

**Molekulare Charakterisierung der Invertebraten-
Lysozyme von *Caenorhabditis elegans* unter
besonderer Berücksichtigung von ILYS-5**

Dissertation

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



vorgelegt von

Silja Lena Fuchs

Kiel, Oktober 2010

Referent:

Prof. Dr. Matthias Leippe

Koreferent:

Prof. Dr. Hinrich Schulenburg

Tag der mündlichen Prüfung:

09.11.2010

Zum Druck genehmigt:

Titel, Vor- und Zuname, Dekan gez.

der Dekan

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	<i>Angeborenes Immunsystem</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Immunsystem von Caenorhabditis elegans</i>	<i>2</i>
1.3	<i>Effektoren des Immunsystems von C. elegans</i>	<i>5</i>
1.4	<i>Lysozyme – universelle Effektormoleküle</i>	<i>9</i>
1.4.1	<i>Lysozyme in C. elegans</i>	<i>15</i>
1.5	<i>Der Modellorganismus C. elegans</i>	<i>17</i>
1.6	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	<i>22</i>
2	Material und Methoden	24
2.1	<i>Reagenzien und Chemikalien</i>	<i>24</i>
2.2	<i>Geräte</i>	<i>25</i>
2.3	<i>Kultivierung von C. elegans</i>	<i>27</i>
2.3.1	<i>Medien und Lösungen</i>	<i>27</i>
2.3.2	<i>Kultivierung der Futterbakterien</i>	<i>28</i>
2.3.3	<i>Stammpopulation von C. elegans</i>	<i>28</i>
2.4	<i>DNA-Arbeiten</i>	<i>29</i>
2.4.1	<i>Medien und Lösungen</i>	<i>29</i>
2.4.2	<i>Antibiotika</i>	<i>31</i>
2.4.3	<i>Restriktionsendonukleasen</i>	<i>31</i>

2.4.4	RNA-Isolierung	31
2.4.5	cDNA-Synthese (Erst- und Zweitstrang)	32
2.4.6	DNA-Isolierung	33
2.4.7	DNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.4.8	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.4.9	Amplifikation kodierender DNA von ds-cDNA	35
2.4.10	Amplifikation kodierender DNA mit regulatorischen Bereichen von genomischer DNA.....	36
2.4.11	Fusions-Polymerase-Kettenreaktion	37
2.4.12	Ligation in einen Klonierungsvektor	38
2.4.13	Transformation mittels Elektroporation	38
2.4.14	Überprüfen der erfolgreichen Transformation	40
2.4.15	Klonierung in den Expressionsvektor	42
2.4.16	Klonierung in den GFP-Reportergenvektor	43
2.4.17	Grün-fluoreszierendes-Protein (GFP)-Reportergenkonstrukte	43
2.4.18	Sicherstellen der Konstrukte.....	44
2.4.19	Sequenzierung	45
2.5	<i>Mikroinjektion der Reportergenkonstrukte in C. elegans</i>	45
2.5.1	Medien und Lösungen	45
2.5.2	Praktische Vorgehensweise	45
2.6	<i>Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen</i>	46
2.7	<i>Rekombinante Proteinsynthese und Präparation von ILYS-5</i>	47
2.7.1	Medien und Lösungen	47
2.7.2	Rekombinante Proteinsynthese	49
2.7.3	Extraktion der Einschlusskörperchen	49
2.7.4	Affinitätschromatographie.....	50

2.7.5	Rückfaltung des rekombinanten Fusionsproteins.....	51
2.7.6	Prozessierung des Fusionsproteins	52
2.7.7	Isolierung von ILYS-5.....	53
2.8	<i>Proteinanalyse</i>	54
2.8.1	Medien und Lösungen	54
2.8.2	Konzentrationsbestimmung.....	56
2.8.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	57
2.8.4	Proteinstandard	57
2.8.5	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	57
2.8.6	Kolloidale Coomassie-Brillant-Blue-Färbung.....	58
2.8.7	Reduktion und Alkylierung der Proteine für SDS-PAGE.....	58
2.8.8	Präparative Behandlung für Massenspektrometrie.....	58
2.8.9	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	59
2.9	<i>Aktivitätsbestimmung (Lysehofplattentest)</i>	60
2.10	<i>Biochemische Charakterisierung von ILYS-5</i>	60
2.10.1	Medien und Lösungen	60
2.10.2	pH-Optimum	61
2.10.3	Einfluss der Ionenstärke	63
2.10.4	Bestimmung der Chitinase-, Cellulase- und Isopeptidase-Aktivitäten	64
2.11	<i>Antibakterielles Spektrum von ILYS-5</i>	66
2.11.1	Medien und Lösungen	66
2.11.2	Bakterienspezies	67
2.11.3	Mikrosuszeptibilitätstest.....	67
2.12	<i>Osmometer</i>	69
2.13	<i>Gefriertrocknung (Lyophilisation)</i>	69

2.14	<i>Vergleich von Aminosäuresequenzen bekannter und mutmaßlicher Lysozyme</i>	69
2.15	<i>Primärstrukturanalysen durch geeignete Software</i>	70
3	Ergebnisse	72
3.1	<i>Primärstrukturvergleiche bekannter und mutmaßlicher Invertebraten-Lysozyme</i>	72
3.2	<i>Lokalisation der Genexpression der i-Typ-Lysozyme aus C. elegans</i>	81
3.2.1	<i>ilys-1::gfp</i> exprimierende Würmer	83
3.2.2	Genexpressionsanalyse von <i>ilys-2</i>	88
3.2.3	Lokalisation von <i>ilys-3::gfp</i> -Fusionsprodukten	91
3.2.4	Transgene <i>ilys-4::gfp</i> -Reporterlinien von <i>C. elegans</i>	93
3.2.5	Lokalisation der Genexpression und Proteinsynthese von ILYS-5.....	99
3.3	<i>Rekombinante Synthese und Präparation von ILYS-5</i>	107
3.4	<i>Molekulare Identität des maturen ILYS-5</i>	115
3.5	<i>Proteinkonzentrationsbestimmung in den gereinigten Proben</i>	116
3.6	<i>Biochemische Charakterisierung von ILYS-5</i>	117
3.6.1	pH-Optimum von ILYS-5	117
3.6.2	Einfluss der Ionenstärke auf ILYS-5	120
3.6.3	Chitinase-, Cellulase- und Isopeptidase-Aktivitäten von ILYS-5.....	121
3.7	<i>Antibakterielles Spektrum von ILYS-5</i>	122
4	Diskussion	125
4.1	<i>Primärstrukturvergleiche von i-Typ-Lysozymen</i>	126
4.2	<i>Lokalisation der ilys-Genexpression in C. elegans</i>	130
4.3	<i>Molekulare Charakterisierung von ILYS-5</i>	138

5	Zusammenfassung	149
6	Summary	151
7	Literaturverzeichnis	153
III	Abbildungsverzeichnis	177
IV	Tabellenverzeichnis	180
8	Anhang	I
	8.1 <i>Verwendete Oligonukleotide</i>	I
	8.2 <i>Verwendete Plasmide</i>	II
	8.3 <i>Verwendete Aminosäuresequenzen</i>	III
	8.3.1 Aminosäuresequenzen der i-Typ-Lysozyme aus <i>C. elegans</i>	III
	8.3.2 Aminosäuresequenzen der i-Typ-Lysozyme aus <i>C. briggsae</i>	III
	8.3.3 Aminosäuresequenzen von i-Typ-Lysozymen aus anderen Invertebraten.....	IV
9	Erklärung	VII
10	Danksagung	VIII
11	Wissenschaftlicher Werdegang	IX

II Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent in Lösung
ABF	Antibakterieller Faktor (<i>antibacterial factor</i>)
ACN	Acetonitril
AgNO ₃	Silbernitrat
AMS	Ammoniumsulfat
APS	Ammoniumpersulfat
ASABF	<i>Ascaris suum</i> -ABF
BCA	Bichinchoninsäure (<i>bichinchoninic acid</i>)
BSA	Rinderserumeiweiß (<i>bovine serum albumin</i> , Fraktion V (pH 7,0))
CaCl ₂	Calciumchlorid
CBB	Coomassie-Brilliant-Blue G-250
cDNA	Von einer RNA-Matrize synthetisierte DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFU	Konzentrationsmaß für lebende Bakterien (<i>colony forming unit</i>)
C ₃ H ₄ N ₂	Imidazol
ch-Typ	Lysozysubtyp (ch = <i>Chalaropsis</i> (Pilz))
Cis-Element	DNA-Abschnitt eines Gens, an den regulatorische Komponenten binden
Cnc	Caenacin (<i>Caenorhabditis bacteriocin</i>)
c-Typ	Lysozysubtyp (c = <i>chicken</i> , Huhn)
CUB	Proteinmotiv (CUB = <i>complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1</i>)
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
Da	Dalton, relative Molmasse (k steht für Kilo)
DAF	Abnorme Dauer-Formation (<i>abnormal dauer formation</i>)
DBL	DPP/BMP-ähnliches Protein (DPP = <i>decapentaplegic</i> , BMP = <i>bone morphogenic protein, dpp/bmp-like protein</i>)
DIC	differentieller Interferenzkontrast (<i>differential interference contrast</i> , auch Nomarski-Kontrast)

DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds-cDNA	doppelsträngige cDNA (<i>double stranded</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extrazelluläres Signal-regulierte Proteinkinase (<i>extracellular signal-regulated protein kinase</i>)
EtOH	Ethanol (>99,8 % p. a.)
Exon	kodierender DNA-Abschnitt, der nach dem Spleißen der RNA erhalten bleibt (<i>expressed region</i>)
FPLC	Schnelle Protein-Flüssigchromatographie (<i>fast protein liquid chromatography</i>)
g	Gravitationsbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>) (aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i> , fluoresziert bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht)
g-Typ	Lysozysubtyp (g = <i>goose</i> , Gans)
HAc	Essigsäure (CH ₃ CO ₂ H)
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoff in Wasser)
HEWL	Lysozym aus Hühnereiweiß (<i>hen egg white lysozyme</i>)
H ₂ O	Wasser, demineralisiert und steril filtriert
H ₃ BO ₃	Borsäure (auch Orthosäure oder Borofax)
IAA	Iodacetamid
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (<i>insulin-like growth factor</i>)
Imd	Immundefizienz (<i>immune deficiency</i>)
Intron	nicht kodierender intragener DNA-Abschnitt (<i>Intervening region</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, Induktor des <i>lac</i> -Operons (Laktose)
i-Typ	Lysozysubtyp (i = <i>invertebrate</i> , Invertebraten)
Ivy	Inhibitor von Vertebraten-Lysozym (<i>inhibitor of vertebrate lysozyme</i>)

