem Vakuum von 0,1 bis 0,2 mbar lyophilisiert. Dadurch wurden H_2O und flüchtige Lösungsmittel wie ACN und TFA entfernt.

3.21 Western-Blot-Analyse direkt nach SDS-PAGE

3.21.1 Elektrotransfer von Proteinen auf eine Membran

Zum Transfer von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran wurde die *Semi-Dry-Blot*-Technik, verändert nach Towbin *et al.* (1979), angewandt. Als Transferpuffer diente entweder 80 % SDS-Elektrophoresepuffer (Kathodenpuffer)/20 % MeOH oder 80 % CAPS/20 % MeOH. Proteine wurden in der Regel auf eine mit Transferpuffer getränkte PVDF-Membran transferiert, alternativ wurde für einige Anwendungen auch eine Nitrocellulose-Membran benutzt. Bei unbekanntem Migrationsverhalten der Proteine während des Transfers wurde sowohl an der zur Anode als auch der zur Kathode der Transfer-Apparatur zeigenden Seite des Gels eine Membran aufgelegt. Zudem befanden sich auf beiden Seiten je drei Lagen auf die Größe des Polyacrylamidgels zurechtgeschnittenes Blotting-Papier (Whatman 3MM Chr, GB33). Zum Blotten wurde eine *Semi-Dry-Blot*-Apparatur mit $20 \times 20 \text{ cm}$ Elektrodenfläche (Peqlab) verwandt. Der Transfer wurde bei 1 mA/cm^2 für Nitrocellulose-Membranen und 2 mA/cm^2 für PVDF-Membranen für 45 min durchgeführt.

3.21.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf einer Membran

Lösungen:

TTBS	20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20
Blockierlösung	TTBS, 3 % (w/v) BSA
AP-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Färbelösung	150 mM NBT, 150 mM BCIP, in AP-Puffer

Die Membran wurde nach dem Elektrotransfer der Proteine für eine Stunde in Blockierlösung geschüttelt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit einem primären Antiserum (anti-Ci-MAM-A24 oder anti-Ci-PAP-A22) in einer Verdünnung von 1:1.000 oder 1:1.500 in Blockierlösung unter permanentem Drehen bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen in TTBS für 10 min wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen-IgG (Ziege) AP-Konjugat, Sigma) in einer Verdünnung von 1:15.000 in Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran in TTBS (dreimal für 10 min) und AP-Puffer (einmal für 10 min) erfolgte die Zugabe der Färbelösung. Die Reaktion wurde bei Erreichen der gewünschten Farbtintensität mit ddH₂O gestoppt und die Membran zwischen Blotting-Papier getrocknet.

3.22 Immunozytochemie

Lösungen:

Blockierlösung	PBS, 3 % (w/v) BSA, 0,05 % (v/v) Tween 20
Marines Antikoagulans (MA)	0,45 M NaCl, 0,1 M Glukose, 15 mM Natriumcitrat, 13 mM Zitronensäure, 10 mM EDTA, pH 7,0
Marine Salzlösung (MS)	12 mM CaCl ₂ , 11 mM KCl, 26 mM MgCl ₂ , 45 mM Tris, 0,45 M NaCl, pH 7,4 eingestellt mit HCl
Mowiol	6 g Glycerin und 2,4 g Mowiol 4-88 für 1 h bei RT lösen, 6 ml ddH ₂ O zugeben und 1 h bei RT rühren, 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 zugeben und 2 h bei 50 °C inkubieren und rühren, Zentrifugation für 15 min bei 5.000 × g, Überstand bei -20 °C lagern
PBS	20 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4
PBT	PBS, 0,05 % (v/v) Tween 20

Für den immunozytochemischen Nachweis natürlicher Peptide wurden die Hämozyten von ein bis drei Exemplaren *C. intestinalis* geerntet. Die Zellen wurden einmal mit Marinem Antikoagulans (MA) gewaschen und in demselben Puffer aufgenommen. Zur Herstellung einschichtiger Zelllagen wurden die Hämozyten in vorher mit poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, P8920) beschichtete Kammerobjektträger (Lab-Tek; Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) gegeben und diese für 5 min bei $350 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das MA wurde durch Marine Salzlösung (MS) ersetzt und die Kammerobjektträger für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die angehefteten Zellen wurden einmal mit sterilfiltriertem Meerwasser gewaschen und anschließend mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in 75 % (v/v) sterilfiltriertem Meerwasser für 10 min bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Das Paraformaldehyd wurde durch mehrfaches Waschen mit PBS wieder entfernt. Wenn später für die Detektion des ersten Antikörpers ein zweiter Antikörper benutzt werden sollte, der an Meerrettich-Peroxidase (HRP; *Horseradish Peroxidase*) gekoppelt ist, musste die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation mit 3 % (v/v) H_2O_2 für 5 min bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ geblockt werden. Die so behandelten Zellen wurden erneut mehrfach mit PBS gewaschen. Um das unspezifische Binden von Antikörpern zu verhindern wurden die Zellen für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen über Nacht mit einer 1:300 Verdünnung des ersten Antikörpers in Blockierlösung bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Schwenktisch inkubiert. Nach mehrfachem Waschen mit PBT wurden die Zellen für eine Stunde bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Dabei handelte es sich um Anti-Kaninchen-IgG (Ziege) entweder gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (DAKO, Denmark) oder mit Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA), die in einer Verdünnung von 1:200 bzw. 1:2.000 in Blockierlösung eingesetzt wurden. Bei Verwendung des an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörpers, wurde die Immunreaktivität durch Entwicklung mit 0,05 % (w/v) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Sigma-Aldrich), 0,03 % (v/v) H_2O_2 in PBS für 2-5 min sichtbar gemacht und die Reaktion schließlich durch intensives Waschen mit H_2O gestoppt. Die Kammerobjektträger, die mit dem zweiten Antikörper gekoppelt an Cy3 behandelt wurden, konnten direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Die Präparate wurden anschließend in Mowiol eingebettet.

3.23 Peptide

Die Peptide Ci-PAP-A22 (ALRSVRTVARVGRAVLPHVAI-NH₂) und Ci-MAM-A24 (WRSLGRTLLRLSHALKPLARRSGW-NH₂) wurden jeweils mit einem amidierten C-Terminus und in einem Reinheitsgrad von >95 % von der Firma Biosynthan (Berlin) synthetisiert. Die Reinheit und molekulare Identität der synthetischen Peptide wurden von Biosynthan mittels

Massenspektrometrie verifiziert. Die Peptide wurden in 10 mM HCl zu Stock-Lösungen mit einer Konzentration von 1 mM gelöst und bei -20 °C gelagert.

Außerdem wurden folgende HPLC-gereinigte Peptide von der Firma Sigma-Aldrich bezogen:

Cecropin P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGIAIAIQGGPR,	(C7927, ≥95 % HPLC)
Magainin 1	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS,	(M7152, ≥97 % HPLC)
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂ ,	(M1407, ≥90 % HPLC)
Alamethicin	Acetyl-BPBABAQVBGLBPVBBQQO,	(A4665, ≥90 % HPLC)
	(B: α-Aminobuttersäure, O: Phenylalaninol)	

Von den Peptiden Cecropin P1, Magainin 1 und Melittin wurden Stocklösungen mit einer Konzentration von 100 µM in 0,01 % Trifluoressigsäure (TFA) hergestellt. Alamethicin wurde zu einer Stocklösung mit einer Konzentration von 50 µM in 100 % EtOH gelöst.

3.24 Immunisierung von Kaninchen

Von den beiden Peptiden Ci-PAP-A22 und Ci-MAM-A24 wurden zusätzlich Varianten mit einem N-terminalen Cysteinrest synthetisiert. Diese Peptide wurden über den Cysteinrest an Maleimid-aktiviertes Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke (*Megathura crenulata*) (Maleimide Activated mcKLH; Pierce, Rockford, IL, USA) nach Angaben des Herstellers gekoppelt. Das Konjugat wurde dann als Antigen für die Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen verwendet, um polyklonale Antikörper zu erhalten. Die Immunisierung der Kaninchen wurde von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. Präimmun- und Immuserum wurden auf Trockeneis versandt und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.25 Identifizierung von Proteinen

3.25.1 Sequenzierung nach Edman

Der Edman-Abbau ist eine Methode zur Sequenzierung der Aminosäurefolge in einer Peptidkette durch wiederholte Endgruppen-Bestimmung. Der Edman-Abbau beruht auf der Reaktion der Aminogruppe des N-terminalen Aminosäurerestes einer Peptidkette mit Phenylisothiocyanat. Der endständige Aminosäurerest wird so von der Kette abgespalten und kann in weiteren Reaktionsschritten identifiziert werden. Die Peptidkette wird dabei schrittweise abgebaut (Edman, 1949). Die Sequenzierungen nach Edman wurden von Dr. Friedrich Buck am Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitäts-Klinikums Eppendorf (UKE) in Hamburg durchgeführt.

3.25.2 Massenspektrometrie

Für die Identifizierung gereinigter Proteine und Peptide wurden zwei unterschiedliche Methoden der Massenspektrometrie (MS) angewendet:

1. MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*) MS
2. Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS):
MALDI-TOF-TOF
und ESI-(Electrospray-Ionization) Quadrupole/Orthogonal TOF MS

Die Untersuchung von Proben per MALDI-TOF MS wurde für die Massenbestimmung von Peptiden und Proteinen und die Erstellung von Peptidmassen-Fingerabdrücken (*Peptide Mass Fingerprints*, PMF) nach der tryptischen Spaltung von Proteinen verwendet. Die Tandem-Massenspektrometrie wurde dagegen für die „de novo“ Sequenzierung von Peptiden benutzt.

Die Massenspektrometrischen Analysen wurden zunächst von Dr. Joachim Bartels an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein mit einem QTOF-II Hybrid-Massenspektrometer (Micromass) und im späteren Verlauf dieser Arbeit im eigenen Labor von Dr. Christoph Gelhaus an einer *4700 Proteomics Analyzer Workstation* (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) durchgeführt.

Die Identifizierung der Proteine und Peptide erfolgte durch die Suche in Protein- und Nukleotidsequenz-Datenbanken über die Suchmaschinen MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) und MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/mshome.htm>). Dabei ist mit beiden Programmen auch ein Zugriff auf EST-Datenbanken möglich, die unter den Rubriken *other chordates* bzw. *others* Nukleotidsequenzdaten von *Ciona intestinalis* enthalten.

3.26 Aktivitätstests

3.26.1 Mikroorganismen

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet: *Bacillus megaterium* (ATCC 14581), *B. subtilis* (ATCC 6051), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *S. epidermidis* (ATCC 14990), *Planococcus citreus* (ATCC 14404), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Vibrio alginolyticus* (ATCC 17749), *Listonella anguillarum* (DSM No. 11323), *Yersinia enterocolitica* (96-C ohne Plasmid, Serotyp 0:9), *Serratia marcescens* (letztere beide stammen vom Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg), *Klebsiella pneumoniae* (erhalten von der Abteilung Zellbiologie der Universität Kassel), *Escherichia coli*

K-12 Stamm D31, ein gegen Ampicillin and Streptomycin resistenter Stamm, dessen Lipopolysaccharidmolekülen teilweise Glukose, Galaktose und Rhamnose fehlen (Monner *et al.*, 1971; Boman *et al.*, 1974) und *E. coli* ML-35p (Lehrer *et al.*, 1988). Übernachtkulturen der Bakterien wurden in der Regel in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) unter konstantem Schütteln bei 37 °C kultiviert und anschließend für die Beimpfung desselben Mediums verwendet, um Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase zu erhalten. Für *B. subtilis* enthielt das LB-Medium 1 % (w/v) Glukose. Die Meeresbakterien *P. citreus*, *V. alginolyticus* and *L. anguillarum* wurden bei 28 °C in LB-Medium kultiviert, das statt der 1 % (w/v) NaCl der Standardrezeptur 1,5 % (w/v) NaCl enthielt.

Außerdem wurden zwei unterschiedliche Stämme des Pilzes *Candida albicans* (ATCC 10261 and SC 5314) verwendet (erhalten von Bernhard Hube, Hans-Knöll-Institut, Jena).

3.26.2 Tests auf antibakterielle Aktivität

3.26.2.1 Mikrosuszeptibilitätstest

Die minimale inhibitorische Konzentration (*Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) von Peptiden und Extrakten gegen das Wachstum von Bakterien wurde mittels eines Mikrosuszeptibilitätstests in einer Rundboden-Mikrotiterplatte (Mikrotestplatte 96-well R, Sarstedt) bestimmt. Um eine Anheftung der antibakteriellen Peptide an die Plastikoberfläche der Titerplatten zu verhindern, wurden diese vor Gebrauch mit Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumine*, BSA) beschichtet. Dazu wurde jede Vertiefung mit 200 µl einer steril filtrierten, 0,1 % BSA-Lösung befüllt und für 15 min inkubiert. In jede der Vertiefungen wurden 90 µl eines 10 mM Na-Phosphat-Puffers mit einem pH-Wert von entweder pH 5,2 oder pH 7,4 vorgelegt. Für Experimente zur Salzabhängigkeit der antibakteriellen Aktivität wurde 10 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,4, mit Endkonzentrationen von 50, 100, 150, 300 oder 450 mM NaCl verwendet. Jeweils 90 µl der zu testenden und verdünnten Peptidlösung wurden in eine Vertiefung der ersten Spalte gegeben und in 1:2 Schritten durch die Reihe verdünnt. Als Positivkontrollen wurden die antimikrobiellen Peptide Cecropin P1, Magainin 1 und Melittin verwendet, als Sterilkontrolle wurden in einer Reihe je 10 µl steriles LB-Medium zu 90 µl vorgelegtem Puffer gegeben und als Wachstumskontrolle wurde das Lösungsmittel des Peptids, 0,01 % (v/v) TFA oder 1 mM HCl, entsprechend dem Volumen der eingesetzten Peptidlösung durch eine Reihe verdünnt.

Bakterienkulturen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden ($OD_{600} = 0,1$ bis 0,2), wurden mit LB-Medium auf 10.000 CFU/ml (CFU, *Colony Forming Units*) verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden in jede Vertiefung mit Ausnahme der Reihe für die Sterilkontrolle 10 µl, also 100 CFU, gegeben. Die Titerplatten wurden anschließend bei 37 °C für 24 bis 48 h inkubiert, bis die gewachsenen Bakterien als Sedimente auf dem Boden der

Vertiefungen deutlich sichtbar waren. Die minimale inhibitorische Konzentration wurde als die Konzentration der höchsten Peptidverdünnung definiert, bei der kein Bakterienwachstum zu beobachten war. Zur Bestimmung der minimalen letalen Konzentration (*Minimal Lethal Concentration*, MLC) wurden aus den Vertiefungen mit der höchsten und der zweithöchsten Peptidverdünnung ohne Bakterienwachstum jeweils zwei Aliquots à 40 µl, sowie aus der niedrigsten Peptidverdünnung mit Bakterienwachstum ein Aliquot à 10 µl (Wachstumskontrolle) entnommen, mit 60 µl bzw. 90 µl entsprechenden Na-Phosphat-Puffers vermischt, auf LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die minimale letale Konzentration wurde als die höchste Peptidverdünnung definiert, bei der keine Koloniebildung zu beobachten war.

Die Mikrosuszeptibilitätstests mit Meeresbakterien wurden mit 10 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,4 und 1,5 % (w/v) NaCl (= 257 mM) bei 28 °C durchgeführt. Zur Bestimmung des MLC-Wertes wurden für Meeresbakterien Agar-Platten bestehend aus 0,5 % (w/v) Pepton, 0,3 % (w/v) Fleischextrakt, 3 % (w/v) NaCl und 1,5 % (w/v) Agar verwendet und diese ebenfalls bei 28 °C inkubiert.

Die Beziehung zwischen der optischen Dichte einer Bakterienflüssigkultur bei 600 nm und der Anzahl der in der Kultur enthaltenen CFU wurde vor der Durchführung der Mikrosuszeptibilitätstests einmal für alle verwendeten Bakterienstämme bestimmt. Hierzu wurden von der jeweiligen Bakterienkultur in der logarithmischen Wachstumsphase unterschiedliche Verdünnungsstufen hergestellt, jeweils ein definiertes Volumen auf Agar-Platten ausplattiert und diese über Nacht inkubiert. Durch Auszählen der gewachsenen Kolonien konnte unter Einberechnung der jeweiligen Verdünnung und des OD₆₀₀-Wertes der ursprünglich verwendeten Bakterienflüssigkultur die für den Bakterienstamm spezifische Relation zwischen der optischen Dichte bei 600 nm und der Anzahl der CFU/ml in der Flüssigkultur berechnet werden. Bei den in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwerte von Dreifachbestimmungen pro Verdünnungsstufe aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 2 Korrelation zwischen OD₆₀₀ und CFU/ml für unterschiedliche Bakterienspezies

Spezies	OD ₆₀₀ = 0,1
<i>Bacillus megaterium</i>	2,8 × 10 ⁶ CFU/ml
<i>Bacillus subtilis</i>	2,2 × 10 ⁶ CFU/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,1 × 10 ⁷ CFU/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,8 × 10 ⁷ CFU/ml
<i>Planococcus citreus</i>	4,0 × 10 ⁶ CFU/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,3 × 10 ⁷ CFU/ml
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1,3 × 10 ⁷ CFU/ml
<i>Listonella anguillarum</i>	2,6 × 10 ⁷ CFU/ml
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2,8 × 10 ⁷ CFU/ml
<i>Serratia marcescens</i>	5,0 × 10 ⁷ CFU/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,3 × 10 ⁷ CFU/ml
<i>Escherichia coli</i>	2,5 × 10 ⁷ CFU/ml

3.26.2.2 Membranpermeabilisierungstest mit SYTOX Green

Die membranpermeabilisierende Aktivität von Peptiden wurde über den Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green (Invitrogen, Molecular Probes) nachgewiesen. Nach Schädigung der bakteriellen Membran gelangt der Farbstoff in die Zelle und interkaliert mit der DNA. Die Anregung des an die DNA gebundenen Farbstoffs mit einer Wellenlänge von 495 nm führt zu einer Verstärkung der emittierten Fluoreszenz bei 538 nm, was mit einem Mikrotiterplatten-Fluorometer (Fluoroskan II, Labsystems) gemessen wurde. *B. megaterium* in der logarithmischen Wachstumsphase wurden zweimal mit HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 25 mM NaCl, pH 7,4) gewaschen und resuspendiert. Eine Flachboden-Titerplatte (Mikrotestplatte 96-well F, Sarstedt) wurde vor Gebrauch mit einer 0,1 % (w/v) BSA-Lösung (A2153, Sigma-Aldrich) befüllt und für 15 min inkubiert. Anschließend wurden in jede Vertiefung 25 µl des HEPES-Puffers vorgelegt. In die Vertiefungen der ersten Spalte wurden 25 µl der verdünnten Peptide gegeben und in 1:2 Schritten durch die Reihen verdünnt (F_{Probe}). Als Postivkontrolle dienten die Peptide Cecropin P1 und Magainin 1. Parallel wurde das Lösungsmittel der Peptide, 0,01 % (w/v) TFA oder 1 mM HCl, entsprechend dem Volumen der eingesetzten Peptidlösung getestet, was der Pufferkontrolle entsprach (F_{Puffer}).

Daraufhin erfolgte die Zugabe von jeweils 25 µl SYTOX Green (4 µM in HEPES-Puffer) und 50 µl der mit HEPES-Puffer auf eine Konzentration von 2×10^6 CFU/ml verdünnten Bakterien, also 10^5 CFU pro Vertiefung. Dieser Moment entsprach dem Zeitpunkt t_0 . Ein Teil der gewaschenen Bakterien wurde mit 1 ml 70 % EtOH versetzt, 5 min bei RT inkubiert, zentrifugiert und entsprechend einer Konzentration von 2×10^6 CFU/ml in HEPES-Puffer resuspendiert. Zur Bestimmung des maximalen Totwertes (F_{Maximum}) wurden in die Vertiefungen einer Reihe jeweils 25 µl HEPES-Puffer, 25 µl SYTOX Green (4 µM in HEPES-Puffer) und 50 µl (10^5 CFU) der getöteten Bakterien gegeben. Die Messungen erfolgten alle 10 min über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde. Der Prozentsatz der durch die membranpermeabilisierende Aktivität der Peptide getöteten Bakterien wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Prozent getötete Bakterien} = (F_{\text{Probe}} - F_{\text{Puffer}}) / (F_{\text{Maximum}} - F_{\text{Puffer}}) \times 100$$

Zur Untersuchung der Salzresistenz der antibakteriellen Aktivität der Peptide wurde der Versuch zusätzlich mit einem HEPES-Puffer durchgeführt, der statt der üblichen 25 mM NaCl mit 150 mM NaCl versetzt war.

3.26.2.3 Membranpermeabilisierungstest mit *E. coli* ML-35p

Die Kinetik der Permeabilisierung der äußeren und der zytoplasmatischen Membran von gramnegativen Bakterien wurde mit einer modifizierten spektrophotometrischen Methode nach Lehrer *et al.* (1988) untersucht. Diese Methode beruht auf der Verwendung des *E. coli*-Stammes ML-35p und den Substraten Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein (CCF2)-FA (*free-acid form*, Invitrogen) und 6,8-Difluoro-4-Methylumbelliferyl-β-D-Galaktopyranosid (DiFMUG) (Molecular Probes) (Zhao *et al.*, 2001). Von beiden Substraten wurden Stocklösungen in HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 25 mM NaCl, pH 7,4) angesetzt. Der Permease-defiziente Stamm *E. coli* ML-35p besitzt eine intrazelluläre β-Galaktosidase, die das Substrat DiFMUG hydrolysieren kann. Außerdem synthetisiert er eine auf einem Plasmid codierte periplasmatische β-Laktamase, deren Substrat die Substanz CCF2-FA ist.

E. coli ML-35p wurden über Nacht in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin kultiviert, zweimal mit HEPES-Puffer gewaschen und in dem gleichen Puffer resuspendiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 25 µl mit 1×10^7 CFU zu 75 µl HEPES-Puffer gegeben, der das Substrat (entweder CCF2-FA oder DiFMUG) und das zu testende Peptid enthielt. Die finalen Konzentrationen im Reaktionsansatz von 100 µl waren 5 µM für das Peptid und 10 µM für beide Substrate. Als Negativkontrolle wurde ein entsprechendes Volumen des Lösungsmittels der Peptide getestet. Beide Substratreaktionen wurden parallel in schwarzen Flachboden-Mikrotiterplatten (96-well, Costar, Corning) durchgeführt, die vor Gebrauch für

15 min mit einer 0,1 % (w/v) BSA-Lösung (A2153, Sigma-Aldrich) inkubiert wurden. Die zeitabhängige Zunahme der Fluoreszenz wurde alle zwei Minuten mit einem Mikrotiterplatten-Fluorometer (Spectrafluor, Tecan) gemessen. Dabei wurde die Platte jede Minute für 10 Sekunden geschüttelt. Für beide Reaktionen wurde eine Anregungswellenlänge von 390 nm und eine Emissionswellenlänge von 465 nm verwendet.

3.26.3 Test auf antimykotische Aktivität

Der Test zur Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) von Peptiden gegen Pilze entspricht im Wesentlichen dem für die antibakterielle Aktivität beschriebenen Mikrosuszeptibilitätstest in Rundboden-Mikrotiterplatten mit den nachfolgend aufgeführten Modifikationen. Sabouraud-Dextrose-Agar-Platten wurden direkt mit *C. albicans* aus tief gefrorenen Stocks (-80 °C) beimpft und bei 28 °C für 48 h kultiviert. Ein bis drei Kolonien von *C. albicans* wurden in 3 ml Sabouraud-Bouillon gelöst, die Konzentration der Zellen mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt und anschließend durch weitere Zugabe von Sabouraud-Bouillon auf 4×10^3 CFU/ml eingestellt. Anschließend wurde die Suspension mit 10 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 5,2 oder 7,4) fünffach verdünnt. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 50 µl des Na-Phosphat-Puffers (pH 5,2 oder 7,4) vorgelegt. Jeweils 50 µl der zu testenden und verdünnten Peptidlösungen wurden in die Vertiefungen der ersten Spalte gegeben und in 1:2 Schritten durch die Reihen verdünnt. Schließlich wurden zu den 50 µl der Peptidverdünnung in jede Vertiefung 50 µl (40 CFU) der *Candida*-Suspension gegeben und die Mikrotiterplatte für 48 h bei 28 °C inkubiert. Die minimale letale Konzentration (MLC) wurde durch Ausplattieren von Aliquots der Inkubationsansätze auf Sabouraud-Dextrose-Agar-Platten bestimmt. Die Definition der MIC- und MLC-Werte erfolgte wie beim antibakteriellen Mikrosuszeptibilitätstest.

3.26.4 Test auf hämolytische Aktivität

Der Test auf hämolytische Aktivität wurde in Mikrotiterplatten mit konischen Böden (Mikrotestplatte 96-well K, Sarstedt) durchgeführt, die vorher mit einer 0,1 % (w/v) BSA-Lösung befüllt und für 15 min inkubiert wurde. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden 80 µl eines Natrium-Phosphat-Puffers mit Salz (PBS; 50 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7,4) vorgelegt. Jeweils 80 µl der zu testenden und verdünnten Peptidlösung wurden in eine Vertiefung der ersten Spalte gegeben und in 1:2 Schritten durch die Reihen verdünnt. Als Positivkontrolle wurde das antimikrobielle und zytolytische Peptid Melittin, das aus dem Gift der Biene (*A. mellifera*) stammt, verwendet. Humane Erythrozyten und Schaferythrozyten wurden mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend im gleichen Puffer zu einer Konzentration von 12,5 % (v/v) resuspendiert. 20 µl der

Erythrozytensuspension wurden in die Vertiefungen zu den verdünnten Peptiden gegeben, so dass der Hämatokrit final 2,5 % (v/v) betrug (experimentelle Lyse). Als Kontrollen wurden in einer Reihe 20 µl der Erythrozytensuspension mit 80 µl destilliertem Wasser (maximale Lyse) und in einer anderen Reihe mit 80 µl PBS, durch die zuvor die entsprechende Menge des Lösungsmittels des Peptids in 1:2 Schritten verdünnt wurde, vermischt (spontane Lyse). Die Platte wurde schließlich für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Erythrozyten wurden dann bei 500 × g für 10 min abzentrifugiert. 20 µl des Überstandes wurden in eine Flachboden-Mikrotiterplatte (Mikrotestplatte 96-well F, Sarstedt) überführt und 10-fach mit PBS verdünnt. Die Extinktion (E) der verdünnten Überstände wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (Titertek Multiskan MCC/340 MKII; Flow Laboratories) gemessen. Der Prozentsatz lysierter Erythrozyten wurde wie folgt berechnet:

$$100 \times (E_{(\text{experimentelle Lyse})} - E_{(\text{spontane Lyse})}) / (E_{(\text{maximale Lyse})} - E_{(\text{spontane Lyse})}).$$

3.26.5 Test auf porenbildende Aktivität

3.26.5.1 Liposomenpräparation

Für die Herstellung der Liposomen wurden 60 mg eines Phospholipidgemisches aus Sojabohnen (grob gereinigtes L- α -Phosphatidylcholin, Typ II S, Sigma) in 1,5 ml Chloroform gelöst und in einen Rundkolben überführt. Durch vorsichtiges Drehen des Kolbens wurde die Lösung eingetrocknet, so dass an dessen Wand ein dünner Lipidfilm entstand. Reste des Chloroforms wurden mit einem Exsikkator unter Vakuum entfernt. Der Lipidfilm wurde in 1,5 ml Liposomenpuffer pH 5,2 oder 7,4 (50 mM Tris-maleat, 50 mM K₂SO₄, 0,5 mM EDTA-Na₂, 0,02 % (w/v) Natriumazid, pH eingestellt mit KOH) durch starkes Schütteln gelöst und für 15 min auf Eis mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die Suspension fünfmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C wieder aufgetaut, bevor sie noch dreimal für je fünf Sekunden beschallt wurde (Pick, 1981). Bis zu ihrer Verwendung wurden die Liposomen bei 4 °C gelagert.

3.26.5.2 Aktivitätsmessung

Die durch Poren hervorgerufene Membrandepolarisation von Liposomen wurde mithilfe des potentialsensitiven Fluoreszenzfarbstoffs 3,3'-Diethylthiadicarbocyaniniodid (DTDC = diS-C₂-(5), Kodak) in einem Lumineszenzspektrometer (LS 50 B, Perkin Elmer) gemessen und dargestellt (Loew *et al.*, 1983). Die Anregungswellenlänge für den Farbstoff betrug 620 nm und die Emissionswellenlänge 670 nm, die eingestellte Spaltbreite war

10 nm. Für die Messung wurden 2 μ l Liposomen (40 mg/ml) und 8 μ l des Fluoreszenzfarbstoffes DTDC (1 mM in EtOH mit 8 ml Küvettenpuffer (50 mM Tris-maleat, 50 mM Na₂SO₄, 0,5 mM EDTA-Na₂, 0,02 % (w/v) Natriumazid, pH eingestellt mit NaOH) gemischt, was einer Endkonzentration von 1 μ M DTDC und 100 % Fluoreszenz entspricht. Nach Zugabe von 2 μ l Valinomycin (0,5 μ M in EtOH) zu 1 ml des Reaktionsansatzes in einer Küvette (entspricht 1 nM Valinomycin) wurde die Fluoreszenz um etwa 90 % abgeschwächt. Durch die Zugabe von Valinomycin wird ein K⁺-Diffusionspotential über den Liposomenmembranen induziert, was zu einer Bindung des Farbstoffs an den Liposomen und den Verlust seiner fluoreszierenden Eigenschaft führt. Durch die Zugabe eines porenbildenden Peptids bricht das Membranpotential zusammen, der Farbstoff wird wieder freigesetzt und die Fluoreszenz steigt an. Ein Anstieg der Fluoreszenz innerhalb einer Minute um 5 % des 100 %-Ausgangswertes wurde als Aktivitätseinheit (Unit) für die Porenbildung definiert (Leippe *et al.*, 1991). Als Positivkontrolle wurde das porenbildende, antimikrobielle Peptid Alamethicin eingesetzt (Fox und Richards, 1982; Hall *et al.*, 1984; He *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 2008).

3.27 Bioinformatik

Vorhergesagte Aminosäuresequenzen mutmaßlicher antimikrobieller Peptide wurden in der *C. intestinalis* EST-Datenbank des „Computational Biology and Functional Genomics Laboratory“ des „Dana-Faber Cancer Institutes (DFCI)“ unter <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/> identifiziert (Quackenbush *et al.*, 2001), indem die cDNA Bibliotheken Cat# BM7 (*Nori Satoh unpublished cDNA library, blood cells*, 56.720 ESTs) und Cat# 9VV (*Ascidian hemocytes cDNA library*, 3.376 ESTs) bzw. Cat# BMS (*Nori Satoh unpublished cDNA library, endostyle*, 4.691 ESTs) mit dem auf der Internetseite verfügbaren Programm nach Hämocyten- und Endostyl-spezifischen EST-Clustern durchsucht wurden. Neben der Internetseite des DFCI wurden für *Ciona*-spezifische BLAST Analysen zusätzlich die *Ciona* EST-Datenbank „Ghost Database“ des „Department of Zoology of the Kyoto University“ unter <http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html> (Satou *et al.*, 2005) und die *Ciona* Genom-Datenbank des „US DOE Joint Genome Institute“ unter <http://genome.igi-psf.org/Cioin2/Cioin2.home.html> benutzt. Allgemeine BLAST-Analysen wurden in der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) durchgeführt. Für die Suche nach möglichen Signalpeptidsequenzen in Aminosäuresequenzen wurde das Programm SignalP V3.0 des „Center for Biological Sequence Analysis of the University of Denmark“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) genutzt (Nielsen *et al.*, 1997; Bendtsen *et al.*, 2004). Für Sekundärstrukturvorhersagen mutmaßlicher Peptide diente PSIPRED, der „Protein Structure Prediction Server“ der „Bioinformatics Unit of the University College

London” (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) (McGuffin *et al.*, 2000). Helixrad-Projektionen wurden mit dem Programm ANTHEPROT 2000 V6.0 generiert (Deléage *et al.*, 2001). Vergleichende Anordnungen von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm ClustalW des „European Bioinformatics Institute“ unter <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> durchgeführt (Chenna *et al.*, 2003).

4 ERGEBNISSE

4.1 Reinigung antimikrobieller Peptide

Für die Reinigung natürlicher antimikrobieller Peptide aus Proteinextrakten von *C. intestinalis* wurden Gewebe ausgewählt, für die eine besondere Abwehrfunktion gegen eindringende Krankheitserreger angenommen wurde. Der Mantel und der Kiemendarm stellen offensichtlich die ersten Barrieren der Seescheiden zur Außenwelt dar. In diesen Geweben sind antimikrobielle Peptide als molekulare Komponenten der epithelialen Abwehr zu erwarten. Die Hämozyten sind bereits von anderen Tunikaten als Synthese- und Speicherort für antimikrobielle Peptide bekannt (Lee *et al.*, 2001 a; Lehrer *et al.*, 2001; Menzel *et al.*, 2002). Außerdem gibt es Beobachtungen, dass Hämozyten bei Tunikaten direkt an der epithelialen Abwehr beteiligt sind. So konnte für *C. intestinalis* gezeigt werden, dass Hämozyten im Verlauf einer künstlich durch Injektion von Erythrozyten hervorgerufenen entzündungsähnlichen Reaktion im Mantel aktiv durch das Mantelepithel zur Injektionsstelle wandern und die fremden Zellen durch Kapselbildung isolieren (Parrinello *et al.*, 1990; De Leo *et al.*, 1996; Di Bella und De Leo, 2000). Bei dem koloniebildenden Tunikaten *Botryllus schlosseri* hat man sogar freie Amöbozyten entdeckt, die sich auf der Innenseite des Siphons der Ingestionsöffnung in direktem Kontakt mit dem einströmenden Meerwasser befinden (Cima *et al.*, 2006). Für diese Zellen nimmt man ebenfalls eine Rolle bei der epithelialen Abwehr an (Cima *et al.*, 2006). Ferner wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass antimikrobielle Peptide von den Hämozyten in die Hämolymphe der Tiere abgegeben werden. Insbesondere ist auch eine artifizielle Lokalisation von antimikrobiellen Peptiden in der Hämolymphe denkbar, die während des Vorgangs der Hämolymphegewinnung von den Hämozyten freigesetzt wurden.

Von den unterschiedlichen Geweben wurden saure Extrakte mit 10 % (v/v) Essigsäure oder reinem Extraktionsmedium (1 M HCl, 5 % (v/v) Ameisensäure, 1 % (v/v) TFA und 1 % (w/v) NaCl) hergestellt und der Überstand jeweils über hydrophobe Interaktionschromatographie (Sep-Pak tC18) und stufenweiser Elution mit Acetonitril (ACN) grob vorfraktioniert. Diese Fraktionen wurden mittels Mikrosuszeptibilitätstests auf ihre antimikrobielle Aktivität gegen *Bacillus megaterium* und *Escherichia coli* überprüft. Anschließend wurde versucht, die für die Aktivität verantwortlichen Substanzen mit unterschiedlichen Chromatographieverfahren zu reinigen und zu identifizieren. Dabei wurden nach jedem Reinigungsschritt jeweils alle Fraktionen wieder auf ihre antibakterielle Aktivität getestet und mittels SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung auf ihre Reinheit kontrolliert. Reinigungsskizzen der erfolgreich isolierten antimikrobiellen Peptide befinden sich im Anhang (8.1). In der Regel wurde jeweils diejenige Fraktion weiter gereinigt, die im Aktivitätstest die stärkste

antimikrobielle Aktivität aufwies. Auf eine Darstellung der Ergebnisse dieser einzelnen Aktivitätstests im Anhang wurde verzichtet.

4.1.1 Reinigung antimikrobieller Peptide aus dem Mantel

Peptid 1 und 2:

Bei dem Mantel von *C. intestinalis* kann zwischen einer inneren mukösen und einer äußeren derben und teils mit Algen bewachsenen Schicht unterschieden werden. Die innere muköse Schicht wurde von der äußeren abgetrennt und für die Herstellung von saurem Proteinextrakt verwendet. Die 20 % ACN Fraktion nach hydrophober Interaktionschromatographie (Sep-Pak tC18) wurde zunächst über Gelfiltrationschromatographie und nachfolgend dreimal über HPLC gereinigt (Anhang 8.1.1). Als Resultat wurden zwei Fraktionen erhalten, die jeweils einem Extinktionsmaximum im Chromatogramm entsprachen und starke Aktivität gegen *B. megaterium* zeigten.

Die N-terminale Sequenzierung der beiden aktiven Fraktionen ergab folgendes Ergebnis:

Fraktion A: (S) V G G H x

Fraktion B: (S) V G/H G H x

Die Identifizierung eingeklammerter Aminosäurereste ist nicht sicher, ein Schrägstrich zwischen zwei Aminosäureresten steht für zwei alternative Möglichkeiten an der entsprechenden Position und ein x bezeichnet den Abbruch der Sequenzierreaktion.

Folglich brach die Sequenzierung bei beiden Reaktionen nach dem fünften Aminosäurerest ab. Die Identifizierung des N-terminalen Serinrestes war jeweils unsicher und bei dem dritten Aminosäurerest von Fraktion B handelte es sich um einen Glycin- oder Histidinrest.

Eine massenspektrometrische Analyse ergab eine monoisotopische Masse von 716,3 für Fraktion A und von 861,0 für Fraktion B. Die Massen stimmten nicht mit den theoretischen monoisotopischen Massen der durch die N-terminalen Sequenzierungen erhaltenen möglichen Aminosäuresequenzen von 455,5 für SVGGH und 535,6 für SVHGH überein.

Eine weitere massenspektrometrische Analyse mit Fraktion A bestätigte die monoisotopische Masse von 716,3 als Hauptkomponente. Die Aminosäuresequenz SV am N-Terminus wurde durch eine MS/MS-Analyse mit Fraktion A als wahrscheinlich bestätigt. Die weitere Abfolge der Aminosäurereste der N-terminalen Sequenzierung konnten auf diese Weise nicht bestätigt werden. Die Analyse der erhaltenen Sequenzvorschläge mit den Programmen MASCOT und MS-Fit ergab keine signifikanten Treffer in den durchsuchten Sequenz-Datenbanken.

Peptid 3:

Aus der 30 % ACN Fraktion nach der Reinigung über die Sep-Pak tC18-Säule wurde mittels Gelfiltrationschromatographie und anschließender HPLC eine Fraktion gereinigt, die gemäß des silbergefärbten SDS-Gels noch mindestens drei Peptide unterschiedlicher molekularer Masse enthielt (Anhang 8.1.2). Die antibakterielle Aktivität dieser Fraktion gegen *B. megaterium* konnte jedoch durch den Vergleich mit benachbarten HPLC Fraktionen der prominentesten Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 5 bis 6 kDa zugeordnet werden. Eine weitere Auftrennung des Proteingemisches wurde mittels HPLC nicht erreicht. Deshalb wurde die Proteinbande auf eine Membran transferiert und einer Sequenzierung nach Edman unterzogen. Da das Peptid N-terminal blockiert war, konnten auf diese Weise keine Informationen über dessen Aminosäuresequenz erlangt werden.

4.1.2 Reinigung antimikrobieller Peptide aus dem Kiemendarm**Peptid 4:**

Die Proteine und Peptide aus der 30 % ACN Fraktion der hydrophoben Interaktionschromatographie (Sep-Pak tC18) mit Kiemendarmextrakten wurden mit Mikrokonzentratoren (Centricon) mit sukzessive abnehmendem Molekulargewichtsausschluss (50, 30, 10, 3 kDa) gemäß ihrer Größe fraktioniert. Aus der Fraktion <3 kDa wurde nach zwei Reinigungsschritten über HPLC eine Fraktion erhalten, die im SDS-Gel eine einzelne Peptidbande und im Mikrosuszeptibilitätstest Aktivität gegen *B. megaterium* zeigte (Anhang 8.1.3). Das Peptid wurde auf eine Membran transferiert und mit folgendem Ergebnis N-terminal nach Edman sequenziert:

(L) F/V G Q S L Q K V X E F (I)

Die Identifizierungen des N-terminalen Aminosäurerestes als Leucinrest und des C-terminalen Aminosäurerestes als Isoleucinrest waren nicht sicher. Bei dem zweiten Rest handelte es sich entweder um einen Phenylalanin- oder einen Valinrest. Der zehnte Aminosäurerest (X) konnte nicht identifiziert werden, möglicherweise weil es sich dabei um einen Cysteinrest handelte. Die Differenz zwischen der theoretischen monoisotopischen Masse der Sequenz LFGQSLQKVCEFI von 1511,79 und der gemessenen monoisotopischen Masse von 1510,75 betrug ca. 1 Da und lag damit über dem zu tolerierenden Bereich (pers. Kommunikation, Dr. Friedrich Buck). Durch eine MS/MS-Analyse konnte die durch Edman-Abbau erhaltene Sequenz nicht bestätigt werden. Außerdem gab es für die bei der MS/MS-Analyse erhaltenen Sequenzvorschläge keine signifikanten Treffer in den mit MASCOT und MS-Fit durchsuchten Sequenz-Datenbanken. Die Sequenz LFGQSLQKVCEFI, sowie die nach Edman-Abbau alternativen

Aminosäuresequenzen wurden für eine BLAST-Analyse in den Nukleotidsequenz-Datenbanken von *Ciona* verwendet. Dabei konnten keine übereinstimmenden Sequenzen oder Sequenzen mit signifikanter Ähnlichkeit gefunden werden.

4.1.3 Reinigung antimikrobieller Peptide aus zellfreier Hämolymphe

Peptid 5:

In Zusammenarbeit mit Henning Sudhaus konnte im Rahmen seiner Diplomarbeit ein gegen *B. megaterium* aktives Protein aus der 30 % ACN Fraktion der hydrophoben Interaktionschromatographie (Sep-Pak tC18) mit Hämolymphextrakt gereinigt werden. Nach Gelfiltration (SuperdexTM 75 pg), HPLC (HAIsil-300-C8-Säule), Kationenaustauschchromatographie (Resource S) und noch zweimal HPLC (2 × VYDAC-Protein-C4-Säule) wurde die im Mikrosuszeptibilitätstest aktive Fraktion auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kDa mittels Peptidmassen-Fingerabdruck (PMF) analysiert (Anhang 8.1.4) (Sudhaus, 2006). Für die erhaltenen Peptidmassen konnten mit den Programmen MASCOT und MS-Fit keine signifikanten Übereinstimmungen in den durchsuchten Sequenz-Datenbanken gefunden werden (Sudhaus, 2006).