JNK	c-Jun N-terminale Kinase (<i>c-Jun N-terminal kinase</i>)
KCl	Kaliumchlorid
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
LB	<i>Luria Bertani</i> (Nährmedium für Bakterien)
LPS	Lipopolysaccharid (Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien)
LRR	Leucin-reiche-Wiederholung (<i>leucin-rich repeat</i>)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
mAU	Extinktionseinheit (Unit) (<i>absorbance units</i> , E _{220/280} x 1000, m steht für milli)
MBC	Minimale bakterizide Konzentration (<i>minimal bactericidal concentration</i>)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid (x6H ₂ O = Hexahydrat)
MgSO ₄	Magnesiumsulfat (x7H ₂ O = Heptahydrat)
MHC	Hauptkompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIC	Minimale inhibitorische Konzentration (<i>minimal inhibitory concentration</i>)
MliC	membrangebundener Lysozyminhibitor von c-Typ-Lysozymen (<i>membrane-bounded lysozyme inhibitor of c-type Lysozyme</i>)
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (Natriumsalz; Puffersubstanz)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i> ; Transkript eines zu einem Gen gehörigen DNA-Abschnitts)
ms	Millisekunden
mS/cm	Konduktivität (<i>Siemens</i> , Leitwert, reziproker Wert des Widerstandes)
MWCO	Molekulares Ausschlussgewicht (<i>molecular weight cut off</i>) in Da
NaAc	siehe NaCH ₃ CO ₂
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaCH ₃ CO ₂	Natriumacetat (3xH ₂ O = Trihydrat), (auch NaAc oder NaOAc abgekürzt)
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natronlauge (Natriumhydroxid in Wasser)
NaS ₂ O ₃	Natriumthiosulfat (x5H ₂ O = Pentahydrat)
n. b.	nicht bestimmt
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B (<i>nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>)
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumbicarbonat (Ammoniumhydrogencarbonat)
NLP	Neuropeptid-ähnliches Protein (<i>neuropeptide-like protein</i>)
NO	Stickstoffmonoxid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm, photometrisch bestimmt
ORF	offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
p38 MAPK	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	mikrobielle, immunrelevante Strukturen (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PCD	Programmierter Zelltod (<i>programmed cell death</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
ph-Typ	Lysozysubtyp (ph = <i>phage</i> , Phage)
pI	Isoelektrischer Punkt (von Proteinen)
Pli	periplasmatischer Lysozyminhibitor verschiedener Subtypen (<i>periplasmic lysozyme inhibitor of</i> , C = <i>c-type</i> , G = <i>goose-type</i> , I = <i>invertebrate-type</i>)
pNA	<i>para</i> -Nitroanilin (C ₆ H ₆ N ₂ O ₂ , auch 1-Amino-4-nitrobenzol)
pNP	<i>para</i> -Nitrophenol (C ₆ H ₅ NO ₃ , auch 1-Hydroxy-4-nitrobenzol)
PR	Pathogenese-verbunden (<i>pathogenesis-related</i>)
PRR	Pathogen-erkennender Rezeptor (<i>pathogen-/pattern-recognition receptor</i>)
Pwo	<i>Pyrococcus woesi</i>
qRT-PCR	quantitative Echt-Zeit-PCR (<i>real time = RT</i> ; PCR-Methode, bei der die gewonnene DNA quantifiziert wird)

r	rekombinant synthetisiert (rILYS-5)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz-Methode
rpm	Umdrehungen in der Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur (~25 °C)
SAPLIP	Saposin-ähnliches Protein (<i>saposin-like proteins</i>)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
ShK	<i>Stichodactyla</i> -Toxin (Peptid-Toxin, blockiert spannungsgesteuerte K ⁺ -Kanäle)
SOC	mit Glukose versetztes SOB-Medium (<i>super optimal broth</i>)
SR	Scavenger-Rezeptor (<i>scavenger receptor</i> , B-class = B-Klasse)
ss-cDNA	einzelsträngige cDNA (<i>single stranded</i>)
TAE	Tris-Acetat-Puffer mit EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-Puffer mit Kochsalz (<i>Tris-buffered saline</i>)
TFA	Trifluoressigsäure (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i> , β -like = β -Typ-ähnliche)
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethyldiamid
TIR	Toll-/Interleukin-1-Rezeptor (<i>toll-/interleukin-1 receptor</i>)
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
Tricin	N-(2-Hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
U	Unit (Aktivitätseinheit)
Urea	Harnstoff
3'-UTR	3' untranslatierter Bereich (<i>three prime untranslated region</i>) (Bereich der mRNA, welcher sich an die kodierende Region anschließt)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1 Einleitung

Im Zuge dieser Arbeit wurden Lysozyme - Effektorproteine des angeborenen Immunsystems - aus einem wirbellosen Modellorganismus erforscht. Jeder lebende Organismus ist durch seine Umwelt permanent von Pathogenen umgeben. Durch die Entwicklung spezieller Zellen und Moleküle schützen sich Lebewesen vor Infektionen. Mit Hilfe dieser Effektorzellen und -moleküle können sie pathogene Strukturen erkennen und bekämpfen. Die überlebenswichtige Abwehr eines jeden Organismus wird unter dem Begriff Immunsystem zusammengefasst.

1.1 Angeborenes Immunsystem

Im Allgemeinen wird zwischen dem angeborenen und dem adaptiven oder erworbenen Immunsystem unterschieden. Alle vielzelligen Organismen, sowohl Pflanzen als auch Tiere, verfügen über eine angeborene Immunantwort (Nürnberger *et al.*, 2004). Das adaptive Immunsystem tritt jedoch erst bei den *Gnathostomata* (Kiefernäulern) und somit den Vertebraten (Wirbeltieren) in Erscheinung (Agrawal *et al.*, 1998), wobei für die *Agnatha* (Kieferlose; Neunauge und Schleimaal) mittlerweile ebenso Komponenten dieses Immunsystems angenommen werden (Pancer *et al.*, 2004; Alder, 2005). Spezifisch für die adaptive Immunantwort sind wesentliche Komponenten wie B- und T-Lymphozyten, MHC-Moleküle (*Major histocompatibility complex I/II*), Antigenrezeptoren der T-Zellen oder Immunglobuline (Antikörper), auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Das angeborene Immunsystem fungiert als erste und schnelle Abwehr von Pathogenen. Bei Invertebraten fungiert es als einziger Schutzschild gegen Infektionen und das sehr effektiv. Es ist also in der Lage zwischen Selbst und Nicht-Selbst zu unterscheiden. Neben anatomischen und physiologischen Barrieren wie einer kompakten Epidermis oder zum Beispiel eines sauren pH-Milieus werden bei der angeborenen Immunabwehr auch konservierte mikrobielle Strukturen von Rezeptoren erkannt und so eine Immunantwort ausgelöst. Diese

Strukturen werden *pathogen-associated molecular patterns* oder PAMPs genannt und jeweils spezifisch von Rezeptoren erkannt. Die Rezeptoren wiederum werden als *pathogen- bzw. pattern-recognition receptors* sprich PRRs bezeichnet. Entgegen ursprünglichen Annahmen arbeitet das angeborene Immunsystem durchaus sehr spezifisch und scheint darüber hinaus, über Gedächtnisfunktionen zu verfügen, was eigentlich nur der erworbenen Immunität zugeschrieben wird (Sadd und Schmid-Hempel, 2006; Pham *et al.*, 2007). Es ist außerdem essentiell für die Aktivierung der adaptiven Immunabwehr (Hoffmann *et al.*, 1999; Janeway und Medzhitov, 2002). Die angeborene Immunantwort löst über die PRRs zweierlei Reaktionen aus. Einerseits werden durch die Pathogenerkennung Signaltransduktionskaskaden eingeleitet, die zur Synthese von Effektormolekülen der Abwehr führen. Daran beteiligt sind beispielsweise Transmembranrezeptoren wie die gut erforschten TLRs (*Toll-like receptors*) (Hultmark, 2003). Andererseits wird durch die PAMP-Bindung an Rezeptoren die zelluläre Antwort, also die phagozytierenden Zellen, aktiviert. Diese zelluläre Antwort scheint in einigen Organismen jedoch zu fehlen (Kurz und Ewbank, 2003).

Immunsysteme sowie Organismen unterliegen generell permanent evolutiven Prozessen, da sie in ständiger Interaktion mit anderen Lebewesen einschließlich Pathogenen stehen (Schulenburg *et al.*, 2009). So gibt es hoch konservierte Mechanismen innerhalb des Tierreichs und dennoch vielzählige Adaptionen von Wirts- und Parasitenorganismen. Die Betrachtung des angeborenen Immunsystems mit seinen komplexen Strukturen und zahlreichen Überschneidungen sowie Vernetzungen mit anderen physiologischen Prozessen ist daher immer noch Gegenstand aktueller Forschung

1.2 *Immunsystem von Caenorhabditis elegans*

Wie viele andere freilebende Bodenbewohner ist auch der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (s. 1.5) ständig von potentiellen Pathogenen umgeben. Darüber hinaus ernährt er sich von Mikroorganismen, die er von Pathogenen unterscheiden muss bzw. die fakultativ auch pathogen für den Wurm sein können. Das Immunsystem von *C. elegans* arbeitet äußerst effektiv. So konnten bis heute keine viralen Infektionen in diesem Modellorganismus nachgewiesen werden (Nicholas und Hodgkin, 2004a).

Die Immunabwehr von *C. elegans* lässt sich in drei verschiedene Mechanismen unterteilen. Zunächst zeigen diese Tiere Vermeidungsverhalten, um einer Pathogeninfektion zu entgehen. Dieses wird entweder durch Flucht oder verminderte Futteraufnahme vermittelt (Pujol *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 1999). Bei der Erkennung potentieller Pathogene spielen chemosensorische Neuronen eine wesentliche Rolle (Aballay *et al.*, 2003; Tenor und Aballay, 2008){Citation}. Des Weiteren bilden anatomische Strukturen wie die Cuticula oder der Grinder eine physische Barriere. Schließlich wird die physiologische Abwehr des Wurms bei Invasion oder Kolonisation durch Pathogene aktiviert.

In *C. elegans* wurden sechs hochkonservierte Signaltransduktionskaskaden identifiziert, die in die Immunabwehr involviert sind (Gravato-Nobre und Hodgkin, 2005). Die p38 MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*)-Signalkaskade wird durch unterschiedliche Stressoren aktiviert und ist demnach auch an generellen Stressantworten beteiligt (Koga *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002 und 2004). Darüber hinaus hat sie regulatorische Funktionen bei der Apoptose in der Keimbahn (Aballay und Ausubel, 2001; Aballay *et al.*, 2003). Die *extracellular signal-regulated protein kinase* (ERK)-, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK)- und die p38 MAPK-Signalkaskaden werden zum Teil zu einer Übergruppe zusammengefasst (Nicholas und Hodgkin, 2004b; Huffman *et al.*, 2004).

Die Induktion der Expression verschiedener Effektormoleküle des Immunsystems erfolgt außerdem über die *transforming growth factor-β-like* (TGF-β-like)-Kaskade (Mallo *et al.*, 2002; Tan, 2001; Mochii *et al.*, 1999). Andere Komponenten dieser Signaltransduktion sind Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Patterson und Padgett, 2000).

Ferner wurde der IGF (*insulin-like growth factor*)- oder auch DAF-2 (*abnormal dauer formation*)-Signaltransduktionsweg identifiziert (Lin *et al.*, 2001; Garsin *et al.*, 2003). Diesem wurde zunächst die Regulation der Lebensdauer zugeordnet. Mittlerweile sind aber auch Interaktionen mit der generellen Stressantwort, Detoxifikation und Immunantwort bekannt (Murphy *et al.* 2003; Ookuma *et al.*, 2003).

Die Signaltransduktion bei dem PCD (*programmed cell death*), einem universellen Mechanismus bei der Entwicklung mehrzelliger Tiere, ist schließlich auch bei der Immunabwehr beteiligt (Aballay und Ausubel, 2001). Wie bereits angedeutet, überschneiden sich die sechs Signaltransduktionskaskaden auf zahlreichen Ebenen und interagieren miteinander. Es han-

delt sich also um kreuzvernetzte Interaktionen bei den Immunantworten von *C. elegans* (Ausubel, 2005; Kurz und Ewbank, 2003). Die Komponenten der Signaltransduktionswege des Modellorganismus sind überdies hoch konserviert und es gibt homologe Strukturen sogar in Säugetieren (Kim und Ausubel, 2005; Schulenburg *et al.*, 2004).

In *C. elegans* wurden bisher nur wenige Pathogen-erkennende Moleküle (PRRs) entdeckt. Die bereits erwähnten TLRs bestehen aus einer extrazellulären Leucin-reichen Domäne (LRR, *leucin-rich repeat*) und einer cytoplasmatischen TIR-Domäne. In dem Fadenwurm wurden lediglich zwei Proteine mit einer TIR-Domäne identifiziert, nur eines beinhaltet die extrazelluläre TOL-1-Domäne (Pujol *et al.*, 2001). TIR-1 ist in die intrazelluläre Signalweiterleitung involviert (Couillault *et al.*, 2004). TOL-1 ist in chemosensorischen Neuronen lokalisiert und mutmaßlich an der Erkennung von Pathogenen beteiligt (Aballay *et al.*, 2003; Kurz *et al.*, 2003; Tenor und Aballay, 2008). In der Regel werden über TLRs nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B-ähnliche Proteine (*nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells*) in *Mammalia* aktiviert. In *C. elegans* wurden keine Gene, die für diese Art von Transkriptionsfaktor kodieren, gefunden.

Das Genom des Wurms enthält hingegen viele Vertreter der für Lektin-ähnliche Proteine kodierenden Gene. Unter den Lektinen wird eine mannigfaltige Gruppe von Proteinen zusammengefasst, denen die Fähigkeit, Kohlenhydrate zu binden, gemein ist (Loris, 2002). Die Proteine, die über eine C-Typ-Lektin-ähnliche Domäne (C steht für Calcium-abhängig) verfügen, sind dabei die häufigsten Vertreter. Die bemerkenswerte Zahl von 278 Genen, die für Lektine kodieren, wurde in dem Modellorganismus beschrieben (Drickamer und Dodd, 1999; Schulenburg *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Gene nach Exposition mit einem Pathogen vermehrt exprimiert werden (Irazaqui *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2007; Alper *et al.*, 2007; Troemel *et al.*, 2006; Shapira *et al.*, 2006; O'Rourke *et al.*, 2006; Mallo *et al.*, 2002). Zu der Gruppe der Lektine werden auch die Galektine, eine β -Galaktosid-bindende Proteinfamilie, gezählt. LEC-1-11 aus dem Wurm binden an Glykolipide. Für LEC-8 wurde nachgewiesen, dass es durch kompetitive Bindung an Glykolipidrezeptoren der Darmzellen bei der Abwehr von *Bacillus thuringiensis*-Toxin beteiligt ist (Ideo *et al.*, 2009). Daneben wurden sechs Homologe der *SR B-class*-Proteine, zehn Homologe der LPS-bindenden Proteine (LPS = Lipopolysaccharid), zahlreiche G-Protein-gekoppelte Chemorezeptoren

und F-Box- oder MATH-BTB-Domäne enthaltende Proteine beschrieben (Schulenburg *et al.*, 2008; Nicholas und Hodgkin, 2004a). SR- oder *scavenger receptor*-Proteine vermitteln die Phagozytose von Pathogenen und werden in unterschiedliche Klassen geteilt (Gordon, 2002). LPS ist ein Bestandteil gramnegativer Bakterienzellwände. Die F-Box- bzw. MATH-BTB-Domäne beinhaltenden Proteine wiederum fungieren als Ubiquitin-abhängige Proteasom-Adaptoren (Thomas, 2006). Die genaue Funktionsweise oder eine direkte Beteiligung konnte für die drei zuletzt genannten Strukturen bislang noch nicht nachgewiesen werden.

Zudem verfügt *Caenorhabditis elegans* anscheinend nicht über den Makrophagen oder Neutrophilen des Immunsystems ähnliche, spezialisierte Zellen. Obwohl zunächst vermutet, konnte eine derartige Funktion noch nicht für die Coelomocyten gezeigt werden (Fares und Greenwald, 2001; Gravato-Nobre und Hodgkin, 2005). Auch die bei der Immunantwort von Insekten essentiellen Imd (*Immune deficiency*)-Signalkaskaden und NO- sowie Phenoloxidas-Kaskaden sind in *C. elegans* anscheinend nicht vorhanden (Schulenburg *et al.* 2004). Nach gegenwärtigem Stand fehlen weitere Erkenntnisse über die Funktionsweise des Immunsystems in dem Modellorganismus *C. elegans* und die Rolle einzelner involvierter Komponenten. Am Ende einer Signaltransduktionskaskade des Immunsystems steht meistens die Induktion von Immuneffektoren. Die daraufhin synthetisierten antimikrobiellen Proteine treten in direkten Kontakt mit den Pathogenen, um diese erfolgreich einzudämmen und zu vernichten.

Auf die Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems des Fadenwurms soll im Folgenden detaillierter eingegangen werden.

1.3 Effektoren des Immunsystems von C. elegans

In den letzten Jahren wurden die Exposition von *C. elegans* mit über 30 verschiedenen pathogenen Bakterien- und Pilzspezies zu Forschungszwecken durchgeführt. Im Zuge dieser Studien wurde der Fadenwurm als Ersatzwirt etabliert und diente auch als Modellwirt für humanpathogene Mikroorganismen (s. Abb. 1; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Garsin *et al.*, 2001; Darby, 2005; Nicholas und Hodgkin, 2004a).

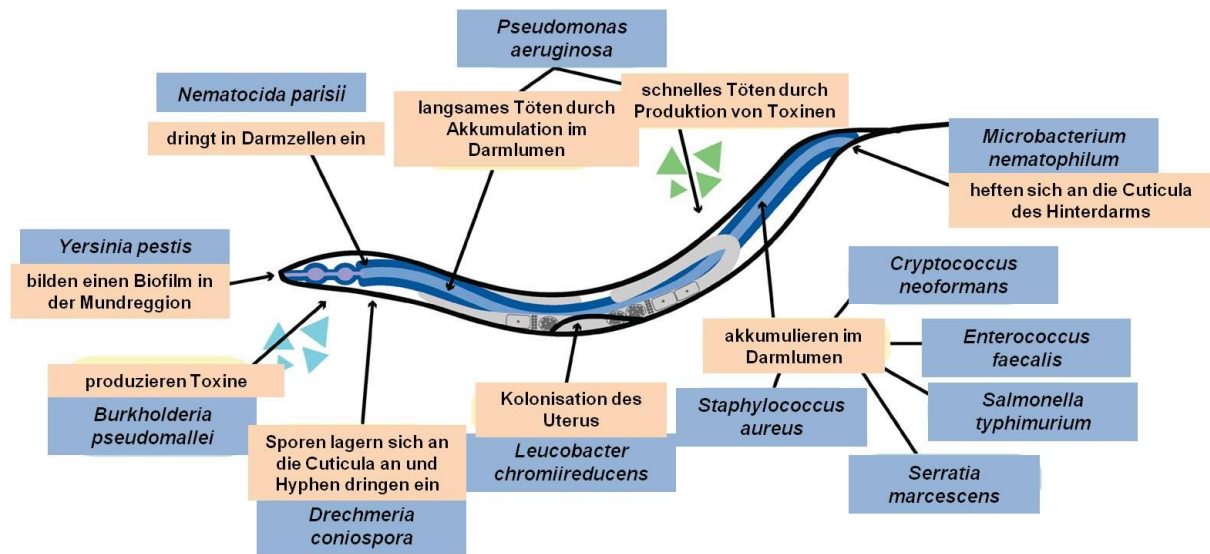


Abb. 1: *C. elegans* und seine Feinde. Darstellung der Anatomie eines Hermaphroditen mit einer Auswahl von Pathogenen und deren Infektionswege, mit denen *C. elegans* unter Laborbedingungen kokultiert wurde. (Abbildung verändert nach (Hodgkin und Partridge, 2008).

Die Art und der Verlauf der Infektionen durch die gezeigten Mikroorganismen wurden unter Laborbedingungen von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Aufgrund des Fehlens einer zellulären Immunantwort in *C. elegans* sind die Mitglieder der humoralen Komponente von zentraler Bedeutung. Das Abwehr-Repertoire des Immunsystems der Nematoden setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Immuneffektoren können generell lokal oder systemisch wirken, ebenso konstitutiv oder induziert exprimiert werden. Im Falle des Wurms ist es in den meisten Fällen noch nicht bekannt, wie oder wo die Effektormoleküle mit den Pathogenen in Wechselwirkung treten.

Zu den Immunantwort-vermittelnden Molekülen werden unter anderem die ShK-Domäne enthaltenden Proteine in *C. elegans* gezählt. Diese Domäne ist ursprünglich bekannt aus dem Toxin Metridin der braunen Seeanemone *Metridium senile*. Die ShK-Domäne findet sich bei dem Fadenwurm jedoch in der C-terminalen Region von Metalloproteasen. Diese Proteine weisen Ähnlichkeiten zu antimikrobiellen Peptiden aus der Pflanze *Amaranthus caudatus* (Garten-Fuchsschwanz) auf. Ihnen wird eine antifungale Aktivität zugesprochen, die bisher aber noch nicht in *C. elegans* bewiesen wurde (Murphy *et al.*, 2003; Nicholas und Hodgkin, 2004a; Schulenburg *et al.*, 2008). Bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* wurden mehrere Gene, die für derartige Proteine kodieren, hochreguliert (Ren *et al.*, 2009). Des Wei-

teren wurden sieben Thaumatine oder PR-5-Proteine beschrieben. Thaumatin ist als natürlich vorkommender Süßstoff bekannt, besitzt darüber hinaus aber antifungale Wirkung durch membranpermeabilisierende Aktivität. RNAi-Verfahren und Microarray-Studien offenbarten eine Beteiligung bei der Immunabwehr (Murphy *et al.*, 2003; O'Rourke *et al.*, 2006; Shapira *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2008).