Mit dem Ziel das Protein über Edman-Abbau zu identifizieren, wurde eine weitere Hämolymphextraktion durchgeführt. Die Reinigung des aktiven Proteins konnte damit allerdings nicht reproduziert werden (Sudhaus, 2006).

4.1.4 Reinigung antimikrobieller Peptide aus Hämozyten

Peptid 6:

Aus der Fraktion 30 % ACN nach hydrophober Interaktionschromatographie (Sep-Pak tC18) mit Hämozytenextrakt konnte nach nur zwei aufeinander folgenden Reinigungsschritten über HPLC ein gegen *B. megaterium* aktives Peptid mit einem Molekulargewicht von etwa 5 kDa isoliert werden (Anhang 8.1.5). Die N-terminale Sequenzierung nach Edman brach nach dem zweiten Aminosäurerest ab. Bei den ersten beiden Aminosäureresten handelte es sich um einen Leucin- und einen Phenylalaninrest. Eine Überprüfung der Sequenzvorschläge einer MS/MS-Analyse mit den Programmen MASCOT und MS-Fit ergab keine signifikanten Treffer in den durchsuchten Sequenz-Datenbanken.

Peptid 7:

Im Rahmen der Diplomarbeit von Henning Sudhaus konnte aus der 30 % ACN Fraktion nach hydrophober Interaktionschromatographie (Sep-Pak tC18) ein weiteres Peptid mit antibakterieller Aktivität isoliert werden. Nach zwei Reinigungsschritten mittels HPLC wurde eine gegen *B. megaterium* aktive Fraktion erhalten, die auf dem silbergefärbten SDS-Gel noch drei Proteinbanden aufwies. Durch den Vergleich mit benachbarten gesammelten Fraktionen konnte die Aktivität der prominentesten Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 7 kDa zugeordnet werden (Anhang 8.1.6). Sowohl ein Peptidmassen-Fingerabdruck, als auch eine MS/MS-Analyse ergaben jedoch keine signifikanten Treffer in den mit MASCOT und MS-Fit durchsuchten Sequenz-Datenbanken (Sudhaus, 2006).

4.2 BLAST-Suche nach Genen, die für Orthologe bekannter antimikrobieller Peptide codieren

In den EST- und Genom-Datenbanken von *C. intestinalis* wurde eine Suche nach Nukleotidsequenzen durchgeführt, die für Orthologe bekannter antimikrobieller Peptide codieren. Hierfür wurde in der Regel die Funktion „tblastn“ verwendet. Dieses Programm vergleicht eine Aminosäuresequenz mit den Sequenzen einer Nukleotidsequenz-Datenbank, die dafür gemäß allen möglichen Leserastern in sechs Aminosäuresequenzen übersetzt werden. Die Suche wurde mit diversen Aminosäuresequenzen von Mitgliedern konservierter antimikrobieller Peptidfamilien durchgeführt. Hierzu gehörten unter anderem die humanen α - und β -Defensine, Cecropine, Cathelicidine, Amoebapores und NK-Lysine. Weiterhin wurden Vertreter diverser kleinerer z. B. art- oder gattungsspezifischer Peptidfamilien (Penaeidine, Styeline, Clavanine etc.), sowie etliche Aminosäuresequenzen einzigartiger Peptide für die BLAST-Suche benutzt (<http://www.bbcm.units.it/~tossi/amsdb.html>). Zudem wurden jeweils aktuell veröffentlichte Aminosäuresequenzen neuartiger antimikrobieller Peptide (z. B. NCBI *Pubmed*, 10th Congress, *International Society of Developmental and Comparative Immunology*, ISDCI) für die Suche nach Orthologen in *C. intestinalis* verwendet (z. B. Tasiemski *et al.*, 2007; Stensvåg *et al.*, 2008).

Einzig bei der Suche mit den Aminosäuresequenzen der Amoebapores und NK-Lysine konnten aufgrund der bei einer Reihe von Proteinen unterschiedlichster Funktion konservierten Saposin B-Domäne ähnliche Sequenzen in den Datenbanken von *Ciona* identifiziert werden. Dabei handelte es sich allerdings nicht um Aminosäuresequenzen porenbildender, antimikrobieller Polypeptide, sondern offensichtlich um drei verschiedene Sphingomyelin-Phosphodiesterasen (TC57746, TC57043, TC67087), eine Acyloxyacylhydrolase (TC67613) und ein mutmaßliches Prosaposin (TC64420/TC64421) (Abb. A 22, Anhang), die allesamt der Familie der Saposin-ähnlichen Proteine angehören.

4.3 *In silico* Identifizierung von Genen, die für neuartige antimikrobielle Peptide codieren

Neben der normalen BLAST-Analyse bietet die *Ciona* EST-Datenbank des „Computational Biology and Functional Genomics Laboratory“ des „Dana-Faber Cancer Institutes (DFCI)“ zusätzlich verschiedene Suchfunktionen. Zum Verständnis ist es notwendig zu wissen, dass die rund 700.000 Nukleotidsequenzen der *Ciona* EST-Datenbank zu Clustern (*Tentative Consensus sequences*, TC) zusammengefasst sind. Dabei gehören jeweils sämtliche ESTs, die von einem bestimmten Gen stammen, demselben Cluster an. Mit den Suchfunktionen auf der Internetseite des DFCI können z. B. die Datenbanken zweier unterschiedlicher Gewebe oder Entwicklungsstadien direkt hinsichtlich der Häufigkeit einzelner ESTs eines Clusters miteinander verglichen werden. Auf diese Weise kann man Informationen darüber erhalten, welche Gene überwiegend in dem einen und welche in dem anderen oder in beiden Geweben bzw. Entwicklungsstadien gleich stark exprimiert werden. Eine weitere Suchfunktion bietet die Möglichkeit, alle Cluster der Datenbank hinsichtlich der Herkunft ihrer einzelnen ESTs zu analysieren. So kann man das Programm z. B. nach Clustern suchen lassen, deren ESTs zu einem gewissen Prozentsatz aus einer gewebespezifischen EST-Datenbank stammen. Diese Funktion wurde für die Suche nach ESTs benutzt, die möglicherweise für antimikrobielle Peptide codieren. Spezifische EST-Datenbanken existieren für Gonaden, Hoden, Eier, unterschiedliche Embryonal- und Larvalstadien, ganze junge adulte und geschlechtsreife adulte Tiere, Verdauungsdrüse, Neuralkomplex, Herz, Hämozyten und Endostyl. Aufgrund der bereits für die Reinigung natürlicher antimikrobieller Peptide geschilderten Argumente (Kapitel 4.1) wurden für die Suche nach ESTs potentieller antimikrobieller Peptide die Hämozyten- und Endostyl-EST-Datenbanken ausgewählt. Es wurde angenommen, dass dem Endostyl eine besonders wichtige Funktion bei der epithelialen Abwehr des Kiemendarms zukommt. Die Drüsenzellen des Endostyls produzieren den Schleim, der für die Benetzung des Kiemendarms verantwortlich ist. Der Schleim stellt somit die erste Barriere für alle Mikroorganismen dar, die mit dem Einstromwasser in das Tier gelangen. Es ist daher anzunehmen, dass dieser große Mengen antimikrobieller Peptide enthält. Folglich wurden die ausgewählten EST-Datenbanken nach hämozyten- und endostylspezifischen Clustern durchsucht. Als hämozytenspezifisch wurde ein Cluster definiert, wenn dessen ESTs zu mindestens 50 % aus den beiden Hämozyten EST-Datenbanken *Cat#* BM7 (*Nori Satoh unpublished cDNA library, blood cells*, 56.720 ESTs) und *Cat#* 9VV (*Ascidian hemocytes cDNA library*, 3.376 ESTs) stammten. Die Summe der ESTs aus den beiden hämozytenspezifischen EST-Datenbanken beträgt 60.096, die zu insgesamt 6.626 unterschiedlichen Clustern und einigen Einzelsequenzen, die nicht weiter beachtet wurden, zusammengefasst werden. Von den Clustern erfüllten 1.171 das beschriebene Kriterium für Hämozytenspezifität. Davon wurden solche Cluster, die nur zwei

oder weniger aus Hämocyten stammende ESTs enthielten nicht berücksichtigt. Denn wenn ein Cluster nur zwei ESTs aus Hämocyten enthielt, dann stammten diese in der Regel ursprünglich von nur einem Plasmid, das für die Erstellung der EST-Datenbank von zwei Seiten sequenziert wurde. Abzüglich solcher Cluster blieben 782 Cluster für eine genauere Betrachtung übrig (Tabelle 3).

Als endostylspezifisch wurde ein Cluster definiert, wenn dessen ESTs zu mindestens 30 % aus der Endostyl EST-Datenbank *Cat# BMS (Nori Satoh unpublished cDNA library, endostyle)* stammten. Die 4.691 ESTs der Endostyl EST-Datenbank sind in insgesamt 1.036 Clustern und einigen Einzelsequenzen organisiert. Von den 230 endostylspezifischen Clustern wurden wiederum alle Cluster mit nur zwei oder weniger aus dem Endostyl stammenden ESTs abgezogen, so dass 77 Cluster einer weiteren Analyse unterzogen wurden (Tabelle 3).

Tabelle 3 Eingrenzung potentieller Kandidaten-ESTs

	Anzahl ESTs	Anzahl TCs
Gesamt (<i>C. intestinalis</i> DFCI Gene Index)	675.528	23.143
Cat#: BM7	56.720	6.358
Cat#: 9VV	3.376	905
ESTs Hämocyten	60.096	6.626
Hämocytenspezifisch (≥ 50 %)	-	1.171
Hämocytenspezifisch (≥ 50 % & n > 2)	-	782
Cat#: BMS	4.691	1.036
Endostylspezifisch (≥ 30 %)	-	230
Endostylspezifisch (≥ 30 % & n > 2)	-	77

BM7, *Nori Satoh unpublished cDNA library, blood cells*; 9VV, *ascidian hemocytes cDNA library*; BMS, *Nori Satoh unpublished cDNA library, endostyle*; TC, *Tentative Consensus sequence*. Jedes gewebespezifische Cluster (TC) wurde individuell hinsichtlich weiterer Kriterien für antimikrobielle Peptide untersucht (siehe Text).

Die resultierenden 782 hämozyten- und 77 endostylspezifischen Cluster wurden individuell hinsichtlich kurzer offener Leserahmen bis 600 Bp bzw. 200 AS analysiert. Da es sich bei antimikrobiellen Peptiden in der Regel um sezernierte, kationisch Peptide handelt, dienten als weitere Auswahlkriterien für die abgeleitete Aminosäuresequenz das Vorhandensein eines Signalpeptids und einer kationischen Region. Außerdem sollte die Sequenz keine

signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen mit anderen Funktionen zeigen. Auf diese Weise konnten 20 Gene mit hämozyten- und 5 Gene mit endostylspezifischer Expression identifiziert werden, die für Vorläufer von kleinen kationischen Peptiden codieren könnten (Abb. 4). Die mutmaßlichen Aminosäuresequenzen wurden nun auf für antimikrobielle Peptide klassische Primär- und Sekundärstrukturen hin untersucht.

Dabei fielen mehrere Sequenzen auf, die zum Teil offensichtliche Sequenzähnlichkeiten zueinander zeigten, und deren kationische Bereiche möglicherweise amphipathische Helices ausbilden könnten (TC67543, TC59885, TC71332, TC55620 aus Hämozyten sowie TC71308 und TC71309 aus dem Endostyl) (Abb. 4). Mit den übersetzten EST-Sequenzen wurden BLAST-Suchen in den *Ciona* EST- und Genom-Datenbanken durchgeführt. Als Ergebnis dieser Analysen konnten zwei mutmaßliche Peptidfamilien mit sieben und drei Mitgliedern beschrieben werden (Abb. 5). Eine BLAST-Suche mit allen zehn Aminosäuresequenzen gegen die NCBI-Datenbank ergab keine signifikanten Treffer. In der Annahme, dass die einzelnen Mitglieder der beiden Genfamilien für Abwehrmoleküle codieren, wurden diese *Ciona - molecule against microbes (Ci-mam) -A bis -G* (TC59885, TC67543, TC67549, TC71308, TC71332, TC71311, TC71336/TC71309) und *Ciona - putative antimicrobial peptide (Ci-pap) -A bis -C* (TC55620, TC56002, TC59649) genannt (Abb. 5). Gemäß den *in silico* Expressionsprofilen des „DFCI *Ciona intestinalis* Gene Index (CinGI)“ werden die Gene *Ci-mam-A*, *-B*, *-C*, *-E*, und *-F* überwiegend bis ausschließlich in Hämozyten exprimiert, während die ESTs von *Ci-mam-D* und *-G* sowohl in der Endostyl- als auch der Hämozyten-Datenbank sehr häufig zu finden sind. Eine vergleichende Anordnung aller Aminosäuresequenzen lässt erkennen, dass sich die Ci-MAM-Peptidfamilie grob in zwei Untergruppen aufspaltet, vertreten durch die Mitglieder A bis C und D bis G (Abb. 5).

Die Vertreter A und C der *Ci-pap*-Genfamilie werden ebenfalls in Hämozyten exprimiert. *Ci-pap-B* ist dagegen bereits als *Ci-mech3* benannt und als mesenchymspezifisches Gen beschrieben worden, das vorübergehend in Mesenchymzellen während des frühen Gastrulastadiums in *C. intestinalis* exprimiert wird (Tokuoka *et al.*, 2004). Laut DFCI CinGI wird das Gen hauptsächlich in Larven und anderen frühen Entwicklungsstadien exprimiert.

A

	Vorhergesagtes Signalpeptid	Mutmaßlicher Peptidvorläufer	
Ci-MAM-A	MDRKIVFALLLLVSLNVSTVYG-----	WSSLGRSLLRLTHALKPLARRSGWDQRAASLNFAPETIEDELEASMDRIMQQMADEKQD	81
Ci-MAM-A (NE)	MDRKIVFALLLLVSLNVSTVYG-----	WRSLGRTLRLSHALKPLARRSGWDQRAASLNVVPEIEDELDASEVDRIMQQMADEKQE	81
Ci-MAM-B	MDRKIAFAFLFVI-LQVTTVSA-----	GWGSLLRVGTAKAILGTLALRRRT-WNENKASQQITPEMEEKLD-AEMEKLMQQLAEDQQ-	78
Ci-MAM-C	MDRKIVFALFLVF-LHISTVSA-----	S---LAAGFKLLFKSWVHRRRT-WNEKTTSDQFTAENDKPFDFEAEMDGLLNNLETENQK	76
Ci-MAM-D	MDRKIVFILLLVV-LLVSQLATA-----	DDG-WVRTGLAVARLVVGRRRRR-WNEANGLEKLSSDAETLSAAEMEEVMQKIMDHQE-	78
Ci-MAM-E	MNRKIVFALFLVV-LFVSQAAA-----	DD--WVRTAIGVAGLVLRGGWQANGLKFFSSDAETLSAAEMEEVMQNIMDHQE-	78
Ci-MAM-F	MDRKIVFALLLVV-LFVSQAAA-----	DD--WVSTAVGVASHLLSRRRRRGWNQANGLKFFSSDAETLSAAEMEEVMQNIMDHQK-	78
Ci-MAM-G	MDRKIVFILLLV-LHITAVMANWSTGLRCAADALGRRRRRSRQRRSRSS---	SSGTTGSSSRSSMRRRRRRRSSNEEIESDEFASEIADALSAEMEEVMQKIMDHQE-	106

B

	Vorhergesagtes Signalpeptid	Mutmaßlicher Peptidvorläufer	
Ci-PAP-A (NE)	--MKFGAAFVLEICLAVSADA--ALRGALRAVARVGKAILPHVAIANPYVRT-PYVHNNPDWSLWRSRRRSNGNQ-PTSQAEIFLEDALEAQAIEALMQQ-	93	
Ci-PAP-A	--MKFGAAFVLVICLAVSADA--ALRSVARTVARVGRAVLPHVAIADPYVRT-PYVHNNPDWSLWR--RKRWNQQ-PTSQADMLEDALAEQAIEALMQEQ	92	
Ci-PAP-B	--MKSVAIVILVICFAVSADA--AARLVRAGAKIVDAALPIVGKLGPHVRTGDYVHNNPDWSLWR--RKRWNQQ-PTSQAEMLEDALAEQAIEALMQEQ	93	
Ci-PAP-C	--MKSVAIVILVICFAAFADA--GVLRSVAKIGAKVVDAALPIVGTAGPHIDTGEYVHNNPDWSPWK--EIKWNQRRAKNAAQMLEDEANAIAEALLQD-	94	
Ci-META4	MNIKAVFVIAVILGFATLPSEARFRGLVRAGGKLVKEVLP--SIVQPIVDS-----TKNKWKPW-----KWNEQ-----ERMALADEIDAELMDLLEQE-	83	

Abb. 5: Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen der beiden *in silico* identifizierten Peptidfamilien Ci-MAM und Ci-PAP. Identische Aminosäurereste sind durch einen senkrechten Balken miteinander verbunden, Aminosäurereste mit ähnlichen Eigenschaften sind durch ein + gekennzeichnet. Die Aminosäuresequenzen mutmaßlicher Signalpeptide sind grau hinterlegt. (A) Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen der sieben Mitglieder der Ci-MAM-Peptidfamilie und der nordeuropäischen Variante (NE) von Ci-MAM-A. (B) Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen der drei Mitglieder der Ci-PAP-Peptidfamilie und der nordeuropäischen Variante (NE) von Ci-PAP-A sowie mit dem mutmaßlichen antimikrobiellen Peptid Ci-META4 (Jang *et al.*, 2005)

Alle beschriebenen Peptide beider Familien weisen eine typische Primärstruktur mit einem mutmaßlichen Signalpeptid, einer darauf folgenden kationischen Region und einer C-terminalen anionischen Verlängerung auf. Weiterhin ergaben Sekundärstrukturvorhersagen mit dem Programm PSIPRED, dass die kationische Region aller Peptide wahrscheinlich überwiegend als Alpha-Helix vorliegt, was, mit der Ausnahme von Ci-MAM-G, zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten amphipathischen Struktur dieser Region führt. Abgesehen von Ci-MAM-G, das nur einen Cysteinrest enthält, weisen die Aminosäuresequenzen der Peptide keine Cysteinreste auf. Die Ausbildung von Disulfidbrücken ist daher nicht möglich.

4.4 Klonierung der nordeuropäischen Varianten der *Ci-mam*- und *Ci-pap*-Genfamilien-Mitglieder ausgehend von Hämozyten-cDNA

Für die Genom- und EST-Projekte von *C. intestinalis* wurden Tiere verwendet, die aus dem Pazifik (P) stammten. Mittlerweile geht man davon aus, dass die Tiere aus nordeuropäischen (NE) Gewässern einer anderen Art als die aus dem Pazifik angehören (Suzuki *et al.*, 2005; Caputi *et al.*, 2007; Iannelli *et al.*, 2007). So konnten bei dem Vergleich von in dieser Arbeit erhaltenen Nukleotidsequenzen Helgoländer Ursprungs mit den entsprechenden Sequenzen aus dem EST-Projekt erhebliche Unterschiede festgestellt werden, die sich in der Regel auch auf die Aminosäuresequenz auswirkten. Um das Ausmaß der Divergenz für die Mitglieder der *Ci-mam*- und *Ci-pap*-Genfamilie zu bestimmen, wurde zunächst RNA aus Hämozyten Helgoländer Tiere isoliert und in cDNA umgeschrieben. Es wurde dann mittels PCR und unter Verwendung von Oligonukleotiden, die entsprechend den Sequenzen aus der EST-Datenbank generiert wurden, versucht, die nordeuropäischen Varianten der Gene von der cDNA zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren. Bis auf *Ci-pap-B/Ci-mech3*, das in Hämozyten nicht exprimiert wird, konnten für alle Gene die entsprechenden homologen Sequenzen ermittelt werden. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Erfassung des codierenden Bereiches, um die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der mutmaßlichen Peptidvorläufer miteinander vergleichen zu können. Auf eine aufwendige, vollständige Analyse der kompletten Nukleotidsequenzen der Transkripte mittels 3'- und 5'-RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) PCR wurde verzichtet. Für Ci-MAM-B, Ci-MAM-G und Ci-PAP-C fehlen deshalb sichere Informationen über neun bis 19 Aminosäurereste am N-Terminus des Signalpeptids, was für die weiteren Analysen jedoch nicht von Bedeutung war.

Mit den Oligonukleotiden spezifisch für *Ci-mam-D* (P) wurde die vermutlich zu *Ci-mam-F* homologe nordeuropäische Variante amplifiziert, entsprechend mit den *Ci-mam-E* (P) spezifischen Oligonukleotiden die zu *Ci-mam-D*, mit den *Ci-mam-F* (P) spezifischen Oligonukleotiden die zu *Ci-mam-E* und zum Teil mit den *Ci-mam-G* (P) spezifischen

Oligonukleotiden die zu *Ci-mam-D* homologe Variante. Unter Berücksichtigung dieser Zuordnungen ergab sich zwischen den pazifischen und nordeuropäischen Varianten der *Ci-mam*- und *Ci-pap*-Gene eine durchschnittliche Identität auf Ebene der Nukleotidsequenz von $90,5 \% \pm 2,3 \%$. Dies resultiert in Divergenzen auf Aminosäureebene von $3,1 \%$ (Ci-MAM-B) bis maximal $17,2 \%$ (Ci-PAP-A) zwischen der nordeuropäischen und der pazifischen Variante.

Die Nukleotidsequenzen der nordeuropäischen und pazifischen Varianten der Gene *Ci-mam-A* und *Ci-pap-A* sind unter den folgenden Nummern (*GeneBank accession no.*) in der Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) hinterlegt: *Ci-mam-A* (NE) (EU497243), *Ci-mam-A* (P) (EU497244), *Ci-pap-A* (NE) (EF638888), *Ci-pap-A* (P) (EF638889).

4.5 Semiquantitative RT-PCR nach Immunstimulation

Um einen ersten Eindruck zu bekommen, ob die Transkription der einzelnen Vertreter der *Ci-pap*- und *Ci-mam*-Genfamilie induzierbar ist, wurden Hämocyten von unbehandelten und immunstimulierten Tieren geerntet und deren RNA isoliert. Dazu wurden adulte *C. intestinalis* zunächst für 42 h in sterilfiltriertem Meerwasser, das alle 6 bis 12 h gewechselt wurde, gehalten, um die Expression möglicher induzierbarer und immunrelevanter Gene auf einem niedrigen Niveau zu halten. Einige Tiere wurden dann in Meerwasser überführt, das mit dem Inhalt eines Biofilters aus einem Meerwasseraquarium verunreinigt war. Zusätzlich wurden den einzelnen Individuen $150 \mu\text{l}$ des mikrobiell kontaminierten Wassers mit einer Kanüle zwischen den Mantel und den Hautmuskelschlauch injiziert. Die Hämocyten von jeweils drei Individuen wurden von unbehandelten Kontrolltieren und von Tieren 6, 12 und 24 h nach der Immunstimulation geerntet, vereinigt und für die Isolierung von Gesamt-RNA und anschließender cDNA-Synthese verwendet. Der Expressionslevel der verschiedenen Transkripte in den unterschiedlichen Proben wurde mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt. Parallel wurde eine PCR mit β -Aktin für die Kalibrierung der eingesetzten cDNA-Menge durchgeführt (Abb. 6).

Die Analysen ergaben, dass die Transkriptionsrate insbesondere von *Ci-mam-A* und *-G* und in geringerem Maße auch von *Ci-mam-B* und *-C* 6 h nach der Immunstimulation erhöht wurde (Abb. 6). Die Anzahl der Transkripte von *Ci-mam-A* und *-G* war auch nach 12 h noch erhöht, während die Expression von *Ci-mam-B* und *-C* zu diesem Zeitpunkt bereits wieder das Niveau unbehandelter Tiere erreicht hatte. Die Gene *Ci-mam-D* bis *-F* werden eher konstitutiv exprimiert, allerdings ist jeweils eine Abnahme der Transkriptmenge 24 h nach Immunstimulation zu beobachten (Abb. 6). Die Expression von *Ci-pap-A* wird nach 12 bis 24 h leicht hochreguliert während *Ci-pap-C* eine sehr schwankende Expression zeigt (Abb. 6).

Ci-pap-B wird in Hämocyten nicht exprimiert. *Ci-meta4*, ebenfalls ein Gen, das für ein mutmaßliches antimikrobielles Peptid codiert, wird konstitutiv exprimiert (Jang *et al.*, 2005) (Abb. 6).

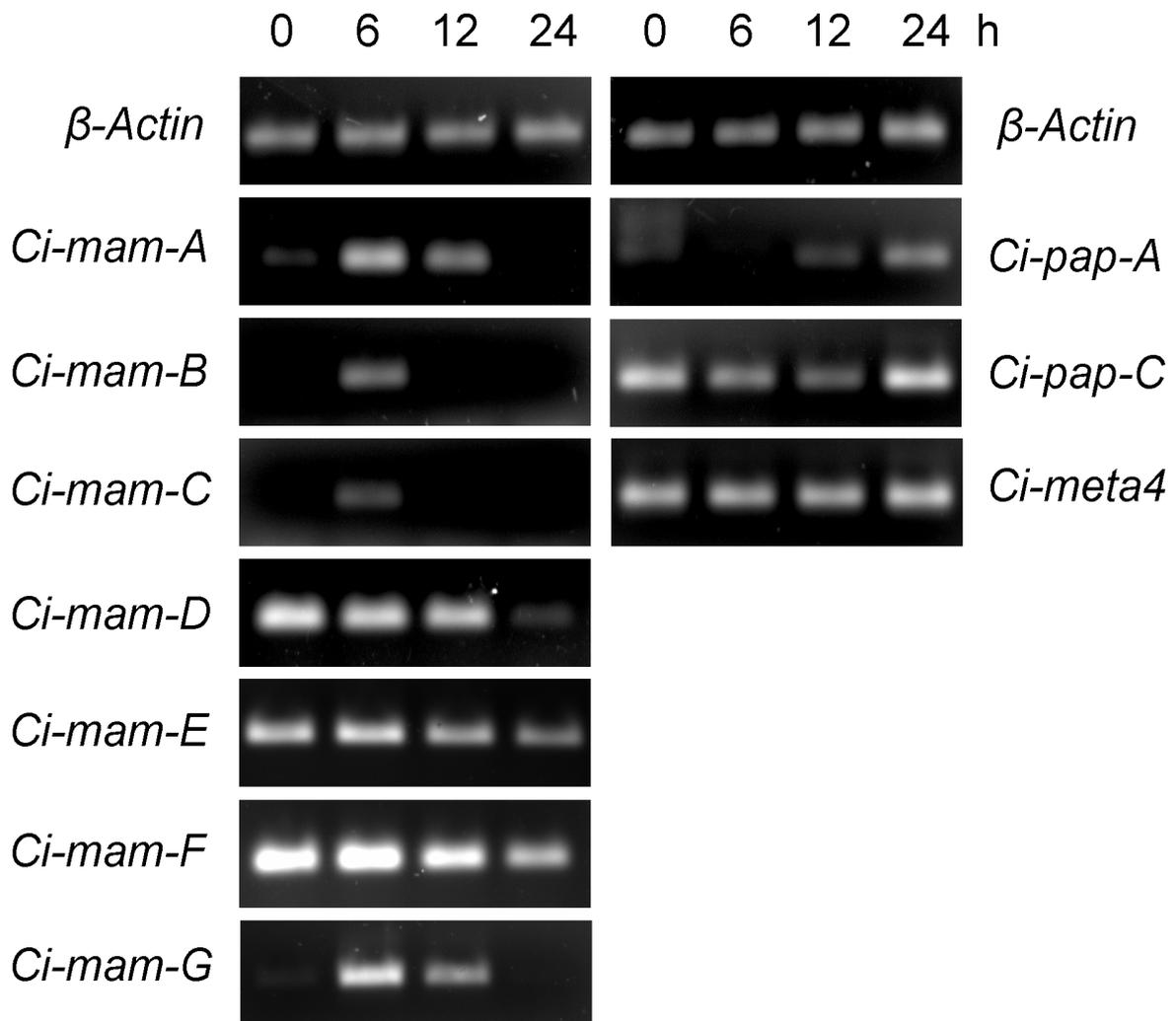


Abb. 6: Zeitabhängige Transkription von Mitgliedern der *Ci-mam*- und der *Ci-pap*-Genfamilie nach Immunstimulation. Gezeigt ist das Transkriptionsprofil der Gene *Ci-mam-A* bis *-G* und *Ci-pap-A* und *-C* sowie *Ci-meta4* in Hämocyten von nordeuropäischen *C. intestinalis* 0, 6, 12 und 24 h nach Immunstimulation. Die Menge der eingesetzten cDNA wurde zwischen den einzelnen Zeitwerten durch Kalibrierung mit *β-Actin* angeglichen.

4.6 Herstellung synthetischer Peptide

Die Annahme, dass die beiden *in silico* identifizierten Genfamilien für antimikrobielle Peptide codieren, sollte überprüft werden, indem von jeweils einem Vertreter pro Familie ein synthetisches Peptid hergestellt wurde. Hierfür wurden Ci-MAM-A und Ci-PAP-A gewählt. Auswahlkriterien waren die induzierbare Expression der Gene in Hämocyten nach Immunstimulation (Abb. 6) und das Potential der kationischen Region der mutmaßlichen Peptide eine besonders deutliche amphipathische Struktur anzunehmen (Abb. 7 B). Die synthetischen Peptide wurden in Anlehnung an die gut untersuchte Prozessierung von Vorläufermolekülen antimikrobieller Peptide aus *Styela clava* konstruiert (Lehrer *et al.*, 2001). Insbesondere zeigen die Vertreter der Ci-MAM- und der Ci-PAP-Peptidfamilie große Ähnlichkeit zu den Styelinen, was die Organisation der Vorläufermoleküle betrifft (Abb. 7 A). Diese werden als Präpromoleküle mit einem Signalpeptid und einer anionischen C-terminalen Verlängerung synthetisiert, die beide durch proteolytische Spaltung entfernt werden, um das aktive Peptid freizusetzen (Lee *et al.*, 1997 b; Zhao *et al.*, 1997 b; Taylor *et al.*, 2000). Es wurde angenommen, dass die primären Translationsprodukte von Ci-MAM-A und Ci-PAP-A ebenfalls Präpropeptide darstellen, die in ähnlicher Weise wie die Styeline prozessiert werden. Dementsprechend repräsentierten die synthetischen Peptide die kationische, amphipathische Region von Ci-MAM-A und Ci-PAP-A, was den ersten 24 bzw. 22 AS des N-Terminus des Propeptids entsprach (Abb. 7 A). Folglich wurden die synthetischen Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 genannt. Während Ci-MAM-A24 (WRSLGRTLLRLSHALKPLARRSGW-NH₂) gemäß der nordeuropäischen Variante von Ci-MAM-A konstruiert wurde, entsprach die Aminosäuresequenz von Ci-PAP-A22 (ALRSVRTVARVGRAVLPHVAI-NH₂) der pazifischen Variante von Ci-PAP-A (Abb. 7 A). Beide Peptide wurden als C-terminal amidierter Versionen synthetisiert.

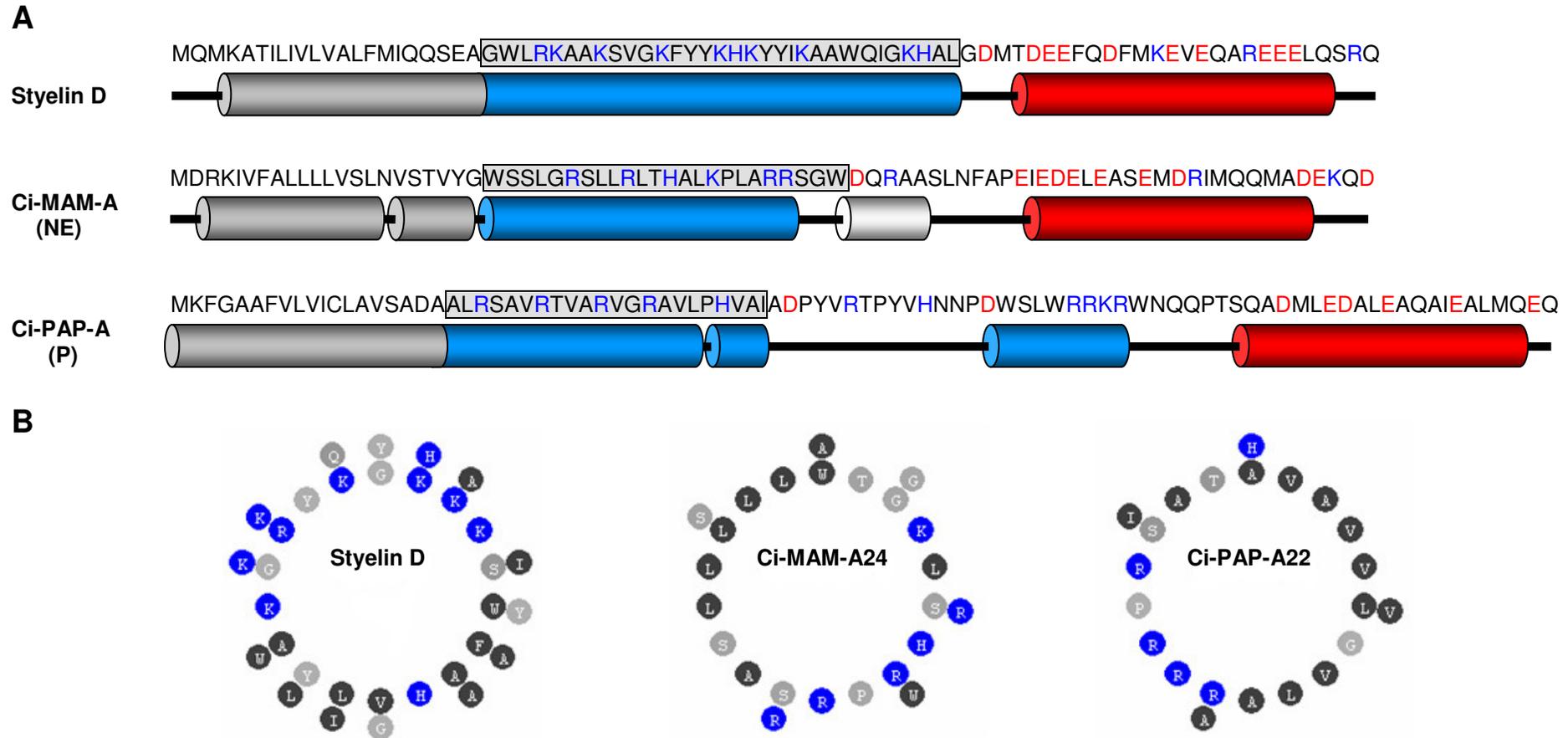


Abb. 7: (A) Vergleich der vorhergesagten Sekundärstrukturen der Vorläufermoleküle von Styelin D, Ci-MAM-A(NE) und Ci-PAP-A(P) und (B) Helixrad-Projektionen des prozessierten Styelin D bzw. der von Ci-MAM-A(NE) und Ci-PAP-A(P) abgeleiteten synthetischen Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22. (A) Vorhergesagte alpha-Helices sind durch Zylinder gekennzeichnet und mutmaßliche Signalpeptide sind dunkel grau markiert. Hydrophile Aminosäurereste und vorhergesagte alpha-helikale Bereiche sind entsprechend ihrer Ladung blau (kationisch) oder rot (anionisch) gefärbt. Die Aminosäuresequenzen des natürlichen Styelin D (ohne Berücksichtigung der bekannten posttranslationalen Modifikationen einiger Aminosäurereste (Taylor *et al.*, 2000)) und der synthetischen Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 sind grau hinterlegt. (B) Die Helixrad-Projektionen des prozessierten Styelin D und der synthetischen Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 zeigen deren amphipathisches Potential. Entsprechend ihrer Eigenschaften sind die Aminosäurereste als blaue (kationisch), dunkel graue (hydrophob) oder hell graue (andere) Kreise dargestellt.

4.7 Antimikrobielle Aktivität von Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22

4.7.1 Mikrosuszeptibilitätstest

Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) und die minimale letale Konzentration (MLC) der beiden synthetischen Peptide wurden gegen eine Reihe von gramnegativen und grampositiven Bakterien, einschließlich Pathogene des Menschen und mariner Invertebraten, und gegen zwei Stämme des fakultativ humanpathogenen Pilzes *Candida albicans* bestimmt. Außerdem wurde die antimikrobielle Aktivität bei zwei unterschiedlichen pH-Werten ermittelt. Dabei repräsentierte ein pH-Wert von 5,2 die Bedingungen im Inneren der Vakuolen von Hämozyten aus Tunikaten (Lee *et al.*, 1990), während der pH-Wert von 7,4 sowohl dem pH in der Hämolymphe von *C. intestinalis* (eigene Beobachtung) als auch physiologischen Bedingungen in humanem Blut entsprach. Die marinen Bakterien *Planococcus citreus*, *Vibrio alginolyticus* und *Listonella anguillarum* wurden nur bei einem pH-Wert von 7,4 getestet, da sie in saurem Milieu schlecht bis gar nicht wachsen.

Ci-MAM-A24 zeigte bei beiden pH-Werten eine starke antimikrobielle Aktivität gegen alle getesteten Stämme mit minimalen inhibitorischen Konzentrationen im niedrigen mikromolaren bis nanomolaren Bereich (Tab. 4). Bei der Bestimmung der minimalen letalen Konzentrationen wurde zudem deutlich, dass die Mikroorganismen durch das Peptid getötet wurden und es sich nicht um eine Aktivität handelte, die überwiegend auf Wachstumshemmung basiert (Tab. 4). Eine beständige pH-Präferenz konnte für Ci-MAM-A24 nicht beobachtet werden, allerdings waren einige Bakterienarten anfälliger für das Peptid bei pH 5,2 und andere bei pH 7,4. Im Allgemeinen waren die MIC-Werte vergleichbar mit denen der bekannten antimikrobiellen Peptide Cecropin P1 und Magainin 1 (Tab. 4). Besonders bemerkenswert ist die Aktivität von Ci-MAM-A24 gegen die beiden *Staphylococcus*-Spezies und *L. anguillarum*, bei denen die Vergleichs-peptide nur sehr geringe bis keine Aktivität zeigten (Tab. 4).

Für Ci-PAP-A22 gelten im Wesentlichen ähnliche Aussagen wie für Ci-MAM-A24, jedoch wies dieses Peptid im direkten Vergleich mit Ci-MAM-A24 gegen alle Bakterien eine etwas geringere Aktivität auf (Tab. 4). Die gramnegativen Bakterien *Serratia marcescens* und *L. anguillarum* konnten mit der maximalen im Mikrosuszeptibilitätstest eingesetzten Konzentration von 25 µM Peptid nicht getötet werden. Ci-PAP-A22 zeigte gegen die Mehrzahl der getesteten Bakterienspezies einen etwas geringeren MIC-Wert bei pH 7,4 (Tab. 4).

Tabelle 4 Antimikrobielle Aktivität der synthetischen *Ciona*-Peptide

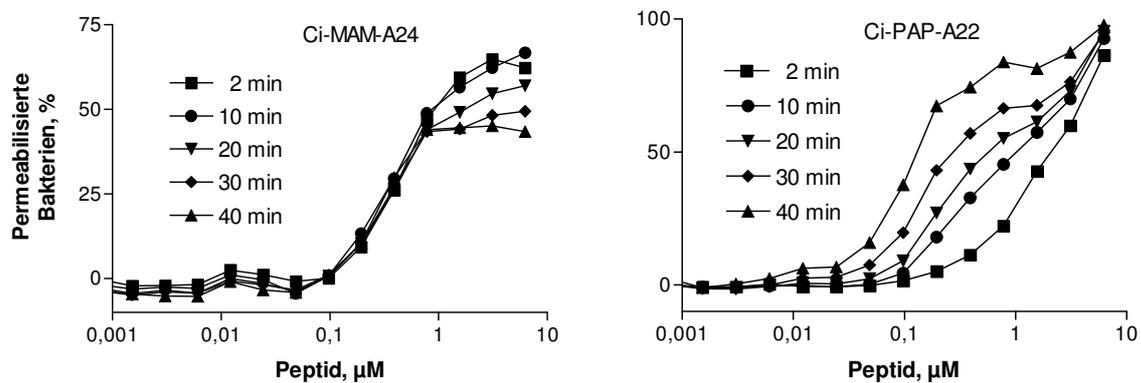
Organismen	MIC (MLC), μM									
	Ci-MAM-A24				Ci-PAP-A22				Magainin 1	Cecropin P1
	pH 5,2		pH 7,4		pH 5,2		pH 7,4		pH 7,4	pH 7,4
Grampositive Bakterien										
<i>B. megaterium</i>	0,02	(0,02)	0,2	(0,2)	0,1	(0,1)	0,2	(0,2)	0,4	0,8
<i>B. subtilis</i>	0,02	(0,02)	0,2	(0,2)	3,1	(3,1)	0,8	(0,8)	3,1	6,3
<i>S. aureus</i>	1,6	(3,1)	0,4	(0,4)	>25,0	(>25,0)	6,3	(6,3-12,5)	>25,0	>25,0
<i>S. epidermidis</i>	0,4	(0,4)	0,2	(0,2)	25,0	(>25,0)	6,3	(12,5)	>25,0	>25,0
<i>P. citreus</i>	-		0,1	(0,1)	-		0,4	(0,4)	1,6	1,6
Gramnegative Bakterien										
<i>E. coli</i> K12 D31	0,05	(0,05)	0,4	(0,4)	0,8	(1,6)	0,8	(1,6)	6,3	0,02
<i>Y. enterocolitica</i>	0,4	(0,8)	0,4	(0,4)	3,1	(6,3)	1,6	(3,1)	12,5	0,1
<i>K. pneumoniae</i>	1,6	(1,6)	0,8	(0,8)	>25,0	(>25,0)	12,5	(12,5)	25,0	0,2
<i>P. aeruginosa</i>	0,1	(0,1)	0,8	(0,8)	12,5	(12,5)	6,3	(6,3)	>25,0	0,8
<i>S. marcescens</i>	3,1	(3,1)	1,6	(1,6)	>25,0	(>25,0)	>25,0	(>25,0)	>25,0	6,3
<i>L. anguillarum</i>	-		3,1	(3,1)	-		>25,0	(>25,0)	>25,0	25,0
<i>V. alginolyticus</i>	-		1,6	(1,6)	-		25,0	(25,0)	12,5	0,2
Pilze										
<i>C. albicans</i> (ATCC 10261)	6,3	(6,3)	6,3	(6,3)	6,3	(6,3)	3,1	(3,1)	6,3	6,3
<i>C. albicans</i> (SC 5314)	3,1	(3,1)	3,1	(3,1)	6,3	(6,3-12,5)	3,1	(3,1)	6,3	6,3

Die wachstumshemmende und mikrobizide Aktivität wurde mit einem Mikrosuszeptibilitätstest bestimmt. Die Aktivität gegen Meeresbakterien sowie die Aktivität der Vergleichspeptide wurden nur bei pH 7,4 getestet. Die MIC-Werte repräsentieren den Median aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Duplikaten und mit einer Divergenz von nicht mehr als einer Verdünnungsstufe. MIC, *Minimal Inhibitory Concentration*; MLC, *Minimal Lethal Concentration*; >, keine Inhibition des Wachstums bei angegebener Konzentration

4.7.2 Test auf Membranpermeabilisierung mit SYTOX Green

Um den Wirkmechanismus der Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 bei der Tötung von Bakterien zu untersuchen, wurden *B. megaterium* und der nicht membranpermeable Fluoreszenzfarbstoff SYTOX Green verwendet. Sobald der Farbstoff aufgrund von Membranschädigungen in die Zellen gelangt, interkaliert er mit der DNA, was zur Verstärkung seiner Fluoreszenz führt.