Überdies verfügt der Modellorganismus über 18 zu PR-1 homologe Gene. PR-1-Proteine sind pflanzliche antimikrobielle Proteine, die gegen Pilze aktiv sein sollen und ebenfalls bei Infektionen mit *Serratia marcescens* hochreguliert werden (Murphy *et al.*, 2003; Schulenburg *et al.*, 2008). Die *shk*-, *thn*- und *pr*-Gene werden unter anderem durch den Transkriptionsfaktor DAF-16 reguliert.

Eine Funktion als Effektormolekül wird weiterhin mehreren Lipasen zugesprochen, die direkt gegen Pathogene zu agieren scheinen. Beispielsweise wird die Expression des *F54F3.3*-Gens bei Infektionen mit *Serratia marcescens* induziert und das Gen wird konstitutiv im Darm exprimiert (Mallo *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2003). Außerdem werden CUB-Motiv enthaltende Proteine genannt. Viele CUB-Proteine sind Peptidasen (Schulenburg *et al.*, 2008). Einige Vertreter davon werden im Darm, Kopf- und Schwanzneuronen und den rektalen Drüsenzellen exprimiert. Unter den Neuronen waren auch Amphid- und Phasmidneuronen (Alper *et al.*, 2007). Eine Induktion durch *P. aeruginosa* konnte für *dod-22* (CUB-Motiv tragend) gezeigt werden (Alper *et al.*, 2009).

Ferner besitzt *C. elegans* sechs Defensin-ähnliche ABF-Peptide (*antibacterial factor*). Deren antibakterielle und antimykotische Aktivität konnte gezeigt werden, nachdem sie aufgrund der Ähnlichkeit mit den ASABF-Proteinen aus *Ascaris suum* (Schweinespulwurm) bereits vermutet wurde (Kato *et al.*, 2002). Die Gene sind denen der Defensine aus Insekten und Mysticin aus Mollusken sehr ähnlich (Zhang und Kato, 2003; Kato und Komatsu, 1996). ABF-2 zeigte sich aktiv gegen grampositive, wie *Bacillus subtilis* oder *Staphylococcus aureus*, und gramnegative Bakterien sowie mehrere Hefen (Means *et al.*, 2009). Die Expression von zwei dieser antimikrobiellen Peptide (*abf-1* und *abf-2*) konnte primär im Pharynx lokalisiert werden und ist konstitutiv. Überdies wurde *abf-2* bei Infektionen mit *Salmonella typhimurium* im Darm und bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* (reguliert über die Proteinkinase D) induziert (Alegado und Tan, 2008; Ren *et al.*, 2009).

Daneben wurde eine Gruppe von Effektormolekülen formuliert, die ein YGGYG-Motiv (Y = Tyrosin, G = Glycin) in ihrer Sequenz aufweisen. Zu dieser Gruppe gehören 21 Mitglieder, die in Caenacine (*Caenorhabditis bacteriocin*, *cnc*) und Neuropeptid-ähnliche Proteine (*neuropeptide-like proteins*, *nlp*) unterteilt werden. Die *nlp*-Gene wurden zunächst als Neurotransmitter annotiert (Nathoo *et al.*, 2001). Die Expression einzelner Mitglieder dieser Gruppe wird bei einer Infektion mit *S. marcescens* oder dem Pilz *Drachmeria coniospora* induziert. Dies wurde für *nlp-29* und *cnc-2* gezeigt. Außerdem bei Infektionen mit der genannten Pilzspezies induziert, wurden *nlp-31*, *nlp-33*, *cnc-4* und *cnc-6* (Mallo *et al.*, 2002; Couillault *et al.*, 2004). Rekombinant hergestelltes NLP-31 war antimykotisch aktiv gegen *D. coniospora*, *Neurospora crassa* und *Aspergillus fumigatus*. Geringe Aktivität zeigte es auch gegen *Escherichia coli* und *Micrococcus luteus*. Regulatorisch unterliegt *nlp-31* TIR-1, dem Homolog des Toll-Interleukin 1-Rezeptors (Couillault *et al.*, 2004). Die Expression von *nlp-29* wurde in der Epidermis lokalisiert und seinesgleichen durch Verwundung induziert (Pujol *et al.*, 2008a). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression des gesamten Genclusters der Caenacine spezifisch bei Pilzinfektionen hochreguliert wird. Ein Vertreter, das *cnc-2*, wurde genauer untersucht und seine dosisabhängige Induktion durch DBL-1 in Neuronen sowie Lokalisation in der Epidermis aufgedeckt (Zugasti und Ewbank, 2009). Überdies sind offenbar Mitglieder dieser Gruppe bei der Abwehr gegen *P. aeruginosa* beteiligt (Ren *et al.*, 2009).

Der Fadenwurm weist zudem antimikrobielle Peptide einer besonderen Familie auf, die als SAPLIPs (Saposin-ähnliche Proteine, *saposin-like proteins*, *spp*) oder Caenopores bezeichnet werden. Zu den SAPLIPs werden über 200 Peptide in verschiedensten Organismen gezählt (Munford *et al.*, 1995). Saposine sind Kofaktoren des Sphingolipid-Stoffwechsels in den Lysosomen eukaryotischer Zellen (O'Brien und Kishimoto, 1991). Den Saposin-ähnlichen Peptiden ist die konservierte α -helikale Struktur mit einer charakteristischen Anordnung von Disulfidbrücken, die zwischen sechs Cysteinresten gebildet werden, gemein. Sie interagieren mit Membranen und verfügen so über eine antimikrobielle Aktivität. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den in *Entamoeba histolytica* identifizierten Amoebapores werden diese Peptide in *C. elegans* auch Caenopores genannt (Leippe, 1999; Roeder *et al.*, 2010). Wie bei den meisten antimikrobiellen Peptiden handelt es sich um Präpropeptide, die Signalpeptide und

Vorstufen der aktiven Peptide umfassen und durch Prozessierung ihre aktive Form annehmen. Der Wurm besitzt mindestens 23 Mitglieder dieser Peptid-Familie (*spp-1-23*), die eventuell sogar 33 Peptide umfasst. Bei Infektionen mit Bakterien werden einige *spp*-Gene gesondert reguliert (Roeder *et al.*, 2010; Alegado *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2003), siehe hierzu auch (Schulenburg *et al.*, 2008). Zum Teil erfolgt die Regulation über den DAF-2/DAF-16-Signaltransduktionsweg (*spp-1* und *spp-12*). Alle *spp*-Gene außer *spp-2*, *spp-12*, *spp-16* und *spp-19* verfügen über eine ELT-2-Bindungsdomäne, die für eine Expression im Darm spricht (McGhee *et al.*, 2007). Lokalisationsstudien mit Reporter-genkonstrukten ergaben, dass *spp-1* ausschließlich im Darm exprimiert wurde und *spp-7* zusätzlich in verschiedenen Pharynxzellen (u. a. pharyngale Muskelzelle pm7) und Kopf-neuronen (Alper *et al.*, 2007). Zuerst wurde die antibakterielle Aktivität für SPP-1 beschrieben (Bányai und Patthy, 1998; Alegado und Tan, 2008). Sie konnte mittlerweile aber auch für Caenopore-1 und -5 gezeigt werden (Roeder *et al.*, 2010; Mysliwy *et al.*, 2010). SPP-5 war gegen *B. megaterium* und *E. coli* aktiv und das pH-Optimum lag im Bereich von pH 5,2. Außerdem wurde es ebenfalls ausschließlich im Darm synthetisiert. SPP-1 zeigte sich dagegen nur gegen *B. megaterium* aktiv. Für die Funktion in der Immunabwehr werden synergistische Funktionen von Caenopores und Lysozymen vorgeschlagen (Leippe, 1999). Schließlich enthält das Genom von *C. elegans* eine ungewöhnlich hohe Zahl an Genen, die für potentielle Lysozyme kodieren. Da Lysozyme als Immuneffektoren von besonderer Relevanz für diese Arbeit sind, werden sie in einem weiteren Kapitel gesondert betrachtet.

1.4 Lysozyme – universelle Effektormoleküle

Lysozyme gehören zu der Enzymklasse der Hydrolasen. Ihnen ist die charakteristische 1,4- β -N-Acetylmuramidase-Aktivität eigen. Spezifisch ist diese Aktivität definiert als die Spaltung der β -glykosidischen Bindung zwischen dem C1-Atom einer N-Acetylmuraminsäure und dem C4-Atom eines N-Acetylglucosamins, welche im Peptidoglykan von Bakterien natürlich vorkommen. Peptidoglykan wird auch Murein genannt (Abb. 2). Entdeckt wurde das Enzym durch Alexander Fleming im Jahre 1921 (Fleming, 1922). Er definierte „Lysozym“ und begründete maßgeblich die Erforschung des Proteins.

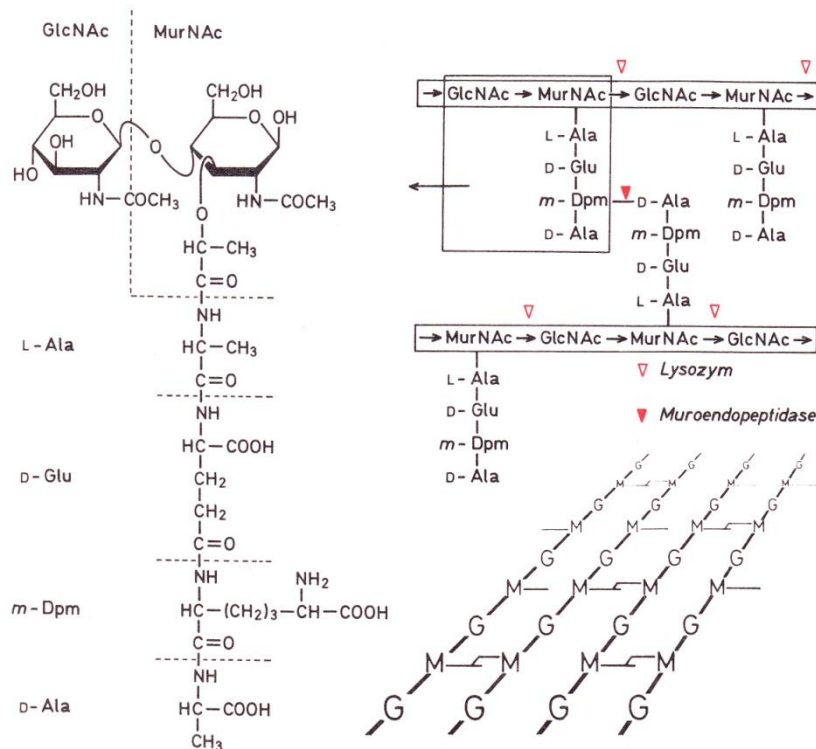


Abb. 2: Peptidoglykanstruktur von *Escherichia coli*. Die aus einer alternierenden Folge von N-Acetylglucosamin (**GlcNAc**) und N-Acetylmuraminsäure (**MurNAc**) bestehenden heteropolymere Ketten sind untereinander peptidisch verknüpft. Auf der linken Bildseite ist das rechts oben eingerandete Muropeptid vergrößert wiedergegeben (**Dpm** = Diaminopimelinsäure). Die roten Pfeile deuten auf die durch Lysozym (Muramidase) und durch eine spezifische Muroendopeptidase spaltbaren Bindungen. Das Bild rechts unten vermittelt einen perspektivischen Eindruck von dem aus GlcNAc (**G**) und MurNAc (**M**) quervernetzten Holmen (Abbildung unverändert übernommen aus Schlegel, 1981).