A



B

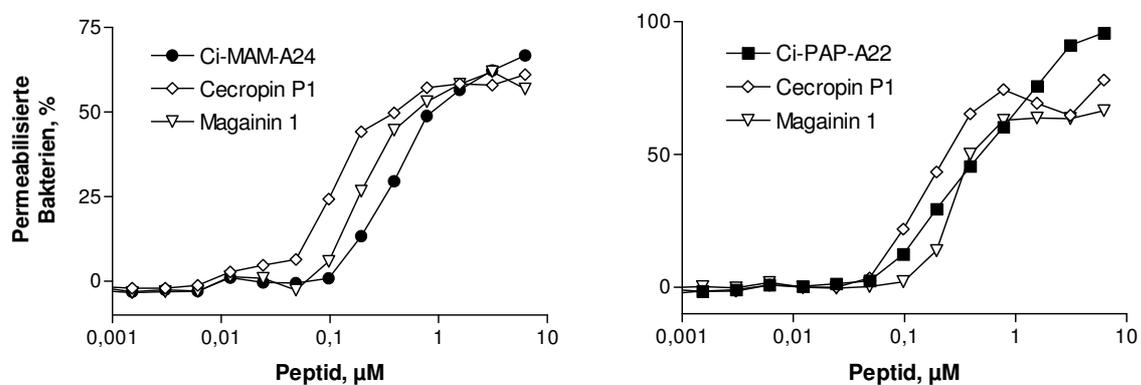


Abb. 8: Membranpermeabilisierung bei *B. megaterium* induziert durch Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22. Die Membranschädigung wurde indirekt über den DNA-bindenden Farbstoff SYTOX Green bei pH 7,4 gemessen. Die antibakterielle Aktivität der Peptide wird als Prozent permeabilisierter Bakterien ausgedrückt. (A) Zeitkinetik der Membranpermeabilisierung hervorgerufen durch unterschiedliche Konzentrationen von Ci-MAM-A24 bzw. Ci-PAP-A22 zu verschiedenen Zeitpunkten. (B) Vergleich der membranpermeabilisierenden Wirkung von Ci-MAM-A24 bzw. Ci-PAP-A22 jeweils mit Cecropin P1 und Magainin 1 nach 10 min Inkubation von *B. megaterium* mit jedem der Peptide bei verschiedenen Konzentrationen. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Mit diesem Test konnte zunächst bestätigt werden, dass die beiden synthetischen Peptide starke Aktivität gegen *B. megaterium* aufwiesen. Insbesondere wurde aber gezeigt, dass dabei die zytoplasmatische Membran der Bakterien schon bei niedrigen Peptidkonzentrationen und innerhalb kürzester Zeit permeabilisiert wurde (Abb. 8 A). Dabei war zu beobachten, dass Ci-MAM-A24 bereits nach zwei Minuten seine maximale Kapazität der Membranpermeabilisierung erreicht hatte, während die durch Ci-PAP-A22 verursachte Schädigung der Membranen zunächst weniger stark war und im weiteren Zeitverlauf bis 40 min nach Zugabe der Bakterien zum Peptid kontinuierlich zunahm (Abb. 8 A). Weiterhin war die Effektivität, mit der die *Ciona*-Peptide die Membranschädigungen hervorriefen, vergleichbar mit der von Cecropin P1 und Magainin 1 (Abb. 8 B). Gemäß den Graphen in Abb. 8 erreicht die durch die Peptide hervorgerufene Anzahl permeabilisierter Bakterien selten 100 %. Dies liegt vermutlich daran, dass die positiv geladenen Peptide nach dem Eindringen in die Zelle mit dem Farbstoff SYTOX Green um die Bindungsstellen an der negativ geladenen DNA konkurrieren. SYTOX Green wird mit fortschreitender Zeit zunehmend verdrängt und die Fluoreszenz nimmt besonders bei hohen Peptidkonzentrationen kontinuierlich ab, obwohl die Membranschädigung eigentlich zunehmen sollte (Gelhaus *et al.*, 2008). Dieses Phänomen gilt insbesondere für Ci-MAM-A24, Cecropin P1 und Magainin 1, weniger für Ci-PAP-A22.

4.7.3 Test auf Membranpermeabilisierung mit *E. coli* ML-35p

Mit einem weiteren Test zur Membranpermeabilisierung konnte der Mechanismus der Lyse gramnegativer Bakterien detaillierter untersucht werden. Hierzu wurde der Permease-defiziente Stamm *E. coli* ML-35p benutzt, der eine zytosolische β -Galaktosidase und eine auf einem Plasmid codierte periplasmatische β -Laktamase besitzt. Durch die Registrierung der Aktivität dieser Enzyme nach Zugabe eines membranschädigenden Peptids, konnte zwischen der zeitabhängigen Permeabilisierung der äußeren und der inneren Membran unterschieden werden. Die Kinetik der Membranpermeabilisierung zeigte, dass sowohl Ci-MAM-A24 als auch Ci-PAP-A22 die Barrierefunktion beider Membranen beeinträchtigten (Abb. 9). Die Effektivität der Schädigung der äußeren Bakterienmembran durch Ci-MAM-A24 lag zwischen der von Cecropin P1 und Magainin 1. Dagegen wurde die innere Membran am stärksten durch Ci-MAM-A24 permeabilisiert (Abb. 9). Sowohl die Schädigung der inneren als auch der äußeren Membran durch Ci-PAP-A22 war deutlich schwächer als durch Ci-MAM-A24 und die Wirkung vergleichbar mit der von Magainin 1 (Abb. 9).

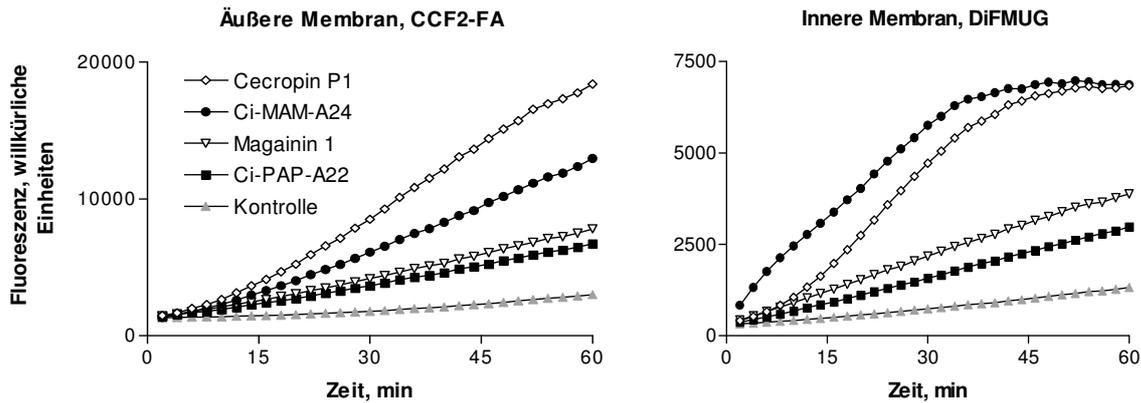


Abb. 9: Permeabilisierung der äußeren und inneren Membran von *E. coli* ML-35p induziert durch Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22. Die Permeabilisierung der äußeren und der inneren Membran wurde über die fluoreszierenden Substrate für die β -Laktamase (CCF2-FA) bzw. β -Galaktosidase (DiFMUG) über einen Zeitraum von 60 min bei pH 7,4 registriert. Als Kontrolle wurden die Bakterien unter identischen Bedingungen aber in der Abwesenheit der Peptide inkubiert. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

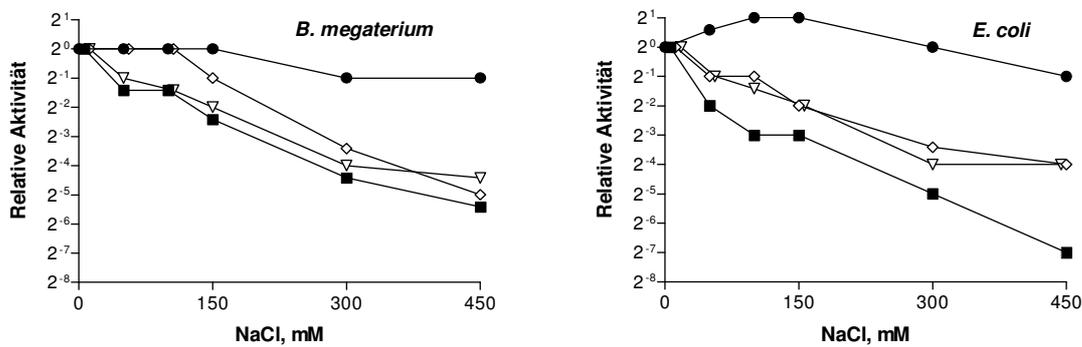
4.8 Effekt von Salz auf die antibakterielle Aktivität von Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22

4.8.1 Mikrosuszeptibilitätstest mit Salz

Im Hinblick auf den möglichen Einsatz der synthetischen Peptide als alternative Therapeutika bei der Behandlung von Infektionskrankheiten schien es wichtig, die antimikrobielle Aktivität von Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 auch unter menschlichen physiologischen Bedingungen zu testen. Besonders kritisch für die Aktivität ist hier in der Regel die Gegenwart von 0,9 % bzw. ~ 150 mM NaCl. Da *C. intestinalis* osmokonform im Meerwasser lebt, war es aus biologischer Sicht außerdem interessant die Aktivität der Peptide bei noch höheren Salzkonzentrationen zu bestimmen. Im Mikrosuszeptibilitätstest bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen stellte sich die Aktivität von Ci-MAM-A24 als ungewöhnlich salzresistent heraus. Bei menschlicher physiologischer Salzkonzentration konnte keine Verringerung der Aktivität des Peptids gegen *B. megaterium* und *E. coli* festgestellt werden (Abb. 10 A). Interessanterweise wurde *E. coli* sogar effektiver getötet, wenn der Puffer 50, 100 oder 150 mM NaCl enthielt. Bei einer Salzkonzentration von 450 mM zeigte das Peptide immer noch 50 % der Aktivität im Vergleich zu den Standardbedingungen ohne zusätzliches Salz (Abb. 10 A). Im Gegensatz dazu nahm die Aktivität von Ci-PAP-A22 gegen *B. megaterium* und insbesondere gegen *E. coli* mit steigenden Salzkonzentrationen drastisch ab (Abb. 10 A). Der Effekt war bei Ci-PAP-A22 sogar noch etwas ausgeprägter zu beobachten als bei den Vergleichspeptiden Magainin 1

und Cecropin P1. Vergleicht man nicht die relative Abnahme der Aktivität, sondern die zur Wachstumshemmung benötigte Konzentration der Peptide bei den unterschiedlichen Salzkonzentrationen miteinander, ergibt sich ein leicht verändertes Bild (Abb. 10 B). So wurden von Ci-PAP-A22 deutlich geringere Konzentrationen benötigt als von Magainin 1 und zumindest gegen *B. megaterium* vergleichbare Mengen wie von Cecropin P1. Die von Ci-MAM-A24 benötigte Peptidmenge gegen *B. megaterium* und *E. coli* war bei allen Salzkonzentrationen extrem gering, ebenso wie die von Cecropin P1 gegen *E. coli* (Abb. 10 B).

A



B

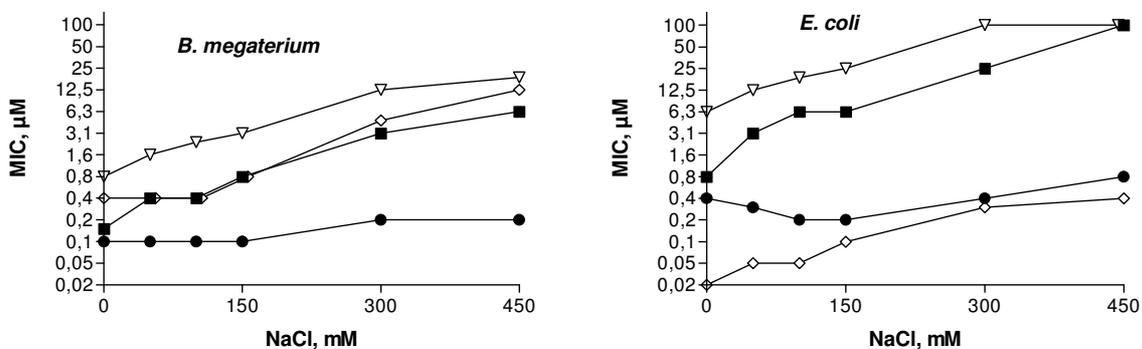


Abb. 10: Effekt von Salz auf die antimikrobielle Aktivität von Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22. Die Aktivitäten von Ci-MAM-A24 (schwarze Kreise) und Ci-PAP-A22 (schwarze Quadrate) wurden mit denen von Cecropin P1 (weiße Rhomben) und Magainin 1 (weiße Dreiecke) verglichen. Die Daten stammen aus Mikrosuszeptibilitätstests mit *B. megaterium* und *E. coli* als Zielzellen und wurden bei pH 7,4 mit 0, 50, 100, 150, 300 und 450 mM NaCl durchgeführt. (A) Die y-Werte spiegeln den Median der relativen Aktivität aus mindestens zwei Experimenten wider, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden. Die in Puffer ohne NaCl gemessene relative Aktivität wurde 1 (2⁰) gesetzt. (B) Die y-Werte beschreiben den Median der minimalen inhibitorischen Konzentration in μM aus dem jeweils selben Experiment wie (A).

4.8.2 Test auf Membranpermeabilisierung mit SYTOX Green und Salz

Die bemerkenswert salzresistente antibakterielle Aktivität von Ci-MAM-A24 sollte mit einem Test zur Wirkweise des Peptids in Gegenwart von Salz genauer untersucht werden. Bei dem Versuch, diesen Test mit dem *E. coli*-Stamm ML-35p durchzuführen, wurde festgestellt, dass die Aktivität der Enzyme β -Galaktosidase und β -Laktamase durch eine erhöhte NaCl-Konzentration im Puffer stark gehemmt wurde. Deshalb wurde der enzymunabhängige Test auf Membranpermeabilisierung mit SYTOX Green für die genauere Analyse der salzresistenten Aktivität von Ci-MAM-A24 gewählt. Der SYTOX Green Test wird standardmäßig mit 25 mM NaCl im Puffer durchgeführt. Zur Überprüfung der Salzresistenz wurde ein Parallelansatz mit 150 mM NaCl im Puffer angesetzt. Im starken Kontrast zu den Kontrollpeptiden Magainin 1 und Cecropin P1 konnte keine Abnahme der membranpermeabilisierenden Aktivität von Ci-MAM-A24 bei erhöhter Salzkonzentration beobachtet werden (Abb. 11).

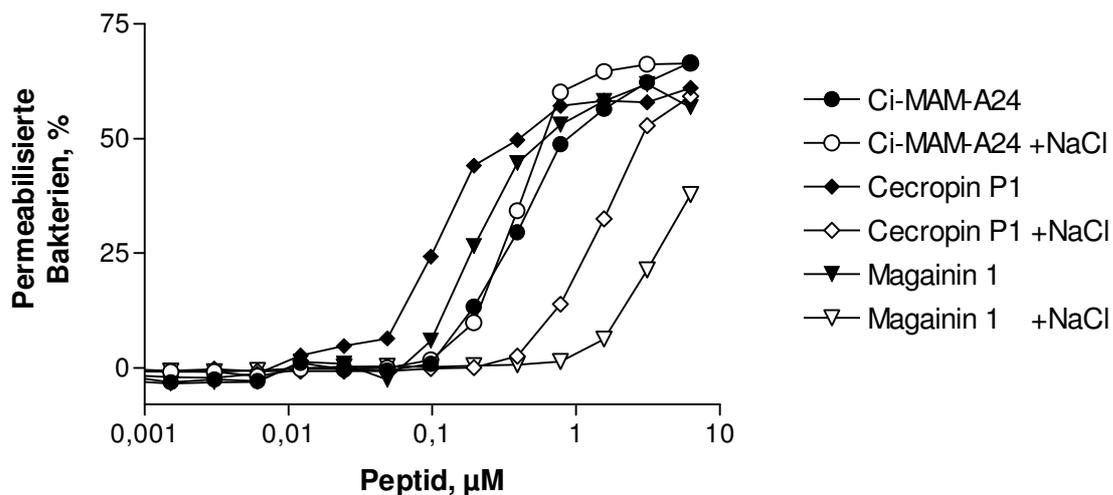


Abb. 11: Effekt von Salz auf die membranpermeabilisierende Wirkung von Ci-MAM-A24. Die Effizienz der Membranpermeabilisierung unter Standardbedingungen von 25 mM NaCl (schwarze Symbole) und in Gegenwart von 150 mM NaCl (weiße Symbole) wird verglichen nach 10 min Inkubation von *B. megaterium* mit verschiedenen Konzentrationen der Peptide Ci-MAM-A24, Cecropin P1 und Magainin 1. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

4.9 Test auf hämolytische Aktivität

Die hämolytische Aktivität von Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 wurde gegen Erythrozyten von Schafen und Menschen getestet. Von den Vergleichspeptiden Cecropin P1, Magainin 1 und der Positiv-Kontrolle Melittin, ein antimikrobielles und zytolytisches Peptid aus dem Gift der Biene (*A. mellifera*), wurden maximale Konzentrationen von 12,5 µM eingesetzt. Nur Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 wurden außerdem in sehr hohen Konzentrationen von bis zu

100 μM getestet. Während Ci-PAP-A22 auch bei der maximal eingesetzten Menge von 100 μM keine hämolytische Aktivität zeigte, wurden durch Ci-MAM-A24 sowohl Schafs- als auch insbesondere humane Erythrozyten bei sehr hohen Konzentrationen des Peptids teilweise lysiert. Schafserthrozyten wurden bei einer Peptidkonzentration von 25 μM zu 2 % und bei 100 μM zu 13 % lysiert. Humane Erythrozyten wurden bereits bei einer Peptidkonzentration von 12,5 μM zu 5 % und bei 100 μM zu 58 % lysiert. Cecropin P1 und Magainin 1 zeigten bis zur maximal eingesetzten Konzentration von 12,5 μM keine hämolytische Aktivität, während Melittin bei dieser Konzentration nahezu alle Erythrozyten lysierte.

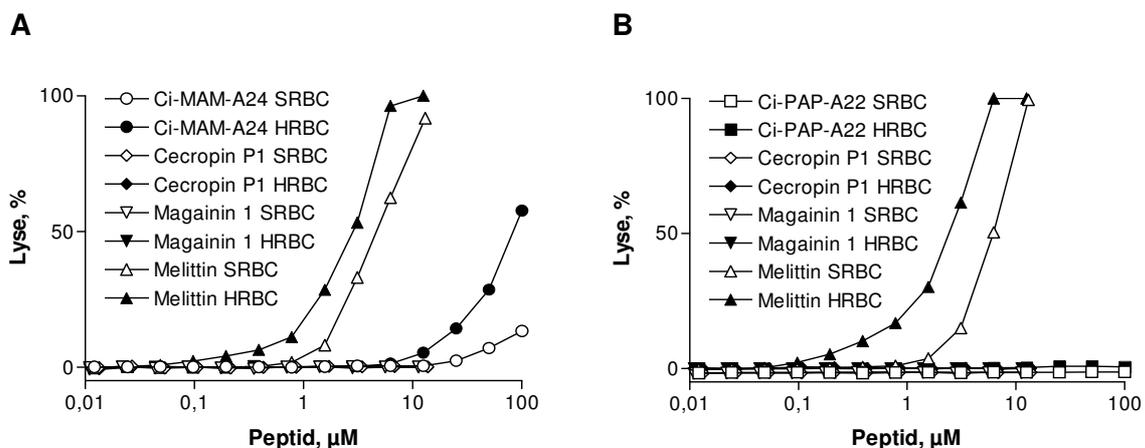


Abb. 12: Hämolytische Aktivität von Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22. Die Aktivität von Ci-MAM-A24 (A) und Ci-PAP-A22 (B) wurde im Vergleich mit anderen Peptiden gegen Schafs- (SRBC; *Sheep Red Blood Cells*, weiße Symbole) und humane Erythrozyten (HRBC; *Human Red Blood Cells*, schwarze Symbole) bestimmt. Alle Vergleichspeptide wurden in verschiedenen Konzentrationen bis 12,5 μM getestet. Von Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 wurden Konzentrationen bis zu 100 μM eingesetzt. Melittin diente als Positiv-Kontrolle. Die Datenpunkte repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden.

4.10 Liposomendepolarisationstest

Zur weiteren Charakterisierung der Wirkmechanismen der *Ciona*-Peptide wurde deren porenbildende Aktivität mithilfe eines minimalistischen Membransystems untersucht. Hierfür wurden multilamellare Lipidvesikel aus Azolektin verwendet, einer groben Mischung aus Phospholipiden der Sojabohne. Die durch die Peptide induzierte Depolarisation dieser Liposomen wurde bestimmt. Bei beiden getesteten pH-Werten zeigten die *Ciona*-Peptide nur schwache porenbildende Aktivität im Vergleich zu Alamethicin, dem Prototyp eines porenbildenden Peptids, das als Positiv-Kontrolle eingesetzt wurde (Abb. 13). Trotzdem war die Aktivität von Ci-MAM-A24 mit 16 (pH 5,2) bzw. 20 U/nmol (pH 7,4) deutlich höher als die der anderen getesteten antimikrobiellen Peptide Ci-PAP-A22, Cecropin P1 und Magainin 1, deren Aktivitäten sich ungefähr zwischen 3 und 7 U/nmol bewegten (Abb. 13).

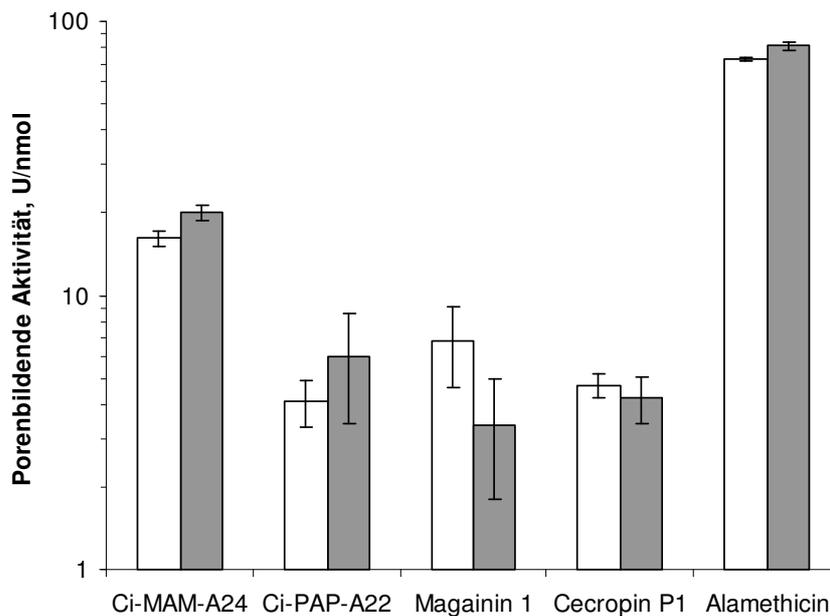


Abb. 13: Porenbildende Aktivität von Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22. Die Aktivitäten wurden als die durch Ci-MAM-A24, Ci-PAP-A22 und Kontrollpeptide hervorgerufene Liposomendepolarisation unter Verwendung von Azolektinvesikeln gemessen. Die Ableitung eines durch Valinomycin induzierten Diffusionspotentials wurde über einen Zeitraum von einer Minute nach der Zugabe des jeweiligen Peptids erfasst (Kapitel 3.26.5.2). Die Versuche wurden bei einem pH-Wert von 5,2 (weiße Balken) und 7,4 (graue Balken) durchgeführt. Die Balken und Klammern repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Man beachte die logarithmische Skalierung der y-Achse.

4.11 Versuche zur Reinigung der natürlichen Peptide Ci-MAM-A und Ci-PAP-A

Die mit einem C-terminalen Cysteinrest versehenen Varianten der synthetischen Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 wurden an KLH gekoppelt und als Antigene zur Generierung von spezifischen polyklonalen Antikörpern in Kaninchen verwendet. Die Spezifität der erhaltenen Antiseren wurde mittels Western-Blot-Analyse und ELISA verifiziert (Daten nicht gezeigt). Vor der Verwendung der Antiseren wurden diese generell mit KLH inkubiert. Dies diente dazu, Reaktivität auszuschließen, die auf Antikörper zurückzuführen ist, die gegen KLH gerichtet sind und deshalb Hämocyanin-ähnliche Proteine von *C. intestinalis* erkennen (Immesberger und Burmester, 2004).

Ausgangspunkt für die Suche nach den natürlichen Peptiden Ci-MAM-A und Ci-PAP-A war die Hämolymphe von *C. intestinalis*, die durch Zentrifugation zunächst in Hämozyten und zellfreie Hämolymphe getrennt wurde. Von beiden Fraktionen wurden saure Extrakte hergestellt, die direkt und nach jedem folgenden Reinigungsschritt mittels Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von Ci-MAM-A und Ci-PAP-A überprüft wurden. Bei den Reinigungsschritten handelte es sich um die grobe Fraktionierung über eine hydrophobe

Matrix (Sep-Pak tC18-Säule) durch Elution mit unterschiedlichen ACN-Konzentrationen, die Trennung über Molekulargewichtsausschluß mittels Mikrokonzentratoren (Centricon™, 30 kDa *cut off*), Kationenaustauschchromatographie mit Vivapure S Mini H Säulen und Affinitätschromatographie mit HiTrap™ NHS-aktivierten HP Säulen, an die die für das jeweilige Peptid spezifischen Antikörper gekoppelt waren. Eluate der Affinitätschromatographie wurden entweder direkt oder nach der Reinigung über HPLC für eine Western-Blot-Analyse verwendet. Zudem wurden erhaltene Fraktionen nach Affinitätschromatographie und HPLC mittels Massenspektrometrie kontrolliert.

Grundsätzlich wurden alle Fraktionen auf die Anwesenheit von Ci-MAM-A und Ci-PAP-A überprüft, d. h. selbst diejenigen, in denen die natürlichen Peptide eigentlich nicht zu erwarten gewesen wären wie z. B. die Fraktionen von Proteinen mit einem Molekulargewicht >30 kDa nach der Trennung mittels Mikrokonzentratoren. Das Rücklösen gefriergetrockneter Fraktionen nach der sauren Extraktion oder nach den verschiedenen Reinigungsschritten führte regelmäßig dazu, dass ein gewisser Anteil unlöslicher Proteine ausfiel. Diese wurden jeweils in 8 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 7,8 gelöst und ebenfalls mittels Western-Blot analysiert. Aufgrund der erwarteten positiven Ladung und des unbekanntem Migrationsverhaltens der natürlichen Peptide Ci-MAM-A und Ci-PAP-A während des Transfers bei der Western-Blot-Analyse wurde in der Regel jeweils eine Membran kathoden- und anodenseits des Gels positioniert. Außerdem wurde sowohl der verwendete Transferpuffer (CAPS/MeOH oder Kathodenpuffer/MeOH) als auch die Transfermembran (PVDF oder Nitrocellulose) variiert. Als Alternative zur Western-Blot-Analyse wurden mit einigen Fraktionen ELISA- und Dot-Blot-Analysen durchgeführt.

Maximal wurde für Western-Blot-Analysen vorfraktionierter Proteinextrakt in einer Menge entsprechend den Hämozyten von 36 Individuen pro Spur auf ein SDS-Gel aufgetragen. Neben der sauren Extraktion wurden Hämozyten auch direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen, der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen und einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

Die Spezifität positiver Signale im Western-Blot wurde durch Vorinkubation des Antiserums mit dem entsprechenden synthetischen Peptid Ci-MAM-A24 oder Ci-PAP-A22 überprüft. Wäre das Signal daraufhin deutlich schwächer als bei dem mit KLH vorinkubierten Antiserum ausgefallen, dann hätten die entsprechenden Fraktionen einer weiteren Analyse unterzogen werden sollen. Ferner wurde routinemäßig auf Kreuzreaktivität des zweiten Antikörpers hin untersucht, die mehrfach festgestellt wurde. Trotz der intensiven Suche in Extrakten von zellfreier Hämolymphe und Hämozyten mit den vorangehend erwähnten Verfahren konnte weder das natürliche Peptid Ci-MAM-A noch Ci-PAP-A mit den jeweils spezifischen Antiseren nachgewiesen und gereinigt werden.

4.12 Immunlokalisation von natürlichem Ci-MAM-A und Ci-PAP-A

Die spezifischen Antiseren gegen Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 wurden genutzt, um immunozytochemische Analysen an fixierten Hämocyten aus *C. intestinalis* durchzuführen. Für den Nachweis des gebundenen ersten Antikörpers wurde ein zweiter Antikörper verwendet, an den entweder der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 gekoppelt war oder eine Meerrettich-Peroxidase, die DAB als Substrat umsetzen und so eine Farbreaktion hervorrufen kann. Durch den Vergleich der beiden alternativen Methoden konnten unerwünschte Effekte der Autofluoreszenz oder endogener Peroxidaseaktivität leicht erkannt und ignoriert werden. Auf diese Weise konnten sowohl das natürliche Peptid Ci-MAM-A als auch Ci-PAP-A in derselben Unterpopulation von Hämocyten von *C. intestinalis* nachgewiesen werden. Gemäß unterschiedlichen Klassifizierungen, eingeführt von Rowley (1981) und Parrinello *et al.* (1996), gehören die für Ci-MAM-A und Ci-PAP-A positiven Zellen der Population der *compartment cells* bzw. *univacuolar refractile granulocytes* (URGs) an. Diese Zellen sind dadurch charakterisiert, dass sie nur ein großes Kompartiment aufweisen, das nahezu die gesamte Zelle ausfüllen kann und häufig einen einzelnen markanten und stark lichtbrechenden Einschluss enthält. Um innerhalb dieses Zelltyps zwischen Zellen mit und ohne Einschluss zu differenzieren, wurde in dieser Arbeit der Begriff *univacuolar non-refractile granulocytes* (UNRGs) für Zellen ohne Granulum eingeführt. Rowley (1981) unterscheidet bei den *compartment cells* nicht zwischen granulär (URG) und agranulär (UNRG) sondern unterteilt diese in kleine ($6,4 \pm 0,9 \mu\text{m} \times 5,7 \pm 0,8 \mu\text{m}$) und große ($10,3 \pm 1,4 \mu\text{m} \times 9,8 \pm 1,4 \mu\text{m}$) Zellen.

Die immunozytochemischen Analysen ergaben, dass Ci-MAM-A nur bei einer Teilpopulation von kleinen UNRGs und ausschließlich innerhalb des Kompartiments dieser Zellen vorhanden war (Abb. 14 A–D). Dagegen war Ci-PAP-A entweder im Zytoplasma von UNRGs nachweisbar oder das Granulum innerhalb des Kompartimentes von URGs war positiv für das Peptid. Auch hier wies jeweils nur eine Teilpopulation der beiden Granulozyten-Typen das Peptid auf (Abb. 15 A–C). Die Bildabfolge in Abb. 16 suggeriert den Verlauf von der Synthese über die Speicherung bis hin zur möglichen Sekretion von Ci-PAP-A.

Wie auch bei den vorangegangenen Anwendungen der Antiseren wurden diese vor Gebrauch mit KLH inkubiert. Außerdem wurden die Antiseren für einen weiteren Kontrollansatz vor dem Einsatz in der Immunozytochemie mit dem synthetischen Peptid Ci-MAM-A24 bzw. Ci-PAP-A22 inkubiert. Dies führte in beiden Fällen dazu, dass keine spezifischen Signale zu sehen waren (Daten nicht gezeigt). Bei der Verwendung der beiden entsprechenden Präimmunseren waren ebenfalls keine Signale zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

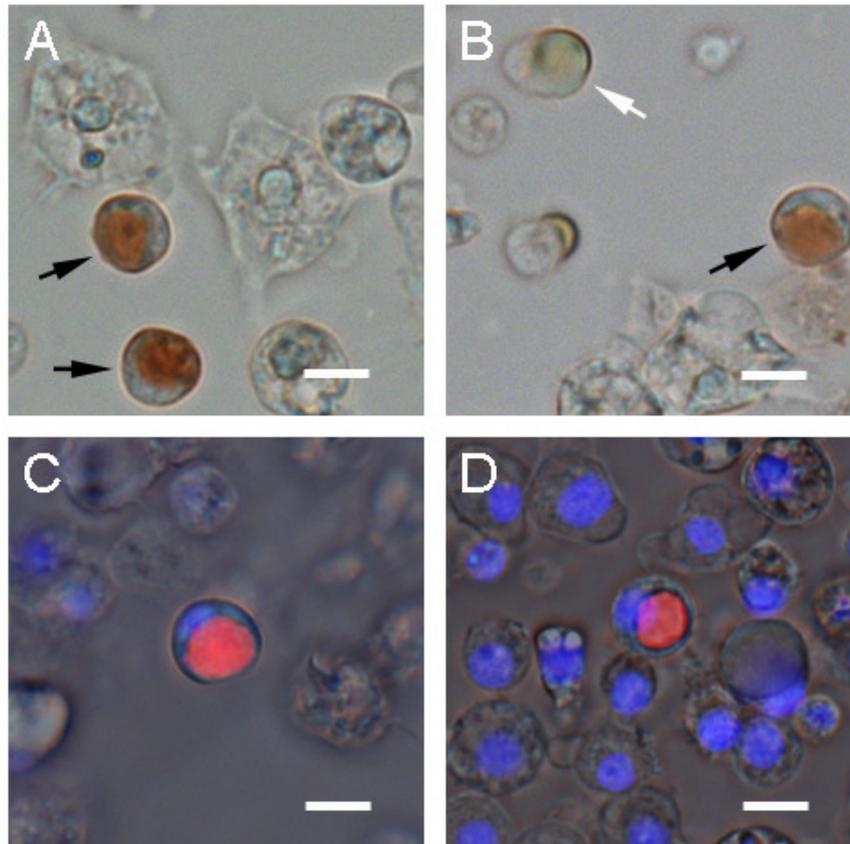


Abb. 14: Immunocytochemischer Nachweis von Ci-MAM-A in kleinen UNRGs. Für die Immunlokalisation wurde ein mit Ci-MAM-A24 als Antigen entwickeltes Antiserum eingesetzt. (A, B) Ci-MAM-A wurde mit dem spezifischen und einem sekundären Antikörper detektiert, der an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Die Immunreaktion wurde mit DAB als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase sichtbar gemacht, was zu einem braunen Niederschlag führte. Das Peptid wurde ausschließlich innerhalb des Kompartiments kleiner UNRGs nachgewiesen. Neben drei für Ci-MAM-A positiven UNRGs (schwarze Pfeile) ist eine für Ci-MAM-A negative URG (weißer Pfeil) zu sehen. Die stark lichtbrechenden Einschlüsse ungefärbter URGs zeigen hier einen grünlichen Schimmer. (C, D) Alternativ wurde der anti-Ci-MAM-A24 Antikörper mit einem zweiten Antikörper detektiert, der an Cy3 gekoppelt war (rot). Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde Hoechst 33258 verwendet (blau). Der Längenmaßstab entspricht jeweils 5 μm .

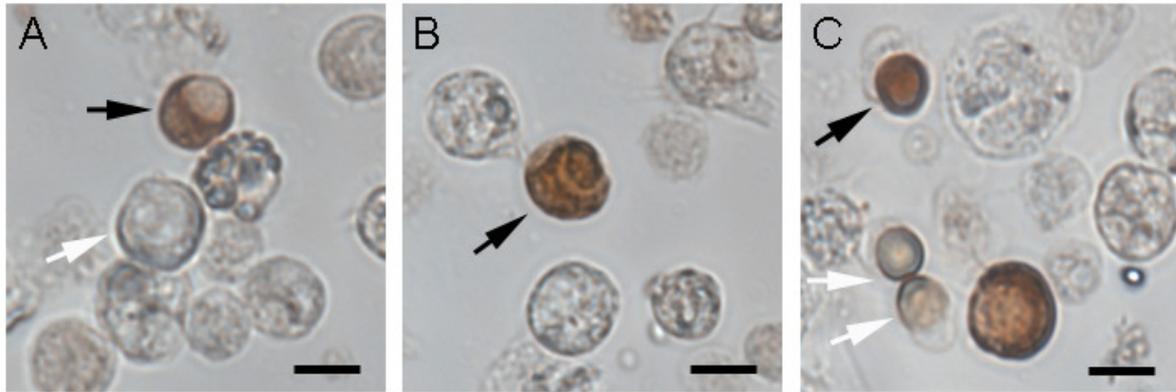


Abb. 15: Immunocytochemischer Nachweis von Ci-PAP-A in kleinen URGs und UNRGs. Für die Immunlokalisation wurde ein mit Ci-PAP-A22 als Antigen entwickeltes Antiserum eingesetzt. Ci-PAP-A wurde mit dem spezifischen und einem zweiten Antikörper detektiert, der an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt war. Die Immunreaktion wurde mit DAB als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase sichtbar gemacht, was zu einem braunen Niederschlag führte. (A) Zwei UNRGs sind durch Pfeile gekennzeichnet. Während das Zytoplasma der oberen Zelle für Ci-PAP-A positiv ist (schwarzer Pfeil), bleibt das Zytoplasma der unteren Zelle ungefärbt (weißer Pfeil). (B) Es ist eine für Ci-PAP-A positive Zelle zu sehen, bei der sowohl das Zytoplasma als auch der Einschluss innerhalb des Kompartiments gefärbt ist. (C) Neben einer für Ci-PAP-A positiven URG (schwarzer Pfeil) sind zwei für Ci-PAP-A negative Zellen desselben Typs zu sehen (weiße Pfeile). Die stark lichtbrechenden Einschlüsse der ungefärbten URGs zeigen hier eine graue bis leicht gelbbraune Farbe. Der Längenmaßstab entspricht jeweils 5 µm.

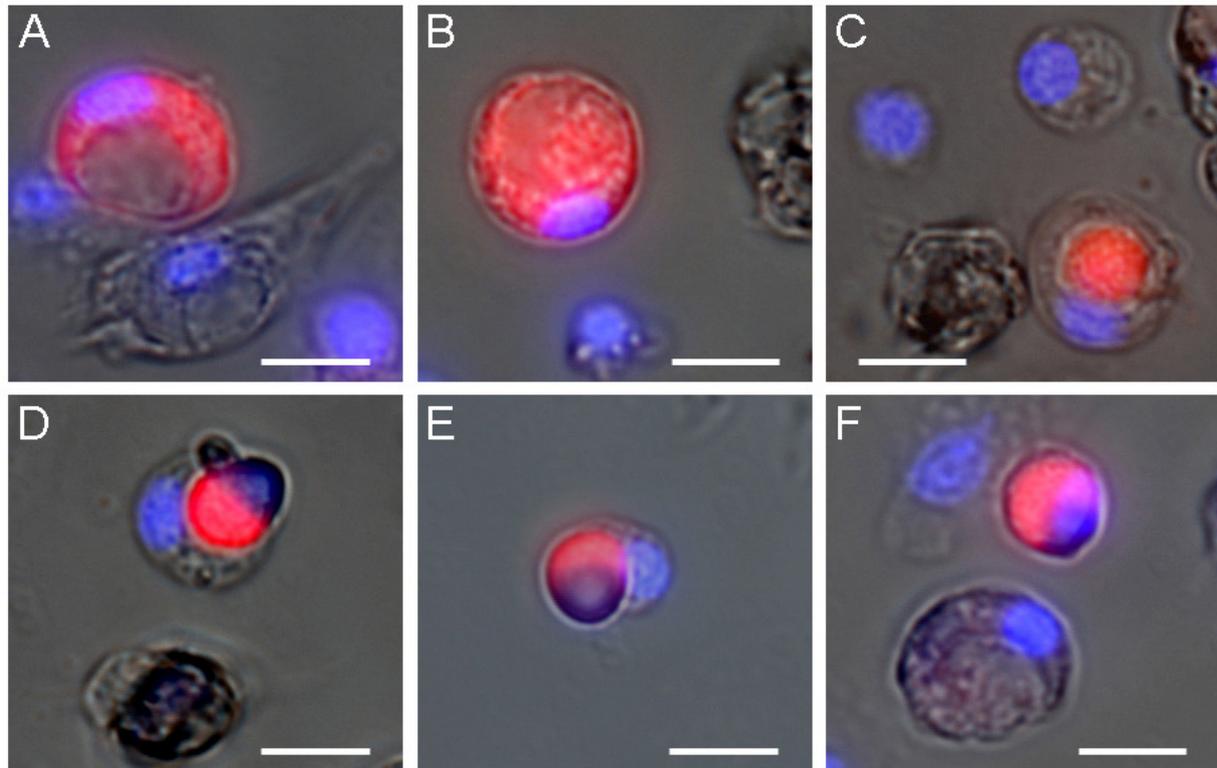


Abb. 16: Immunocytochemischer Nachweis von Ci-PAP-A in möglicherweise unterschiedlichen Differenzierungsstadien von UNRGs und URGs. Für die Immunlokalisation wurde ein mit Ci-PAP-A22 als Antigen entwickeltes Antiserum eingesetzt. Ci-PAP-A wurde mit dem spezifischen und einem zweiten Antikörper detektiert, der an Cy3 gekoppelt war (rot). Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurde Hoechst 33258 verwendet (blau). (A) Das Peptid befindet sich im Zytoplasma der Zelle. (B) Das Peptid ist sowohl im Zytoplasma als auch in dem Kompartiment der Zelle nachweisbar. (C) Das Peptid akkumuliert ausschließlich innerhalb des Kompartiments der Zelle. (D, E) Deformierte Zellen mit großen für Ci-PAP-A positiven Einschlüssen und besonders in (E) mit nur wenig sichtbarem Zytoplasma. (F) Der für Ci-PAP-A positive Einschluß füllt nahezu die gesamte Zelle aus. Der Längenmaßstab entspricht jeweils 5 μm .

4.13 *In situ* Hybridisierung

Als Bestätigung der Ergebnisse der immunocytochemischen Analysen wurde mit der *in situ* Hybridisierung eine grundlegend andere Technik angewendet, mit der sich nicht das immunreaktive Peptid, sondern das Transkript des entsprechenden Gens nachweisen lässt. Die *in situ* Hybridisierung wurde an Schnitten von Mägen durchgeführt, da dieses Gewebe bei *Ciona* dafür bekannt ist, dass sich in dessen Peripherie besonders viele Hämozyten ansammeln (Marino *et al.*, 2002). Auf diese Weise konnte sowohl das Transkript von *Ci-mam-A* als auch von *Ci-pap-A* in Hämozyten nachgewiesen werden (Abb. 17).

Das Färbungsmuster war dasselbe wie bei der immunocytochemischen Analyse, allerdings beschränkt auf das Zytoplasma der Zellen (Abb. 17). Wiederum waren Teilpopulationen von univakuolären Granulozyten positiv für das Transkript von *Ci-mam-A* bzw. *Ci-pap-A*

(Abb. 17). Eine eindeutige Unterscheidung zwischen Zellen mit und ohne stark lichtbrechenden Granula ist in den Gewebeschnitten nicht immer möglich.

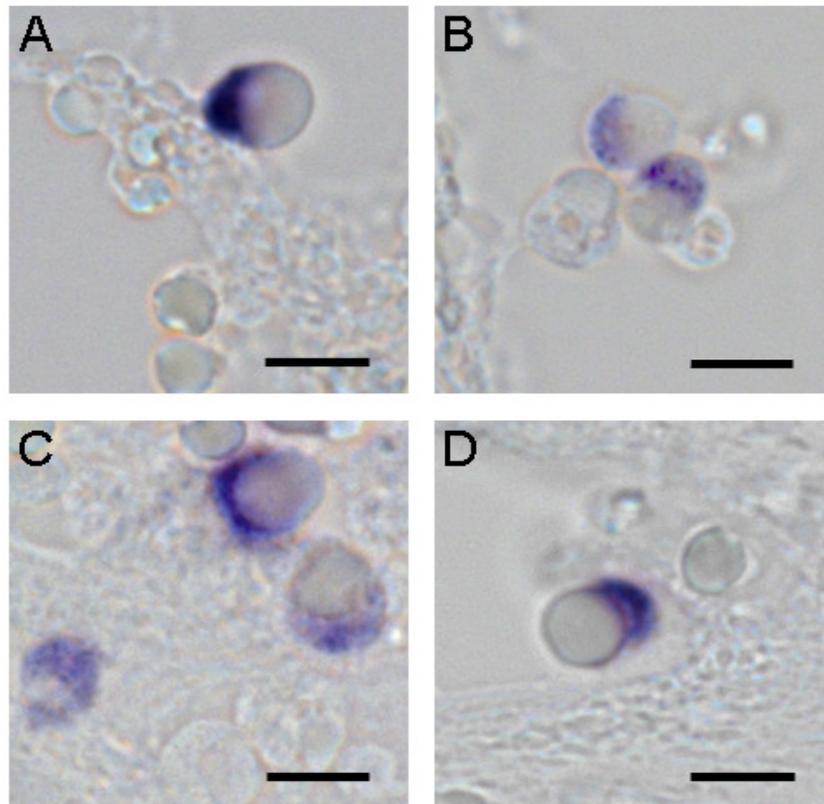


Abb. 17: Nachweis der Transkripte von *Ci-mam-A* und *Ci-pap-A* in univakuolären Granulozyten durch *in situ* Hybridisierung an Magenschnitten. Hybridisierte mit DIG UTP markierte RNA-Sonden wurden mit einem an Alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper nachgewiesen. Als Substrat diente NBT/BCIP. Dies führte in Zellen, bei denen eine Hybridisierung der Sonde erfolgt war, zu einem blauen bis violetten Niederschlag. Die Färbung beschränkte sich sowohl bei Sonden spezifisch für das Transkript von *Ci-mam-A* (A, B), als auch bei Sonden spezifisch für das Transkript von *Ci-pap-A* (C, D) auf das Zytoplasma von univakuolären Granulozyten. Der Längenmaßstab entspricht jeweils 5 μm . Man beachte, dass die Hämozyten in Magenschnitten nach der Prozedur der *in situ* Hybridisierung etwas geschrumpft sind.

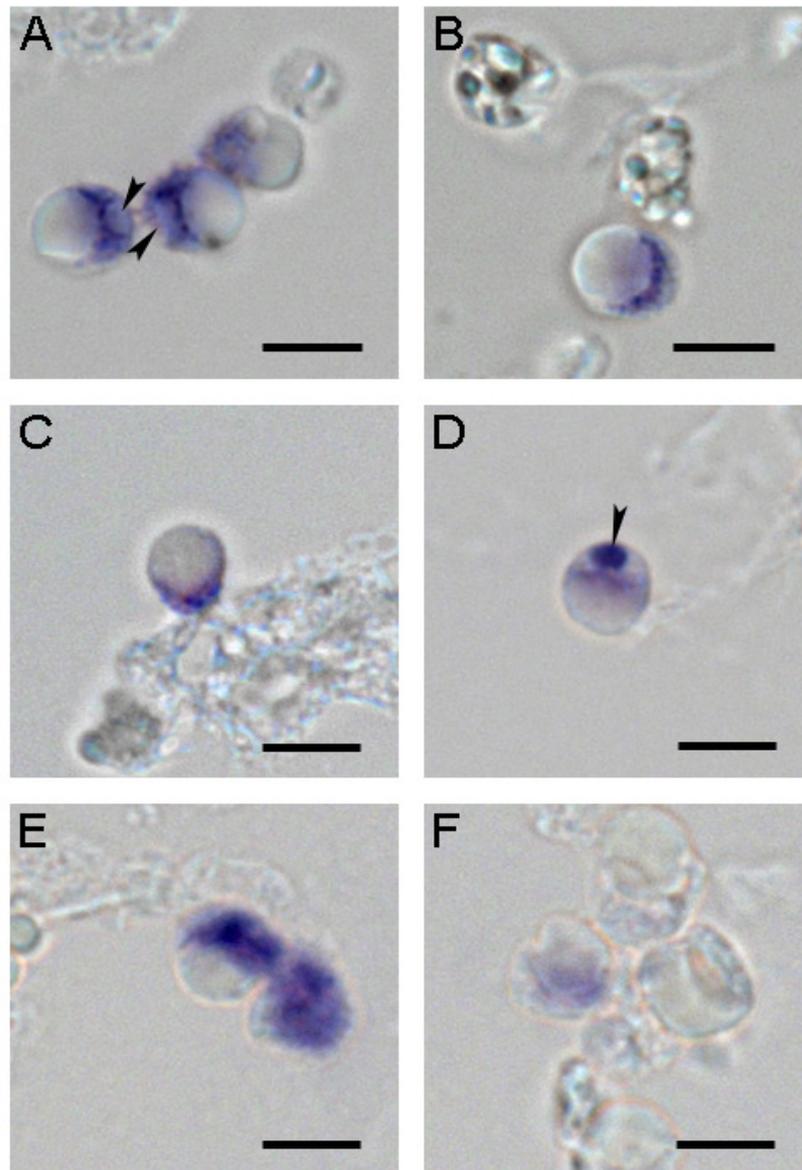


Abb. 18: Nachweis der Transkripte von *Ci-mam-D*, *-F* und *-G* in univakuolären Granulozyten durch *in situ* Hybridisierung an Magenschnitten. (A, B) Bei Zellen, die positiv für das Transkript von *Ci-mam-D* waren, beschränkte sich die Färbung ausschließlich auf das Zytoplasma von univakuolären Granulozyten. (A) Teilweise ist neben der großen Vakuole auch der Kern als nicht gefärbter Bereich im Zytoplasma der Zellen zu erkennen (Pfeile). (C, D) Bei univakuolären Granulozyten, die positiv für das Transkript von *Ci-mam-F* waren, konnten neben Zellen mit einer Färbung des Zytoplasmas (C) auch solche nachgewiesen werden, bei denen das Transkript offensichtlich im Kern zurückgehalten wurde (Pfeil) und nur zu einem geringeren Teil im Zytoplasma zu finden war (D). (E, F) Bei den Zellen, die positiv für das Transkript von *Ci-mam-G* waren, handelte es sich ebenfalls um univakuoläre Granulozyten. Der Längenmaßstab entspricht jeweils 5 µm. Man beachte, dass die Hämazyten in Magenschnitten nach der Prozedur der *in situ* Hybridisierung etwas geschrumpft sind.

Für drei weitere Mitglieder der *Ci-mam*-Genfamilie (*Ci-mam-D*, *-F* und *-G*) konnte mit dieser Methode ebenfalls eine Expression in univakuolären Granulozyten nachgewiesen werden (Abb. 18 A-F). Bei einigen univakuolären Granulozyten, die positiv für das Transkript von *Ci-mam-D* waren, setzte sich der Zellkern deutlich als nicht gefärbter Bereich innerhalb des

Zytoplasmas ab (Abb. 18 A). Unter den univakuolären Granulozyten, die positiv für das Transkript von *Ci-mam-F* waren, konnten dagegen Zellen identifiziert werden, bei denen das Transkript offensichtlich im Zellkern zurückgehalten wurde (Abb. 18 D). Die Transkripte der Gene *Ci-mam-B*, *-C*, *-E* und *Ci-pap-C* konnten über die *in situ* Hybridisierung an Magenschnitten nicht nachgewiesen werden. Für alle untersuchten Transkripte wurden als Kontrolle Hybridisierungen mit *Sense*-Sonden durchgeführt, die in keinem Fall zu einer Färbung in Hämozyten führten (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei den festgestellten Signalen um die Folgen einer Aktivität endogener Alkalischer Phosphatasen handelte.

5 Diskussion

Für die Untersuchung des angeborenen Immunsystems haben sich wirbellose Tiere als hervorragend geeignete Modellorganismen bewährt. Viele Mechanismen der angeborenen Immunabwehr von der Erkennung bis zur Eliminierung von Krankheitserregern sind zwischen Wirbellosen und höheren Tieren konserviert, so dass Erkenntnisse aus der Erforschung des Immunsystems wirbelloser Organismen in einigen Fällen sogar direkt auf die Säugetiere einschließlich des Menschen übertragen werden können. Eines der prominentesten Beispiele ist die Entdeckung des immunrelevanten Toll-Rezeptors bei *Drosophila*, von dem orthologe Proteine mit vergleichbarer Funktion später beim Menschen beschrieben wurden (Lemaitre *et al.*, 1996; Medzhitov *et al.*, 1997).

Die Seescheide *Ciona intestinalis* ist der bekannteste und am besten untersuchte Vertreter des Unterstammes Tunicata. Aufgrund des abgeschlossenen Genomprojektes und der Vielzahl verfügbarer EST-Daten kommt *Ciona* eine wachsende Bedeutung als moderner Modellorganismus zu (Dehal *et al.*, 2002). Weiterhin sind die Tunikaten phylogenetisch an der Basis der Chordata anzusiedeln und werden nach aktuellem Stand der Forschung sogar als die nächsten Verwandten der Wirbeltiere angesehen (Delsuc *et al.*, 2006). Umso mehr kann man durch die Erforschung des Immunsystems von *C. intestinalis* auf Erkenntnisse mit direktem Bezug zum Menschen hoffen.

Über die Mechanismen der antimikrobiellen Abwehr von *C. intestinalis* ist bisher nur sehr wenig bekannt. Als sessil am Meeresgrund lebender Organismus, der permanent Mikroben enthaltendes Meerwasser filtriert, ist *C. intestinalis* einer ständigen Infektionsgefahr ausgesetzt. Die Fähigkeit, opportunistische und pathogene Mikroorganismen zu erkennen und zu vernichten, ist essentiell. Folglich ist es anzunehmen, dass die Tiere ein effektives Abwehrsystem aufweisen, das den Besitz hoch wirksamer antimikrobieller Peptide einschließt.

Erste Berichte über die antimikrobielle und toxische Aktivität in der Hämolymphe, den Hämocyten und in löslichen Extrakten ganzer Tiere oder des Mantels von *C. intestinalis* finden sich in der Literatur bei Johnson und Chapman (1970), Rowley (1982 a) und Teo und Ryland (1994). Diese konnten die Aktivität jedoch keiner bestimmten Stoffklasse oder gar einer Substanz zuschreiben. Findlay und Smith (1995 a + b) konnten die antibakterielle Aktivität in Hämocyten-Extrakten von *C. intestinalis* zwei durch Gelfiltrationschromatographie grob gereinigten Proteinfractionen zuordnen. Dabei handelte es sich jeweils um einzelne oder mehrere Peptide bzw. Proteine mit einem Molekulargewicht von 8-15 bzw. 60-70 kDa. Während die Peptidfraktion ausschließlich Aktivität gegen grampositive Bakterien zeigte, war die Proteinfraction sowohl gegen grampositive wie gramnegative Bakterien aktiv. Weiterhin konnte Lysozym als Ursache der antibakteriellen Aktivitäten ausgeschlossen werden

(Findlay und Smith 1995 a + b). Seither sind keine weiteren Ergebnisse einer genaueren Identifizierung und Charakterisierung der antimikrobiellen Aktivität in Hämocyten oder anderen Geweben von *C. intestinalis* bekannt geworden. Aus den Hämocyten verschiedener anderer Seescheidenarten, aber insbesondere aus *Styela clava*, wurden dagegen bereits mehrere antimikrobielle Peptide beschrieben (Lee *et al.*, 1997 a+b; Zhao *et al.*, 1997 a+b; Lee *et al.*, 2001 a; Jang *et al.*, 2002; Tincu *et al.*, 2003).

5.1 Reinigung natürlicher antimikrobieller Peptide aus Extrakten

Im Rahmen dieser Arbeit sollten antimikrobielle Peptide zunächst in einem klassischen Ansatz nach ihrer Aktivität aus Extrakten verschiedener Gewebe von *C. intestinalis* gereinigt werden. Die Reinigung der Peptide aus Extrakten hat gegenüber der reinen *in silico* Analyse durch BLAST-Suche einen entscheidenden Vorteil. Die Peptide werden dabei nach dem Kriterium ihrer antimikrobiellen Aktivität isoliert und man erhält die natürlich vorkommende bereits prozessierte und eventuell modifizierte Form des aktiven Peptids. Auf diese Weise kann man sowohl Orthologe bereits bekannter antimikrobieller Peptidfamilien als auch neuartige Peptide isolieren. Die Verfügbarkeit der umfangreichen Nukleotidsequenzdaten von *C. intestinalis* bietet dann später bei der Identifizierung der erhaltenen gencodierten Peptide vielfältige Vorteile. Die Primärstruktur der Peptide kann entweder über Edman-Abbau und anschließende BLAST-Suche in der EST-Datenbank oder über verschiedene massenspektrometrische Methoden wie MALDI-TOF MS, Peptidmassen-Fingerabdruck und MS/MS-Analyse ermittelt werden. Die Massenspektrometrie greift dabei direkt auf die in der EST-Datenbank von *C. intestinalis* vorhandenen Nukleotidsequenzen zurück. Neben der schnellen Identifizierung vollständiger Transkripte erleichtern BLAST-Analysen mit den erhaltenen Aminosäuresequenzen in der Genom- und EST-Datenbank das anschließende Auffinden eventuell vorhandener Genfamilien wesentlich. Dadurch entfällt das nicht immer erfolgreiche und oft sehr zeitaufwendige Klonieren der Transkripte von cDNA mit degenerierten Oligonukleotiden.

Zwar konnten mehrere Peptide mit antibakterieller Aktivität aus sauren Extrakten verschiedener Gewebe bis zu einer Reinheit isoliert werden, die für eine Identifizierung der Primärstruktur ausreichend gewesen wäre. Die nachfolgende vollständige Bestimmung der Aminosäuresequenz war allerdings bei keinem dieser Peptide erfolgreich. Dies hatte vermutlich mehrere unterschiedliche Ursachen.

Bei mehreren Peptiden war entweder der N-Terminus für eine Sequenzierung nach Edman blockiert oder es kam zu einem Abbruch der Sequenzierreaktion, nachdem bereits mehrere Aminosäurereste identifiziert wurden. Proteine und Peptide, die N-terminal blockiert sind, verfügen über keine freie N-terminale Aminogruppe und können deshalb nicht sequenziert

werden. Zu den häufigsten Ursachen gehören eine N-terminale Acetyl- oder Formylgruppe und Pyroglutaminsäure (Bayard und Lottspeich, 2001). Derartige Formen der posttranslationalen Modifikation kommen bei etwa 50 % der eukaryotischen Proteine vor (Bayard und Lottspeich, 2001).

Von den beiden aus Mantelextrakt isolierten Peptiden konnten jeweils nur die ersten fünf N-terminalen Aminosäurereste bestimmt werden (Kapitel 4.1.1, Peptide 1 und 2). Die per Massenspektrometrie identifizierten Massen ließen allerdings etwas größere Peptide vermuten, was auf einen vorschnellen Abbruch der Sequenzierung hindeutete. Des Weiteren konnte die durch Edman-Abbau bestimmte Primärstruktur nur für die ersten beiden Aminosäurereste durch eine MS/MS-Analyse bestätigt werden. Die Daten deuteten eventuell darauf hin, dass die zwei gereinigten Substanzen keine klassischen Peptide waren (pers. Kommunikation, Dr. Friedrich Buck, Hamburg). Eine denkbare Möglichkeit könnte sein, dass es sich bei den beiden Substanzen um peptidähnliche Moleküle handelte, die bei der auf die Anreicherung von Peptiden ausgerichteten sauren Extraktionsmethode und anschließenden Reinigung mittels Säulenchromatographie ebenfalls isoliert werden können. Für die Identifizierung peptidähnlicher Substanzen aus Tunikaten, bei denen es sich möglicherweise um Sekundärmetabolite handelt, gibt es diverse Beispiele (Rinehart *et al.*, 1981; Azumi *et al.*, 1990; Davidson, 1993). Weiterhin sollte bei der Reinigung von Proteinen und anderen Substanzen aus dem Mantel von *Ciona* die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass diese nicht von der Seescheide selbst sondern von assoziierten Mikroorganismen stammen, die den Mantel besiedeln (Davidson, 1993; James *et al.*, 1996).

Bei einem weiteren aus Hämocyten isolierten Peptid trat ein Abbruch der N-terminalen Sequenzierung nach Edman bereits nach dem zweiten Aminosäurerest auf (Kapitel 4.1.4, Peptid 6). Eine Ursache für einen Abbruch der Reaktion kann zum Beispiel das Vorkommen eines Isoasparaginsäurerestes sein. Die Bildung von Isoaspartyl-Peptidbindungen durch die Modifikation von Asparagin oder Asparaginsäure ist die häufigste Form der nicht-enzymatischen Modifikation von Peptiden und Proteinen, die sowohl *in vivo* als auch bei der Reinigung, Analyse und Lagerung von Proteinen auftreten kann (Aswad *et al.*, 2000).

Ebenfalls zum Abbruch der Sequenzierreaktion nach Edman kann es durch das Vorhandensein verschiedener Dehydroaminosäuren kommen wie es z. B. für die antimikrobiellen Peptide Nisin und Subtilin, Lantibiotics aus grampositiven Bakterien, beschrieben wurde (Liu und Hansen, 1990 und 1991). Interessanterweise sind Seescheiden dafür bekannt, dass sie eine neuartige Klasse sehr kleiner Peptide und peptidähnlicher Substanzen produzieren, deren strukturelle Gemeinsamkeit das Vorhandensein der Enamine, α,β -dehydro-3,4-Dihydroxyphenylalanin (Δ DOPA) und α,β -dehydro-3,4,5-Trihydroxyphenylalanin (Δ TOPA) oder ihrer gesättigten Analoga, DOPA und TOPA, in ihrer Primärsequenz ist. Hierzu gehören die Tunichrome (Oltz *et al.*, 1988; Bayer *et al.*, 1992;

Tincu und Taylor, 2002) und die antimikrobiell aktiven Halocyamine (Azumi *et al.*, 1990). Eine weitere Gemeinsamkeit dieser Peptide ist ein C-terminaler decarboxylierter α,β -ungesättigter aromatischer Rest, abgeleitet von Tyrosin, DOPA, TOPA oder 6-Bromotryptophan. Das wahrscheinlich mit den Tunichromen verwandte antimikrobielle Peptid Plicatamide aus der Seescheide *Styela plicata* besitzt ebenfalls ein C-terminales decarboxy- (*E*)- α,β -dehydro-3,4-Dihydroxyphenylalanin (dc Δ DOPA), so dass der Edman-Abbau nach Identifizierung von sieben der insgesamt acht Aminosäureresten abbricht (Tincu *et al.*, 2000 und 2003).

Aus den Hämocyten der Seescheiden *Molgula manhattensis* und *Ascidia ceratodes* wurden mehrere Polypeptide unbekannter Funktion mit einer Größe von 9-10 kDa bzw. 3,5-5,3 kDa isoliert (Taylor *et al.*, 1995). Die Edman-Sequenzierung brach bei diesen Peptiden jeweils nach wenigen Aminosäureresten ab. Außerdem sind die Peptide resistent gegen proteolytische Spaltung. Als Ursache hierfür werden unbekannte posttranslationale Modifikationen vermutet (Taylor *et al.*, 1995).

Robert I. Lehrer, in dessen Arbeitsgruppe fast alle bisher von Tunikaten beschriebenen antimikrobiellen Peptide identifiziert wurden, berichtet in einem Zwischenbericht über ein Projekt zur Identifizierung neuartiger, posttranslational modifizierter Peptidantibiotika solitärer Seescheiden auch über Probleme bei der Charakterisierung von Peptiden aus *C. intestinalis* (Lehrer *et al.*, 2004). Demnach wurden zwei antimikrobielle Peptide namens Cionarin I und H isoliert, die sowohl gegen Edman-Abbau als auch proteolytische Spaltung resistent sind. Diese Eigenschaften werden ebenfalls auf mögliche unbekannte posttranslationale Modifikationen zurückgeführt (Lehrer *et al.*, 2004).

Neben den beschriebenen Modifikationen, die die Sequenzierung von Proteinen nach Edman blockieren und den abgewandelten Aminosäuren DOPA und TOPA muss bei Peptiden aus Seescheiden wahrscheinlich mit dem Auftreten weiterer ungewöhnlicher Aminosäuren gerechnet werden. So enthält das vollständig charakterisierte antimikrobielle Peptid Styelin D neben DOPA auch 5-Hydroxylysin, Dihydroxylysin, Dihydroxyarginin und 6-Bromotryptophan (Taylor *et al.*, 2000). Insbesondere wird von Bromotryptophan als Bestandteil von Peptiden mariner wirbelloser Tiere häufiger berichtet (Craig *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1997; Tasiemski *et al.*, 2007).

Mit dem gehäuften Vorkommen modifizierter Aminosäuren bei Seescheiden können wahrscheinlich auch die negativen Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen mittels MALDI-TOF MS, Peptidmassen-Fingerabdruck und MS/MS erklärt werden. Bei dem Abgleich der erhaltenen Massen mit den EST-Daten von *C. intestinalis* gab es in keinem Fall signifikante Treffer. Die Programme zur Auswertung der massenspektrometrischen Daten können ungewöhnliche und vor allem unbekannte Modifikationen nicht automatisch

berücksichtigen, so dass die identifizierten Massen dann nicht den in Aminosäuresequenzen übersetzten ESTs zugeordnet werden können.

In dieser Hinsicht noch schwerwiegender ist vermutlich die Tatsache, dass sich die Nukleotid- und davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit verwendeten *Ciona*-Individuen (Helgoland) deutlich von denen unterscheiden, die ursprünglich für das Genom- und EST-Projekt verwendet wurden (Kalifornien und Japan). Erst kürzlich hat man erkannt, dass es sich bei der vermeintlich kosmopolitisch verbreiteten Art *Ciona intestinalis* um zwei kryptische also morphologisch nicht unterscheidbare Arten handelt (Suzuki *et al.*, 2005; Iannelli *et al.*, 2007; Caputi *et al.*, 2007). Seither wird zwischen den beiden *Ciona intestinalis* Spezies A und B differenziert. Während die auch pazifisch genannte Spezies A an der Westküste der USA, bei Japan, südlich Australiens, an der Ostküste Südamerikas und im Mittelmeer vorkommt, wurde die auch als nordeuropäisch bezeichnete Spezies B in der Nordsee und an der Ostküste Kanadas nachgewiesen (Caputi *et al.*, 2007) (Abb. 19). Dabei nimmt man an, dass die der Spezies A angehörende Population im Mittelmeer dort nicht ursprünglich vorkam, sondern durch Schiffstransport an südeuropäische Küsten gelangt ist (Suzuki *et al.*, 2005). Im Ärmelkanal kommen beide Arten sympatrisch vor (Caputi *et al.*, 2007) (Abb. 19).

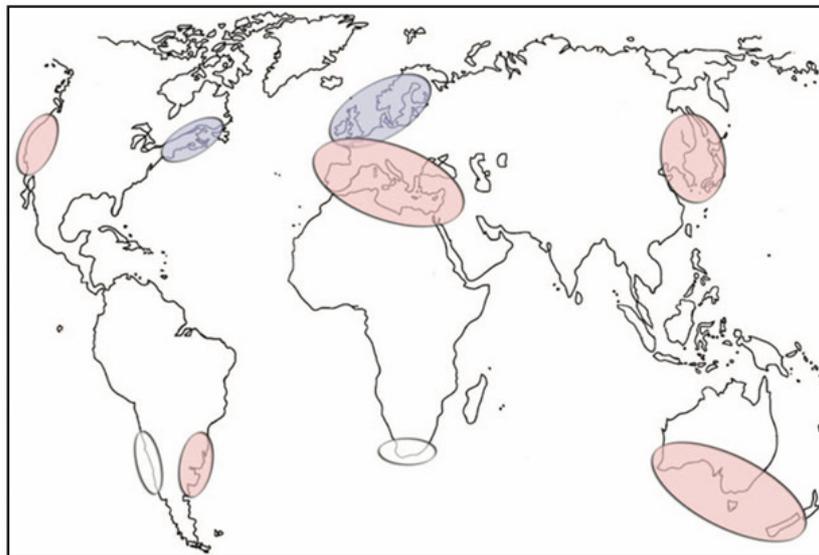


Abb. 19: Geographische Verbreitung von *Ciona intestinalis* Spezies A und B. Bekannte Verbreitungsgebiete der Spezies A sind rosa und die der Spezies B blau gekennzeichnet. Leere Ovale zeigen nicht näher charakterisierte Vorkommen von *C. intestinalis* an. (verändert nach Caputi *et al.*, 2007)

Die Aufspaltung von *C. intestinalis* in zwei Arten basiert sowohl auf signifikanten Sequenzunterschieden der Kern- wie auch der Mitochondrien-DNA, wobei intraspezifische Variabilität sicher ausgeschlossen werden kann (Suzuki *et al.*, 2005; Iannelli *et al.*, 2007; Caputi *et al.*, 2007). Die Ergebnisse des Vergleichs von Nukleotidsequenzen werden durch Kreuzungsexperimente gestützt. So war es zwar möglich aus Kreuzung der Gameten von

Spezies A und B im Labor Hybriden zu erzeugen, diese waren allerdings ihr Leben lang unfruchtbar (Caputi *et al.*, 2007).

Suzuki *et al.* (2005) zeigten bei dem Vergleich der offenen Leserahmen von zufällig gewählten ESTs entsprechend 24 Genen zwischen britischen und japanischen Individuen eine mittlere Übereinstimmung der Nukleotidsequenz von 95 % mit einer Standardabweichung von 2,2 %. Der in dieser Arbeit ermittelte Wert von $90,5 \pm 2,3$ % ist damit sogar noch niedriger. Hierfür wurden die Nukleotidsequenzen des offenen Leserahmens von neun verschiedenen Genen mutmaßlicher antimikrobieller Peptide von Helgoländer Tieren (*Ci-mam-A* bis *-G* und *Ci-pap-A* und *-C*) mit den Sequenzen aus der EST-Datenbank verglichen. Auf Aminosäureebene ergaben sich daraus Übereinstimmungen von nur 82,8 % - 96,9 %. Eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zu Suzuki *et al.* (2005) geringeren Werte könnte die kleinere Stichprobengröße dieser Arbeit sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die in der vorliegenden Arbeit ermittelte höhere Divergenz darauf zurückzuführen ist, dass die Nukleotidsequenzen von Genen miteinander verglichen wurden, die für mutmaßliche antimikrobielle Peptide codieren. Zum einen zeigen antimikrobielle Peptide im Allgemeinen eine hohe Diversität, die aus der positiven Selektion nach der Fähigkeit neue oder veränderte Pathogene zu bekämpfen resultiert (Hedengren *et al.*, 2000; Dassanayake *et al.*, 2007). Zum anderen interagieren sie als Effektormoleküle des Immunsystems direkt mit den Komponenten von Mikroorganismen und sind deshalb einem besonderen selektiven Druck ausgesetzt, der zu einer schnellen adaptiven Evolution ihrer Gene führt (Tennessee, 2005; Semple *et al.*, 2006).

In Anbetracht der deutlichen Unterschiede auf der Ebene der Aminosäuresequenzen ist es offensichtlich, dass massenspektrometrische Analysen insbesondere mit antimikrobiellen Peptiden der Spezies B wenig Erfolg versprechend sind, wenn dabei mit Nukleotidsequenzdaten der Spezies A abgeglichen wird.

5.2 BLAST-Suche nach Genen antimikrobieller Peptide

Parallel zur Reinigung natürlicher antimikrobieller Peptide aus Extrakten wurde versucht, mittels BLAST-Analyse in den Nukleotidsequenz-Datenbanken von *C. intestinalis* (Spezies A) Gene zu identifizieren, die für antimikrobielle Peptide codieren.

Mit der Veröffentlichung der genomischen Nukleotidsequenz von *C. intestinalis* erhoffte man sich, Erkenntnisse über den evolutionären Ursprung der Vertebraten und des adaptiven Immunsystems zu erlangen (Delsuc *et al.*, 2006). Hierzu wurden bereits intensive BLAST-Analysen mit bekannten immunrelevanten Genen anderer Organismen gegen die Genom- und EST-Datenbanken von *C. intestinalis* durchgeführt. Diese ergaben, dass die Tunikaten nicht das adaptive Immunsystem der höheren Vertebraten basierend auf den

Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) I und II, T-Zell-Rezeptoren und Immunglobulinen besitzen (Azumi *et al.*, 2003). Dagegen hat man diverse über viele Klassen des Tierreichs konservierte Gene identifizieren können, die eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort spielen, darunter solche, die für Komponenten des Komplementsystems und für Toll-*like* Rezeptoren codieren (Azumi *et al.*, 2003).

Gene antimikrobieller Peptide konnten in den Nukleotidsequenz-Datenbanken von *C. intestinalis* bisher nicht identifiziert werden (Azumi *et al.*, 2003; Shida *et al.*, 2003), obwohl es sich dabei um Schlüsselmoleküle der angeborenen Immunabwehr handelt. Man geht davon aus, dass antimikrobielle Peptide bei allen Vertretern des Tier- und Pflanzenreichs zu finden sind. Dabei scheint es allerdings so, dass jeder Organismus seinen eigenen Satz einzigartiger Moleküle besitzt, um sich gegen die spezifische Flora der ihn umgebenden Mikroorganismen zu schützen. Diese Moleküle weisen zwar häufig sehr ähnliche strukturelle Eigenschaften auf, zeigen aber gleichzeitig eine völlig unterschiedliche Primärstruktur. Deshalb sind BLAST-Analysen mit Aminosäuresequenzen bekannter antimikrobieller Peptide einer bestimmten Spezies in der übersetzten Nukleotidsequenz-Datenbank eines anderen Organismus oft nicht erfolgreich. Orthologe Gene antimikrobieller Peptide sind meistens nur bei sehr nahe verwandten Arten oder innerhalb bestimmter Gruppen zu finden. So wurden z. B. die Penaeidine bisher ausschließlich von verschiedenen Garnelenspezies der Gattungen *Penaeus*, *Litopenaeus* und *Fenneropenaeus* beschrieben (Cuthbertson *et al.*, 2008). Die α -Defensine kommen nur bei Säugetieren vor, während die β -Defensine und die Cathelicidine als spezifisch für die Vertebraten angesehen werden (Ganz, 2003; Xiao *et al.*, 2004; Zanetti, 2004; van Dijk *et al.* 2005; Chang *et al.*, 2005). Bisher wurden in nur wenigen Fällen sehr ähnliche Moleküle aus phylogenetisch weit entfernten Organismen beschrieben. Zum Beispiel wurden den Cecropinen der Insekten ähnelnde Peptide auch im Nematoden *Ascaris suum* identifiziert (Pillai *et al.*, 2005). Die Amoebapores, antimikrobielle und zytolytische Polypeptide, wurden zuerst aus dem humanpathogenen Protozoen *Entamoeba histolytica* isoliert (Leippe *et al.*, 1991 und 1992) und strukturell und funktionell homologe Proteine wurden später auch in Lymphozyten vom Schwein (Andersson *et al.*, 1995) und des Menschen gefunden (Pena *et al.*, 1997).

Es ist als sehr wahrscheinlich anzunehmen, dass potentielle Vertreter solcher in einzelnen Klassen oder durchs Tierreich konservierten Peptidfamilien und Orthologe zu Peptiden anderer Tunikaten, wie den Styelinen oder Clavaninen aus der Seescheide *Styela clava* (Lehrer *et al.*, 2001), leicht durch BLAST-Suchen in den übersetzten Nukleotidsequenz-Datenbanken von *C. intestinalis* gefunden werden würden. Die negativen Resultate der intensiven BLAST-Analysen dieser Arbeit erlauben den Schluss, dass *C. intestinalis* keine Vertreter der bekannten Peptidfamilien besitzt, was die bisherigen Erkenntnisse einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Azumi *et al.*, 2003; Shida *et al.*, 2003).

Anhand der Suche mit den Aminosäuresequenzen der Amoebapores und NK-Lysine konnte gezeigt werden, dass die BLAST-Analyse mit Aminosäuresequenzen gegen übersetzte Nukleotidsequenzen grundsätzlich eine geeignete Methode ist, um orthologe Gene zu identifizieren. Die Amoebapores und NK-Lysine gehören zu der Familie der Saposin-ähnlichen Proteine, der außerdem eine Reihe weiterer Proteine mit unterschiedlichen Funktionen und das namensgebende Saposin bzw. dessen Vorläuferprotein, das Prosaposin, angehören. Die Gemeinsamkeit der Saposin-ähnlichen Proteine ist der Besitz mindestens einer Saposin-Domäne des b-Typs, die durch die spezifische Anordnung von sechs Cysteinresten charakterisiert ist. Als Ergebnis der BLAST-Analysen konnten vier Gene identifiziert werden, die für Saposin-ähnliche Proteine mit offensichtlicher Orthologie zu Acyloxyacylhydrolasen (AOAH) und Sphingomyelin-Phosphodiesterasen bzw. Sphingomyelinasen codieren. Die Acyloxyacylhydrolase ist ein leukozytisches Enzym, das für die Hydrolyse von Acyloxyacyl-Bindungen in der Lipid A-Region von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) verantwortlich ist und dadurch dessen toxische Eigenschaft zerstört (Munford und Hunter, 1992). Die humane saure Sphingomyelinase ist ein lysosomales Enzym, das Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphocholin hydrolysiert (Ferlinz *et al.*, 1994).

Außerdem konnte in der EST-Datenbank von *Ciona* ein Gen beschrieben werden, dessen Produkt eine sehr große Ähnlichkeit zu den Prosaposinen der Vertebraten aufweist (Abb. A 22, Anhang). Das Prosaposin ist das Vorläufermolekül der Saposine, die die lysosomale Hydrolyse von Sphingolipiden durch saure Hydrolasen aktivieren (Munford *et al.*, 1995; Vaccaro *et al.*, 1999). Die Prosaposine der Vertebraten zeichnen sich dadurch aus, dass sie neben vier Saposin-Domänen des b-Typs (die späteren Saposine A, B, C und D) sowohl N- als auch C-terminal eine Saposin-Domäne des a-Typs besitzen (Patthy, 1991; Hazkani-Covo *et al.*, 2002). Das mutmaßliche Prosaposin aus *Ciona* weist elf Saposin-Domänen des b-Typs und N- und C-terminal je eine Saposin-Domäne des a-Typs auf (Abb. A 22, Anhang).

Dadurch unterscheidet sich das mutmaßliche Prosaposin aus *Ciona* eindeutig von den Vorläufermolekülen porenbildender antimikrobieller Peptide wie den Naegleriapores. Diese sind als Präpropolypeptide mit ebenfalls mehreren Saposin-Domänen des b-Typs organisiert, besitzen aber keine N- und C-terminalen Saposin-Domänen des a-Typs (Herbst *et al.*, 2004).

Obwohl über die möglicherweise *in vivo* stattfindende Prozessierung des Prosaposin-ähnlichen Proteins in *C. intestinalis* und die Funktion der daraus entstehenden einzelnen Saposin-Domänen des b-Typs nur spekuliert werden kann, wurde aufgrund der zu den Prosaposinen der Vertebraten ähnlichen Organisation des Vorläufermoleküls auch von einer vergleichbaren Funktion ausgegangen.

Mit Sicherheit lässt sich nach der *in silico* Analyse dagegen festhalten, dass *C. intestinalis* keine Gene besitzt, die für typische Vorläufermoleküle von NK-Lysin- und Amoebapore-ähnlichen Proteinen codieren.

5.3 *In silico* Identifizierung mutmaßlicher antimikrobieller Peptide

Das Prinzip der BLAST-Suche beruht darauf, bereits bekannte Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen mit denen in einer Datenbank zu vergleichen. Deshalb können auf diese Weise nur solche Sequenzen identifiziert werden, die zu der für die Suche verwendeten Sequenz ähnlich sind. Da keine Gene definierter Peptidfamilien oder von Peptiden mit Sequenzähnlichkeit zu anderen bekannten antimikrobiellen Peptiden über die BLAST-Suche in den Datenbanken von *C. intestinalis* gefunden werden konnten, wurde in dieser Arbeit eine Methode der *in silico* Analyse entwickelt, mit der erfolgreich auch Gene mutmaßlicher antimikrobieller Peptide identifiziert werden können, deren Produkte keine Sequenzähnlichkeit zu bekannten Peptiden zeigen. Die Identifizierung von Peptiden mit völlig neuartiger Primärstruktur ist mit dieser Methode nicht möglich, da als Suchkriterien allgemein für antimikrobielle Peptide charakteristische strukturelle Eigenschaften angewendet wurden. Hierzu gehören die Lokalisation und Länge des Transkriptes und die Zugehörigkeit zu einer der großen Gruppen, in die die meisten antimikrobiellen Peptide aufgrund ihrer Primär- und Sekundärstruktur eingeteilt werden können. Dennoch konnten als Ergebnis eines umfassenden *Screenings* übersetzter ESTs von *C. intestinalis* zwei neue Genfamilien identifiziert werden, deren Produkte typischen Vorläufermolekülen antimikrobieller Peptide des kationischen, alpha-helikalen Typs ähneln (Abb. 5 und 7). Diese stellen meistens ein Präpropeptid dar, das aus einem Signalpeptid, einer kationischen Region und einer anionischen Verlängerung oder eines Prostücks besteht, die durch proteolytische Spaltung entfernt werden, um das aktive Peptid zu erhalten. Die α -Defensine gehören zu den ersten antimikrobiellen Peptiden, für die diese Art der Prozessierung beschrieben und detailliert untersucht wurde (Daher *et al.*, 1988; Valore und Ganz, 1992). Man nimmt an, dass der anionische Teil der Vorläufer die zytotoxische Eigenschaft der kationischen Region während des Transports durch saure intrazelluläre Kompartimente neutralisiert (Michaelson *et al.*, 1992; Valore *et al.*, 1996). Strukturell vergleichbare Beispiele von Tunikaten sind die Vorläufermoleküle der Styeline und Clavanine (Lee *et al.*, 1997 a+b; Zhao *et al.*, 1997 a+b, Taylor *et al.*, 2000). Obwohl zwischen den beiden bei *Ciona* identifizierten, Ci-MAM und Ci-PAP genannten, Peptidfamilien und den Styelinen keine signifikante Sequenzidentität besteht, gibt es doch offensichtliche Ähnlichkeiten bezüglich der Gesamtgröße, Domänenstruktur der putativen Vorläufer, einschließlich einer anionischen Verlängerung, und dem amphipathischen Potential der kationischen Region (Abb. 7).