Es war überdies das erste Enzym oder Protein, dessen Primärstruktur sequenziert, mit dem eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt und dessen Aktivitätsmechanismus aufgeklärt wurde (Jollès und Jollès, 1961; Jollès *et al.*, 1963; Canfield, 1963; Blake *et al.*, 1965; Phillips, 1966). Es handelt sich überwiegend um sehr stabile Enzyme, die ubiquitär vorkommen. Unabhängig von der Definition der Lysozyme können sie sich strukturell, immunologisch und katalytisch jedoch stark unterscheiden, weswegen mehrere Subtypen differenziert werden (Jollès, 1969).

Wohl am weitesten verbreitet im Tierreich sind die *chicken-type*- oder c-Typ-Lysozyme. Der bekannteste Vertreter ist das Lysozym aus dem Hühnereiweiß (*hen egg white lysozyme*, HEWL). Dieser Subtyp findet sich sowohl in Wirbellosen als auch in Wirbeltieren und

darüber hinaus in Protisten wie der Amöbe *Dictyostelium discoideum* (Jollès, Jollès, 1984; Müller *et al.*, 2005). Eine weitere Unterteilung der c-Typ-Lysozyme umfasst die so genannten Calcium-bindenden Lysozyme und die α -Lactalbumine (Nitta *et al.*, 1988; Brew und Campbell, 1967). Die maturen Proteine dieses Subtyps besitzen molekulare Massen um die 14 kDa, bestehend aus zwei Domänen und vier ausgebildeten Disulfidbrücken. Am katalytischen Prozess sind zwei Aminosäurereste beteiligt (z. B.: HEWL, Glu-35 und Asp-52). Für detaillierte Informationen sei hier auf die Literatur verwiesen (Prager und Jollès, 1996; Phillips, 1966; Qasba und Safaya, 1984; Tanford *et al.*, 1973; Kuroki *et al.*, 1986). Die c-Typ-Lysozyme weisen zum Teil auch eine Chitinase-Aktivität auf (Imoto *et al.*, 1972). Außerdem gibt es Vertreter, die bakterizid auf gramnegative Bakterien oder nicht-enzymatisch bakterizid wirken (de-la-Re-Vega *et al.*, 2006; Masschalck und Michiels, 2003; Ibrahim, 2001; Düring *et al.*, 1999; Laible und Germaine, 1985; Engström *et al.*, 1984). Die nicht-enzymatische Aktivität beruht dabei entweder auf direkter Wechselwirkung und Interaktion mit den Zellmembranen oder auf der Aktivierung des bakteriellen Autolysins durch eine kationische Interaktion.

Lysozyme des g-Typs (*goose-type*) existieren hauptsächlich in Vogeleiweißen, wurden aber außer bei Vögeln auch in anderen Organismen, darunter wirbellosen Mollusken, gefunden (Canfield und McMurry, 1967; Hikima *et al.*, 2001; Nilsen *et al.*, 2003). Das aktive Zentrum ähnelt dem der c-Typ-Lysozyme und ihr Molekulargewicht liegt bei ca. 21 kDa (Grütter *et al.*, 1983; Prager *et al.*, 1974). Einige g-Typ-Lysozyme sind auch gegen gramnegative Bakterien aktiv (Zhao *et al.*, 2007; Hikima *et al.*, 2001) bzw. zeigen Chitinase-Aktivität (Thammasirirak *et al.*, 2001).

Ein weiterer Subtyp umfasst Lysozyme, die zuerst in Bakteriophagen identifiziert wurden. Bei den ph-Typ (*phage-type*)-Lysozymen unterscheidet man zwischen V, G und λ -Gruppen. Die Proteine liegen im Größenbereich von 18-19 kDa und das aktive Zentrum ist mit denen der bereits beschriebenen Subtypen vergleichbar (Matthews und Remington, 1974; Tsugati und Ikeya-Oeda, 1972). Auch für das T4-Phagen-Lysozym konnte eine nicht-enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (Düring *et al.*, 1999). Wahrscheinlich gehen c-, g- und ph-Typ-Lysozyme aus einem gemeinsamen Vorläufer hervor (Weaver *et al.*, 1985).

Die in Pilzen entdeckten *chalaropsis*-Typ-Lysozyme (ch-Typ) umfassen auch zahlreiche Mitglieder, die in Bakterien und Bakteriophagen gefunden wurden (Hash, 1963; Morita *et al.*, 1978; Bräu *et al.*, 1991). Sie können N, O-Diacetylmuramin-Verbindungen spalten, die beispielsweise in *S. aureus* vorkommen. Die Struktur eines dieser Lysozyme wurde bereits aufgeklärt und dabei drei katalytische Aminosäurereste (Asp-9, Asp-98, Glu-100) formuliert (Rau *et al.*, 2001). Ihr Molekulargewicht beträgt zwischen 20-23 kDa.

Sehr ähnlich zu den ch-Typ-Lysozymen sind Lysozyme, die ursprünglich in der Amöbe *E. histolytica* beschrieben wurden und strukturell verwandte Vertreter in *C. elegans* und *D. discoideum* besitzen. Da die Ähnlichkeit der Lysozymsequenzen mit denen des ch-Typs geringer als untereinander ist, werden sie als eigener Subtyp geführt (eh-Typ). *E. histolytica* verfügt über zwei eh-Typ-Lysozyme, die beide ~23 kDa groß sind und ein saures pH-Optimum besitzen. Das erste identifizierte Lysozym aus *E. histolytica* war gegen mehrere grampositive Bakterien aktiv, nicht jedoch gegen gramnegative oder *S. aureus*. Obwohl dieses Lysozym, vergleichbar mit den Vertretern des ch-Typs, keine Chitinase-Aktivität aufwies, war es nicht in der Lage, die Zellwände von *S. aureus* mit den spezifischen Zuckerverbindungen, die von ch-Typ-Lysozymen gespalten werden, zu zerstören. Allerdings zeigte es wiederum auch keine Aktivität gegen deacetylierte Formen dieser Zellwände, was auf andere Schutzmechanismen dieser Bakterien schließen lässt und nicht unbedingt auf das Fehlen der katalytischen Eigenschaften. Das zweite isolierte Lysozym aus *E. histolytica* wies einen isoelektrischen Punkt (pI = 4,5) im stark sauren Bereich auf (Jacobs und Leippe, 1995; Nickel *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2005).

Die Amöbe *Dictyostelium discoideum* verfügt über ein außerordentlich diverses Repertoire an Lysozymgenen. In keinem anderen Organismus wurden bisher so viele verschiedene Varianten entdeckt. Darüber hinaus wurde ein weiterer Subtyp für vier Gene formuliert, da keine ausreichenden strukturellen Ähnlichkeiten zu bereits bekannten Lysozymen ausgemacht werden konnten. Neben den zu dem neuen Subtyp zusammengefassten Lysozymgenen verfügt diese Amöbe über potentielle Lysozyme des c-Typs, ph-Typs und eh-Typs (Müller *et al.*, 2005).

Schließlich gibt es noch die i-Typ-Lysozyme (Invertebraten-Typ), die erstmalig im Seestern *Asterias rubens* identifiziert wurden (Jollès und Jollès, 1975). Mittlerweile wurde diese Art

der Lysozyme auch in zahlreichen Mollusken, Insekten, Crustaceen, Anneliden und Nematoden beschrieben (Callewaert und Michiels, 2010; Xue *et al.*, 2004; Bachali *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 1999). Vergleiche mit zugänglichen Genomsequenzen von Vertebraten verdeutlichten, dass dieser Subtyp tatsächlich auf Invertebraten beschränkt zu sein scheint. Auffallend in den i-Typ-Lysozymsequenzen ist die große Zahl an Cysteinresten, die für diese Lysozyme charakteristisch zu sein scheint. Lysozyme dieses Subtyps verfügen über molekulare Massen um 13 kDa, obwohl es N-terminale Extensionen in Lysozymen, die aus Muscheln isoliert wurden, zu geben scheint (Olsen *et al.*, 2003; Xue *et al.*, 2004). Genauso wie die c-Typ-Lysozyme zeigen mehrere Vertreter des i-Typs eine Chitinase-Aktivität (Miyachi *et al.*, 2006; Nilsen *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurde eine Isopeptidase-Aktivität beschrieben (Zavalova *et al.*, 2000; Takeshita *et al.*, 2003; Josková *et al.*, 2009). Die Fähigkeit Isopeptidbindungen zu spalten, wird bei allen i-Typ-Lysozymen vermutet, die die Destabilase-Domäne (PF05497) in ihrer Sequenz enthalten. Isopeptidasen können Vernetzungen des Fibrins hydrolysieren und so den finalen Schritt der Blutkoagulation inhibieren. Daher werden sie auch als Destabilase bezeichnet. Eine ähnliche Peptidbindung tritt auch im Peptidoglykan vieler grampositiver Bakterien auf.

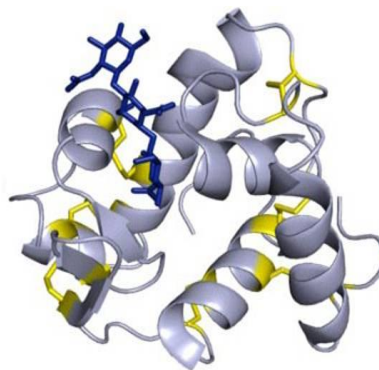


Abb. 3: Die Struktur des i-Typ-Lysozyms aus *Tapes japonica*. Dargestellt ist die Tertiärstruktur des Lysozym-Monomers, welches mit dem Substrat (NAG)₃ (dunkelblau) einen Komplex bildet (verändert n. Goto *et al.*, 2007).

Die Struktur eines Proteins des i-Typs konnte bereits aufgeklärt werden (Abb. 3), woraufhin zwei katalytische Aminosäurereste postuliert wurden (Glu-18, Asp-30; (Goto *et al.*, 2007).

Ferner zeigen sich diese Lysozyme ebenfalls gegen gramnegative Bakterien wirksam (Nilsen *et al.*, 1999). Der optimale pH-Bereich variiert und liegt offenbar zwischen pH 4,5-8,0.

Außer in Bakterien, Protisten und tierischen Eukaryoten sind Lysozyme auch aus Pflanzen bekannt. Dabei handelt es sich überwiegend um Chitinasen, die zusätzlich eine Muramidase-Aktivität zeigen. Sie besitzen meist basischen Charakter. Bekannte Vertreter sind das Hevamin des Gummibaums *Hevea brasiliensis* und ein Lysozym der Papaya (Beintema und Terwisscha van Scheltinga, 1996).