Die Beobachtung, dass die Transkriptionsrate einiger Mitglieder der beiden Genfamilien nach Immunstimulation in Hämocyten deutlich hochreguliert wurde (Abb. 6), deutete ebenfalls darauf hin, dass es sich zumindest um Gene handelt, die eine Rolle bei der Immunabwehr spielen. Wie bereits für die β -Defensine genau gezeigt, kann auch die Expression verschiedener Mitglieder derselben Genfamilie entweder konstitutiv oder induzierbar sein (Harder *et al.*, 1997; Valore *et al.*, 1998) und sie kann nach mikrobieller Stimulation molekular in ganz unterschiedlicher Weise reguliert werden (Zaalouk *et al.*, 2004; Sørensen *et al.*, 2005).

Als ein möglicher Mechanismus der Pathogenerkennung und Signalweiterleitung bis hin zur Induktion der Expression antimikrobieller Peptide ist bei *C. intestinalis* z. B. eine Beteiligung des Toll-Signaltransduktionswegs denkbar. Orthologe Gene mehrerer Komponenten dieser Kaskade sind im Genom von *C. intestinalis* beschrieben worden (Azumi *et al.*, 2003).

5.4 Eigenschaften der synthetischen Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22

Neben der induzierbaren Transkription einiger Mitglieder der beiden identifizierten Genfamilien wird die Annahme, dass die einzelnen Gene für antimikrobielle Peptide codieren, zusätzlich durch die intensive Charakterisierung zweier synthetischer Peptide gestützt, die jeweils von einem Mitglied jeder Familie abgeleitet und entsprechend der bekannten Prozessierung der Styeline konstruiert wurden (Lee *et al.*, 1997 b; Zhao *et al.*, 1997 b, Taylor *et al.*, 2000). Die beiden synthetischen Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 zeigten starke Aktivität gegen eine Reihe von grampositiven und gramnegativen Bakterien und gegen den Pilz *C. albicans* (Tab. 4). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl grampositive, als auch gramnegative Bakterien von beiden Peptiden durch die Permeabilisierung ihrer zytoplasmatischen Membran getötet werden (Abb. 8 und 9). Die Kinetiken und die benötigten Peptidkonzentrationen waren dabei vergleichbar mit denen der gut untersuchten antimikrobiellen Peptide Magainin 1 und Cecropin P1. Dies lässt einen ähnlichen Wirkmechanismus bei allen vier getesteten Peptiden vermuten. Für die Cecropine und Magainine nimmt man einen Zwei-Schritte-Mechanismus bei der Tötung von Bakterien an. Demnach binden die Peptide zunächst aufgrund ihrer positiven Ladung an der negativen Oberfläche der Zielzellen. Hier nehmen sie dann eine alpha-helikale Konformation an und stören die Integrität der Zielmembran (Merrifield *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1988; Maloy und Kari, 1995). Über CD-Spektroskopie konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Grötzinger (Kiel) für Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 ebenfalls gezeigt werden, dass sie in Lösung unstrukturiert vorliegen und sich nach der Anlagerung an Membranen zu einer Alpha-Helix organisieren (Fedders *et al.*, 2008).

Obwohl viele membranaktive antimikrobielle Peptide sowohl grampositive wie gramnegative Bakterien töten, zeigen sie häufig eine Präferenz für die eine oder die andere Gruppe. In den meisten Fällen werden allerdings grampositive Bakterien effektiver geschädigt, da die äußere Membran der gramnegativen Bakterien für viele Peptide eine kritische Barriere darstellt. Dies gilt nicht für Ci-MAM-A24, wie durch den Versuch mit dem transgenen *E. coli* Stamm ML-35p gezeigt werden konnte, indem die Kinetiken der Permeabilisierung der beiden Membranen von gramnegativen Bakterien getrennt beobachtet wurden (Abb. 9). Im direkten Vergleich mit Cecropin P1, das für seine besondere Aktivität gegen gramnegative Bakterien bekannt ist (Lee *et al.*, 1989), zeigt Ci-MAM-A24 eine schnellere Perforation der inneren Membran und eine etwas langsamere aber deutliche Schädigung der äußeren Membran (Abb. 9). Schließlich werden durch das Peptid beide Membranen effektiv permeabilisiert, wodurch dessen einheitlich niedrige MIC-Werte gegen grampositive und gramnegative Bakterien erklärt werden können (Tab. 4). Ci-PAP-A22 und Magainin 1 zeigen insgesamt niedrigere MIC-Werte mit einer Präferenz für grampositive Bakterien (Tab. 4). Dies spiegelt sich in einem im Vergleich zu Ci-MAM-A24 und Cecropin P1 flacheren Verlauf der Kurven für die Kinetiken der Permeabilisierung sowohl der äußeren als auch der inneren Membran von *E. coli* wider (Abb. 9).

Während für Ci-PAP-A22 meistens etwas niedrigere MIC-Werte entsprechend ein bis zwei Verdünnungsstufen gegen verschiedene Bakterien bei pH 7,4 festgestellt wurden, war der Effekt des pH-Wertes auf die Aktivität von Ci-MAM-A24 zwar ebenfalls deutlich aber sehr inkonsistent (Tab. 4). Ci-MAM-A24 zeigte eine deutlich höhere Aktivität entsprechend drei Verdünnungsstufen bei pH 5,2 gegen vier Bakterienstämme (*B. megaterium*, *B. subtilis*, *E. coli* und *P. aeruginosa*) (Tab. 4). Ebenfalls gegen vier Bakterienstämme wies Ci-MAM-A24 eine höhere Aktivität bei pH 7,4 auf. Der Unterschied im Vergleich zur Aktivität bei pH 5,2 betrug hier jedoch nur eine (*S. epidermidis*, *K. pneumoniae* und *S. marcescens*) bzw. zwei Verdünnungsstufen (*S. aureus*) (Tab. 4). Eine pH-abhängige Aktivität bei antimikrobiellen Peptiden wird oft auf die Gegenwart von Histidinresten zurückgeführt, da diese bei einem pH-Wert kleiner als 6 protoniert vorliegen. Die positive Nettoladung kationischer Peptide kann dadurch deutlich erhöht werden. Histidinreiche Peptide können durch das Absenken des pH-Wertes sogar von einem inaktiven in einen aktiven Zustand wechseln, da ihnen erst die positive Nettoladung erlaubt, mit der negativ geladenen Bakterienmembran zu interagieren (Lee *et al.*, 1997 c; Mason *et al.*, 2006; Kacprzyk *et al.*, 2007). Sowohl Ci-PAP-A22, als auch Ci-MAM-A24 besitzen neben vier bzw. sechs kationischen Aminosäureresten jeweils einen Histidinrest (Abb. 7). Dieser könnte eventuell für die deutlich erhöhte Aktivität von Ci-MAM-A24 gegen vier Bakterienstämme verantwortlich sein. Ein allgemeiner Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Vorkommen eines Histidinrestes und der antimikrobiellen Aktivität ist allerdings nicht erkennbar insbesondere wegen der

durchschnittlichen höheren Aktivität von Ci-PAP-A22 bei pH 7,4. Zwar gibt es eine starke Korrelation zwischen der Kationizität alpha-helikaler Peptide und ihrer antimikrobiellen Aktivität. Diese Beziehung ist allerdings nicht proportional und man hat festgestellt, dass eine zunehmende positive Ladung ab einem gewissen Grad nicht mehr zu einer Steigerung der Aktivität führt (Dathe *et al.*, 2001). Zusätzlich spielen diverse andere Parameter wie die Hydrophobizität, hydrophober Moment, Amphipathizität und polarer Winkel von alpha-helikalen Peptiden eine wichtige Rolle (Dathe *et al.*, 2001; Yeaman und Yount, 2003). Weiterhin deuten besonders die je nach verwendeter Bakterienart und pH-Wert uneinheitlichen Ergebnisse mit Ci-MAM-A24 darauf hin, dass die optimale positive Ladung eines antimikrobiellen Peptids auch von der artspezifischen Zusammensetzung der bakteriellen Zielmembran abhängig ist.

Als Maß für die porenbildende Aktivität wurde in einem minimalistischen System die Depolarisation von Liposomen durch die Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 gemessen (Abb. 13). Die im Vergleich zu Alamethicin relativ schwache Aktivität der *Ciona*-Peptide lässt auf unterschiedliche Mechanismen der Membranpermeabilisierung schließen. Während Alamethicin als Prototyp eines porenbildenden Peptids bekannt ist, das nach dem „*barrel-stave model*“ agiert (Fox und Richards, 1982; Hall *et al.*, 1984; He *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 2008), könnte man für die *Ciona*-Peptide annehmen, dass sie die Zielmembranen zum Beispiel nach dem „*toroidal pore*“ oder „*carpet model*“ (Brogden, 2005) perforieren.

Die Selektivität membranaktiver kationischer Peptide basiert auf ihrer elektrostatischen Interaktion mit der negativ geladenen Oberfläche der Mikroorganismen. Deshalb setzen freie Ionen im umgebenden Medium häufig die Bindungseffizienz der Peptide herab und beeinträchtigen deren Wirksamkeit. Für die biologische Funktion und die mögliche pharmakologische Anwendung ist es notwendig, dass ein antimikrobielles Peptid bei entsprechenden physiologischen Salzkonzentrationen immer noch aktiv ist. In den antibakteriellen Tests mit erhöhtem Salzgehalt stellte sich die Aktivität von Ci-MAM-A24 als ungewöhnlich salztolerant heraus (Abb. 10 und 11). Kürzlich wurde berichtet, dass ein Austausch der Argininreste zu Lysinresten im humanen α -Defensin 1 zu einer drastischen Abnahme der antimikrobiellen Aktivität und zu einer größeren Sensitivität gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen führt (Zou *et al.*, 2007). Interessanterweise basiert die positive Nettoladung von Ci-MAM-A und des abgeleiteten synthetischen Peptids Ci-MAM-A24 hauptsächlich auf Arginin- anstatt auf Lysinresten. Andrä *et al.* (2008) vermuten in Bezug auf das antimikrobielle Peptid Arenicin aus dem Wattwurm (*Arenicola marina*), dessen positive Ladung auf sechs Argininresten beruht, dass die evolutionäre Selektion von Argininen eine Anpassung an die hohen Salzkonzentrationen im Meerwasser sein könnte. Die Kationizität von Ci-PAP-A basiert ebenfalls fast ausschließlich auf Argininresten. Obwohl das synthetische Peptid Ci-PAP-A22 vier Arginin-, ein Histidin- und keine Lysinreste aufweist,

zeigte dessen Aktivität aber keine besondere Salzresistenz (Abb. 10). Ob es sich dennoch auch hier um eine Adaption an hohe Salzkonzentrationen handelt, würde sich erst nach Experimenten mit synthetischen Peptidvarianten beurteilen lassen, bei denen die Argininreste durch Lysinreste ausgetauscht wurden. Möglicherweise würde eine Variante von Ci-PAP-A22 mit Lysinresten eine noch weitaus schwächere Aktivität in der Gegenwart von Salz zeigen.

Ein weiterer wichtiger Punkt im Hinblick auf die Entwicklung antimikrobieller Therapeutika auf der Basis membranpermeabilisierender Peptide ist, dass diese nicht die Membranen von Säugetierzellen angreifen dürfen. Im Vergleich mit seiner antimikrobiellen Aktivität zeigte Ci-MAM-A24 fast keine zytotoxische Aktivität gegen Erythrozyten von Säugetieren. Nur bei sehr hohen Konzentrationen ab 25 μM bzw. 12,5 μM wurden die Erythrozyten vom Schaf und noch effektiver vom Menschen lysiert (Abb. 12). Ci-PAP-A22 zeigte dagegen gar keine zytotoxische Aktivität gegen Erythrozyten (Abb. 12).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die synthetischen Peptide Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 eine selektive und starke Aktivität gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen einschließlich mehrerer Pathogene des Menschen zeigen. Die Wirksamkeit der Peptide bleibt bei verschiedenen pH-Werten bestehen und die antibakterielle Aktivität von Ci-MAM-A24 zeigt sich außergewöhnlich tolerant gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen. Im Gegensatz dazu sind die Peptide im direkten Vergleich mit ihrer antimikrobiellen Aktivität praktisch nicht zytolytisch gegen Erythrozyten von Säugetieren.

Die genannten Eigenschaften machen die beiden synthetischen Peptide zu viel versprechenden Kandidaten, die als Matrizen für die Entwicklung neuartiger Peptid-Antibiotika dienen könnten.

Weiterhin deuten die Induzierbarkeit einiger Mitglieder der beiden Genfamilien durch Immunstimulation und die Aktivität der synthetischen Peptide gegen bakterielle Krankheitserreger mariner wirbelloser Tiere und Fische auf eine wichtige biologische Bedeutung der natürlichen Peptide in der Immunabwehr von *C. intestinalis* hin. In diesem Zusammenhang ist wiederum die Beständigkeit der antibakteriellen Aktivität des synthetischen Derivates von Ci-MAM-A (NE) bei der sehr hohen Salzkonzentration von 450 mM NaCl hervorzuheben. Dies entspricht in etwa den natürlichen Bedingungen im Meerwasser.

5.5 Synthese und Speicherung der Peptide Ci-MAM-A und Ci-PAP-A in definierten Hämozytentypen

Die Hämozyten von wirbellosen Tieren einschließlich der Tunikaten wurden bereits mehrfach als Hauptquelle von Abwehrmolekülen identifiziert (Leippe und Renwranz, 1988; Toh *et al.*, 1991; Tincu und Taylor, 2004). Es wurde gezeigt, dass verschiedene Hämozytentypen große Mengen antimikrobieller Peptide produzieren und diese in der Regel in zytoplasmatischen Vakuolen lagern, bis sie nach Immunstimulation in die Hämolymphe abgegeben werden (Toh *et al.*, 1991; Mitta *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2002).

Die Tunikaten besitzen in ihrer Hämolymphe mehrere verschiedene Typen von Hämozyten, die im Allgemeinen in vier große Kategorien eingeteilt werden können: Stammzellen, Amöbozyten, Zellen mit Vakuolen und pigmentierte Zellen (Wright, 1981). Innerhalb dieser Kategorien werden mehrere Zelltypen nach verschiedenen feineren morphologischen Merkmalen unterschieden (Rowley, 1981 und 1982 b).

In der Vergangenheit wurden bereits Aspekte der humoralen und zellulären Immunabwehr im Hinblick auf die unterschiedlichen Typen von Hämozyten in *C. intestinalis* untersucht. Zum Beispiel wurde *in vitro* eine phagozytotische Aktivität gegen Erythrozyten und Bakterien nur für vakuoläre hyaline und granuläre Amöbozyten beschrieben (Rowley, 1981; Smith und Peddie, 1992). Weiterhin wurde eine starke antibakterielle Aktivität einer über einen Percoll-Gradienten isolierten Hämozytenpopulation zugeordnet, die aus *morula cells* und *compartment cells* bestand, aber zusammenfassend als *morula cells* bezeichnet wurde (Smith und Peddie, 1992; Findlay und Smith, 1995). Im Gegensatz dazu wurde für hyaline Amöbozyten berichtet, dass diese nur eine sehr geringe antibakterielle Aktivität aufweisen (Findlay und Smith, 1995).

Interessanterweise konnte das natürliche Produkt der mutmaßlichen antimikrobiellen Peptide Ci-MAM-A und Ci-PAP-A über Immunozytochemie jeweils in einer Teilpopulation der von Findlay und Smith (1995) beschriebenen *compartment cells* nachgewiesen werden, deren auffälligstes Charakteristikum der Besitz einer großen Vakuole ist und die bereits als Quelle der antibakteriellen Aktivität identifiziert wurden (Findlay und Smith, 1995). Leider wurde der Begriff *compartment cells* kürzlich auch für Hämozyten mit mehreren kleineren Vakuolen in *C. intestinalis* und anderen Tunikaten verwendet (De Leo, 1992; Marino *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2003). Dies entspricht nicht der ursprünglich von Rowley (1981) eingeführten Definition. Folglich sind die *compartment cells*, die die C3-ähnlichen Gene *CiC3-1* und *CiC3-2* (*complement component C3*) exprimieren (Marino *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2003), nicht identisch mit den Zellen, die die Peptide Ci-MAM-A und Ci-PAP-A enthalten. Deshalb wurde in dieser Arbeit für die ursprünglich als *compartment cells* bezeichneten Hämozyten der von Parrinello *et al.* (1996) verwendete Begriff *univacuolar refractile granulocytes* (URGs, univakuoläre lichtbrechende Granulozyten) benutzt und für Zellen des gleichen Typs, die

keine lichtbrechenden Granula in ihrer Vakuole enthalten, wurde entsprechend der Begriff *univacuolar non-refractile granulocytes* (UNRGs) eingeführt.

Während Ci-MAM-A nur innerhalb der großen Vakuole von UNRGs festgestellt wurde (Abb. 14), kann man aus den Ergebnissen mit dem Antikörper gegen Ci-PAP-A schließen, dass das Vorläufermolekül von Ci-PAP-A zunächst in kleine zytoplasmatische Vesikel verpackt wird, in denen dann möglicherweise eine Prozessierung stattfindet. Diese Vesikel könnten mit der Membran der großen Vakuole verschmelzen und ihren Inhalt entladen. In der großen Vakuole könnte das aktive Peptid gesammelt und gelagert werden bis seine Sekretion initiiert wird (Abb. 15 und 16).

Darüber hinaus scheint es, dass die URGs und UNRGs für diverse andere Abwehrfunktionen in *C. intestinalis* von Bedeutung sind. Für die gemischte Population aus *morula cells* und *compartment cells* (URGs und UNRGs) wurde gezeigt, dass sie die höchste Phenoloxidaseaktivität und durch Lipopolysaccharide induzierte Proteaseaktivität von allen Hämocytyentypen in *C. intestinalis* besitzen (Smith und Söderhäll 1991; Smith und Peddie, 1992). Später konnte die Phenoloxidaseaktivität genauer nur den URGs zugeordnet werden (Parrinello *et al.*, 2003). Obwohl die Funktion der Phenoloxidaseaktivität *in vivo* bei Tunikaten unbekannt ist, kann man eine Abwehrfunktion wie für das Prophenoloxidase aktivierende System der Arthropoden vermuten (Cerenius und Söderhäll, 2004).

Weiterhin wurde für die gemischte Population aus *morula cells* und *compartment cells* beschrieben, dass diese opsonierende Faktoren enthält, die *in vitro* die Phagozytose von Bakterien durch Amöbozyten fördern (Smith und Peddie, 1992). Außerdem sind die URGs in der Lage, *in vitro* Erythrozyten von Säugetieren zu lysieren (Parrinello *et al.* 1996), sind aber nicht zytotoxisch für verschiedene Zelllinien von Menschen und Mäusen (Peddie und Smith, 1993).

Schließlich wird durch die Injektion von Erythrozyten in den Mantel von *Ciona* eine entzündungsähnliche Reaktion ausgelöst, in deren Verlauf es zu einer massiven Ansammlung von Granulozyten um die Injektionsstelle kommt (Parrinello *et al.*, 1990; De Leo *et al.*, 1996). Es konnte detailliert gezeigt werden, dass die Granulozyten hierfür aus den Lakunen des Hämolympfsystems durch das Mantelepithel in den Mantel einwandern (Di Bella und De Leo, 2000) (Abb. 20). Die fremden Zellen werden von den Hämocyten durch Kapselbildung isoliert und vermutlich durch Substanzen zerstört, die durch Degranulation freigesetzt werden (Parrinello *et al.*, 1990; De Leo *et al.*, 1996). An diesen Prozessen sind insbesondere Zellen beteiligt, die in den entsprechenden Publikationen als *unilocular granulocytes*, *microgranulocytes* und *vacuolar granulocytes* bezeichnet werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen (Abb. 20) lassen darauf schließen, dass es sich dabei um dieselben Zelltypen handelt, die ursprünglich als *compartment cells* bezeichnet wurden und in dieser Arbeit URGs und UNRGs genannt werden. Die Abb. 20

zeigt *unilocular granulocytes* und *microgranulocytes* beim Durchqueren des Mantelepithels während einer entzündungsähnlichen Reaktion. Die Ähnlichkeit der *unilocular granulocytes* zu URGs und der *microgranulocytes* zu UNRGs ist deutlich zu erkennen.

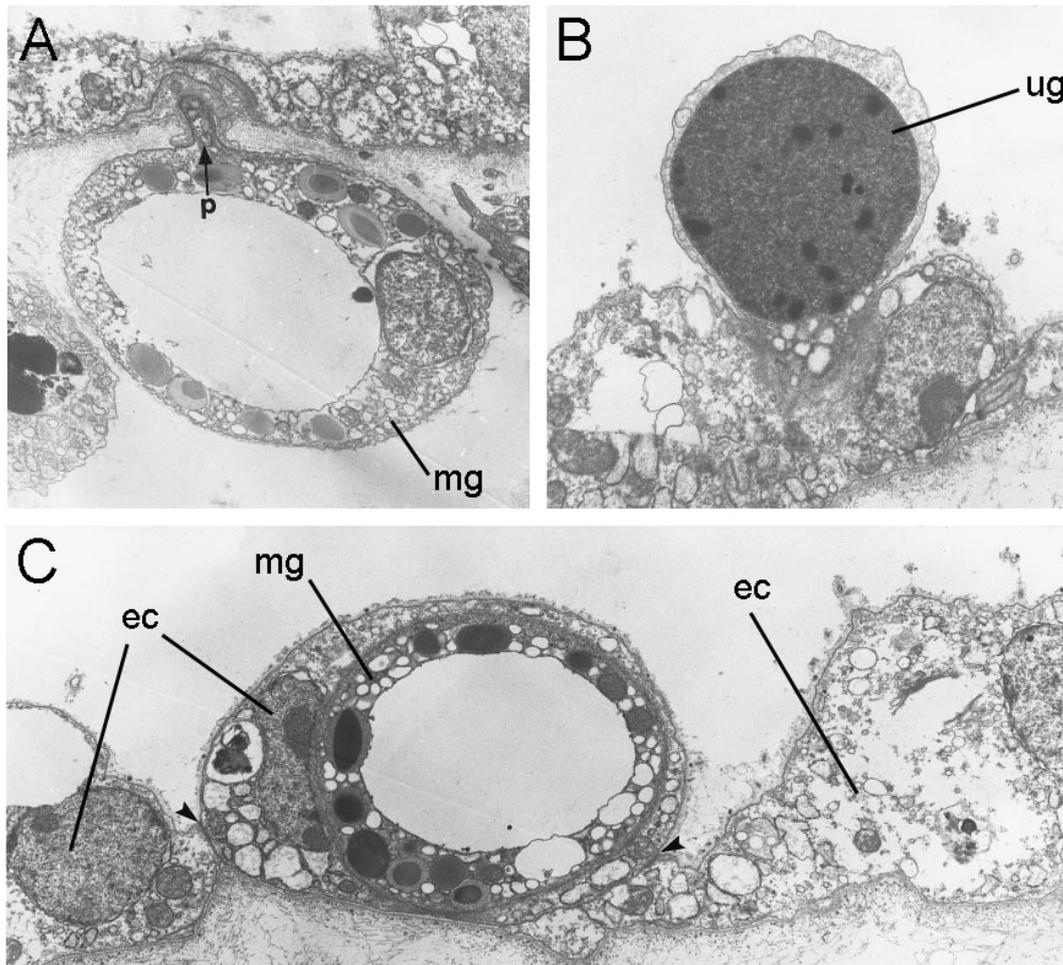


Abb. 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Granulozyten beim Durchqueren des Mantelepithels während einer experimentell herbeigeführten entzündungsähnlichen Reaktion durch Injektion von Erythrozyten in den Mantel von *C. intestinalis*. (A) Ein aus dem Lumen einer hämolymphatischen Lakune in das Mantelepithel einwandernder *microgranulocyte* (mg). Der Großteil des Granulozyten befindet sich noch im Lumen der Lakune, während ein von der Zelle gebildetes Pseudopodium (p) bereits in das Mantelepithel eingedrungen ist; $\times 7.800$. (B) *Unilocular granulocyte* (ug) beim Verlassen des Mantelepithels. Der Granulozyt hat bereits den Mantel erreicht und steht nur noch über eine kleine Kontaktfläche mit dem Mantelepithel in Verbindung; $\times 8.850$. (C) Ein *microgranulocyte* (mg) beim Durchqueren des Mantelepithels. Der Ausschnitt zeigt drei nebeneinander liegende Epithelzellen (ec), die durch elektronendichte Kontaktstellen (Pfeilspitzen) miteinander verbunden sind. Die mittlere Epithelzelle hat den einwandernden Granulozyten komplett umschlossen; $\times 7.800$. (verändert nach Di Bella und De Leo, 2000)

Mit der Methode der *in situ* Hybridisierung konnte zum einen die Synthese der Peptide Ci-MAM-A und Ci-PAP-A in den univakuolären Granulozyten bestätigt werden (Abb. 17), und zum anderen wurde auf diese Weise für weitere Mitglieder der *Ci-mam*-Genfamilie eine Expression in dem gleichen Zelltyp nachgewiesen (Abb. 18). Ein möglicher Grund dafür,

dass die Transkripte der Gene *Ci-mam-B*, *-C*, *-E* und *Ci-pap-C* nicht per *in situ* Hybridisierung detektiert werden konnten, könnte eine zu geringe Transkriptmenge dieser Gene in Hämocyten unstimulierter Tiere sein. Besonders *Ci-mam-B* und *-C* zeigen auch bei der Analyse der Induzierbarkeit nach Immunstimulation mittels semiquantitativer RT-PCR eine sehr schwache bis gar keine Expression (Abb. 6).

Fasst man die Ergebnisse der bisherigen Arbeiten zur zellulären Immunantwort von *C. intestinalis* zusammen, kommt man zu dem Schluss, dass den URGs und UNRGs offensichtlich eine Schlüsselrolle bei der Immunabwehr dieses Organismus zukommt. In dieser Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eben diese Zellen mutmaßliche antimikrobielle Peptide produzieren und in ihrer großen Vakuole speichern. Es ist anzunehmen, dass diese Peptide bei Bedarf entsprechend den Beobachtungen von Parrinello *et al.* (1990) und De Leo *et al.* (1996) zur effektiven Abwehr von eindringenden Fremdkörpern freigesetzt werden.

5.6 Das mutmaßliche antimikrobielle Peptid Ci-META4

Jang *et al.* (2005) berichteten kürzlich von der *in silico* Identifizierung eines Gens und der Charakterisierung der antimikrobiellen Aktivität eines davon abgeleiteten synthetischen Peptids. Deren Ergebnisse ergänzen die Resultate dieser Arbeit. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit des Signalpeptids zu dem des antimikrobiellen Peptids Halocidin identifizierten die Autoren ein Gen, das erst kürzlich als *Ci-meta4* beschrieben wurde. *Ci-meta4* wurde ursprünglich als ein Gen charakterisiert, dessen Transkriptionsrate während der Metamorphose erhöht wird (Nakajama *et al.*, 2002). Ähnlich wie die Mitglieder der Ci-MAM- und Ci-PAP-Peptidfamilien weist das mutmaßliche Vorläufermolekül von Ci-META4 typische Eigenschaften auf, die denen antimikrobieller Peptide ähneln. Das synthetische Peptid (M4F19), das vom N-Terminus des mutmaßlichen Vorläufers abgeleitet wurde, zeigte antibakterielle Aktivität und war nicht hämolytisch für humane Erythrozyten (Jang *et al.*, 2005). Weiterhin zeigte der Vorläufer von Ci-META4 eine gewisse Sequenzähnlichkeit zu denen von Ci-PAP-A, -B und -C, und es ist denkbar, dass alle Peptide derselben Überfamilie angehören. Die Sequenzidentität zwischen Ci-META4 und den Mitgliedern der Ci-PAP-Familie beträgt 26 % bis 30 % (Fedders und Leippe, 2008) (Abb. 5).

5.7 Mögliche Erklärung für die erfolglose Reinigung der natürlichen Peptide Ci-MAM-A und Ci-PAP-A

Die Spezifität der in der Immunocytochemie verwendeten Antikörper gegen die natürlichen Peptide Ci-MAM-A und Ci-PAP-A wurde mit eindeutigen Kontrollversuchen überprüft, indem die Antiseren vor ihrem Einsatz mit dem entsprechenden Peptid-Antigen oder KLH vorinkubiert wurden. Zudem wurden die Ergebnisse der Immunocytochemie mit der unabhängigen Methode der *in situ* Hybridisierung bestätigt. Dennoch war es in diversen Versuchen nicht möglich, die natürlichen Peptide über Western-Blot-Analysen in Extrakten von Hämozyten und der Hämolymphe direkt oder nach unterschiedlichen Reinigungsschritten nachzuweisen. Ein möglicher Grund hierfür könnte der geringe Prozentsatz an Zellen sein, die die Peptide in ihrer Vakuole enthalten. Rowley (1981) ermittelte für die großen und kleinen *compartment cells* zusammen einen Anteil von nur 5,4 % \pm 3,0 % an der Hämozyten-Gesamtpopulation. Nach einer groben Schätzung sind etwa 50 % der *compartment cells* der Gruppe der kleinen Zellen zuzuordnen, von denen wiederum ungefähr 50 % lichtbrechende Granula enthalten. Dabei unterscheiden sich die Ci-MAM-A-positiven von den Ci-PAP-A-positiven Zellen dadurch, dass sie nie lichtbrechende Einschlüsse in ihrer Vakuole aufweisen. Geht man weiterhin davon aus, dass etwa die Hälfte der kleinen *compartment cells* mit oder ohne Granula weder das eine noch das andere Peptid enthält, erhält man grob geschätzt einen Anteil von maximal 1,1 % positiver Zellen an der Gesamtpopulation für jedes der beiden Peptide. Durch das Auszählen von Übersichtsbildern der immunocytochemischen Analyse erhält man für beide Peptide ähnliche Werte für die Anzahl positiver Zellen von etwa 1 bis 2 % der Hämozytenpopulation. Die Menge der durch Extraktion erhaltenen Peptide ist für den Nachweis per Western-Blot wahrscheinlich zu gering.

5.8 Haltung, Zucht und genetische Manipulation von *Ciona intestinalis*

Die relativ geringe Anzahl der Tiere, die in dieser Arbeit zur Verfügung standen, war bei allen Versuchen zur Reinigung natürlicher Peptide aus *C. intestinalis* ein wesentlicher limitierender Faktor. Dies gilt insbesondere für die Reinigung von Peptiden aus Hämozyten, deren Anteil an der Gesamtbioasse eines Individuums extrem gering ist. So beträgt die Anzahl der Hämozyten bei *Styela clava*, einer Seescheide von vergleichbarer Größe wie *C. intestinalis*, im Schnitt nur 4×10^6 Zellen pro Individuum (Lee *et al.*, 1997 a; Menzel *et al.*, 2002).

Die für die Herstellung von Extrakten verwendeten *C. intestinalis* wurden an der Küste Helgolands von Tauchern der BAH gesammelt und entweder per Post versendet oder direkt nach dem Transport mit der Fähre im Hafen von Büsum abgeholt. Eine Lieferung umfasste

in der Regel etwa 30 bis maximal 100 Exemplare. Der regelmäßige Bezug größerer Mengen war sowohl aus logistischen als auch ökologischen Gründen nicht möglich.

Die von Helgoland erhaltenen Tiere konnten in Meerwasseraquarien mit einem geschlossenen Wasserkreislauf für etwa vier Wochen gehalten werden. Tiere, die einmal von ihrem Untergrund gelöst wurden, können sich danach nicht wieder festheften, was die Lebenserwartung der Tiere anscheinend stark senkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, *Ciona intestinalis* im eigenen Labor nach den abgewandelten Protokollen von Cirino *et al.* (2002) und Hendrickson *et al.* (2004) in einer kleinen geschlossenen Meerwasseraquarienanlage zu züchten. Zwar gelang es nach der künstlich induzierten Abgabe von Spermien und Eiern, befruchtete Eizellen zu bekommen, von denen sich aber nur wenige zu freischwimmenden Larven entwickelten. Diese starben dann nach wenigen Tagen, ohne sich festzusetzen und eine Metamorphose zum jungen adulten Tier zu vollziehen. In den beschriebenen Protokollen von Cirino *et al.* (2002) und Hendrickson *et al.* (2004) werden direkt am Meer gelegene Aquarienanlagen mit permanentem Durchfluss von frischem Meerwasser für die Zucht von *C. intestinalis* verwendet. Dies scheint ein entscheidender Faktor zu sein, der die Zucht deutlich erleichtert. Interessanterweise gelang es während eines Forschungsaufenthalts auf Helgoland in den dort vorhandenen Aquarienanlagen mit permanentem Durchfluss frischen Meerwassers, *C. intestinalis* in großer Zahl über das Larvenstadium hinaus bis zu festsitzenden jungen adulten Tieren heranzuziehen.

Erst kürzlich berichteten Joly *et al.* (2007) von der erfolgreichen Etablierung einer Methode zur Kultivierung und Zucht von *C. intestinalis* in einem großen, geschlossenen System im Inland. Die Errichtung eines vergleichbaren Systems könnte das Problem der begrenzten Verfügbarkeit von Tieren lösen, vorausgesetzt die Anlage weist eine gewisse Mindestkapazität auf. Orientiert man sich an den bei Joly *et al.* (2007) geschilderten Gegebenheiten, wäre dies jedoch nur mit einem wesentlich erhöhten Kosten- und vor allem Zeit- und Personalaufwand zu erreichen.

Für die weitere funktionelle Analyse der in dieser Arbeit beschriebenen Gene antimikrobieller Peptide wäre die Produktion von transgenen Tieren wünschenswert. Die Generierung und Haltung stabiler transgener Linien erfordert jedoch ebenfalls eine einwandfrei funktionierende Zucht von *C. intestinalis* über viele Generationen (Sasakura *et al.*, 2003; Joly *et al.*, 2007).

Die Methoden der genetischen Manipulation durch Elektroporation von DNA, RNA und Morpholinos in Eier von *C. intestinalis* können dagegen auch direkt an Tieren durchgeführt werden, die man zu diesem Zweck der Natur entnimmt (Satoh *et al.*, 2003). Die mit diesen Techniken erzielten Effekte sind jedoch nur von kurzer Dauer und deshalb ausschließlich für die Beobachtung von Auswirkungen auf die Embryogenese bis zum Larvenstadium geeignet. Die Überexpression und Stilllegung von Genen zur Beobachtung von Langzeiteffekten lässt

sich mit diesen Methoden nicht studieren. Ferner sind diese Methoden speziell für die Untersuchung von solchen Genen ungeeignet, die in Geweben wie dem Endostyl und den Hämocyten exprimiert werden, da diese sich erst während der Metamorphose zum adulten Tier entwickeln (Cloney, 1982; Passamaneck und Di Gregorio, 2005). Die Möglichkeit einer Anwendung der erwähnten Techniken bei adulten Tieren wurde bisher nicht beschrieben.

6 A ZUSAMMENFASSUNG

Neben der hochspezifischen zellvermittelten Immunantwort höherer Organismen besitzen sowohl Wirbeltiere als auch Wirbellose Mechanismen zur unspezifischen Abwehr von Pathogenen. Schlüsselmoleküle dieser so genannten angeborenen Immunantwort sind die antimikrobiellen Peptide, die eine schnelle und effiziente Verteidigung gegen eindringende Mikroorganismen bewirken.

Als am Meeresgrund lebender Filtrierer ist die Seescheide *Ciona intestinalis* einer ständigen Infektionsgefahr durch im Meerwasser lebende Mikroben ausgesetzt. Es ist daher anzunehmen, dass *C. intestinalis* ein effizientes Abwehrsystem aufweist, das den Besitz hoch wirksamer antimikrobieller Effektormoleküle einschließt.

Ziel dieser Arbeit war es, antimikrobielle Peptide aus *C. intestinalis* zu identifizieren und zu charakterisieren. Dabei sollten die vielfältigen Vorteile, die der Modellorganismus *C. intestinalis* durch die Verfügbarkeit umfangreicher Nukleotidsequenzdaten für die Identifizierung und Analyse gencodierter Proteine und Peptide bietet, intensiv genutzt werden.

Mehrere antimikrobielle Peptide wurden aus sauren Extrakten solcher Gewebe isoliert, für die eine besondere Barrierefunktion gegen Pathogene angenommen wurde. Die Identifizierung der molekularen Identität war für keines der gereinigten Peptide erfolgreich. Hierfür gibt es zwei wesentliche Ursachen. Wie sich erst im Verlauf dieser Arbeit herausstellte, gehören die in dieser Arbeit verwendeten und von Helgoland stammenden Tiere einer eigenen kryptischen Art an. Die Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Gene Helgoländer Individuen unterscheiden sich signifikant von denen der Tiere, die für das Genom- und EST-Projekt von *C. intestinalis* benutzt wurden. Hinzu kommt ein gehäuftes Vorkommen von Aminosäureresten mit unbekanntem posttranslationalen Modifikationen. Dadurch wird die Entschlüsselung der Primärstruktur isolierter Peptide sowohl mittels der Sequenzierreaktion nach Edman als auch über die Anwendung moderner massenspektrometrischer Methoden erheblich erschwert.

Eine intensive BLAST-Analyse gegen die Nukleotidsequenz-Datenbanken von *Ciona* führte zu dem Ergebnis, dass diese Tiere in ihrem Genom keine Gene besitzen, die für Orthologe bereits bekannter antimikrobieller Peptide codieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode der *in silico* Analyse entwickelt, mit der Gene identifiziert werden können, die für neuartige antimikrobielle Peptide codieren. Die Methode beruht auf einem *Screening* der übersetzten EST-Sequenzen von *C. intestinalis* unter Verwendung typischer struktureller Eigenschaften von antimikrobiellen Peptiden als Suchkriterien. Auf diese Weise konnten zwei Genfamilien (*Ci-mam* und *Ci-pap*) identifiziert werden, deren einzelne Mitglieder für mutmaßliche Vorläufermoleküle antimikrobieller

Peptide codieren. Diese Annahme wurde durch die Ergebnisse einer semiquantitativen RT-PCR Analyse gestützt. Demnach wurde die Transkriptionsrate einiger Mitglieder der beiden Genfamilien nach Immunstimulation in Hämozyten deutlich hochreguliert. Für die kationische Kernregion von fast allen identifizierten, mutmaßlichen Peptidvorläufermolekülen konnte eine alpha-helikale amphipathische Struktur vorhergesagt werden. Um die antimikrobielle Wirksamkeit der mutmaßlichen Verteidigungsproteine zu überprüfen, wurden zwei synthetische Peptide hergestellt, die jeweils der kationischen Kernregion eines Vertreters beider Peptidfamilien entsprachen.

Die beiden Ci-MAM-A24 und Ci-PAP-A22 genannten synthetischen Peptide wiesen eine starke Aktivität sowohl gegen eine Reihe von grampositiven und gramnegativen Bakterien einschließlich Pathogenen des Menschen und mariner Wirbelloser auf. Außerdem waren beide Peptide gegen den opportunistisch humanpathogenen Pilz *Candida albicans* aktiv.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass grampositive und gramnegative Bakterien von beiden Peptiden durch die Permeabilisierung ihrer zytoplasmatischen Membran getötet werden. Die Wirksamkeit der Peptide blieb bei verschiedenen pH-Werten bestehen und insbesondere zeigte sich die antibakterielle Aktivität von Ci-MAM-A24 außergewöhnlich tolerant gegenüber erhöhten Salzkonzentrationen im umgebenden Medium. Die hohe Salztoleranz der Aktivität von Ci-MAM-A24 deutet zusätzlich auf eine biologische Funktion der Peptidfamilie als Abwehrmoleküle hin, da *C. intestinalis* osmokonform im Meerwasser lebt. Im direkten Vergleich mit ihrer antimikrobiellen Aktivität waren die Peptide praktisch nicht zytolytisch gegen Erythrozyten von Säugetieren. Die Kombination dieser Eigenschaften macht die beiden synthetischen Peptide zu viel versprechenden Kandidaten, die als Matrizen für die Entwicklung neuartiger Antibiotika dienen könnten.

Um die natürlichen Pendanten der synthetischen Peptide nachweisen zu können, wurden die Peptide Ci-MAM-A24 and Ci-PAP-A22 als Antigene für die Generierung spezifischer Antikörper in Kaninchen verwendet. Immunozytochemische Analysen ergaben, dass die natürlichen Peptide in dem charakteristischen großen Kompartiment eines bestimmten Hämozytentyps, den univakuolären Granulozyten, gespeichert werden. Dieses Ergebnis konnte durch *in situ* Hybridisierungen bestätigt werden, indem die Transkripte, die für die Peptide codieren, im Zytoplasma desselben Zelltyps nachgewiesen wurden.

Die univakuolären Granulozyten wurden bereits in früherer Literatur über die zelluläre Immunantwort von *C. intestinalis* als eine besonders immunkompetente Population der Hämozyten beschrieben, die an verschiedenen Abwehrreaktionen beteiligt ist.

In Anbetracht der Tatsache, dass *C. intestinalis* keine Genprodukte besitzt, die antimikrobiellen Peptiden anderer Organismen ähneln, stellen die beiden beschriebenen Peptidfamilien höchst wahrscheinlich wichtige Effektormoleküle der Hämozyten zur Abwehr mikrobieller Infektionen bei Seescheiden dar.

6 B SUMMARY

Apart from the highly specific and cell-mediated immune response of higher organisms, all vertebrates and invertebrates possess some mechanisms to kill pathogens non-specifically. The key molecules of this, so called innate immunity are antimicrobial peptides. Antimicrobial peptides allow direct killing of invading microorganisms. The solitary ascidian, *Ciona intestinalis* lives in the sea bottom as a filter feeding organism and is therefore permanently exposed to pathogenic microbes present in the sea water. This suggests that they may exhibit powerful antimicrobial effector molecules. Goal of this study was to identify the genes encoding for antimicrobial peptides of *C. intestinalis* and to characterize their translational products. The availability of entire genome sequence and ESTs for *C. intestinalis* was more advantageous to carry out this study.