Bakterien entwickelten ihrerseits Strategien, der bakteriziden Wirkung der Lysozyme zu entgehen. Zum einen fanden Zellwandmodifikationen des Glykanstrangs statt. So wurden sowohl in grampositiven als auch gramnegativen Bakterienstämmen N-Acetylierung, N-Glykosylierung und O-Acetylierung oder kovalente Bindungen mit anderen Zellwandpolymeren wie der Teichonsäure in den Peptidoglykanen beobachtet (Vollmer *et al.*, 2008). Solche Strukturen treten vor allem in pathogenen Spezies wie *S. aureus* auf (Bera *et al.*, 2006). Zum anderen bringen pathogene Bakterien Inhibitoren hervor. Diese werden in verschiedene Familien unterteilt (Ivy = *inhibitor of vertebrate lysozyme*, PliC = *periplasmic lysozyme inhibitor of c-type lysozyme*, MliC = *membrane-bounded lysozyme inhibitor of c-type lysozyme*, sowie PliI (I = *invertebrate-type lysozyme*) und PliG (G = *goose-type lysozyme*)). Die bisher bekannten Inhibitoren richten sich demzufolge gegen c-Typ, g-Typ und i-Typ-Lysozyme (Monchois *et al.*, 2001; Vanderkelen *et al.*, 2010; Van Herreweghe *et al.*, 2010).

Die biologische Rolle der Lysozyme kann sehr unterschiedlich sein. Vielfach werden sie als effektive Immuneffektoren beschrieben, die die angeborene Immunantwort komplettieren. Dabei werden sie konstitutiv exprimiert, um eine generelle Schutzfunktion einzunehmen, oder spezifisch bei Infektionen mit einer pathogenen Spezies induziert. Durch das Vorkommen unterschiedlicher Lysozymtypen und verschiedener Gene in ein und demselben Organismus lassen sich essentielle Funktionen vermuten. Gerade bei Organismen, in denen eine große Anzahl an Lysozym-kodierenden Genen im Genom vorliegt, höchstwahrscheinlich aus Genduplikationen hervorgegangen, übernehmen diese Enzyme häufig Verdauungsfunktionen. Deren Rolle in der Ernährung ist besonders gut in wiederkäuenden Wirbeltieren charakterisiert, mittlerweile aber auch aus Insekten wie der Taufliede bekannt (Dobson *et al.*, 1984; Stewart *et al.*, 1987; Daffre *et al.*, 1994; Kornegay *et al.*, 1994; Regel *et al.*, 1998).

Lysozyme mit Verdauungsfunktion besitzen meist ihr pH-Optimum im sauren Bereich und einen niedrigen pI-Wert. Darüber hinaus zeigen sie sich, öfter als andere Lysozyme, resistent gegenüber Proteasen. Indessen liegt das pH-Optimum von Lysozymen mit Abwehrfunktion meist im neutralen Bereich und deren isoelektrischer Punkt bei pI = 8 oder höher. Lysozyme können demnach innerhalb eines Subtyps oder eines Organismus zwei differente Funktionen ausüben.

1.4.1 Lysozyme in *C. elegans*

C. elegans besitzt insgesamt fünfzehn potentielle Lysozyme. Zehn gehören dem Subtyp der eh-Lysozyme und fünf dem i-Typ an. Zunächst wurden diese durch Sequenzvergleiche identifiziert (Jacobs und Leippe, 1995; Bachali *et al.*, 2002). Der Ort ihrer Expression oder ihre Funktionsweise ist bis heute überwiegend unbekannt. Bemerkenswert ist die große Zahl an mutmaßlichen Lysozymen, die die größte überhaupt bekannte in einem einzelnen Organismus sein dürfte.

In vorangegangenen Studien wurde den zehn Genen in *C. elegans*, die für potentielle Lysozyme des eh-Typs kodieren (*lys-1-lys-10*), eine Aufgabe bei der Immunabwehr zugesprochen. Basierend auf Expressionsanalysen wurde gezeigt, dass einzelne Vertreter bei Infektionen mit pathogenen Bakterien oder Pilzen vermehrt exprimiert wurden. So wurden beispielsweise alle bis auf *lys-9* bei Infektionen mit unterschiedlichen Pathogenen differentiell exprimiert. In den meisten Fällen wurde die Expression hochreguliert. Unter den verwendeten Bakterien befanden sich auch humanpathogene wie *P. aeruginosa* oder *S. marcescens*. Die Induktion der Expression der Lysozymgene wird offenbar durch verschiedene Signaltransduktionswege reguliert. Unter anderem stehen sie unter dem Einfluss von DAF-16, TIR-1 und DBL-1. Beispielsweise werden *lys-7* und *lys-8* durch DAF-16 induziert und die Expression von *lys-1* und *lys-3* runterreguliert (siehe dazu Übersichtsartikel wie (Schulenburg *et al.*, 2008; Ewbank, 2006; Gravato-Nobre und Hodgkin, 2005). Obwohl die *lys-1*-Expression durch eine *S. marcescens*-Infektion induziert wurde, offenbarten jedoch RNAi-Versuche, dass keine erhöhte Sensibilität der Tiere durch *knock-down* von *lys-1* hervorgerufen wurde. Des Weiteren konnte die Expression von allen Lysozymgenen außer *lys-3* und *lys-10* im

Darm lokalisiert werden, wobei der Promotorbereich von *lys-2* zusätzlich über eine Bindungsdomäne für ELT-2 verfügt, was ebenfalls für eine Expression im Darm spricht (McGhee *et al.*, 2007; Shapira *et al.*, 2006). Eventuell unterliegt *lys-1* auch dem Einfluss von ELT-2. Dieses Lysozym wurde in apikalen Vesikeln der Darmzellen exprimiert und weiterhin in Kopf- und Schwanzneuronen, darunter Amphid- und Phasmidneuronen sowie IL-1- und IL-2-Neuronen (Mallo *et al.* 2002; Mochii *et al.*, 1999; Alper *et al.*, 2007). Reportergenkonstrukte von *lys-7* wiederum deuteten auf eine Lokalisation des Lysozyms, außer im Darm, in Kopfneuronen und den rektalen Drüsenzellen hin (Alper *et al.*, 2007). Außerdem wurde *lys-8* auch im terminalen Bulbus des Pharynx sowie den pharyngalen Drüsenzellen identifiziert (Smit *et al.*, 2008; Mallo *et al.*, 2002; Mochii *et al.*, 1999).

Die potentiellen i-Typ-Lysozyme aus *C. elegans* sind bislang weniger gut untersucht als die eh-Typ-Lysozyme. Aufgrund von vorhandenen Bindungsstellen für GATA-Transkriptionsfaktoren wie ELT-2 wird die Expression im Darm für *ilys-2*, *ilys-3* und *ilys-5* angenommen (McGhee *et al.*, 2007; Shapira *et al.*, 2006; Pauli *et al.*, 2006). Auch sollen *ilys-3*, *ilys-4* und *ilys-5* durch DAF-16 reguliert werden, wobei einzig *ilys-3* hochreguliert werden soll (McElwee *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2003). Bei Infektionen mit den Bakterien *Microbacterium nematophilum*, *Photorhabdus luminescens*, *P. aeruginosa* und *S. aureus* wurden die Gene differentiell exprimiert. So wurden drei der Lysozymgene (*ilys-1* (nur schwach), *ilys-2* und *ilys-3*) durch eine Infektion mit *M. nematophilum* induziert (O'Rourke *et al.*, 2006). Wobei die höhere Empfindlichkeit gegenüber *M. nematophilum* bei RNAi-Versuchen mit *ilys-3* eine maßgebliche Beteiligung dieses Lysozyms an der Abwehr vermuten lässt. Auch bei Infektionen mit *S. aureus* wurde eine Induktion der *ilys-3*-Genexpression gezeigt (Irazoqui *et al.*, 2010). In mit *P. aeruginosa* infizierten Würmern werden *ilys-2*, *ilys-3* und *ilys-5* herunter, *ilys-4* hingegen hochreguliert (Troemel *et al.*, 2006). Ferner scheint die Expression von *ilys-2* und *ilys-3* durch *P. luminescens* induziert zu werden (Wong *et al.*, 2007).

Die Rolle der Lysozyme in *C. elegans* ist somit noch unklar. Ob ihre Funktion in der Abwehr von Pathogenen liegt oder bei der Ernährung eine Rolle spielt, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden. Trotz beinahe 100-jähriger Erforschung von Lysozymen ist deren genaue Stellung in der angeborenen Immunabwehr vielfach nicht ausreichend geklärt. Außerdem ist über

die Funktionsweise und Vernetzung der zahlreichen potentiellen Lysozyme aus *C. elegans* so gut wie nichts bekannt. Die wenigsten Interaktionen des Immunsystems von diesem Modellorganismus wurden bislang auf Proteinebene untersucht. Somit wird offenbar, dass die Fragen über die Rolle der Lysozyme in *C. elegans* noch nicht erschöpfend beantwortet werden konnten.

1.5 Der Modellorganismus *C. elegans*

Der freilebende Fadenwurm *C. elegans* lebt auf verrottendem, organischen Material im Boden und ernährt sich von den dort vorkommenden Mikroorganismen (Barriere und Felix, 2005 und 2007). Sein natürliches Verbreitungsgebiet erstreckt sich über anthropogene Habitate in der ganzen Welt (Koch *et al.*, 2000). Über sein natürliches Nahrungsspektrum und ökologisches Umfeld ist jedoch bisher nur wenig bekannt. *C. elegans* ist relativ durchsichtig und besitzt einen drehrunden, unsegmentierten und bilateralsymmetrisch organisierten Körper. Die Länge der adulten Tiere beträgt ungefähr 1 mm. Die artenreiche Gruppe der Fadenwürmer (Nematoden, ~16.000 Arten) umfasst sowohl freilebende als auch parasitäre Arten wie *Trichinella spiralis* (Trichine), *A. suum* (Schweinespulwurm) oder *Dramunculus medinensis* (Medinawurm) (Mehlhorn und Piekarski, 2002). Der Modellorganismus *C. elegans* gehört zur Familie der *Rhabditidae* in der Ordnung *Rhabditida* und zur Gattung *Caenorhabditis* (Kiontke *et al.*, 2004). Sein wissenschaftlicher Name wurde von Maupas und Osche eingeführt (Maupas, 1900; Osche, 1952). Zu Forschungszwecken wird überwiegend der N2-Stamm genutzt, der aus einer aus einem Kompost bei Bristol isolierten Population hervorgeht (Nicholas *et al.*, 1959). Es sind aber mittlerweile zahlreiche verschiedene Isolate für die Kultivierung im Labor erhältlich.

C. elegans bildet zwei Geschlechter aus, Hermaphroditen und Männchen. Das diploide Genom der Tiere setzt sich aus sechs Chromosomenpaaren, fünf autosomalen (I-V) und einem Geschlechtschromosomenpaar (X), zusammen. Das Genom kodiert für ~19.000 Gene und hat eine Größe von 97 Mb. Männchen (X0) kommen in natürlichen Populationen nur zu ~0,05 % vor und sind zur Fortpflanzung auf die Paarung mit einem Hermaphroditen (XX) angewiesen (Hope, 1999). Hermaphroditen sind jedoch funktionale Weibchen, die adult keine Spermien

mehr produzieren. Zur Rekombination kommt es nur bei Kreuzbefruchtungen, wobei dann die Spermien des Männchens bevorzugt werden. Die Hermaphroditen sind in der Lage sich selbst zu befruchten und legen im Laufe ihres circa dreiwöchigen Lebens 300-600 Eier. Die Embryogenese umfasst den Zeitraum zwischen Befruchtung und Schlüpfen der ersten Larve und beginnt im Uterus (Sulston *et al.*, 1983; Hope, 1999). Aus den Eiern entwickeln sich über vier Larvenstadien (L1-L4) die adulten Tiere (Cassada und Russell, 1975). Bei ungünstigen Lebensbedingungen wird alternativ ein Dauerstadium ausgebildet, aus dem sich bei veränderten Umweltbedingungen über die L4-Larve die Adulten entwickeln (Abb. 4; Albert und Riddle, 1988; Byerly *et al.*, 1976). Der Generationszyklus von *C. elegans* ist temperaturabhängig.

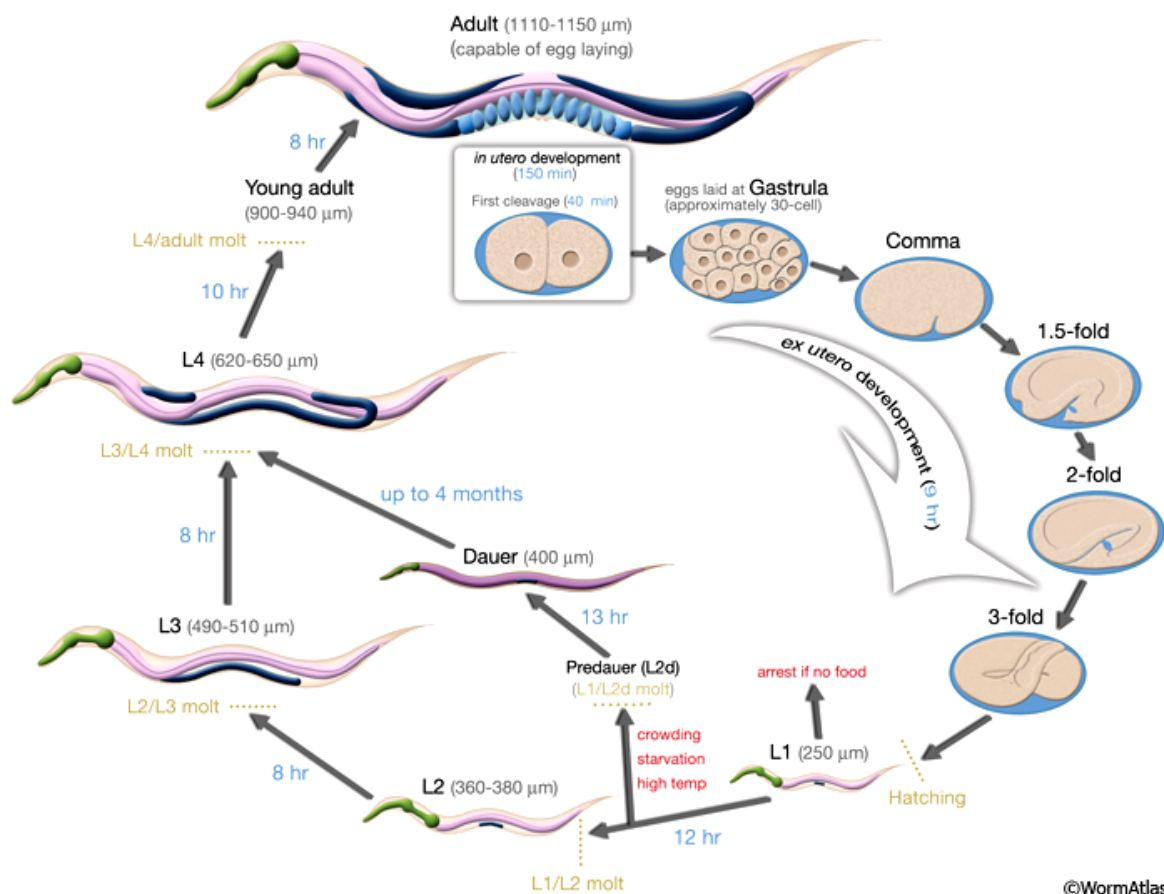


Abb. 4: Entwicklungszyklus von *C. elegans* mit alternativem Dauerstadium bei 22 °C. Abbildung mit englischer Beschriftung unverändert entnommen. (Quelle: <http://www.wormatlas.org/handbook/>; Zugriff: 05.09.2010).

Die Anatomie der beiden Geschlechter unterscheidet sich in dem Aufbau der Gonaden und des Schwanzes (Kimble und Hirsh, 1979; Sulston *et al.*, 1980). Die Gonaden der Hermaphroditen sind symmetrisch als zwei paarige Lappen organisiert, die beide ventral über den Uterus in der zentralen Vulva münden (Abb. 5). Im distalen Teil befinden sich jeweils die Ovarien und im proximalen Teil die Ovidukte und Spermatheken (Schedl, 1997). Die Befruchtung der Eier erfolgt in den Spermatheken. Männchen sind ausschließlich zur Spermatogenese befähigt und verfügen über eine einlappige Gonade, einen *Vas deferens*, eine Kloake und einen zur Paarung spezialisierten Schwanz.

Ein charakteristisches Merkmal der Nematoden ist ihre primäre Leibeshöhle oder Pseudocoel. Das Mesenchym dieser Organismen wird fast vollständig zurückgebildet und zwischen Darmkanal und Körperwand entsteht ein flüssigkeitsgefüllter Raum, welcher als Hydroskelett fungiert. Die Turgeszenz der Körperhöhle dient bei diesen Tieren als Antagonist zur Längsmuskulatur. Ring- oder Dorsalmuskulatur fehlt den Fadenwürmern gänzlich, und sie bewegen sich in charakteristischen Schlängelbewegungen fort. Die Längsmuskelzellen bilden vereinzelt neuromuskuläre Synapsen, eine Besonderheit der Nematoden, aus (Waterston, 1988). Die Körperwand von *C. elegans* setzt sich aus einer einschichtigen, syncytialen Epidermis (Hypodermis) und der von ihr sezernierten Cuticula zusammen. Die Cuticula besteht hauptsächlich aus Kollagen (Peixoto *et al.*, 1997). Unter der Hypodermis liegen die vier longitudinalen Muskelbänder. Die Würmer durchlaufen in ihrer Entwicklung vier Häutungen, bei denen die Körperwand jeweils erneuert wird.

Der Verdauungstrakt setzt sich aus Mund, Pharynx, Mittel- und Enddarm sowie dem After zusammen. Der schlauchartige Darm in adulten Tieren wird von 20 Darmzellen mit in der Summe 30-34 Zellkernen mit je 32 Chromosomen gebildet. Diese binukleären, polyploiden Zellen stammen von einer einzigen Vorläuferzelle ab (Leung, 1999; Hedgecock und White, 1985; Sulston und Horvitz, 1977). Die epithelialen Zellen sind sehr groß und tragen viele Organellen sowie cytoplasmatische Granula. Einige dieser Granula zeigen eine Autofluoreszenz, die sich über die Lebensdauer verstärkt. Morphologisch lassen sich bei den Darmzellen eine basale und eine apikale Seite erkennen. An der apikalen Seite werden oberflächenvergrößernde Mikrovilli ausgebildet, welche von einer extrazellulären Glykokalyx überlagert werden (Leung, 1999). Der Darm ist nicht starr an der Körperwand befestigt. Stattdessen ist

er an den Übergängen zum Pharynx und zum Anus verankert (*pharyngeal* und *rectal valve*) und darüber hinaus werden der Länge nach mehrere dünne Streifen aus *Hemicentin* gebildet, welche die Basallamina des Darms mit der Körperwand verbinden (Vogel und Hedgecock, 2001). Der Darm wird nicht direkt über Nerven innerviert und ist nur am posterioren Ende mit einem Muskel assoziiert. Der muskulöse Pharynx vermittelt die Nahrungsaufnahme und –beförderung in den Mitteldarm. In seinem terminalen Bulbus liegt ein *Grinder* (Mahlwerkzeug), mit dessen Hilfe aufgenommene Mikroorganismen mechanisch größtenteils zerstört werden (Albertson und Thomson, 1976). Frei im Pseudocoel und oft paarig sind des Weiteren sechs phagocytotisch aktive Coelomocyten lokalisiert. Deren genaue Funktion ist nicht bekannt (Fares und Greenwald, 2001; Chitwood und Chitwood, 1974; Bolla *et al.*, 1972).

Das Exkretionssystem des Wurms setzt sich aus fünf Zellen zusammen und durchzieht den ganzen Körper. Aus einer Zelle wird die Pore mit einer Öffnung zur Außenwelt gebildet. Weiterhin sind zwei paarige Drüsenzellen und eine Kanalzelle angelegt. Schließlich bildet eine Zelle das charakteristische H-Kanalsystem aus, welches sich entlang der anterior-posterior-Achse erstreckt. Neben exkretorischen verfügt das System auch über sekretorische Funktionen (Nelson und Riddle, 1984).

Das Nervensystem dieser Nematoden konzentriert sich in einer Ringkommissur, die den Pharynx umgibt, einem ventralen Nervenstrang und im Schwanzbereich. Es setzt sich bei den Hermaphroditen aus 302 Zellen zusammen, die 118 verschiedenen anatomisch definierten Gruppen angehören. Die Männchen verfügen über 79 zusätzliche Neuronen, was wahrscheinlich in dem Sexualverhalten begründet liegt (Sulston *et al.*, 1980; Emmons, 2005). Das Nervensystem ist untergliedert in große somatische Nerven (282 Neuronen) und kleine pharyngale Nerven (20 Neuronen), welche durch ein einzelnes Paar von Interneuronen kommunizieren (RIP) (Ward *et al.*, 1975; White *et al.*, 1983; Sulston, 1983). Im Gegensatz zum somatischen System liegen die pharyngalen Neuronen direkt zwischen den pharyngalen Muskeln und sind nicht durch eine Basallamina von den Muskeln getrennt. Wohingegen die somatischen Neuronen sich eine Basallamina mit der Hypodermis teilen, die sie von den Muskeln separieren.