Certain body parts of *C. intestinalis* were assumed to have specially evolved to function as barriers against potential pathogens apart from their other functions. Acid extracts from these tissues were collected to identify antimicrobial peptides. Attempts to identify the molecular identity of these peptides were unsuccessful. The reasons were the following. During the course of this thesis work it has become clear that *C. intestinalis* collected from Heligoland used for this study comes under cryptic species. The antimicrobial peptide encoding genes and their derived amino acid sequences of Heligoland isolates were significantly different from that of *C. intestinalis* used for the genome and EST-project. Moreover, the occurrence of amino acid residues exhibiting unknown posttranslational modifications turned out to be exceptionally high. Thus the approaches to identify the primary structures of isolated peptides using Edman degradation and mass spectrometry have become more complicated. In addition, an extensive BLAST analysis against the nucleotide databases of *C. intestinalis* revealed, that these animals do not possess genes encoding for orthologs of antimicrobial peptides known from other organisms.

Therefore, a unique method was developed to identify novel antimicrobial peptide encoding genes by screening the translated EST sequences of *C. intestinalis*.

This method employs characteristic structural features of antimicrobial peptides as search criteria. By this way two gene families (*Ci-mam* and *Ci-pap*) coding for putative antimicrobial peptide precursors were discovered. The assumptions were supported by semiquantitative RT-PCR results, which show that the expression of some of these genes was markedly upregulated in hemocytes after immune challenge.

Furthermore, the cationic core regions of most of the putative peptide precursors were predicted to adopt an amphipathic alpha-helical structure. To evaluate the antimicrobial potency of these putative defense proteins, two peptides corresponding to cationic core region of one member of each peptide family were synthesized. Both synthetic peptides,

called as Ci-MAM-A24 and Ci-PAP-A22, exhibit strong antimicrobial activity against a set of Gram-positive and Gram-negative bacteria including several pathogens of human and marine invertebrates. Also these antimicrobial peptides are effective against opportunistic fungal pathogen, *Candida albicans*.

Moreover, it had been shown that these synthetic peptides killed Gram-positive and Gram-negative bacteria by permeabilizing their cytoplasmic membrane. The efficacy of these peptides retained at different pH values and interestingly the antibacterial activity of Ci-MAM-A24 was exceptionally salt tolerant. This property of Ci-MAM-A24 indicates its biological function as defense molecule of *C. intestinalis* as this organism lives osmoconform in sea water. In contrast to their antimicrobial activity the peptides were virtually non-cytolytic for mammalian erythrocytes. All the above results arrive at an idea that the synthetic peptide derivatives of putative antimicrobial peptides from *C. intestinalis* could be one among the valuable candidates for the development of novel antibiotics.

In order to detect the natural parent molecules, antibodies were raised in rabbits using the synthetic form of these peptides as antigens. Immunocytochemical analyses revealed that these natural peptides are stored in a characteristic large compartment of a distinct type of hemocytes, called the univacuolar granulocytes. These findings were further confirmed by *in situ* hybridization analyses demonstrating that the transcripts coding for these peptides were localized to the cytoplasm of the same cell type. Earlier literature about cellular immune response in *C. intestinalis* has shown that these univacuolar granulocytes are in particular immune competent subpopulation of hemocytes that are involved in diverse defense functions.

Since *C. intestinalis* apparently does not possess gene products that resemble well-known antimicrobial peptides of other organisms, the aforementioned peptide families may represent a potent armamentarium of the hemocytes to combat microbial infection in sea squirts.

7 LITERATUR

Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferreira, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wie, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M. und Venter, J. C. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195.

Aiello, A., Carbonelli, S., Esposito, G., Fattorusso, E., Iuvone, T. und Menna, M. (2000) Novel bioactive sulfated alkene and alkanes from the mediterranean ascidian *Halocynthia papillosa*. *J. Nat. Prod.* 63, 1590-1592.

Alder, J. D. (2005) Daptomycin: a new drug class for the treatment of Gram-positive infections. *Drugs Today (Barc)* 41, 81-90.

Alder, M. N., Rogozin, I. B., Iyer, L. M., Glazko, G. V., Cooper, M. D. und Pancer, Z. (2005) Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science* 310, 1970-1973.

Andersson, M., Gunne, H., Agerberth, B., Boman, A., Bergman, T., Sillard, R., Jornvall, H., Mutt, V., Olsson, B., Wigzell, H., *et al.* (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 antitumour activity. *EMBO J.* 14, 1615-1625.

Andrä, J., Jakovkin, I., Grötzinger, J., Hecht, O., Krasnosdembskaya, A. D., Goldmann, T., Gutsmann, T. und Leippe, M. (2008) Structure and mode of action of the antimicrobial peptide arenicin. *Biochem. J.* 410, 113-122.

- Aswad, D. W., Paranandi, M. V. und Schurter, B. T. (2000) Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *21*, 1129-1136.
- Azumi, K., Yokosawa, H. und Ishii, S. (1990) Halocyamines: novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Biochemistry* *29*, 159-165.
- Azumi, K., De Santis, R., De Tomaso, A., Rigoutsos, I., Yoshizaki, F., Pinto, M. R., Marino, R., Shida, K., Ikeda, M., Ikeda, M., Arai, M., Inoue, Y., Shimizu, T., Satoh, N., Rokhsar, D. S., Du Pasquier, L., Kasahara, M., Satake, M. und Nonaka, M. (2003) Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot". *Immunogenetics* *55*, 570-581.
- Barbachyn, M. R. und Ford, C. W. (2003) Oxazolidinone structure-activity relationships leading to linezolid. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *42*, 2010-2023.
- Bayard, C. und Lottspeich, F. (2001) Bioanalytical characterization of proteins. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* *756*, 113-122.
- Bayer, E., Schiefer, G., Waidelich, D., Scippa, S., und de Vincentiis, M. (1992) Structure of the tunichrome of tunicates and its role in concentrating vanadium. *Angew. Chem. Int. Ed.* *31*, 52-54.
- Belvin, M. P. und Anderson, K. V. (1996) A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* *12*, 393-416.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. und Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* *340*, 783-795.
- Birchler, T., Seibl, R., Büchner, K., Loeliger, S., Seger, R., Hossle, J. P., Aguzzi, A. und Lauener, R. P. (2001) Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3131-3137.
- Blunden, G. (2001) Biologically active compounds from marine organisms. *Phytother. Res.* *15*, 89-94.
- 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.
- Brogden, K. A., De Lucca, A. J., Bland, J. und Elliott, S. (1996) Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *193*, 412-416.
- Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 238-250.
- Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J. L., Lambert, J., Reichhart, J. M., Hoffmann, D., Hetru, C. und Hoffmann, J. A. (1991) Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *J. Biol. Chem.* *266*, 24520-24525.
- Caenorhabditis elegans* Sequencing Consortium. (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* *282*, 2012-2018.

- Cambi, A., Koopman, M. und Figdor, C. G. (2005) How C-type lectins detect pathogens. *Cell. Microbiol.* 7, 481-488.
- Caputi, L., Andreakis, N., Mastrototaro, F., Cirino, P., Vassillo, M. und Sordino, P. (2007) Cryptic speciation in a model invertebrate chordate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 9364-9369.
- Carneiro, L., Magalhaes, J., Tattoli, I., Philpott, D. J. und Travassos, L. (2008) Nod-like proteins in inflammation and disease. *J. Pathol.* 214, 136-148.
- Cerenius, L. und Söderhäll, K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* 198, 116-126.
- Chain, E., Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J. und Sanders, A. G. (1940) Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 2, 226-228.
- Chang, C. I., Zhang, Y. A., Zou, J., Nie, P. und Secombes, C. J. (2006) Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 185-195.
- Chen, H. C., Brown, J. H., Morell, J. L. und Huang, C. M. (1988) Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity. *FEBS Lett.* 236, 462-466.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T. J., Higgins, D. G. und Thompson, J. D. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31, 3497-3500.
- Chill, L., Aknin, M. und Kashman, Y. (2003) Barrenazine A and B; two new cytotoxic alkaloids from an unidentified tunicate. *Org. Lett.* 5, 2433-2435.
- Cima, F., Ballarin, L., Gasparini, F. und Burighel, P. (2006) External amebocytes guard the pharynx entry in a tunicate (Ascidacea). *Dev. Comp. Immunol.* 30, 463-472.
- Cirino, P., Toscano, A., Caramiello, D., Macina, A., Miraglia, V. und Monte, A. (2002) Laboratory culture of the ascidian *Ciona intestinalis* (L.): a model system for molecular developmental biology research. *Mar. Mod. Elec. Rec.* Erhältlich unter: <http://www.mbl.edu/html/BB/MMER/CIR/CirTit.html> [2008, 04, 03].
- Clark, N. M., Hershberger, E., Zervosc, M. J. und Lynch, J. P., 3rd. (2003) Antimicrobial resistance among gram-positive organisms in the intensive care unit. *Curr. Opin. Crit. Care* 9, 403-412.
- Cloney, R. A. (1982) Ascidian larvae and the events of metamorphosis. *Am. Zool.* 22, 817-826.
- Corbo, J. C., Di Gregorio, A. und Levine, M. (2001) The ascidian as a model organism in developmental and evolutionary biology. *Cell* 106, 535-538.
- Craig, A. G., Jimenez, E. C., Dykert, J., Nielsen, D. B., Gulyas, J., Abogadie, F. C., Porter, J., Rivier, J. E., Cruz, L. J., Olivera, B. M. und McIntosh, J. M. (1997) A novel post-translational modification involving bromination of tryptophan. Identification of the residue, L-6-bromotryptophan, in peptides from *Conus imperialis* and *Conus radiatus* venom. *J. Biol. Chem.* 272, 4689-4698.

- Cuthbertson, B. J., Deterding, L. J., Williams, J. G., Tomer, K. B., Etienne, K., Blackshear, P. J., Büllsbach, E. E. und Gross, P. S. (2008) Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 167-181.
- Daher, K. A., Lehrer, R. I., Ganz, T. und Kronenberg, M. (1989) Isolation and characterization of human defensin cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7327-7331.
- Dassanayake, R. S., Silva Gunawardene, Y. I. und Tobe, S. S. (2007) Evolutionary selective trends of insect/mosquito antimicrobial defensin peptides containing cysteine-stabilized alpha/beta motifs. *Peptides* **28**, 62-75.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M. und Bienert, M. (2001) Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Lett.* **501**, 146-150.
- Davidson, B. S. (1993) Ascidians: producers of amino acid-derived metabolites. *Chemical Reviews* **93**, 1771-1791.
- Davies-Coleman, M. T., Gustafson, K. R., Cantrell, C. L., Beutler, J. A., Pannell, L. K. und Boyd, M. R. (2000) Stolonin acids A and B, new cytotoxic cyclic peroxides from an Indian Ocean ascidian *Stolonica* species. *J. Nat. Prod.* **63**, 1411-1413.
- Dehal, P., Satou, Y., Campbell, R. K., Chapman, J., Degnan, B., De Tomaso, A., Davidson, B., Di Gregorio, A., Gelpke, M., Goodstein, D. M., Harafuji, N., Hastings, K. E., Ho, I., Hotta, K., Huang, W., Kawashima, T., Lemaire, P., Martinez, D., Meinertzhausen, I. A., Necula, S., Nonaka, M., Putnam, N., Rash, S., Saiga, H., Satake, M., Terry, A., Yamada, L., Wang, H. G., Awazu, S., Azumi, K., Boore, J., Branno, M., Chin-Bow, S., DeSantis, R., Doyle, S., Francino, P., Keys, D. N., Haga, S., Hayashi, H., Hino, K., Imai, K. S., Inaba, K., Kano, S., Kobayashi, K., Kobayashi, M., Lee, B. I., Makabe, K. W., Manohar, C., Matassi, G., Medina, M., Mochizuki, Y., Mount, S., Morishita, T., Miura, S., Nakayama, A., Nishizaka, S., Nomoto, H., Ohta, F., Oishi, K., Rigoutsos, I., Sano, M., Sasaki, A., Sasakura, Y., Shoguchi, E. Shin-i, T., Spagnuolo, A., Stainier, D., Suzuki, M. M., Tassy, O., Takatori, N., Tokuoka, M., Yagi, K., Yoshizaki, F., Wada, S., Zhang, C., Hyatt, P. D., Larimer, F., Detter, C., Doggett, N., Glavina, T., Hawkins, T., Richardson, P., Lucas, S., Kohara, Y., Levine, M., Satoh, N. und Rokhsar, D. S. (2002) The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* **298**, 2157-2167.
- Deléage, G., Combet, C., Blanchet, C. und Geourjon, C. (2001) ANTHEPROT: an integrated protein sequence analysis software with client/server capabilities. *Comput. Biol. Med.* **31**, 259-267.
- De Leo, G. (1992) Ascidian hemocytes and their involvement in defense reactions. *Boll. Zool.* **59**, 195-213.
- De Leo, G., Parrinello, N., Parrinello, D., Cassara, G. und di Bella, M. A. (1996) Encapsulation response of *Ciona intestinalis* (Ascidacea) to intratunical erythrocyte injection. I. The inner capsular architecture. *J. Invertebr. Pathol.* **67**, 205-212.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D. und Philippe, H. (2006) Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* **439**, 965-968.
- Dempsey, C. E. und Butler, G. S. (1992) Helical structure and orientation of melittin in dispersed phospholipid membranes from amide exchange analysis in situ. *Biochemistry* **31**, 11973-11977.

- Di Bella, M. A. und De Leo, G. (2000) Hemocyte migration during inflammatory-like reaction of *Ciona intestinalis* (Tunicata, ascidiacea). *J. Invertebr. Pathol.* **76**, 105-111.
- Di Gregorio, A. und Levine, M. (2002) Analyzing gene regulation in ascidian embryos: new tools for new perspectives. *Differentiation* **70**, 132-139.
- Dybern, B. I. (1963) Biotope choice in *Ciona intestinalis* (L.). Influence of light. *Zool. Bidr. Upps.* **35**, 171-199.
- Edman, P. (1949) A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch. Biochem.* **22**, 475.
- Endo, Y., Takahashi, M. und Fujita, T. (2006) Lectin complement system and pattern recognition. *Immunobiology* **211**, 283-293.
- Esser, A. F. (1994) The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. *Toxicology* **87**, 229-247.
- Fedders, H. und Leippe, M. (2008) A reverse search for antimicrobial peptides in *Ciona intestinalis*: Identification of a gene family expressed in hemocytes and evaluation of activity. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 286-298.
- Fedders, H., Michalek, M., Grötzinger, J. und Leippe, M. (2008) An exceptional salt tolerant antimicrobial peptide derived from a novel gene family of hemocytes of the marine invertebrate *Ciona intestinalis*. *Biochem. J.*, *in revision*.
- Ferlinz, K., Hurwitz, R., Vielhaber, G., Suzuki, K. und Sandhoff, K. (1994) Occurrence of two molecular forms of human acid sphingomyelinase. *Biochem. J.* **301**, 855-862.
- Findlay, C. und Smith, V. J. (1995) Antibacterial activity in the blood cells of the solitary ascidian, *Ciona intestinalis*, in vitro. *J. Exp. Zool.* **273**, 434-444.
- Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226-236.
- Fox, R. O. und Richards, F. M. (1982) A voltage-gated ion channel model inferred from the crystal structure of alamethicin at 1.5 Å resolution. *Nature* **300**, 325-330.
- Fritsche, T. R., Rhomberg, P. R., Sader, H. S. und Jones, R. N. (2008 a) Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride against contemporary fungal pathogens responsible for catheter-associated infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1187-1189.
- Fritsche, T. R., Rhomberg, P. R., Sader, H. S. und Jones, R. N. (2008 b) Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride tested against contemporary bacterial pathogens commonly responsible for catheter-associated infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 1092-1098.
- Fujita, T., Matsushita, M. und Endo, Y. (2004) The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* **198**, 185-202.
- Ganz, T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 710-720.
- Ge, Y., MacDonald, D. L., Holroyd, K. J., Thornsberry, C., Wexler, H. und Zasloff, M. (1999) In vitro antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 782-788.

- Gelhaus, C., Jacobs, T., Andrä, J. und Leippe, M. (2008) The antimicrobial peptide NK-2, the core region of mammalian NK-lysin, kills intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 1713-1720.
- Gutsmann, T., Rieckens, B., Bruhn, H., Wiese, A., Seydel, U. und Leippe, M. (2003) Interaction of amoebapores and NK-lysin with symmetric phospholipid and asymmetric lipopolysaccharide/phospholipid bilayers. *Biochemistry* *42*, 9804–9812.
- Hall, J. E., Vodyanoy, I., Balasubramanian, T. M. und Marshall, G. R. (1984) Alamethicin: a rich model for channel behavior. *Biophys. J.* *45*, 233-247.
- Hancock, R. E. (1984) Alterations in outer membrane permeability. *Annu. Rev. Microbiol.* *38*, 237-264.
- Hancock, R. E. (1997) Peptide antibiotics. *Lancet* *349*, 418-422.
- Hancock, R. E. und Sahl, H. G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* *24*, 1551-1557.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E. und Schröder, J. M. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* *387*, 861.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. und Anderson, K. V. (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* *52*, 269-279.
- Hazkani-Covo, E., Altman, N., Horowitz, M. und Graur, D. (2002) The evolutionary history of prosaposin: two successive tandem-duplication events gave rise to the four saposin domains in vertebrates. *J. Mol. Evol.* *54*, 30-34.
- He, K., Ludtke, S. J., Worcester, D. L. und Huang, H. W. (1996) Neutron scattering in the plane of membranes: structure of alamethicin pores. *Biophys. J.* *70*, 2659-2666.
- 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.
- Hedengren, M., Borge, K. und Hultmark, D. (2000) Expression and evolution of the *Drosophila* Attacin/Diptericin gene family. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* *279*, 574–581.
- Hendrickson, C., Christiaen, L., Deschet, K., Jiang, D., Joly, J. S., Legendre, L., Nakatani, Y., Tresser, J. und Smith, W. C. (2004) Culture of adult ascidians and ascidian genetics. *Methods Cell Biol.* *74*, 143-170.
- Herbst, R., Marciano-Cabral, F. und Leippe, M. (2004) Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. *J. Biol. Chem.* *279*, 25955-25958.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1986) Vereinfachte und universelle Methode zur Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen. Bemerkungen zum Mechanismus der Silberfärbung. *Pharmacia LBK-Applikationen RE-034*.
- Hibino, T., Loza-Coll, M., Messier, C., Majeske, A. J., Cohen, A. H., Terwilliger, D. P., Buckley, K. M., Brockton, V., Nair, S. V., Berney, K., Fugmann, S. D., Anderson, M. K., Pancer, Z., Cameron, R. A., Smith, L. C. und Rast, J. P. (2006) The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev. Biol.* *300*, 349-365.

- Hoffmann, J. A. (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426, 33-38.
- Iannelli, F., Pesole, G., Sordino, P. und Gissi, C. (2007) Mitogenomics reveals two cryptic species in *Ciona intestinalis*. *Trends Genet.* 23, 419-422.
- Immesberger, A. und Burmester, T. (2004) Putative phenoloxidases in the tunicate *Ciona intestinalis* and the origin of the arthropod hemocyanin superfamily. *J. Comp. Physiol. [B]* 174, 169-180.
- Inamori, K., Ariki, S. und Kawabata, S. (2004) A Toll-like receptor in horseshoe crabs. *Immunol. Rev.* 198, 106-115.
- Ishii, A., Kawasaki, M., Matsumoto, M., Tochinai, S. und Seya, T. (2007) Phylogenetic and expression analysis of amphibian *Xenopus* Toll-like receptors. *Immunogenetics* 59, 281-293.
- James, S. G., Holmström, C. und Kjelleberg, S. (1996) Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2783-2788.
- Janeway, C. A. Jr. und Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197-216.
- Jang, W. S., Kim, K. N., Lee, Y. S., Nam, M. H. und Lee, I. H. (2002) Halocidin: a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS Lett.* 521, 81-86.
- Jang, W. S., Kim, C. H., Kang, M. S., Chae, H. J., Son, S. M., Seo, S. J. und Lee, I. H. (2005) cDNA cloning of halocidin and a new antimicrobial peptide derived from the N-terminus of Ci-META4. *Peptides* 26, 2360-2367.
- Jeffery, W. R. (2001) Determinants of cell and positional fate in ascidian embryos. *Int. Rev. Cytol.* 203, 3-62.
- Jenssen, H., Hamill, P. und Hancock, R. E. (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 491-511.
- Johnson, P. T. und Chapman, F. A. (1970) Comparative studies on the *in vitro* response of bacteria to invertebrate body fluids. II. *Aplysia californica* and *Ciona intestinalis*. *J. Invertebr. Pathol.* 16, 259-267.
- Joly, J. S., Kano, S., Matsuoka, T., Auger, H., Hirayama, K., Satoh, N., Awazu, S., Legendre, L. und Sasakura, Y. (2007) Culture of *Ciona intestinalis* in closed systems. *Dev. Dyn.* 236, 1832-1840.
- Kacprzyk, L., Rydengård, V., Mörgelin, M., Davoudi, M., Pasupuleti, M., Malmsten, M. und Schmidtchen, A. (2007) Antimicrobial activity of histidine-rich peptides is dependent on acidic conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 2667-2680.
- Kavanagh, K. und Dowd, S. (2004) Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 285-289.
- Kawai, T. und Akira, S. (2007 a) TLR signaling. *Semin. Immunol.* 19, 24-32.
- Kawai, T. und Akira, S. (2007 b) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13, 460-469.

- Keller, F., Hanke, W., Trissl, D. und Bakker-Grunwald, T. (1989) Pore-forming protein from *Entamoeba histolytica* forms voltage- and pH-controlled multi-state channels with properties similar to those of the barrel-stave aggregates. *Biochim. Biophys. Acta* 982, 89–93.
- Kokryakov, V. N., Harwig, S. S. L., Panyutich, E. A., Shevchenko, A. A., Aleshina, G. M., Shamova, O. V., Korneva, H. A. und Lehrer, R. I. (1993) Protegrins, leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.* 327, 231–236.
- Kragol, G., Hoffmann, R., Chattergoon, M. A., Lovas, S., Cudic, M., Bulet, P., Condie, B. A., Rosengren, K. J., Montaner, L. J. und Otvos, L. Jr. (2002) Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the prolinerich peptide, pyrrococricin. *Eur. J. Biochem.* 269, 4226–4237.
- Kunike G. (1925) Nachweis und Verbreitung organischer Skeletsubstanzen bei Tieren. *Zeitschr. vergl. Physiol.* 2, 233-253.
- Ladokhin, A. S. und White, S. H. (1999). Folding of amphipathic α -helices on membranes: energetics of helix formation by melittin. *J. Mol. Biol.* 285, 1363-1369.
- Lai, R., Liu, H., Hui Lee, W. und Zhang, Y. (2002) An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 796-799.
- Lee, J. Y., Boman, A., Sun, C. X., Andersson, M., Jörnvall, H., Mutt, V. und Boman, H. G. (1989) Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9159-9162.
- Lee, S. H., Nakanishi, K. und Kustin, K. (1990) The intracellular pH of tunicate blood cells: *Ascidia ceratodes* whole blood, morula cells, vacuoles and cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta* 1033, 311-317.
- Lee, I. H., Zhao, C., Cho, Y., Harwig, S. S., Cooper, E. L. und Lehrer, R. I. (1997 a) Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Lett.* 400, 158-162.
- Lee, I. H., Cho, Y. und Lehrer, R. I. (1997 b) Styelins, broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 118, 515-521.
- Lee, I. H., Cho, Y. und Lehrer, R. I. (1997 c) Effects of pH and salinity on the antimicrobial properties of clavanins. *Infect. Immun.* 65, 2898-2903.
- Lee, I. H., Lee, Y. S., Kim, C. H., Kim, C. R., Hong, T., Menzel, L., Boo, L. M., Pohl, J., Sherman, M. A., Waring, A. und Lehrer, R. I. (2001 a) Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *Biochim. Biophys. Acta* 1527, 141-148.
- Lee, I. H., Zhao, C., Nguyen, T., Menzel, L., Waring, A. J., Sherman, M. A. und Lehrer, R. I. (2001 b) Clavaspirin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava*. *J. Pept. Res.* 58, 445-456.
- Leeb, M. (2004) Antibiotics: a shot in the arm. *Nature* 431, 892-893.
- Lehrer, R. I., Barton, A. und Ganz, T. (1988). Concurrent assessment of inner and outer membrane permeabilization and bacteriolysis in *E. coli* by multiple-wavelength spectrophotometry. *J. Immunol. Methods* 108, 153–158.

- Lehrer, R. I., Lee, I. H., Menzel, L., Waring, A. und Zhao, C. (2001) Clavanins and styelins, alpha-helical antimicrobial peptides from the hemocytes of *Styela clava*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **484**, 71-76.
- Lehrer, R. I., Vacquier, V. D. und Taylor, S. (2004) Novel post-translationally modified peptide antibiotics from solitary tunicates. California Sea Grant College Program. Research Completion Reports. Paper NMP04_02. (http://repositories.cdlib.org/csgc/rcr/NMP04_02)
- Leippe, M. und Renwranz, L. (1988) Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus* hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **12**, 297-308.
- 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., 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.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
- Liu, W. und Hansen, J. N. (1990) Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2551-2558.
- Liu, W. und Hansen, J. N. (1991) Conversion of *Bacillus subtilis* 168 to a subtilin producer by competence transformation. *J. Bacteriol.* **173**, 7387-7390.
- Loew, L. M., Rosenberg, I., Bridge, M. und Gitler, C. (1983) Diffusion potential cascade. Convenient detection of transferable membrane pores. *Biochemistry* **22**, 837-844.
- Lorenzini, D. M., da Silva, P. I. Jr., Fogaça, A. C., Bulet, P. und Daffre, S. (2003) Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 781-791.
- Maloy, W. L. und Kari, U. P. (1995) Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides. *Biopolymers* **37**, 105-122.
- Mandard, N., Sodano, P., Labbe, H., Bonmatin, J. M., Bulet, P., Hetru, C., Ptak, M. und Vovelle, F. (1998) Solution structure of thanatin, a potent bactericidal and fungicidal insect peptide, determined from proton two-dimensional nuclear magnetic resonance data. *Eur. J. Biochem.* **256**, 404-410.
- Marino, R., Kimura, Y., De Santis, R., Lambris, J. D. und Pinto, M. R. (2002) Complement in urochordates: cloning and characterization of two C3-like genes in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Immunogenetics* **53**, 1055-1064.

- Mason, A. J., Gasnier, C., Kichler, A., Prevost, G., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H. und Bechinger, B. (2006) Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine-rich peptides at acidic pH. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 3305-3311.
- Matsuoka, T., Awazu, S., Shoguchi, E., Satoh, N. und Sasakura, Y. (2005) Germline transgenesis of the ascidian *Ciona intestinalis* by electroporation. *Genesis* *41*, 67-72.
- 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.
- Matsuzaki, K. (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* *1462*, 1-10.
- Matthysse, A. G., Deschet, K., Williams, M., Marry, M., White, A. R. und Smith, W. C. (2004) A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *101*, 986-991.
- McAuliffe, O., Ross, R. P. und Hill, C. (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* *25*, 285-308.
- McGuffin, L. J., Bryson, K. und Jones, D. T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* *16*, 404-405.
- McManus, A. M., Dawson, N. F., Wade, J. D., Carrington, L. E., Winzor, D. J. und Craik, D. J. (2000) Three-dimensional structure of RK-1: a novel alpha-defensin peptide. *Biochemistry* *39*, 15757-15764.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. und Janeway, C. A. Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.
- Melo, M. N., Dugourd, D. und Castanho, M. A. (2006) Omiganan pentahydrochloride in the front line of clinical applications of antimicrobial peptides. *Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc.* *1*, 201-207.
- Menzel, L. P., Lee, I. H., Sjostrand, B. und Lehrer, R. I. (2002) Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* *26*, 505-515.
- Merrifield, R. B., Vizioli, L. D. und Boman, H. G. (1982) Synthesis of the antibacterial peptide cecropin A (1-33). *Biochemistry* *21*, 5020-5031.
- Michaelson, D., Rayner, J., Couto, M. und Ganz, T. (1992) Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J. Leukoc. Biol.* *51*, 634-639.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F. und Roch, P. (1999) Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci.* *112*, 4233-4242.
- Monner, D. A., Jonsson, S. und Boman, H. G. (1971) Ampicillin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12 with lipopolysaccharide alterations affecting mating ability and susceptibility to sex-specific bacteriophages. *J. Bacteriol.* *107*, 420-432.
- Morgan, T. H. (1940) An interim report on cross and self fertilisation in *Ciona*. *J. Exp. Zool.* *85*, 1-32.

- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.
- Munford, R. S. und Hunter, J. P. (1992) Acyloxyacyl hydrolase, a leukocyte enzyme that deacylates bacterial lipopolysaccharides, has phospholipase, lysophospholipase, diacylglycerollipase, and acyltransferase activities in vitro. *J. Biol. Chem.* **267**, 10116-10121.
- 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.
- Munoz, M., Vandenbulcke, F., Saulnier, D. und Bachere, E. (2006) Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2678-2689.
- Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T. und Shimonishi, Y. (1988) Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J. Biol. Chem.* **263**, 16709-16713.
- Nakashima, K., Yamada, L., Satou, Y., Azuma, J. und Satoh, N. (2004) The evolutionary origin of animal cellulose synthase. *Dev. Genes Evol.* **214**, 81-88.
- Nakayama, A., Satou, Y. und Satoh, N. (2002) Further characterization of genes expressed during *Ciona intestinalis* metamorphosis. *Differentiation* **70**, 429-437.
- Nickel, R., Ott, C., Dandekar, T. und Leippe, M. (1999) Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. Similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. *Eur. J. Biochem.* **265**, 1002-1007.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **10**, 1-6.
- Nishida, H. (1987) Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. Up to the tissue restricted stage. *Dev. Biol.* **121**, 526-541.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**, 249-266.
- Ogasawara, M., Di Lauro, R. und Satoh, N. (1999) Ascidian homologs of mammalian thyroid peroxidase genes are expressed in the thyroid-equivalent region of the endostyle. *J. Exp. Zool.* **285**, 158-169.
- Oltz, E. M., Bruening, R. C., Smith, M. J., Kustin, K., und Nakanishi, K. (1988) The tunichromes. A class of reducing blood pigments from sea squirts: Isolation, structures and vanadium chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 6162-6172.
- Oshiumi, H., Tsujita, T., Shida, K., Matsumoto, M., Ikeo, K. und Seya, T. (2003) Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics* **54**, 791-800.
- Otvos, L. Jr. (2002) The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1138-1150.

- Pancer, Z., Amemiya, C. T., Ehrhardt, G. R., Ceitlin, J., Gartland, G. L. und Cooper, M. D. (2004) Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* **430**, 174-180.
- Park, C. B., H. S. Kim, und S. C. Kim. (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 253–257.
- Park, C. B., Yi, K. S., Matsuzaki, K., Kim, M. S. und Kim, S. C. (2000) Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8245-8250.
- Parrinello, N., De Leo, G. und Di Bella, M. A. (1990) Fine structural observations of the granulocytes involved in the tunic inflammatory-like reaction of *Ciona intestinalis* (Tunicata). *J. Invertebr. Pathol.* **56**, 181-189.
- Parrinello, N., Cammarata, M. und Arizza, V. (1996) Univacuolar refractile hemocytes from the tunicate *Ciona intestinalis* are cytotoxic for mammalian erythrocytes in vitro. *Biol. Bull.* **190**, 418-425.
- Parrinello, N., Arizza, V., Chinnici, C., Parrinello, D. und Cammarata, M. (2003) Phenoloxidases in ascidian hemocytes: characterization of the pro-phenoloxidase activating system. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **135**, 583-591.
- Passamaneck, Y. J. und Di Gregorio, A. (2005) *Ciona intestinalis*: chordate development made simple. *Dev. Dyn.* **233**, 1-19.
- Patthy L. (1991) Homology of the precursor of pulmonary surfactant-associated protein SP-B with prosaposin and sulfated glycoprotein 1. *J. Biol. Chem.* **266**, 6035-6037.
- Peddie, C. M. und Smith, V. J. (1993) In vitro spontaneous cytotoxic activity against mammalian target cells by the hemocytes of the solitary ascidian, *Ciona intestinalis*. *J. Exp. Zool.* **267**, 616-23.
- Pena, S. V., Hanson, D. A., Carr, 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.
- Perron, G. G., Zasloff, M. und Bell, G. (2006) Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proc. Biol. Sci.* **273**, 251-256.
- Pick, U. (1981) Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures. *Arch. Biochem. Biophys.* **212**, 186-194.
- 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.
- Pinto, M. R., Chinnici, C. M., Kimura, Y., Melillo, D., Marino, R., Spruce, L. A., De Santis, R., Parrinello, N. und Lambris, J. D. (2003) CiC3-1a-mediated chemotaxis in the deuterostome invertebrate *Ciona intestinalis* (Urochordata). *J. Immunol.* **171**, 5521-5528.
- Powers, J. P., Rozek, A. und Hancock, R. E. (2004) Structure-activity relationships for the beta-hairpin cationic antimicrobial peptide polyphemusin I. *Biochim. Biophys. Acta* **1698**, 239-250.

- Powers, J. P., Tan, A., Ramamoorthy, A. und Hancock, R. E. (2005) Solution structure and interaction of the antimicrobial polyphemusins with lipid membranes. *Biochemistry* *44*, 15504-15513.
- Powers, J. P., Martin, M. M., Goosney, D. L. und Hancock, R. E. (2006) The antimicrobial peptide polyphemusin localizes to the cytoplasm of *Escherichia coli* following treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 1522-1524.
- Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L., Winton, J. R. und Roach, J. C. (2006) Conservation of Toll-like receptor signaling pathways in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* *1*, 77-88.
- Qian, S., Wang, W., Yang, L. und Huang, H. W. (2008) Structure of the alamethicin pore reconstructed by x-ray diffraction analysis. *Biophys. J.* *94*, 3512-3522.
- Quackenbush, J., Cho, J., Lee, D., Liang, F., Holt, I., Karamycheva, S., Parvizi, B., Pertea, G., Sultana, R. und White, J. (2001) The TIGR Gene Indices: analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nucleic Acids Res.* *29*, 159-164.
- Raja, A., LaBonte, J., Lebbos, J. und Kirkpatrick, P. (2003) Daptomycin. *Nat. Rev. Drug Discovery.* *2*, 943-944.
- Rast, J. P., Smith, L. C., Loza-Coll, M., Hibino, T. und Litman, G. W. (2006) Genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science* *314*, 952-956.
- Rinehart, K. L. Jr., Gloer, J. B., Hughes, R. G. Jr., Renis, H. E., McGovern, J. P., Swynenberg, E. B., Stringfellow, D. A., Kuentzel, S. L. und Li, L. H. (1981) Didemnins: antiviral and antitumor depsipeptides from a caribbean tunicate. *Science* *212*, 933-935.
- Robinson, M. J., Sancho, D., Slack, E. C., LeibundGut-Landmann, S. und Reis e Sousa, C. (2006) Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat. Immunol.* *7*, 1258-1265.
- Rosati, F. und de Santis, R. (1978) Studies on fertilization in the Ascidans. I. Self-sterility and specific recognition between gametes of *Ciona intestinalis*. *Exp. Cell Res.* *112*, 111-119.
- Rosenstiel, P., Jacobs, G., Till, A. und Schreiber, S. (2008) NOD-like receptors: Ancient sentinels of the innate immune system. *Cell. Mol. Life Sci.* [Epub ahead of print]
- Rowley, A. F. (1981) The blood cells of the sea squirt *Ciona intestinalis*: Morphology, differential counts, and in vitro phagocytic activity. *J. Invertebr. Pathol.* *37*, 91-100.
- Rowley, A. F. (1982 a) The blood cells of *Ciona intestinalis*: An electron probe X-ray microanalytical study. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* *62*, 607-620.
- Rowley, A. F. (1982 b) Ultrastructural and cytochemical studies on the blood cells of the sea squirt, *Ciona intestinalis*. I. Stem cells and amoebocytes. *Cell Tissue Res.* *223*, 403-414.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-1354.
- Sasakura, Y., Awazu, S., Chiba, S. und Satoh, N. (2003) Germ-line transgenesis of the Tc1/mariner superfamily transposon Minos in *Ciona intestinalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *100*, 7726-7730.

- Sasakura, Y., Oogai, Y., Matsuoka, T., Satoh, N. und Awazu, S. (2007) Transposon mediated transgenesis in a marine invertebrate chordate: *Ciona intestinalis*. *Genome Biol.* 8 Suppl 1:S3.
- Satoh, N., Satou, Y., Davidson, B. und Levine, M. (2003) *Ciona intestinalis*: an emerging model for whole-genome analyses. *Trends Genet.* 19, 376-381.
- Satoh, N. und Levine, M. (2005) Surfing with the tunicates into the post-genome era. *Genes Dev.* 19, 2407-2411.
- Satou, Y., Imai, K. S. und Satoh, N. (2001) Action of morpholinos in *Ciona* embryos. *Genesis* 30, 103-106.
- Satou, Y., Kawashima, T., Shoguchi, E., Nakayama, A. und Satoh, N. (2005) An integrated database of the ascidian, *Ciona intestinalis*: towards functional genomics. *Zoolog. Sci.* 22, 837-843.
- Sawai, M. V., Jia, H. P., Liu, L., Aseyev, V., Wiencek, J. M., McCray, P. B. Jr., Ganz, T., Kearney, W. R. und Tack, B. F. (2001) The NMR structure of human beta-defensin-2 reveals a novel alpha-helical segment. *Biochemistry* 40, 3810-3816.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A. und Schlissel, M. S. (1992) V(D)J recombination: molecular biology and regulation. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 359-383.
- Schitteck, B., Hipfel, R., Sauer, B., Bauer, J., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Schirle, M., Schroeder, K., Blin, N., Meier, F., Rassner, G. und Garbe, C. (2001) Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat. Immunol.* 2, 1133-1137.
- Sekine, H., Kenjo, A., Azumi, K., Ohi, G., Takahashi, M., Kasukawa, R., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T., Matsushita, M., Endo, Y. und Fujita, T. (2001) An ancient lectin-dependent complement system in an ascidian: novel lectin isolated from the plasma of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *J. Immunol.* 167, 4504-4510.
- Selsted, M. E., Harwig, S. S., Ganz, T., Schilling, J.W. und Lehrer, R. I. (1985) Primary structures of three human neutrophil defensins. *J. Clin. Invest.* 76, 1436-1439.
- Selsted, M. E., Novotny, M. J., Morris, W. L., Tang, Y. Q., Smith, W. und Cullor, J. S. (1992) Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.* 267, 4292-4295.
- Selsted, M. E., Tang, Y. Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W., Henschen, A. H. und Cullor, J. S. (1993) Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268, 6641-6648.
- Selsted, M. E. (2004) Theta-defensins: cyclic antimicrobial peptides produced by binary ligation of truncated alpha-defensins. *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 365-371.
- Semple, C. A., Gautier, P., Taylor, K. und Dorin, J. R. (2006) The changing of the guard: Molecular diversity and rapid evolution of beta-defensins. *Mol. Divers.* 10, 575-584.

- Shida, K., Terajima, D., Uchino, R., Ikawa, S., Ikeda, M., Asano, K., Watanabe, T., Azumi, K., Nonaka, M., Satou, Y., Satoh, N., Satake, M., Kawazoe, Y. und Kasuya, A. (2003) Hemocytes of *Ciona intestinalis* express multiple genes involved in innate immune host defense. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 207-218.
- Shinnar, A. E., Butler, K. L. und Park, H. J. (2003) Cathelicidin family of antimicrobial peptides: proteolytic processing and protease resistance. *Bioorg. Chem.* **31**, 425-436.
- Simmaco, M., Mignogna, G. und Barra, D. (1998) Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* **47**, 435-450.
- Smith, V. J. und Söderhäll, K. (1991) A comparison of phenoloxidase activity in the blood of marine invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* **15**, 251-261.
- Smith, V. J. und Peddie, C. M. (1992) Cell cooperation during host defense in the solitary tunicate *Ciona intestinalis* (L). *Biol. Bull.* **183**, 211-219.
- Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. A., Angerer, R. C., Angerer, L. M., Arnone, M. I., Burgess, D. R., Burke, R. D., Coffman, J. A., Dean, M., Elphick, M. R., Etensohn, C. A., Foltz, K. R., Hamdoun, A., Hynes, R. O., Klein, W. H., Marzluff, W., McClay, D. R., Morris, R. L., Mushegian, A., Rast, J. P., Smith, L. C., Thorndyke, M. C., Vacquier, V. D., Wessel, G. M., Wray, G., Zhang, L., Elsik, C. G., Ermolaeva, O., Hlavina, W., Hofmann, G., Kitts, P., Landrum, M. J., Mackey, A. J., Maglott, D., Panopoulou, G., Poustka, A. J., Pruitt, K., Sapojnikov, V., Song, X., Souvorov, A., Solovyev, V., Wie, Z., Whittaker, C. A., Worley, K., Durbin, K. J., Shen, Y., Fedrigo, O., Garfield, D., Haygood, R., Primus, A., Satija, R., Severson, T., Gonzalez-Garay, M. L., Jackson, A. R., Milosavljevic, A., Tong, M., Killian, C. E., Livingston, B. T., Wilt, F. H., Adams, N., Bellé, R., Carbonneau, S., Cheung, R., Cormier, P., Cosson, B., Croce, J., Fernandez-Guerra, A., Genevière, A. M., Goel, M., Kelkar, H., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Robertson, A. J., Goldstone, J. V., Cole, B., Epel, D., Gold, B., Hahn, M. E., Howard-Ashby, M., Scally, M., Stegeman, J. J., Allgood, E. L., Cool, J., Judkins, K. M., McCafferty, S. S., Musante, A. M., Obar, R. A., Rawson, A. P., Rossetti, B. J., Gibbons, I. R., Hoffman, M. P., Leone, A., Istrail, S., Materna, S. C., Samanta, M. P., Stolc, V., Tongprasit, W., Tu Q., Bergeron, K. F., Brandhorst, B. P., Whittle, J., Berney, K., Bottjer, D. J., Calestani, C., Peterson, K., Chow, E., Yuan, Q. A., Elhaik, E., Graur, D., Reese, J. T., Bosdet, I., Heesun, S., Marra, M. A., Schein, J., Anderson, M. K., Brockton, V., Buckley, K. M., Cohen, A. H., Fugmann, S. D., Hibino, T., Loza-Coll, M., Majeske, A. J., Messier, C., Nair, S. V., Pancer, Z., Terwilliger, D. P., Agca, C., Arboleda, E., Chen, N., Churcher, A. M., Hallböök, F., Humphrey, G. W., Idris, M. M., Kiyama, T., Liang, S., Mellott, D., Mu, X., Murray, G., Olinski, R. P., Raible, F., Rowe, M., Taylor, J. S., Tessmar-Raible, K., Wang, D., Wilson, K. H., Yaguchi, S., Gaasterland, T., Galindo, B. E., Gunaratne, H. J., Juliano, C., Kinukawa, M., Moy, G. W., Neill, A. T., Nomura, M., Raisch, M., Reade, A., Roux, M. M., Song, J. L., Su, Y. H., Townley, I. K., Voronina, E., Wong, J. L., Amore, G., Branno, M., Brown, E. R., Cavalieri, V., Duboc, V., Duloquin, L., Flytzanis, C., Gache, C., Lapraz, F., Lepage, T., Locascio, A., Martinez, P., Matassi, G., Matranga, V., Range, R., Rizzo, F., Röttinger, E., Beane, W., Bradham, C., Byrum, C., Glenn, T., Hussain, S., Manning, G., Miranda, E., Thomason, R., Walton, K., Wikramanayake, A., Wu, S. Y., Xu, R., Brown, C. T., Chen, L., Gray, R. F., Lee, P. Y., Nam, J., Oliveri, P., Smith, J., Muzny, D., Bell, S., Chacko, J., Cree, A., Curry, S., Davis, C., Dinh, H., Dugan-Rocha, S., Fowler, J., Gill, R., Hamilton, C., Hernandez, J., Hines, S., Hume, J., Jackson, L., Jolivet, A., Kovar, C., Lee, S., Lewis, L., Miner, G., Morgan, M., Nazareth, L. V., Okwuonu, G., Parker, D., Pu, L. L., Thorn, R. und Wright, R. (2006) The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* **314**, 941-952.
- Sørensen, O. E., Thapa, D. R., Rosenthal, A., Liu, L., Roberts, A. A. und Ganz, T. (2005) Differential regulation of beta-defensin expression in human skin by microbial stimuli. *J. Immunol.* **174**, 4870-4879.

- Steinberg, D. A., Hurst, M. A., Fujii, C. A., Kung, A. H., Ho, J. F., Cheng, F. C., Loury, D. J. und Fiddes, J. C. (1997) Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* *41*, 1738-1742.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engstrom, A., Bennich, H. und Boman, H. G. (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* *292*, 246-248.
- Stensvåg, K., Haug, T., Sperstad, S. V., Rekdal, O., Indrevoll, B. und Styrvold, O. B. (2008) Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Dev. Comp. Immunol.* *32*, 275-285.
- Storch, V. und Welsch, U. (1996) Kükenthal Zoologisches Praktikum. 22., neubearb. Aufl. – Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm: G. Fischer.
- Sudhaus, H. (2006) Charakterisierung antimikrobieller Peptide von *Ciona intestinalis*. Diplomarbeit, Universität Kiel.
- Suzuki, M. M., Nishikawa, T. und Bird, A. (2005) Genomic approaches reveal unexpected genetic divergence within *Ciona intestinalis*. *J. Mol. Evol.* *61*, 627-635.
- Takeda, K., Kaisho, T. und Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 335-376.
- Tang, Y. Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Ouellette, A. J. und Selsted, M. E. (1999) A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*. *286*, 498-502.
- Tasiemski, A., Schikorski, D., Le Marrec-Croq, F., Pontoire-Van Camp, C., Boidin-Wichlacz, C. und Sautière, P. E. (2007) Hedistin: A novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. *Dev. Comp. Immunol.* *31*, 749-762.
- Taylor, S. W., Ross, M. M. und Waite, J. H. (1995) Novel 3,4-di- and 3,4,5-trihydroxyphenylalanine-containing polypeptides from the blood cells of the ascidians *Ascidia ceratodes* and *Molgula manhattensis*. *Arch. Biochem. Biophys.* *324*, 228-240.
- Taylor, S. W., Kammerer, B., Nicholson, G. J., Pusecker, K., Walk, T., Bayer, E., Scippa, S. und de Vincentiis, M. (1997) Morulin Pm: a modified polypeptide containing TOPA and 6-bromotryptophan from the morula cells of the ascidian, *Phallusia mammillata*. *Arch. Biochem. Biophys.* *348*, 278-288.
- Taylor, S. W., Craig, A. G., Fischer, W. H., Park, M. und Lehrer, R. I. (2000) Styelin D, an extensively modified antimicrobial peptide from ascidian hemocytes. *J. Biol. Chem.* *275*, 38417-38426.
- Tennessen, J. A. (2005) Molecular evolution of animal antimicrobial peptides: widespread moderate positive selection. *J. Evol. Biol.* *18*, 1387-1394.
- Tenor, J. L. und Aballay, A. (2008) A conserved Toll-like receptor is required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *EMBO Rep.* *9*, 103-109.
- Teo, S. L. M. und Ryland, J. S. (1994) Toxicity and palatability of some British ascidians. *Mar. Biol.* *120*, 297-303.

- 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.
- Thiel, S. (2007) Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol. Immunol.* **44**, 3875-3888.
- Tincu, J. A., Craig, A. G. und Taylor, S. W. (2000) Plicatamide: A lead to the biosynthetic origins of the tunichromes? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 421-424.
- Tincu, J. A. und Taylor, S. W. (2002) Tunichrome sp-1: new pentapeptide tunichrome from the hemocytes of *Styela plicata*. *J. Nat. Prod.* **65**, 377-378.
- Tincu, J. A., Menzel, L. P., Azimov, R., Sands, J., Hong, T., Waring, A. J., Taylor, S. W. und Lehrer, R. I. (2003) Plicatamide, an antimicrobial octapeptide from *Styela plicata* hemocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 13546-13553.
- Tincu, J. A. und Taylor, S. W. (2004) Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3645-3654.
- Ting, J. P. und Davis, B. K. (2005) CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 387-414.
- Toh, Y., Mizutani, A., Tokunaga, F., Muta, T. und Iwanaga, S. (1991) Morphology of the granular hemocytes of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* and immunocytochemical localization of clotting factors and antimicrobial substances. *Cell Tissue Res.* **266**, 137-147.
- Tokuoka, M., Imai, K. S., Satou, Y. und Satoh, N. (2004) Three distinct lineages of mesenchymal cells in *Ciona intestinalis* embryos demonstrated by specific gene expression. *Dev. Biol.* **274**, 211-224.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Tsukamoto, S., Kato, H., Hirota, H. und Fusetani, N. (1994) Antibacterial and antifungal sulfated alkane and alkenes from the hepatopancreas of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *J. Nat. Prod.* **57**, 1606-1609.
- Uddin, M. J., Kokubo, S., Ueda, K., Suenaga, K. und Uemura, D. (2001) Haterumaimides F-I, four new cytotoxic diterpene alkaloids from an ascidian *Lissoclinum* species. *J. Nat. Prod.* **64**, 1169-1173.
- Uehara, A., Fujimoto, Y., Fukase, K. und Takada, H. (2007) Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol.* **44**, 3100-3111.
- Vaccaro, A. M., Salvioli, R., Tatti, M. und Ciaffoni, F. (1999) Saposins and their interaction with lipids. *Neurochem. Res.* **24**, 307-314.
- Valore, E. V. und Ganz, T. (1992) Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. *Blood* **79**, 1538-1544.

- Valore, E. V., Martin, E., Harwig, S. S. und Ganz, T. (1996) Intramolecular inhibition of human defensin HNP-1 by its propeptide. *J. Clin. Invest.* *97*, 1624-1629.
- Valore, E. V., Park, C. H., Quayle, A. J., Wiles, K. R., McCray, P. B. Jr. und Ganz, T. (1998) Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J. Clin. Invest.* *101*, 1633-1642.
- van Dijk, A., Veldhuizen, E. J., van Asten, A. J. und Haagsman, H. P. (2005) CMAP27, a novel chicken cathelicidin-like antimicrobial protein. *Vet. Immunol. Immunopathol.* *106*, 321-327.
- van Kan, E. J., Demel, R. A., Breukink, E., van der Bent, A. und de Kruijff, B. (2002) Clavanin permeabilizes target membranes via two distinctly different pH-dependent mechanisms. *Biochemistry* *41*, 7529-7539.
- Vignal, E., Chavanieu, A., Roch, P., Chiche, L., Grassy, G., Calas, B. und Aumelas, A. (1998) Solution structure of the antimicrobial peptide ranalexin and a study of its interaction with perdeuterated dodecylphosphocholine micelles. *Eur. J. Biochem.* *253*, 221-228.
- von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S. und Häbich, D. (2006) Antibakterielle Naturstoffe in der medizinischen Chemie – Exodus oder Renaissance? *Angew. Chem.* *118*, 5194–5254.
- Voss, E., Wehkamp, J., Wehkamp, K., Stange, E. F., Schröder, J. M. und Harder, J. (2006) NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J. Biol. Chem.* *281*, 2005-2011.
- Waksman, S. A. und Schatz, A. (1945) Streptomycin - Origin, Nature, and Properties. *J. Am. Pharm. Assoc.* *34*, 273-291.
- Wiens, M., Korzhev, M., Perovic-Ottstadt, S., Luthringer, B., Brandt, D., Klein, S. und Müller, W. E. (2007) Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (demospongiae: Porifera). *Mol. Biol. Evol.* *24*, 792-804.
- Williams, R.W., Starman, R., Taylor, K. M., Gable, K., Beeler, T., Zasloff, M. und Covell D. (1990) Raman spectroscopy of synthetic antimicrobial frog peptides magainin 2a and PGLa. *Biochemistry* *29*, 4490-4496.
- World Health Organization (2004) *The world health report 2004 - changing history*, "Annex Table 2: Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002".
- Wright, R. K. (1981) Urochordates. In: Ratcliffe NA, Rowley AF (eds) *Invertebrate blood cells* Vol 2. Academic Press, London, 565-626.
- Wu, M., Maier, E., Benz, R. und Hancock, R. E. (1999) Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry.* *38*, 7235-7242.
- Xiao, Y., Hughes, A. L., Ando, J., Matsuda, Y., Cheng, J. F., Skinner-Noble, D. und Zhang, G. (2004) A genome-wide screen identifies a single beta-defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins. *BMC Genomics.* *5*, 56.
- Yamada, L., Shoguchi, E., Wada, S., Kobayashi, K., Mochizuki, Y., Satou, Y. und Satoh, N. (2003) Morpholino-based gene knockdown screen of novel genes with developmental function in *Ciona intestinalis*. *Development* *130*, 6485-6495.

- Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L. und Huang, H. W. (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* *81*, 1475-1485.
- Yeaman, M. R. und Yount, N. Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* *55*, 27-55.
- Zaalouk, T. K., Bajaj-Elliott, M., George, J. T. und McDonald, V. (2004) Differential regulation of beta-defensin gene expression during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect. Immun.* *72*, 2772-2779.
- Zanetti, M. (2004) Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J. Leukoc. Biol.* *75*, 39-48.
- Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *84*, 5449-5453.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* *415*, 389-395.
- Zhang, L., Parente, J., Harris, S. M., Woods, D. E., Hancock, R. E. und Falla, T. J. (2005) Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 2921-2927.
- Zhao, C., Liaw, L., Lee, I. H. und Lehrer, R. I. (1997 a) cDNA cloning of Clavanins: antimicrobial peptides of tunicate hemocytes. *FEBS Lett.* *410*, 490-492.
- Zhao, C., Liaw, L., Lee, I. H. und Lehrer, R. I. (1997 b) cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela clava*. *FEBS Lett.* *412*, 144-148.
- Zhao, C., Nguyen, T., Boo, L. M., Hong, T., Espiritu, C., Orlov, D., Wang, W., Waring, A. und Lehrer, R. I. (2001) RL-37, an alpha-helical antimicrobial peptide of the rhesus monkey. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 2695-2702.
- Zhu, Y., Thangamani, S., Ho, B. und Ding, J. L. (2005) The ancient origin of the complement system. *EMBO J.* *24*, 382-394.
- Zou, G., de Leeuw, E., Li, C., Pazgier, M., Li, C., Zeng, P., Lu, W. Y., Lubkowski, J. und Lu, W. (2007) Toward understanding the cationicity of defensins. Arg and Lys versus their noncoded analogs. *J. Biol. Chem.* *282*, 19653-19665.

8 ANHANG

8.1 Reinigung antimikrobieller Peptide

8.1.1 Peptide 1 und 2

- Quelle:** - Mantelinnenseite
- Extraktionsmethode:** - saures Extraktionsmedium
- Zentrifugation bei $150.000 \times g$
- Vorfraktionierung:** - Überstand auf Sep-Pak tC18-Säule
- stufenweise Elution mit 10, 20, 25, 30, 40, 50 und 84 % ACN in 0,1 % TFA

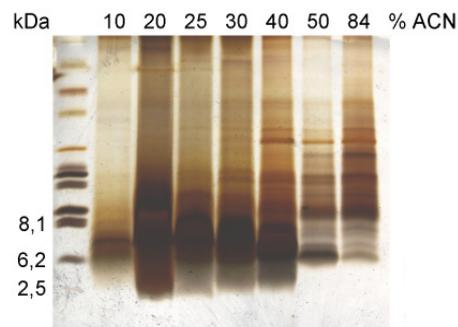


Abb. A 1: Silbergefärbtes SDS-Tricine-Gel mit den Protein-Fractionen nach Elution von der Sep-Pak tC18-Säule.

Reinigung:

- 1. Schritt:** Gelfiltrationschromatographie (SuperdexTM Peptide) mit der Fraktion 20 % ACN nach Elution von der Sep-Pak tC18-Säule.

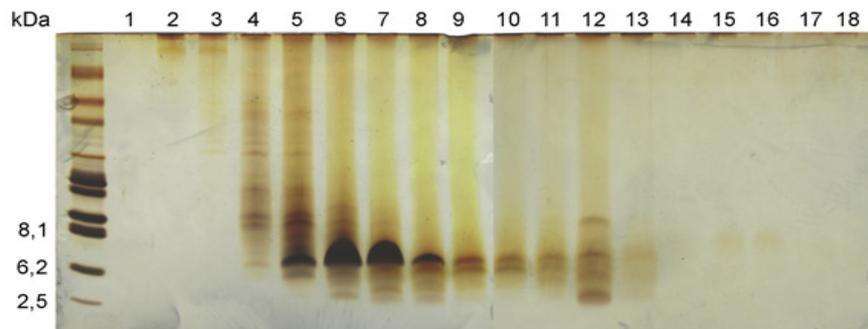


Abb. A 2: Silbergefärbtes SDS-Tricine-Gel mit den Peptid-Fractionen nach Gelfiltrationschromatographie (SuperdexTM Peptide).

2. Schritt: Vereinigung der Fraktionen 14-16 aus Schritt 1 und Reinigung über HPLC (PRP-3-Säule), Gradient: 0,5 % ACN pro min.

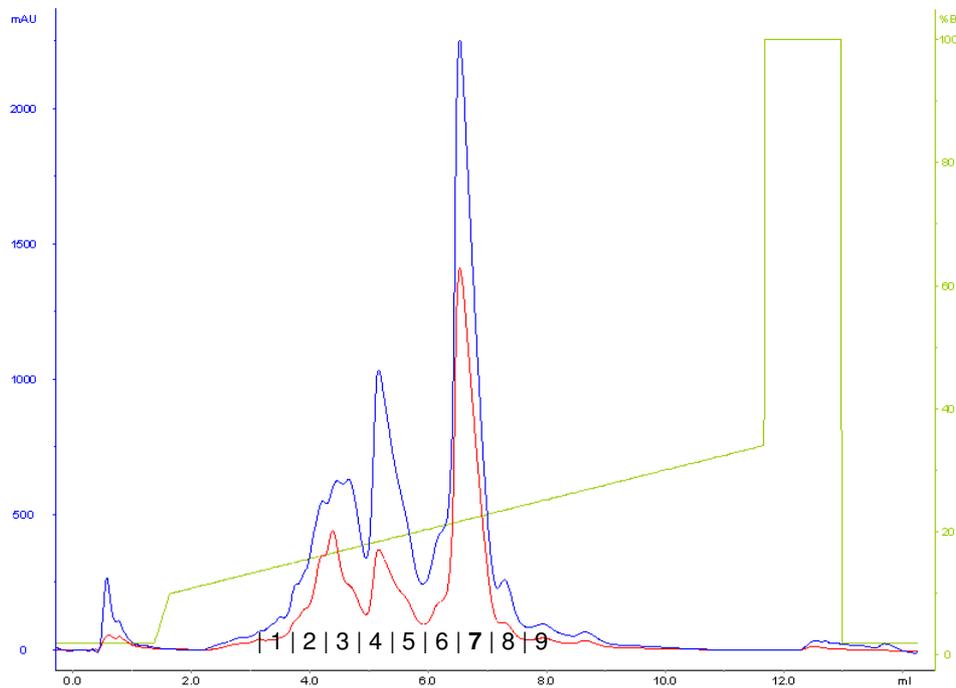


Abb. A 3: Chromatogramm der HPLC mit Fraktion 14-16 aus Schritt 1. Die Absorption wurde bei 214 nm (blau) und 280 nm (rot) gemessen.

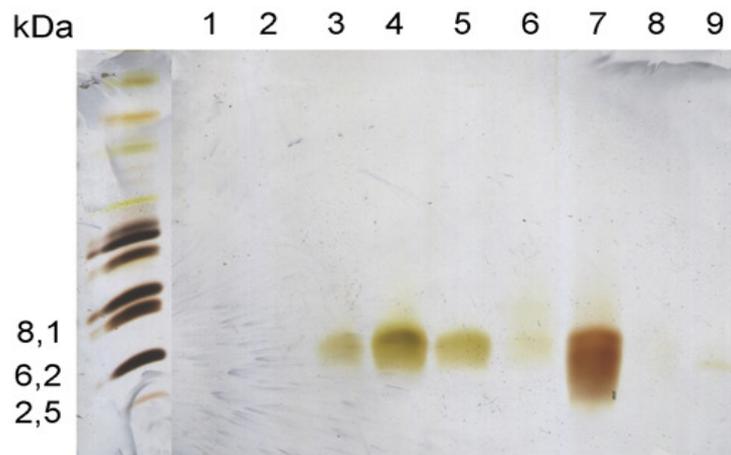


Abb. A 4: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel mit den Peptid-Fractionen 1-9 aus Schritt 2.

3. Schritt: Reinigung von Fraktion 7 aus Schritt 2 über HPLC (HAIsil 300 C8-Säule), Gradient: 0,2 % ACN pro min.

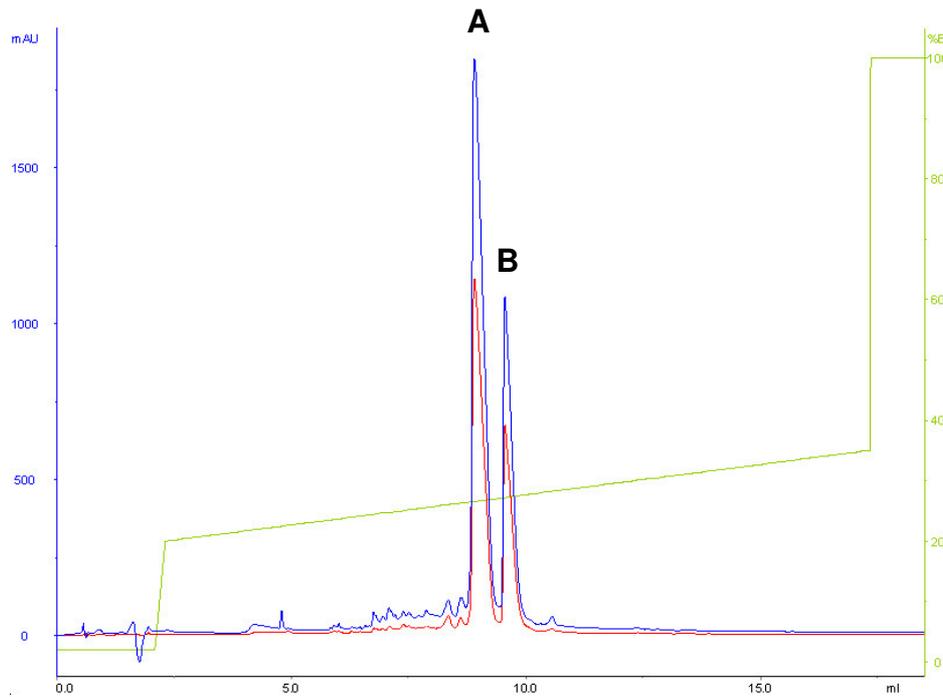


Abb. A 5: Chromatogramm der HPLC mit Fraktion 7 aus Schritt 2. Die Absorption wurde bei 214 nm (blau) und 280 nm (rot) gemessen.

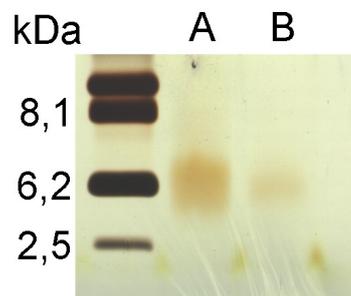


Abb. A 6: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel mit den Fraktionen entsprechend den Extinktionsmaxima A und B aus Schritt 3 (Abb. A 5).

4. Schritt: N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau) der Fraktionen A und B aus Schritt 3 (Abb. A 5).

Ergebnis Fraktion A: (S) V G G H x

Ergebnis Fraktion B: (S) V G/H G H x

(x = Abbruch der Reaktion)

5. Schritt: Für eine MS/MS-Analyse wurden die beiden Fraktionen A und B noch einmal zusätzlich mittels HPLC über eine Polyencap 300 C18-Säule von Bischoff gereinigt.

6. Schritt: MS/MS-Analyse mit Extinktionsmaximum A aus Schritt 5.

Ergebnis: Bestätigung der Aminosäuresequenz SV als wahrscheinlichen N-Terminus, aber keine weiteren Sequenzinformationen.

8.1.2 Peptid 3

Quelle: - Mantelinnenseite

Extraktionsmethode: - saures Extraktionsmedium
- Zentrifugation bei $150.000 \times g$

Vorfraktionierung: - Überstand auf Sep-Pak tC18-Säule
- stufenweise Elution mit 10, 20, 25, 30, 40, 50 und 84 % ACN in 0,1 % TFA (siehe Abb. A 1)

Reinigung:

1. Schritt: Gelfiltrationschromatographie (Superdex™ Peptide) mit der Fraktion 30 % ACN nach Elution von der Sep-Pak tC18-Säule.

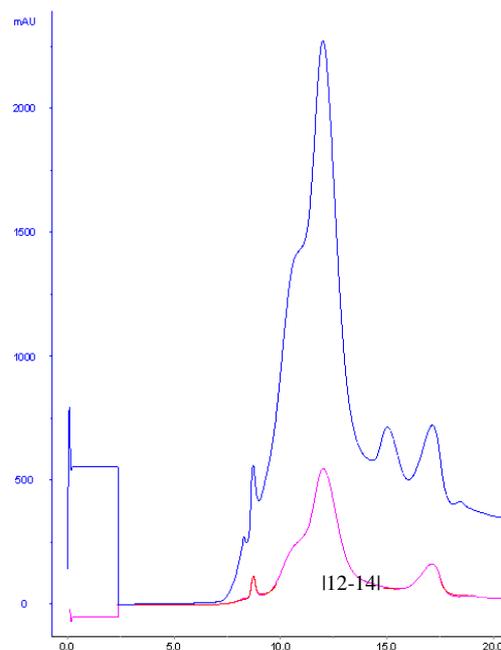


Abb. A 7: Chromatogramm der Gelfiltrationschromatographie mit der Fraktion 30 % ACN nach Sep-Pak tC18. Die Absorption wurde bei 214 nm (blau) und 280 nm (rot) gemessen.

2. Schritt: Vereinigung der Fraktionen 12-14 aus Schritt 1 (Abb. A 7) und Reinigung über HPLC (PRP-3-Säule), Gradient: 0,56 % ACN pro min.

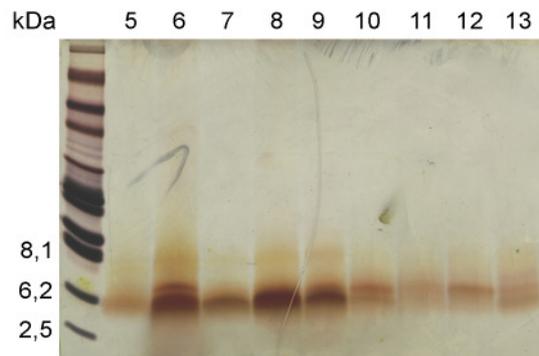


Abb. A 8: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel mit den Fraktionen 5-13 nach HPLC aus Schritt 2.

3. Schritt: SDS-Gelelektrophorese mit Fraktion 10 (25,5-26,5 % ACN) aus Schritt 2 nach Reduktion und Alkylierung, Transfer auf eine PVDF-Membran und Färbung mit Coomassie.

Die prominenteste Peptidbande wurde aus der Membran ausgeschnitten und für eine Sequenzierung nach Edman eingesetzt (siehe Pfeil im entsprechenden silbergefärbten SDS-Gel, Abb. A 9).

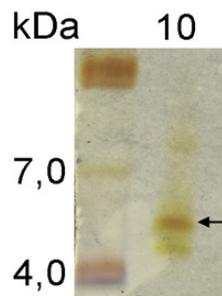


Abb. A 9: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel mit Fraktion 10 aus Schritt 2.

4. Schritt: N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau) der auf eine PVDF-Membran transferierten, prominenten Bande der Fraktion 10 aus Schritt 3.

Ergebnis: Peptid ist N-terminal blockiert

8.1.3 Peptid 4

- Quelle:** - Kiemendarm
- Extraktionsmethode:** - saures Extraktionsmedium
- Zentrifugation bei $150.000 \times g$
- Vorfraktionierung:** - Überstand auf Sep-Pak tC18-Säule
- stufenweise Elution mit 10, 20, 25, 30, 40, 50 und 84 % ACN in 0,1 % TFA

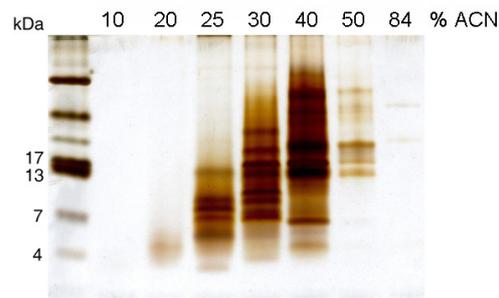


Abb. A 10: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel mit den Protein-Fractionen nach Elution von der Sep-Pak tC18-Säule.

Reinigung:

- Schritt 1:** Trennung der Peptide und Proteine der Fraktion 30 % ACN nach der Sep-Pak tC18-Säule mittels Mikrokonzentratoren (Centricon) mit sukzessiv abnehmendem Molekulargewichtsausschluss von 50, 30, 10, und 3 kDa.

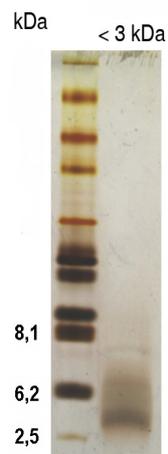


Abb. A 11: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel der Fraktion <3 kDa

Schritt 2: Reinigung der Fraktion <3 kDa aus Schritt 1 (Abb. A11) über HPLC (PRP-3-Säule), Gradient: 1 % ACN pro min.

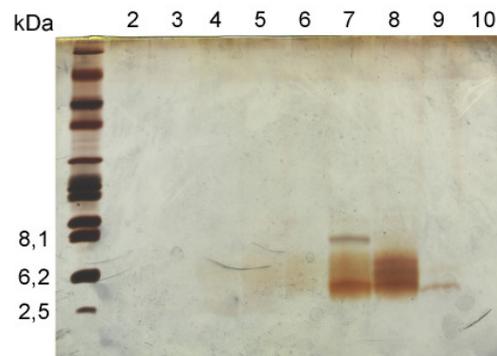


Abb. A 12: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel mit den Fraktionen 2-10 nach HPLC aus Schritt 2.

Schritt 3: Reinigung von Fraktion 9 aus Schritt 2 (Abb. A 12) über HPLC (HAIsil 300 C8-Säule), Gradient: 0,336 % ACN pro min.

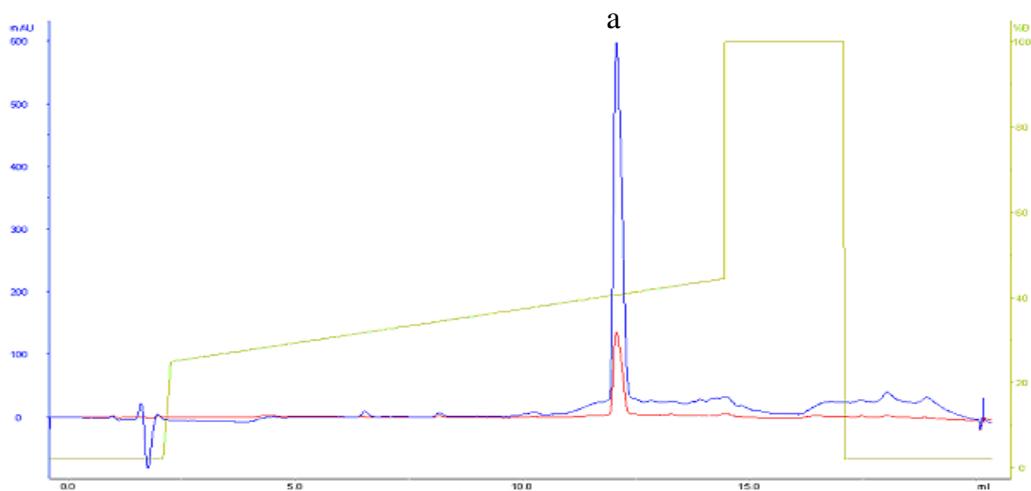


Abb. A 13: Chromatogramm der HPLC mit Fraktion 9 aus Schritt 2. Die Absorption wurde bei 214 nm (blau) und 280 nm (rot) gemessen.

Schritt 4: N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau) der Fraktion (a) aus Schritt 3 (Abb. A 13).

Ergebnis: (L) (F/V) G Q S L Q K V X E F (I)

Schritt 5: Um Material für weitere Analysen zu gewinnen, wurde die Reinigung des Ausgangsmaterials bis Schritt 3 wiederholt und zusätzlich eine Rechromatographie (HAIsil-C8-Säule) durchgeführt.

Schritt 6: MS/MS-Analyse

Ergebnis: Das Resultat der Sequenzierung nach Edman konnte nicht bestätigt werden. Die Analyse der erhaltenen Sequenzvorschläge ergab keine signifikanten Treffer in den mit MASCOT und MS-Fit durchsuchten Datenbanken.

8.1.4 Peptid 5

Quelle: - zellfreie Hämolymphe

Extraktionsmethode: - saures Extraktionsmedium
- Zentrifugation bei 150.000 × *g*

Vorfraktionierung: - Überstand auf Sep-Pak tC18-Säule
- stufenweise Elution mit 10, 20, 25, 30, 40, 50 und 84 %
ACN in 0,1 % TFA

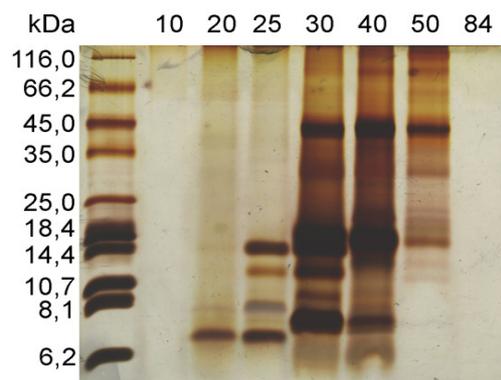


Abb. A 14: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel mit den Protein-Fractionen nach Elution von der Sep-Pak tC18-Säule.

Aus der Fraktion 30 % ACN nach der Sep-Pak tC18-Säule konnte nach sechs Chromatographien ein antibakterielles Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 15 kDa gereinigt werden. Eine detaillierte Darstellung des Reinigungsschemas findet sich bei Sudhaus, 2006. Die Identifizierung der Primärstruktur des Proteins mittels Peptidmassen-Fingerabdruck war nicht erfolgreich.

8.1.5 Peptid 6

- Quelle:** - Hämozyten
- Extraktionsmethode:** - 10 % (v/v) Essigsäure
- Zentrifugation bei $150.000 \times g$
- Vorfraktionierung:** - Überstand auf Sep-Pak-Säule
- stufenweise Elution mit 10, 20, 30, 40, 50 und 84 % ACN
in 0,1 % TFA

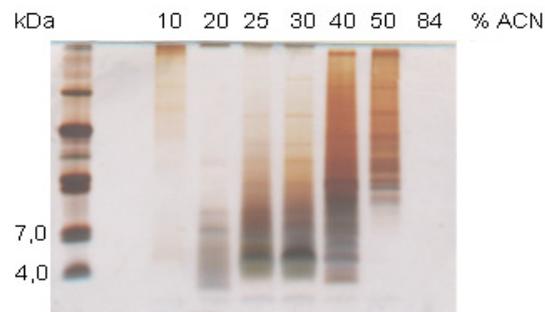


Abb. A 15: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel mit den Protein-Fractionen nach Elution von der Sep-Pak tC18-Säule.

Reinigung:

- 1. Schritt:** HPLC (PRP-3-Säule) mit der Fraktion 30 % ACN nach Sep-Pak tC18-Säule, Gradient: 1,134 % ACN pro min (Abb. A 16).
- 2. Schritt:** Rechromatographie (PRP-3-Säule) von Fraktion 2 aus Schritt 1, Gradient: 0,42 % ACN pro min (Abb. A 17).

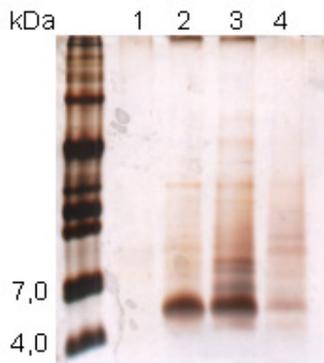


Abb. A 16: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel mit den Fraktionen 1-4 nach HPLC aus Schritt 1.



Abb. A 17: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel nach Rechromatographie von Fraktion 2.

3. Schritt: N-terminale Sequenzierung (Edman-Abbau) der Fraktion 2b (Abb. A 17) aus Schritt 2.

Ergebnis: L F x (x = Abbruch der Reaktion)

8.1.6 Peptid 7

Quelle: - Hämozyten

Extraktionsmethode: - saures Extraktionsmedium
- Zentrifugation bei $150.000 \times g$

Vorfractionierung: - Überstand auf Sep-Pak tC18-Säule
- stufenweise Elution mit 10, 20, 25, 30, 40, 50 und 84 % ACN in 0,1 % TFA

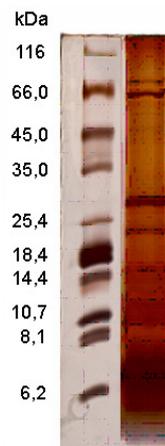


Abb. A 18: Silbergefärbtes SDS-Tricin-Gel mit der 30 % ACN Fraktion nach Sep-Pak tC18.

Reinigung:

1. Schritt: Reinigung der Fraktion 30 % ACN nach Sep-Pak tC18-Säule über HPLC (HAIsil 300 C8-Säule), Gradient: 0,84 % ACN pro min (Abb. A 19).

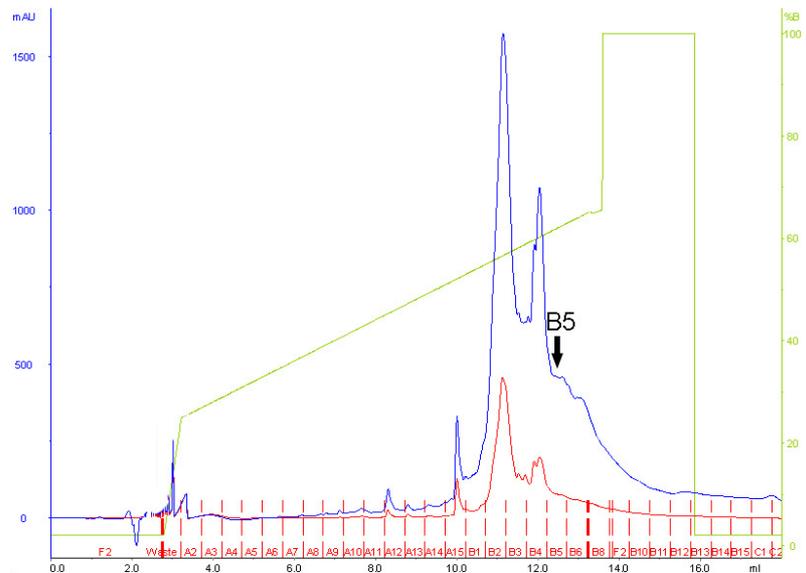


Abb. A 19: Chromatogramm der HPLC mit der Fraktion 30 % ACN nach Sep-Pak tC18-Säule. Die Absorption wurde bei 214 nm (blau) und 280 nm (rot) gemessen.

2. Schritt: Rechromatographie (HAIsil 300 C8-Säule) der Fraktion B5 aus Schritt 1 (Abb. A 20).

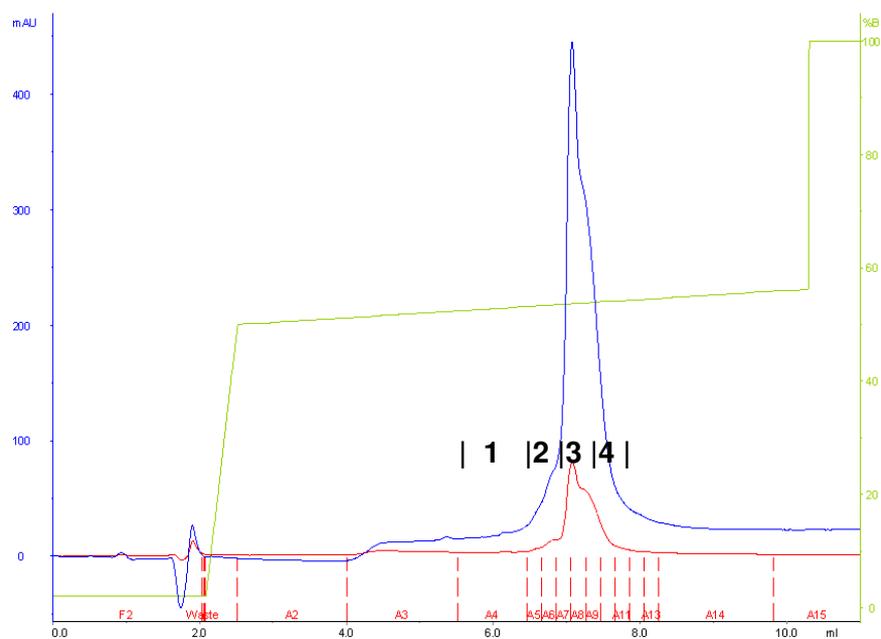


Abb. A 20: Chromatogramm der HPLC mit der Fraktion B5 aus Schritt 1. Die Absorption wurde bei 214 nm (blau) und 280 nm (rot) gemessen.

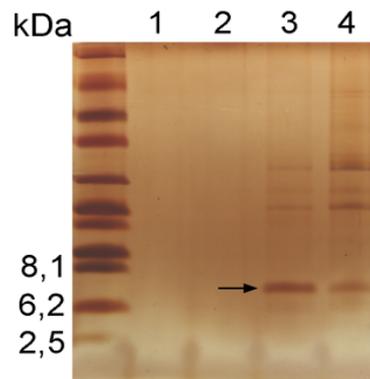


Abb. A 21: Silbergefärbtes SDS-Tricine-Gel mit den Fraktionen 1-4 nach HPLC aus Schritt 2.

3. Schritt: Peptidmassen-Fingerabdruck mit der prominenten Bande in Fraktion 3 (Pfeil, Abb. A 21) aus Schritt 2.

Fraktion 3 aus Schritt 2 wurde auf ein SDS-Tricine-Gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Die Peptid-Bande entsprechend der in Abb. A 21 mit einem Pfeil gekennzeichneten Bande wurde ausgestanzt und das extrahierte Peptid reduziert/carbamidomethyliert und mit Trypsin geschnitten.

Die MALDI-TOF Analyse ergab mehrere Peptidmassen, für die mit der Suche über MASCOT und MS-Fit keine signifikanten Übereinstimmungen in den NCBI-Sequenzdatenbanken gefunden werden konnten.

8.2 *In silico* Identifizierung eines mutmaßlichen Prosaposins aus *Ciona intestinalis*

MKSLLCIVILSLVAYEVQSAVVGADRCTWGPSYWCKNYGAAKTCGAVDHCKTNAWNKPVK
 NDEICTLCKEGMEMVDNYLKEKATKAKIEKAILQICSDIPLADLKTECKQVVTENFDLIYDEGLILIGNDMVCSAIGLCTSSTSEVEDKIVHEMVKKLPDIVRKAME
 NNELPIASPFIAPLPLFSQPETPQEGSENYCADCQAFIKDVQHEIMNDPAMVKSWTNLVKGECDALGAGLDEICKTAVDKYLPNLLDVLTDVTTICNTIKMCGFKAQAKS
 DNDMCTDCTNFFDDWKQLMINNKTVVNEIIGQMSDFYCLOKPANLRKQCVRYVGMVIETFLNRLMQESPTDICRSIYFCEAGTAKESLSAITRVNTLQQVPVELD
 NQKYCTDCTAFMKDLQGAANNKTIISELTELVKEQCSQFDPVAELCKLQVPNAVTTLLPQFEKLDVNTICSTIMMCPATSQHKKMV
 TGNLCTDCTAFFGDWQEI IQNNKSVIEKQLQELGVMYCKQVPGFFESECDSVVARAIDNYLHLISVTDAGLICSTLYMCEEADKPAVQPVSVAKQAPVGAG
 DPISCAVCKLVVHELDQMLEGNKTEAAVVAALEKVCSLMSGDIRQECQNFVDHYGRTLVDLIINEVESGAICSMLLLCSPQANYNKVS
 GSPTCEVCTLIATALDQLLTSNSTEQEIIAAVEKVCSILPATYKTECDSLIDQYGVVIIQLLAQELDPSKICAELGLCVSYKSQVS
 DSTTCELCELVAGELDSLLENSTESEIIAAVEKVCTILPSNLQTECKTLIDQYGKEIINLLAQQIKPAQLCATLKLCTSAYVS
 SSTTCELCELVASELDKLLTDKSTETEI VDAVENICKVLPANLQTECKNLIDQYGTDLINLLAQEIKPSELCAAIKLCSSYKNTQIKVR
 SDVTCELCTAVMTQVDKLLSENATQTEIVAALDKVCMIIPGDLKQQCVGFINDNGPMIIQLLLEEIAPSAVCSALKLCSNSNKVMFK
 SSELCDVCKAAIGFLDQEVGANSTKAEVEAALDNICVKLPASLKETCDDLVKQYTPFIELDMIENIADPDYICIHLKLCTAQNHML
GANPCTFGPSYWCKNQQTATECNAVSHCEKHVWE

Abb. A 22: Darstellung der *in silico* identifizierten Aminosäuresequenz des mutmaßlichen Prosaposins aus *C. intestinalis*. Das Signalpeptid ist grau, Cysteinreste sind gelb, die Saposin-Domänen des a-Typs grün und die des b-Typs orange hinterlegt. Die elf verschiedenen Saposin-Domänen des b-Typs mit ihren jeweils sechs charakteristischen Cysteinresten sind vergleichend angeordnet. In der EST-Datenbank des Dana-Faber Cancer Instituts ist die Sequenz des mutmaßlichen *Ciona*-Prosaposins in zwei unterschiedlichen Clustern (TC64420 und TC64421) annotiert, deren Sequenzen sich aber zum Teil überschneiden. Dargestellt ist eine aus beiden Clustern abgeleitete kombinierte Aminosäuresequenz, die zusätzlich über die entsprechende genomischen Nukleotidsequenz abgeglichen wurde. Vom N-Terminus bis zur fünften Saposin-Domäne des b-Typs gibt es dadurch einige Sequenzunsicherheiten, die aber keine Auswirkung auf die Domänenstruktur haben.

8.4 Vergleiche der Nukleotid- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der nordeuropäischen (NE) und pazifischen (P) Genvarianten der *Ci-mam-* und *Ci-pap-*Genfamilien

Aminosäure- und Nukleotidaustausche zwischen Sequenzen, die von nordeuropäischen (NE) und pazifischen (P) Tieren stammen, sind rot hinterlegt. Start- (ATG) und Stop-Codons (TAA, TAG) in Nukleotidsequenzen sind fett markiert und Hybridisierungsstellen für Oligonukleotide farbig hervorgehoben. Bei Aminosäuresequenzen ist das vorhergesagte Signalpeptid grau hinterlegt.

PCR mit *Ci-mam-A* (P) spezifischen Oligonukleotiden ergibt *Ci-mam-A* (NE)

Vergleichende Anordnung der Nukleotidsequenzen von *Ci-mam-A* (NE) und *Ci-mam-A* (P):

```

Ci-mam-A (NE)    ---GGCACGAGGATCTCAACGAAATGGATCGAAAATTGTTTTGCTCTTCTTCTTTGG 57
Ci-mam-A (P)    TTCGGCACGAGGATCTCAACGAAATGGATCGAAAGATTGTTTTTGCTCTTCTTCTTTGG 60
                *****

Ci-mam-A (NE)    TGTCTCTCAACGTCTCTACGTTTATGGATGGAGATCTCTAGGTCGCACTCTACTCCGTT 117
Ci-mam-A (P)    TGTCTCTCAACGTTTCTACGTTTATGGATGGAGTTCTCTTGGTCGCCTCTACTCCGCT 120
                *****

Ci-mam-A (NE)    TATCGCATGCACTTAAACCTTTAGCTCGCCGATCAGGGTGGGATCAACGAGCTGCTTCTT 177
Ci-mam-A (P)    TAACGCATGCACTTAAACCTTTAGCTCGCCGATCAGGGTGGGATCAACGAGCTGCTTCTT 180
                ** *****

Ci-mam-A (NE)    TGAACCTGTCCCGAAATTGAGGATGAATTAGACGCTCTGAGGTGGATCGATCATGC 237
Ci-mam-A (P)    TGAACTTTGCTCCAGAAATTGAGGATGAATTAGAAGCGTCTGAGATGGATCGTATCATGC 240
                *****

Ci-mam-A (NE)    AACAAATGGCAGACGAAAACAAGATAGTGCGGTGGAATAAGAGTCAACCATTCAGTG 297
Ci-mam-A (P)    AACAAATGGCAGACGAAAACAAGACTAGTGCGGGTGGAAATAAGAGTCAACCATTCAGTG 300
                *****

Ci-mam-A (NE)    A-----ACTTGTCATTGAACGAACAAGTG----- 323
Ci-mam-A (P)    AGGGTGAACTTGTCATTGAACGAACAAGTGTTAAACCAATAAACGAAATAAAATGT 359
                * *****

```

Verwendete Oligonukleotide:

```

Ci-mam-A_F1    5' GCTCTTCTTCTTTGGTGT 3'
Ci-mam-A_R1    5' CACTTTGTTTCGTTCAATGACAAG 3'
Ci-mam-A_F5'   5' GGCACGAGGATCTCAACG 3'

```

Die Identität zwischen den codierenden Bereichen der Nukleotidsequenzen *Ci-mam-A* (NE) und *Ci-mam-A* (P) beträgt 93,1 %.

Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen von Ci-MAM-A (NE) und Ci-MAM-A (P):

```

Ci-MAM-A (NE)  MDRKIVFALLLLVSLNVSTVYGRSLGRLLRLSHALKPLARRSGWDQRAASLNWVPEIE 60
Ci-MAM-A (P)  MDRKIVFALLLLVSLNVSTVYGWSSSLGRSLRLTHALKPLARRSGWDQRAASLNFAPEIE 60
                *****:****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Ci-MAM-A (NE)  DELDASEVDRIMQQMADEKQ 81
Ci-MAM-A (P)  DELEAEMDRIMQQMADEKQD 81
                ***:***:*****:*****:

```

Die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen von Ci-MAM-A (NE) und Ci-MAM-A (P) beträgt 90,1 %.

PCR mit *Ci-mam-B* (P) spezifischen Oligonukleotiden ergibt *Ci-mam-B* (NE)

Vergleichende Anordnung der Nukleotidsequenzen von *Ci-mam-B* (NE) und *Ci-mam-B* (P):

```

Ci-mam-B (NE)  -----GCCTTCGCTTTTCTGTTCTGATTCTTC 28
Ci-mam-B (P)  TTCGGCACGAGGACGAAATGGATCGAAAAATAGCCTTCGCTTTCTGTTCTGATTCTTC 60
                *****
Ci-mam-B (NE)  AAGTTACTACAGTTTCGGCCGGTTGGGGAGCCTCTTCGTGTGGGACCAAAGCAATTC 88
Ci-mam-B (P)  AAGTTACTACAGTTTCGGCCGGTTGGGGTAGCCTGCTTCGTGTGGGACCAAAGCAATTC 120
                *****
Ci-mam-B (NE)  TAGGTACTCTGGCATTACGCGACGTAAGTGAACGAAACAAGGCATCCCAACAATA 148
Ci-mam-B (P)  TAGGTACTCTGGCATTACGCGACGTAAGTGAACGAGAAACAAGGCATCCCAACAATA 180
                * *****
Ci-mam-B (NE)  CTCCTGAGATGGAAGAAAAATGGATGCTGAAATGGAAAAATTAATGCAACAAGTGGCAG 208
Ci-mam-B (P)  CTCCTGAGATGGAAGAAAAATGGACGCTGAAATGGAAAAATTAATGCAACAAGTGGCAG 240
                *****
Ci-mam-B (NE)  AAGACAACAATAATCATGGATTGAATAAGAAATACCA----- 245
Ci-mam-B (P)  AAGACCAACAATAGCATGGATTGAATAAGAAATACCATTTAGTAAAGGAGTCATTAGAAA 300
                * * * * *
Ci-mam-B (NE)  -----
Ci-mam-B (P)  CCGATAGTTATTTCAATAAAGTAATGGC 328

```

Verwendete Oligonukleotide:

```

Ci-mam-B_F1  5' CTGTTCTGATTCTTCAAGTTAC 3' (keine Hybridisierung)
Ci_mam-B_R1  5' TCCGTTTCTAATGACTCCTTAC 3' (keine Hybridisierung)
Ci_mam-B_F2  5' GCCTTCGCTTTTCTGTTCTG 3'
Ci_mam-B_R2  5' TGGTATTCTTATTCAATCCATGC 3'
Ci_mam-B_F5' 5' CGGCACGAGGACGAAATG 3' (keine Hybridisierung)

```

Die Identität zwischen den codierenden Bereichen der Nukleotidsequenzen *Ci-mam-B* (NE) und *Ci-mam-B* (P) beträgt 93,1 %. (Bemerkung: Die codierende Sequenz von *Ci-mam-B* (NE) ist nicht komplett)

Vergleich der Aminosäuresequenz von Ci-MAM-B (NE) mit Ci-MAM-B (P):

```

Ci-MAM-B (NE)      AFAFLFVILQVTTVSAGWGSLLRVGTKAILGTLALRRRTWENKASQQITPEMEE 55
Ci-MAM-B (P)      MDRKIAFAFLFVILQVTTVSAGWGSLLRVGTKAILGTLALRRRTWENKASQQITPEMEE 60
                   *****
Ci-MAM-B (NE)      KLDAEME LMQQLAED Q 73
Ci-MAM-B (P)      KLDAEMEKLMQQLAEDQQ 78
                   *****:*****:*
```

Das 5' Ende von *Ci-mam-B* konnte nicht vollständig von der cDNA amplifiziert werden, deshalb fehlen bei der vergleichenden Anordnung fünf Aminosäurereste am N-Terminus des vorhergesagten Signalpeptids von Ci-MAM-B (NE). Die Identität zwischen den 73 verglichenen Aminosäureresten von Ci-MAM-B (NE) und Ci-MAM-B (P) beträgt 97,3 %.

PCR mit *Ci-mam-C* (P) spezifischen Oligonukleotiden ergibt *Ci-mam-C* (NE)

Vergleichende Anordnung der Nukleotidsequenzen von *Ci-mam-C* (NE) und *Ci-mam-C* (P):

```

Ci-mam-C (NE)      -CTCGAGACGAAACTCAACGAAATGGATCGAAAGATTGTGTTGCACTGCTCTGGTGTT 59
Ci-mam-C (P)      GCTCGAGACGAAACTCAACGAAATGGATCGAAAGATTGTGTTGCACTGTTCTTGGTGTT 60
                   *****
Ci-mam-C (NE)      TCTCACATCTCTACGGTTTCTGCTAGTTTAGAGCCGGATTCTAGCTCTTTTAAAGTC 119
Ci-mam-C (P)      TCTCCACATATCTACGGTTTCTGCTAGTTTAGCAGCCGGATTCAAGCTGCTTTTAAAGTC 120
                   *** *****
Ci-mam-C (NE)      GTGGGTTCCGACGTCGCACATGGAACGAGAAAACGACCTCTGATCGATTACTGCCGA 179
Ci-mam-C (P)      GTGGGTTCCATAGACGTCGTACATGGAACGAGAAAACGACTTCTGATCAATTCACTGCCGA 180
                   *****
Ci-mam-C (NE)      AAATGACAAACGTTTGATTTCGCTGAAATGGATAGCTTACTCAACAACCTTGAAACAGA 239
Ci-mam-C (P)      AAATGACAAACCGTTTGATTTCGCTGAAATGGATGGTTTACTCAACAACCTTGAAACAGA 240
                   *****
Ci-mam-C (NE)      AAACCAAAGTAAAGTCGTCGAAAAAAGCATGGCTAAGCTGTGATTTTGC----- 289
Ci-mam-C (P)      AAACCAAAGTAAAGTCGTCGAAAAAAGCATGGCTAAGCTGTGATTTTGCATTCATGA 300
                   *****
Ci-mam-C (NE)      -----
Ci-mam-C (P)      ATCAAATGTAAACTTAATAAACAAAATAAATGTAA 337
```

Verwendete Oligonukleotide:

Ci-mam-C_F1 5' TTCTTGGTGTTCACATATC 3'
Ci-mam-C_R1 5' GCAAAATCACAGCTTAGCCATG 3'
Ci-mam-C_F5' 5' CTCGAGACGAAACTCAACG 3'

Die Identität zwischen den codierenden Bereichen der Nukleotidsequenzen *Ci-mam-C* (NE) und *Ci-mam-C* (P) beträgt 93,1 %.

Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen von Ci-MAM-C (NE) und Ci-MAM-C (P):

```

Ci-MAM-C (NE)  MDRKIVFALLLVFLHISTVSASLGAGFLLLFKSWVHRRRTWNEKTTSDRFTAENDKRFDF 60
Ci-MAM-C (P)  MDRKIVFALFLVFLHISTVSASLAAGFKLLFKSWVHRRRTWNEKTTSDQFTAENDKPFDF 60
                *****:*****.***:*****:*****
                *

Ci-MAM-C (NE)  ASMDSLLNNLETENQK 76
Ci-MAM-C (P)  AEMDGLLNNLETENQK 76
                *:**.*****
  
```

Die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen von Ci-MAM-C (NE) und Ci-MAM-C (P) beträgt 90,8 %.

Die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen von Ci-MAM-F (NE) und Ci-MAM-D (P) beträgt 79,5 %.

Vergleichende Anordnung der Nukleotidsequenzen von *Ci-mam-F* (NE) und *Ci-mam-F* (P):

```

Ci-mam-F (NE) -----CG-GCACGAGGCAAATATTAACG 22
Ci-mam-F (P)  CCAACAATTCAAATTACCAGGAAAGAAATAAATCAACGCATTCCAGACAAATATTAACG 60
                **      * * * * *

Ci-mam-F (NE)  AAATGGATCGAAAGATTGTTTTGCTTCTTCTGGTGGTTCTTCTATTTCACAAGCGG 82
Ci-mam-F (P)  AAATGGATCGAAAGATTGTTTTGCCCTTCTTCTGGTGGTTCTTTTTGTTTCACAAGCGG 120
                ***** * *****

Ci-mam-F (NE)  CGGCCGAGGACTGGGTAGACAGCACTAAAAGTTGCAAGTCATGTCTGAGTCGTCGTC 142
Ci-mam-F (P)  CGGCCGACGACTGGGTAAGTACAGCTGTAGGAGTTGCAAGTCATCTGCTATCGGGTCGTC 180
                ***** * ***** * * *****

Ci-mam-F (NE)  GTCGTGAGGTTGGAACCAAGCCAACGTTTGAAGAAATCTCTCTGACGCGGAAGAAA 202
Ci-mam-F (P)  GTCGTAGAGGTTGGAACCAAGCCAACGTTTGAAGAAATCTCCTCTGACGCGGAAGAAA 240
                ***** * *****

Ci-mam-F (NE)  CACTGTCTGCCGCTGAGATGGAAGAAGTAATGCAAAATATTATGGACCATCAAGAGTAGT 262
Ci-mam-F (P)  CACTGTCTGCCGCTGAGATGGAAGAAGTAATGCAAAATATTATGGATCATCAAAAGTAGT 300
                ***** * *****

Ci-mam-F (NE)  GCGGATGAAATAAGAGTCAACCATT-CAGTGAACCTG----- 298
Ci-mam-F (P)  GCGGGTGAATAAGAGTCAACCATTTCAGTGAGGACGTGTTTTAACTCTTTGTTTT 357
                **** * ***** *

```

Die Identität zwischen den codierenden Bereichen der Nukleotidsequenzen *Ci-mam-F* (NE) und *Ci-mam-F* (P) beträgt 89,9 %.

Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen von Ci-MAM-F (NE) und Ci-MAM-F (P):

```

Ci-MAM-F (NE)  MDRKIVFALLLVVLLIISQAAADDWVSTALLVAGHVLSRRRRGWNQANGLKKFSSDAEET 60
Ci-MAM-F (P)  MDRKIVFALLLVVLFVSQAAADDWVSTAVGVASHLLSGRRRRGWNQANGLKKFSSDAEET 60
                *****:*****:*.:.** *****

Ci-MAM-F (NE)  LSAEMEEVMQNIMDHQE 78
Ci-MAM-F (P)  LSAEMEEVMQNIMDHQK 78
                *****:

```

Die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen von Ci-MAM-F (NE) und Ci-MAM-F (P) beträgt 89,7 %.

PCR mit *Ci-mam-E* (P) spezifischen Oligonukleotiden ergibt *Ci-mam-D* (NE)

Vergleichende Anordnung der Nukleotidsequenzen von *Ci-mam-D* (NE) und

Ci-mam-E (P):

```

Ci-mam-D (NE)   GGCCGCTGACAAATATCAACGAAATGATCGAAAGATTGTTTTGCTTCTTCTGGTGG 60
Ci-mam-E (P)   GGCCGCTGACAAATATCAACGAAATGAATCGAAAGATTGTTTTGCCCTTTTCTGGTGG 60
                *****

Ci-mam-D (NE)   TTCTTTTTGTTTCACAAGCGGCGCCGACGACGGTTGGGTTCGACAGGTGTGGGGTGG 120
Ci-mam-E (P)   TTCTTTTTGTTTCACAAGCGGCGCCGACGAC---TGGGTTCGTACAGCTATAGGGGTGG 117
                *****

Ci-mam-D (NE)   CAGGTTTGTCTGGGTTCGTCGTCGTCGTCGTAATAAGATGGAACAAGCCAACGGTTTGA 180
Ci-mam-E (P)   CAGGTTTGGTCTTGGGTTCGTCGTCGTCGTCGAG---GTTGGAACCAAGCCAACGGTTTGA 174
                **

Ci-mam-D (NE)   AGAAATTCTCTCTGACGCGAAGAAACAATGCTGCCGCTGAGATGGAACAAGTAATGC 240
Ci-mam-E (P)   AGAAATTCTCCTCTGACGCGAAGAAACACTGCTGCCGCTGAGATGGAAGAAGTAATGC 234
                *****

Ci-mam-D (NE)   AAAAGCTTATGGATCAACAAGAGTAGTGCGGGTGGAATAAGAGTCAAC 288
Ci-mam-E (P)   AAAATATTATGGATCATCAAGAGTAGTGCGGGTGGAATAAGAGTCAAC 282
                ***
  
```

Verwendete Oligonukleotide:

```

Ci-mam-E/F_R1 5' GTTACTCTTATCCACCCGC 3' (hybridisiert mit Ci-mam-D und -E (NE))
Ci-mam-E_F5' 5' GGCCGCTGACAAATATCAACG 3' (hybridisiert mit Ci-mam-D (NE))
  
```

Die Identität zwischen den codierenden Bereichen der Nukleotidsequenzen *Ci-mam-D* (NE) und *Ci-mam-E* (P) beträgt 87,7 %.

Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen von *Ci-MAM-D* (NE) und *Ci-MAM-E* (P):

```

Ci-MAM-D (NE)   MDRKIVFALFLVVLVFSQAAADDGWVRTGLAVARFVVGRRRRRIRWNEANGLKKFSSDAE 60
Ci-MAM-E (P)   MNRKIVFALFLVVLVFSQAAADDWVRTAIGVAGLVLGRRRRRGGWNQANGLKKFSSDAE 58
                *

Ci-MAM-D (NE)   ETSAAEMENVQTLMDQE 80
Ci-MAM-E (P)   ETLAAEMEEVMQNIMDHQE 78
                **
  
```

Die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen von *Ci-MAM-D* (NE) und *Ci-MAM-E* (P) beträgt 77,5 %.

PCR mit *Ci-mam-F* (P) spezifischen Oligonukleotiden ergibt *Ci-mam-E* (NE)

Vergleichende Anordnung der Nukleotidsequenzen von *Ci-mam-E* (NE) und *Ci-mam-F* (P):

```

Ci-mam-E (NE) -----GCATTCCAGACAAATATTAACG 22
Ci-mam-F (P) CCAACAATTCAAATTACCAGGGAAAGAAATAAATCAACGCATTCCAGACAAATATTAACG 60
                *****

Ci-mam-E (NE) AAATGGATCGAAAGATTGTTTTGCTTCTTCTGGTGGTTCTTTTTGTTTCACAAGCGG 82
Ci-mam-F (P) AAATGGATCGAAAGATTGTTTTGCCCTTCTTCTGGTGGTTCTTTTTGTTTCACAAGCGG 120
                *****

Ci-mam-E (NE) CGGCCGACGACGGCTGGATAGACAGCTATGCACTTGCAAGTCTGCTCTTAGCTCGTC 142
Ci-mam-F (P) CGGCCGACGAC---TGGGTAAGTACAGCTGTAGGAGTTGCAAGTCATCTGCTATCGGGTC 177
                *****

Ci-mam-E (NE) GTCGTCGTGAATTGGAACGAAGCCAACGGTTTGAAGAAATCTCCTCTGAGCGGAAG 202
Ci-mam-F (P) GTCGTCGTAGAGTTGGAACCAAGCCAACGGTTTGAAGAAATCTCCTCTGACGCGGAAG 237
                *****

Ci-mam-E (NE) AAACAATGTCTGCCGCTGAGATGGAAGAAAGTAATGCAAAATATTATGGATCATCAGCAGT 262
Ci-mam-F (P) AAACACTGTCTGCCGCTGAGATGGAAGAAGTAATGCAAAATATTATGGATCATCAAAAGT 297
                *****

Ci-mam-E (NE) AGTGCGGGTGAATAAGAGTCAAC----- 286
Ci-mam-F (P) AGTGCGGGTGAATAAGAGTCAACCATTTTCAGTGAGGACGIGTTTTAACTCTTTGTTTT 357
                *****

```

Verwendete Oligonukleotide:

```

Ci-mam-E/F_R1 5' GTTGACTCTTATTCACCCGC 3' (hybridisiert mit Ci-mam-E und -D (NE))
Ci-mam-F_F5 5' GCATTCCAGACAAATATTAACGAAATG 3' (hybridisiert mit Ci-mam-E (NE))

```

Die Identität zwischen den codierenden Bereichen der Nukleotidsequenzen *Ci-mam-E* (NE) und *Ci-mam-F* (P) beträgt 86,7 %.

Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen von *Ci-MAM-E* (NE) und *Ci-MAM-F* (P):

```

Ci-MAM-E (NE) MDRKIVFALLLVVLFVSQAAADDGWISTGIALAG-LVLGRRRRG-IWNEANGLKKFSSDAE 59
Ci-MAM-F (P) MDRKIVFALLLVVLFVSQAAADD-WVSTAVGVASHLLSGRRRRG-WNQANGLKKFSSDAE 58
                *****

Ci-MAM-E (NE) ETLSAAEMEIVMQS IMDHQ 78
Ci-MAM-F (P) ETLSAAEMEIVMQNIMDHQK 78
                *****

```

Die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen von *Ci-MAM-E* (NE) und *Ci-MAM-F* (P) beträgt 79,5 %.

Vergleichende Anordnung der Nukleotidsequenzen von *Ci-mam-E* (NE) und *Ci-mam-E* (P):

```

Ci-mam-E (P)      -GGCCGCTGACAAATATCAACGAAATGATCGAAAGATTGTTTTGCTTTCTTCTTCTGGTG 59
Ci-mam-E (NE)    GCATTCAGACAAATATTAACGAAATGGATCGAAAGATTGTTTTGCTCTTCTTCTGGTG 60
                  * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *

```

```

Ci-mam-E (P)      GTTCTTTTGTTCACAAGCGGCGCCGACGAC---TGGTTGGTACAGTATAGGGCTG 116
Ci-mam-E (NE)    GTTCTTTTGTTCACAAGCGGCGCCGACGACGGCTGGATTAGCACAGGTATAGCACTT 120
                  ***** * * * * * * * * * * *

```

```

Ci-mam-E (P)      GCAGGTGGTCTTGGTCGTCGTCGTCGTTGGAACCAAGCCAACGGTTTGAAG 176
Ci-mam-E (NE)    GCAGGTGGTCTTAGGTCGTCGTCGTCGTTGGAACGAAGCCAACGGTTTGAAG 180
                  ***** * ***** * ***** * ***** *

```

```

Ci-mam-E (P)      AAATTCCTCTGAGCGGAAGAAACAATGCTGCCGCTGAGATGGAAAGTAATGCAA 236
Ci-mam-E (NE)    AAATTCCTCTGATGCGGAAGAAACAATGCTGCCGCTGAGATGGAAAACGTAATGCAA 240
                  ***** * ***** * ***** * ***** *

```

```

Ci-mam-E (P)      ATATTATGGATCATCAGAGTAGTGC GGGTGAATAAGAGTCAAC 282
Ci-mam-E (NE)    AGTATTATGGATCATCAGAGTAGTGC GGGTGAATAAGAGTCAAC 286
                  * ***** * ***** * ***** *

```

Die Identität zwischen den codierenden Bereichen der Nukleotidsequenzen *Ci-mam-E* (NE) und *Ci-mam-E* (P) beträgt 89,6 %.

Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen von *Ci-MAM-E* (NE) und *Ci-MAM-E* (P):

```

Ci-MAM-E (NE)    MDRKIVFALFLVVLVFSQAAADDGWISTEIALAGLVLGRRRRGWNVANGLKKFSSDAEE 60
Ci-MAM-E (P)    MNRKIVFALFLVVLVFSQAAADDWVRTAIGVAGLVLGRRRRGGWNQANGLKKFSSDAEE 59
                  * :***** :***** * : * . :***** ** :*****

```

```

Ci-MAM-E (NE)    TMSAAEMENVMQS IMDHQE 79
Ci-MAM-E (P)    TMSAAEMEEVMQNIMDHQE 78
                  * :***** :*** .*****

```

Die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen von *Ci-MAM-E* (NE) und *Ci-MAM-E* (P) beträgt 83,5 %.

PCR mit *Ci-mam-G* (P) spezifischen Oligonukleotiden ergibt *Ci-mam-G* (NE)

Vergleichende Anordnung der Nukleotidsequenzen von *Ci-mam-G* (NE) und *Ci-mam-G* (P):

```

Ci-mam-G (NE) -----
Ci-mam-G (P) AATTGGGCACGAGGCAAATATTAACAAAATGGATCGAAAGATTGTTTTTATTCTACTCCT 60

Ci-mam-G (NE) --TGCTTCTGCATATCACTGCAGTTATGGCTAACTGGTCAAGCAGGTCTCAGATGCGCGGC 58
Ci-mam-G (P) GGTGCTTCTGCATATCACTGCAGTCATGGCTAACTGGTCAAGCAGGTCTCAGATGCGCGGC 120
                *****

Ci-mam-G (NE) TGACGCTTTAAGTCGTGCGCCGGCGTCAAGCGAGCCSTAGCCAAAGCAGCAGCAGCAG 118
Ci-mam-G (P) TGACGCTTTGGGTCGTGCGCCGGCGTCAAGTCGAAGCCAGAGGCGAA-----GCCGAAG 174
                *****

Ci-mam-G (NE) CAGCAGCAGCGGTACAAAGGTAGCAGTAGAGAAGTAGCAGGAGACGACGACGCCGA-- 176
Ci-mam-G (P) CAGCAGCAGCGGTACAACAGGTAGCAGCAGTAGAAGCAGCATGAGACGACGACGCCGCCG 234
                *****

Ci-mam-G (NE) ---AGCAGTAACGAGGAGATTGAATCCGACGAATTTACTTCGAAATAGCGGAAGCCCT 232
Ci-mam-G (P) CCGCAGCAGTAACGAGGAGATTGAATCCGACGAATTTGCTTCGAAATAGCGGATGCACT 294
                *****

Ci-mam-G (NE) GTCTGCCCTGAGATGGAAGAAGTAATGCAAAAGATTATGGAGCATCAAGAGTAGTGCGG 292
Ci-mam-G (P) GTCTGCCGCTGAGATGGAAGAAGTAATGCAAAAGATTATGGATCATCAAGAGTAGTGCGG 354
                *****

Ci-mam-G (NE) ATGGAATAAGAGTCAACCATTCACTGAACTTG----- 324
Ci-mam-G (P) GTGGAATTAAGAGTCAACCATTCACTGAACTTGTCATTGAACGAAACAAAGTGTGAACT 414
                *****

Ci-mam-G (NE) -----
Ci-mam-G (P) AATAAACGGAAAAATGTAAAAAA 437

```

Verwendete Oligonukleotide:

```

Ci-mam-G_F1 5' TGCTTCTGCATATCACTGCAG 3' (hybridisiert mit Ci-mam-G (NE))
Ci-mam-G_R1 5' CAAGTTCAGTGAATGGTTGACTC 3' (hybridisiert mit Ci-mam-F und -G (NE))
Ci-mam-G_F5' 5' CGGCACGAGGCAAATATTAAC 3' (hybridisiert mit Ci-mam-F (NE))

```

Die Identität zwischen den codierenden Bereichen der Nukleotidsequenzen *Ci-mam-G* (NE) und *Ci-mam-G* (P) beträgt 87,4 %.

Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen von *Ci-MAM-G* (NE) und *Ci-MAM-G* (P):

```

Ci-MAM-G (NE) -----LLHITAVMANWSAGLRCAADALSRRRRRSRSSQSSSRSSSSSGTKGSS 48
Ci-MAM-G (P) MDRKIVFILLVLLHITAVMANWSTGLRCAADALGRRRRRSR--SQRRSRSSSSSGTTGSS 58
                *****

Ci-MAM-G (NE) SRSS--RRRRRRSSNEEIESDEFIASEIADALSAAEMEEVMQKIMDHQE 94
Ci-MAM-G (P) SRSSMRRRRRRRSSNEEIESDEFASEIADALSAAEMEEVMQKIMDHQE 106
                *****

```

Das 5' Ende von *Ci-mam-G* konnte nicht vollständig von cDNA amplifiziert werden, deshalb fehlen zwölf Aminosäuren am N-Terminus des vorhergesagten Signalpeptids von Ci-MAM-G (NE). Die Identität zwischen den 94 verglichenen Aminosäureresten von Ci-MAM-G (NE) und Ci-MAM-G (P) beträgt 85,1 %.

PCR mit *Ci-pap-A* (P) spezifischen Oligonukleotiden ergibt *Ci-pap-A* (NE)

Vergleichende Anordnung der Nukleotidsequenzen von *Ci-pap-A* (NE) und *Ci-pap-A* (P):

```

Ci-pap-A (NE)  --GTTGTTTCCTTAACAAACAAAGATGAAATTGGAGCTGCTTCTGTCTCGAGATCTGCT 58
Ci-pap-A (P)  CAGTTGTTCCTTAACAAACAAAGATGAAGTTGGAGCTGCCTTGTCTCTCGAGATCTGCT 60
                *****
                *****

Ci-pap-A (NE)  TAGCTGTATCTGCCGATGCTGCTCTAAGCGGTGCTTTAAGACCCGTCGCCAGAGTGGGAA 118
Ci-pap-A (P)  TAGCTGTATCTGCCGATGCTGCTCTAAGAGGTGCTTTAAGACCCGTCGCCAGAGTGGGAA 120
                *****

Ci-pap-A (NE)  AAGCAATTTTGCCACATGTCGCCATAGCGATATCCCTATGTCAGAACCCCATACGTCCACA 178
Ci-pap-A (P)  GAGCAGTTTTGCCACATGTCGCCATAGCGATCCCTATGTCAGAACCCCATACGTCCACA 180
                ****

Ci-pap-A (NE)  ACAACCCAGACTGGAGTTTGTGGCGCAGTAGAGAGACGGTCCGGGAACCAACAACCAACAA 238
Ci-pap-A (P)  ACAACCCAGACTGGAGTTTGTGGCGCAGAAAGAGATGG-----AACCAACAGCCAACAA 234
                *****

Ci-pap-A (NE)  GCAAGCAGAGATACCTGGAAGACGCATTGGAAGCTCAAGCCATGGAAGCTCTTATGCAAC 298
Ci-pap-A (P)  GCCAAGCTGATATGTTGGAAGACGCATTGGAAGCGCAGGCCATCGAAGCTCTTATGCAAG 294
                *

Ci-pap-A (NE)  AATAAAGCGATAAGCAAACACCAGCTCTACGATTAATCGAACGAAACTCGTTTATCG 358
Ci-pap-A (P)  AACAAATAAGCGATAAGCAAACACCAGCTCTACGATTAATCAGAACGAAACTCGTTTATCG 354
                **

Ci-pap-A (NE)  TAG----- 361
Ci-pap-A (P)  TAGTGTATTAAAGGTGAATAAATACTTGC 384
                ***

```

Verwendete Oligonukleotide:

```

Ci-pap-A_F1 5' GATGCTGCTCTAAGAAGTGC 3'
Ci-pap-A_R1 5' CTACGATAAACGAGTTTCGTT 3'
Ci-pap-A_F2 5' GTTCTCGTGATCTGCTTAGC 3'
Ci-pap-A_F3 5' GTTGTTCCTTAACAAACAAAGATG 3'
Ci-pap-A_F4 5' GATCTGCTTAGCTGATCTGCT 3'

```

Die Identität zwischen den codierenden Bereichen der Nukleotidsequenzen *Ci-pap-A* (NE) und *Ci-pap-A* (P) beträgt 87,7 %.

Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen von Ci-PAP-A (NE) und Ci-PAP-A (P):

```

Ci-PAP-A (NE)  MKFGAAFVLIICLAVSADAALRCAIRAVARVGNALPHVAIANPYVRTPYVHNNPDWSLW 60
Ci-PAP-A (P)  MKFGAAFVLVICLAVSADAALRSQAVRTVARVGRAVLPHVAIADPYVRTPYVHNNPDWSLW 60
*****
*****

Ci-PAP-A (NE)  RSRRRSCNQQPTSQAETILEDALDAQAIEALMQE 93
Ci-PAP-A (P)  R--RKRWNQQPTSQADMLEDALDAQAIEALMQEQ 92
* * : *****:*****:

```

Die Identität zwischen den Aminosäuresequenzen von Ci-PAP-A (NE) und Ci-PAP-A (P) beträgt 82,8 %.

Ci-pap-B / Ci-mech3

Ci-pap-B (NE) konnte nicht mit *Ci-pap-B* (P) spezifischen Oligonukleotiden von cDNA amplifiziert werden. (Bemerkung: Die für die PCR verwendete cDNA wurde von RNA aus Hämocyten generiert. Laut CinGI wird *Ci-pap-B / Ci-mech3* nicht in Hämocyten exprimiert)

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von *Ci-pap-B* (P):

```

DNA: GACCAGATGAAATCTGTAGTTGCCGTCATCCTCGTAATCTGCTTCGCTGTA
+1:  M K S V V A V I L V I C F A V

DNA: TCTGCCGATGCTGCTGCAAGAGCTCTTGTAAAGAGCCGGCGCCAAAATCGTC
+1:  S A D A A A R A L V R A G A K I V

DNA: GATGCTGCTTTGCCATTGTTGGCAAGTTGGGCCACATGTCCGTACTGGT
+1:  D A A L P I V G K L G P H V R T G

DNA: GACTACGTCCACAACAACCCAGACTGGAGTTTGTGGCGCAGAAAGAGATGG
+1:  D Y V H N N P D W S L W R R K R W

DNA: AACCAACAACCAACAAGCCAAGCCGAGATGTTGGAAGACGCATTAGAAGCC
+1:  N Q Q P T S Q A E M L E D A L E A

DNA: GAAGCCATCGAAGCTCTTATGCAAGAACAATAAGCGATAAGGAAACACCTC
+1:  E A I E A L M Q E Q * A I R K H L

DNA: CTCTACGATTAATCGGGATGAATAACCAAATACTCGTTTCATTTTAATTGAT
+1:  L Y D * S G * I T K Y S F I L I D

DNA: TAAAAGTTAAATACACGCTTGCAAAAAAAAAA
+1:  * K L N T R L Q K K

```

Verwendete Oligonukleotide:

```

Ci-pap-B_F1 5' GATGCTGCTGCAAGAGCTC 3'
Ci-pap-B_R1 5' CGAGTATTGGTTATTCATCCCG 3'
Ci-pap-B_R2 5' AGAGCTTCGATGGCTTCGG 3'

```

PCR mit *Ci-pap-C* (P) spezifischen Oligonukleotiden ergibt *Ci-pap-C* (NE)

Vergleichende Anordnung der Nukleotidsequenzen von *Ci-pap-C* (NE) und *Ci-pap-C* (P):

```

Ci-pap-C (NE) -----AATCTGTAGTTGCCGTTATCC 21
Ci-pap-C (P) TCATAAATCATTTCAGTTACTCTTCAACAACCAATGATGAAATCTGTAGTTGCCGTTATCC 120
                *****

Ci-pap-C (NE) TCGTGATCTGCTTCGCTGCATTTGCCGATGCGGGTGTGTTTAAAGAAGTGTGAAAAATCG 81
Ci-pap-C (P) TCGTGATCTGCTTCGCTGCATTTGCCGATGCCGGTGTGTTTAAAGAAGTGTGCAAAAATTG 180
                *****

Ci-pap-C (NE) GCGCAAAAGTCGTCGACGCTGCTTTGCCATTGTGCTACAGCCGGACCACATATCGACA 141
Ci-pap-C (P) GCGCAAAAGTCGTCGACGCTGCTTTGCCATTGTGCTACAGCCGGACCACATATCGATA 240
                *****

Ci-pap-C (NE) CTGGTGAATATGTTCAAACTACCCAGACTGGAGATCGTGAAAACAATAAATGGAACC 201
Ci-pap-C (P) CTGGTGAATATGTTCAACAACAACCCAGATTGGAGCCCGTGAAAAGAAATAAAGTGAACC 300
                *****

Ci-pap-C (NE) AACGCGCAAAAGTCGTCGACGCTGCTTTGCCATTGTGCTACAGCCGGACCACATATCGACA 258
Ci-pap-C (P) AACGACGAGCAAAGAACGCAGCTCAGATGTTGGAAGATGAAGCGAATGCCGAAGCCATCG 360
                *****

Ci-pap-C (NE) AAGCTCTTCTGCAAGATTAAATAAACGATAAG----- 289
Ci-pap-C (P) AAGCTCTTCTGCAAGATTAAATAAACGATAAGCCAACACCCTGACAACGTTTAAATGGAAC 420
                *****

```

Verwendete Oligonukleotide:

```

Ci-pap-C_R1 5' CTTATCGTTTATTAATCTTGCAG 3'
Ci-pap-C_F2 5' AATCTGTAGTTGCCGTTATC 3'

```

Die Identität zwischen den codierenden Bereichen der Nukleotidsequenzen *Ci-pap-C* (NE) und *Ci-pap-C* (P) beträgt 91,8 %. (Bemerkung: Die codierende Sequenz von *Ci-pap-C* (NE) ist nicht komplett)

Vergleichende Anordnung der Aminosäuresequenzen von Ci-PAP-C (NE) und Ci-PAP-C (P):

```

Ci-PAP-C (NE) ---SVVAVILVICFAAFADAGVLRSVKIGAKVVDAALPIVGTAGPHIDTGEYVHNPDW 57
Ci-PAP-C (P) MMKSVVAVILVICFAAFADAGVLRVAKIGAKVVDAALPIVGTAGPHIDTGEYVHNNPDW 60
                *****

Ci-PAP-C (NE) RSWKTKWNQRKAKNAAQLEDEANAEAIEALLQD- 91
Ci-PAP-C (P) SPWKEIKWNQRRAKNAAQMLEDEANAEAIEALLQD- 95
                .** :***** ***** *****

```

Das 5' Ende von *Ci-pap-C* konnte nicht vollständig von cDNA amplifiziert werden, deshalb fehlen drei Aminosäuren am N-Terminus des vorhergesagten Signalpeptides von Ci-PAP-C

(NE). Die Identität zwischen den 91 verglichenen Aminosäureresten von Ci-PAP-C (NE) und Ci-PAP-C (P) beträgt 90,1 %.

ERKLÄRUNG

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

Kiel, den 22. April 2008

Henning Fedders

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Matthias Leippe für die Überlassung des Themas, die kontinuierliche wissenschaftliche Unterstützung und persönliche Betreuung.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für eine von Hilfsbereitschaft geprägte Arbeitsatmosphäre.

Besonders danke ich Dr. Christoph Gelhaus für eine Vielzahl kompetenter Ratschläge und die Durchführung von massenspektrometrischen Analysen.

Henning Sudhaus danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit während seiner Diplomarbeit.

Bei Heidrun Ließegang bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei etlichen Sytox Green Tests und für die herzliche Hilfe im Labor.

Frau Antje Thomas danke ich für die Herstellung von Gewebeschnitten und Dr. Friedrich Buck und Dr. Joachim Bartels danke ich für die Durchführung von Edman-Sequenzierungen bzw. massenspektrometrischen Analysen.

Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Bosch danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Meinen Eltern gilt ein besonderer Dank für ihre immerwährende Unterstützung.

LEBENS LAUF

Name: Henning Sax Fedders
Geburtsdatum: 24.11.1976
Geburtsort: Kiel
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Doktorarbeit: 11/2003 – 06/2008 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
Institut für Zoologie, Zoophysiologie,
bei Prof. Dr. Matthias Leippe
05/2003 – 10/2003 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Zentrum für Infektionsforschung,
bei Prof. Dr. Matthias Leippe

Diplomarbeit: 06/2002 – 04/2003 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
Institut für Zoologie, Allgemeine Zoologie,
bei Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch

Hochschulausbildung: 10/1997 – 04/2003 Studium der Biologie mit Abschluss
Diplom an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel

Zivildienst: 09/1996 – 10/1997 Naturschutzbund (NABU) Schleswig-
Holstein, Wallnau auf Fehmarn

Schulbildung: 1996 Allgemeine Hochschulreife
1987 – 1996 Gymnasium im Bildungszentrum Kiel-
Mettenhof
1983 – 1987 Grundschule Melsdorf