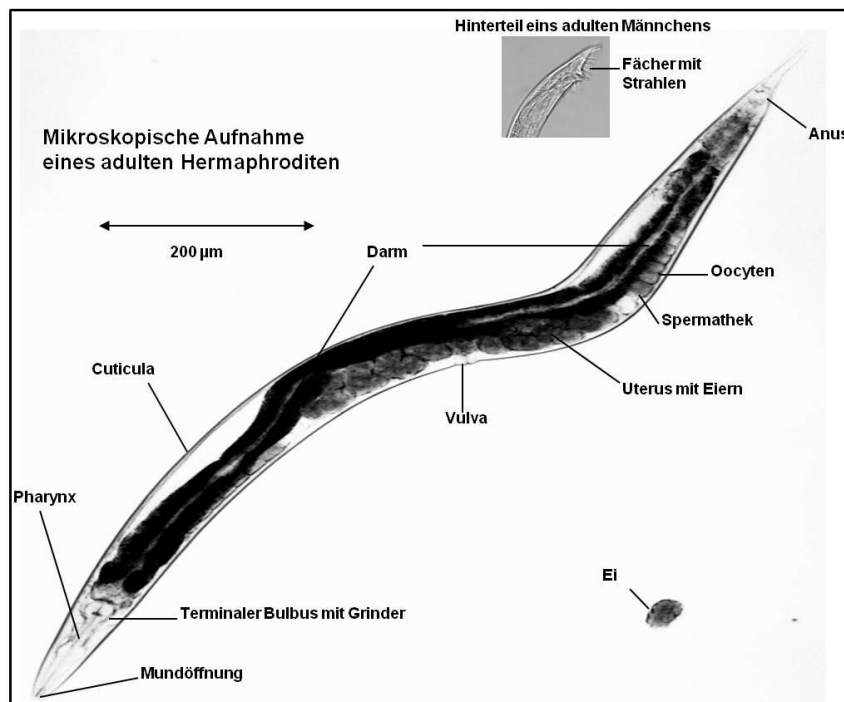


Abb. 5: Anatomie von *C. elegans*. Die anatomischen Einheiten und Größenverhältnisse sind direkt gekennzeichnet. Im kleinen Bildausschnitt sind die spezifischen Strukturen eines männlichen Schwanzes dargestellt.

C. elegans verfügt über verschiedene komplexe Verhaltensmuster. Die Koordination von Bewegungsabläufen, Nahrungssuche, Nahrungsaufnahme und Defäkation gehört zu den grundlegenden Fähigkeiten. Der Wurm registriert Chemikalien, mechanische Reize, Duftstoffe, Temperaturen, Pheromone und Sauerstoffkonzentrationen (Barr und Garcia, 2006; Jeong *et al.*, 2005). Darüber hinaus verfügt er über soziales Fress-, Vermeidungs-, Lern- und Gedächtnisverhalten. Beispielsweise wird Vermeidungsverhalten, ausgelöst durch Kontakt zu Pathogenen, durch chemosensorische Neuronen induziert und durch die Regulation von Serotonin in serotonergen Neuronen koordiniert (Bargmann, 2006).

C. elegans ist neben der Taufliege *Drosophila melanogaster* der wichtigste wirbellose Modellorganismus. Als solcher wurde er mehr oder weniger von einer Person, Sydney Brenner, eingeführt (Brenner, 1974). Zahlreiche Eigenschaften des Fadenwurmes begünstigen seine Funktion als biologisches Forschungsobjekt. Die geringe Größe, einfache Kultivierung und Lagerung über lange Zeiträume, durchsichtige Statur und kurze Generationszeit sind nur einige davon. Die bei *C. elegans* auftretende Eutelie (Zellkonstanz), das vollständig sequen-

zierte Genom, die Vererbung durch Selbstbefruchtung sowie mögliche Generierung homozygoter Mutanten begünstigen genetische Manipulations-Experimente (Hope, 1999; Sulston und Hodgkin, 1988; *C. elegans* sequencing consortium, 1998). Mittlerweile wurden auch die Schwesterarten *C. briggsae* und *C. remanei* vollständig sequenziert (Stein *et al.*, 2003; Wylie *et al.*, 2004). Darüber hinaus zeigen sich die Würmer für das RNAi-Verfahren sehr zugänglich, was das Methodenspektrum zur Erforschung einzelner Gene und deren Funktionen erweitert (Fire *et al.*, 1998; Sönnichsen *et al.*, 2005).

Durch Kombination moderner genetischer und molekularbiologischer Methoden können somit Funktionsweisen biologischer Mechanismen analysiert und so Rückschlüsse auf allgemeine Prinzipien gezogen werden. Die aus Untersuchungen mit *C. elegans* gewonnenen Erkenntnisse über die angeborene Immunität könnten Aufschluss über die phylogenetische Entwicklung, Spezifität und Funktionsweise des Immunsystems allgemein geben.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

C. elegans ist ein wichtiger Modellorganismus in den biologischen Wissenschaften, dennoch ist über sein Immunsystem auf Proteinebene bislang nur wenig bekannt. Ferner sind Lysozyme universelle immunologische Effektoren. Auf Grundlage eines etablierten Modellorganismus und einer zum Teil gut charakterisierten Proteinklasse sollten neue Erkenntnisse über die Funktionsweise und Rolle der Lysozyme des Invertebraten-Subtyps aus *C. elegans* gewonnen werden. Dabei sollten die fünf potentiellen i-Typ-Lysozyme, mit dem Fokus auf ein einzelnes, molekular charakterisiert werden.

Durch die Analyse der *ilys*-Genexpression sollten neue Erkenntnisse über den Funktionsmechanismus der mutmaßlichen Lysozyme und deren Beteiligung an der Immunabwehr bzw. Ernährung gewonnen werden. Mit Hilfe von transgenen Linien, die ein *gfp*-Reportergenkonstrukt trugen, sollten die Expression der Gene und deren Genprodukte in den Würmern lokalisiert werden. Anhand der zu beobachtenden Expressionsprofile könnten Gemeinsamkeiten und gewebsspezifische Besonderheiten der potentiellen i-Typ-Lysozyme verifiziert werden. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte aus natürlichen Proteinextrakten von *C. elegans* bereits eines dieser Lysozyme teilgereinigt und identifiziert werden. Aufgrund dessen stand die bioche-

mische Charakterisierung dieses ILYS-5 im Fokus der weiterführenden Arbeiten. Hierfür sollte eine heterologe Expression von *ilys-5* im Bakteriensystem erfolgen. Mit dem rekombinant synthetisierten Lysozym sollte anschließend seine enzymatischen Eigenschaften näher untersucht werden.

Informationen über mögliche Aktivitätsunterschiede bei unterschiedlichen pH- und Salzbedingungen erlauben Rückschlüsse auf die Funktion des Lysozyms in einem Organismus. Ferner sollte die antibakterielle Aktivität von ILYS-5 gegen verschiedene Bakterienspezies aufgedeckt werden. Im Zuge des experimentellen Vorgehens sollten die wachstumshemmenden und bakteriziden Konzentrationen des Lysozyms für die einzelnen Bakterienstämme bestimmt werden.

Neue Erkenntnisse über den Wirkmechanismus und das antibakterielle Spektrum eines der fünf mutmaßlichen i-Typ-Lysozyme einerseits und die Lokalisation der Genprodukte aller Lysozyme dieses Subtyps andererseits sollten deren biologische Rolle in *C. elegans* verdeutlichen. Anhand der gewonnenen Ergebnisse sollten schließlich erste Thesen über deren Beteiligung an der Immunabwehr oder eben bei der Ernährung formuliert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von der Firma **Applichem** in Darmstadt bezogen.

Weitere Bezugsquellen:

- **Brand GmbH & Co KG** (Wertheim):
Messkolben (Duran®, Glas) vers. Größen, Parafilm® M
- **Fermentas GmbH** (St. Leon-Rot):
GeneRuler™ DNA Ladder Mix, dNTP-Mix (100 mM *Solutions*, ATP, GTP, TTP, CTP), 25 mM MgCl₂ (PCR), 10 x PCR-Puffer (-MgCl₂, +KCl), Proteinase K (recombinant) PCR grade (20mg/ml), Restriktionsendonukleasen (*Age* I, *Nco* I, *Pst* I, *Xho* I), *Taq*-DNA-Polymerase (recombinant), T4-DNA-Ligase (*supplied with PEG*, 1000 U), 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer
- **Gibco™ BRL** (Paisly, UK, Invitrogen Corporation):
TRIzol® Reagent
- **Invitrogen GmbH** (Karlsruhe):
EKMax™ Enterokinase (250 U, 1 U/μl), SuperScript™-III Reverse Transkriptase-Kit
- **Merck KGaA** (Darmstadt):
Cholesterin (kristall. rein), K₂HPO₄, EDTA (Dinatriumsalz), Formaldehyd (min. 37%), Imidazol, KH₂PO₄, KOH-Plätzchen, MgCl₂·6H₂O, MgSO₄·7H₂O, NaCl, NaOH-Plätzchen, ortho-Phosphorsäure (min. 85%), *p*-Nitroanilin (4-Nitroanilin) (C₆H₆N₂O₂, 6760), *p*-Nitrophenol (4-Nitrophenol (C₆H₅NO₃, 6798)
- **MP Biomedicals** (Eschwege):
SDS
- **Roth GmbH & Co KG** (Karlsruhe):
ACN, Agar-Agar, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, HAc, H₂O (HPLC *gradient grade*), Ethidiumbromid (1 %ig), EtOH, α-D (+)-Glukose-Monohydrat, Glutardialdehyd, Glycerin, Hefe-Extrakt, IPTG, Isopropanol, Kanamycin, KCl, NaCH₃CO₂·3H₂O, Na₂CO₃, Na₂S₂O₃·5H₂O, NH₄HCO₃, Palmitinsäure (≥98 %), Rotiphorese Gel 30

(37,5:1), Standardobjektträger und Deckgläschen (Glas), TFA, Tris, Trypton (entspricht Pepton aus Casein), Urea

- **Sarstedt** (Nürnbrecht):
Sämtliche Plastikmaterialien
- **Serva Electrophoresis GmbH** (Heidelberg):
BSA, Coomassie Brilliant Blue G250, Trypsin (NB *sequencing grade from porcine pancreas*), Tween® 20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆)
- **Sigma-Aldrich Chemie GmbH** (Steinheim):
AMS, Chitinase von *Streptomyces griseus* (Pulver, ≥25 U/g, ehemals Fluka 22725), DiI (97 %, 468495, 100 mg), DMF, IAA, N-(*p*-Nitrophenyl)-L-glutamin Hydrochlorid (*L-Glutamyl-γ-(p-nitroanilide)-hydrochloride*) (C₁₁H₁₃N₃O₅xHCl; G6133), *Micrococcus luteus*-Zellwände (auch *M. lysodeikticus*; lyophilisiert), 4-Nitrophenyl-β-D-Cellobiosid (C₁₈H₂₅NO₁₃, N5759), 4-Nitrophenyl-N,N'-Diacetyl-β-D-Chitobiosid (C₂₂H₃₁N₃O₁₃, N6133), NP-40 (Nonidet-40 *Electrophoresis Reagent X*)
- **Spectrum®Laboratories** (Spectrum Europe B. V.) (Breda, Niederlande):
Dialyseschläuche Spectra/Por® (*molecular membrane tubing*) 3,500 MWCO und 12,000-14,000 MWCO in 45 mm und 18 mm Breite mit dazu passenden Verschlussklemmen des Herstellers

2.2 Geräte

- **Analysewaage ABJ 220-4M** (Kern & Sohn AG, Balingen)
- **Autoklav Varioklav® Steam Dampfsterilisator 135 S** (H+P Labortechnik, Oberschleißheim, heute Thermo Fisher Scientific Ltd. & Co. KG)
- **Beckman L7-65 Ultrazentrifuge** (Rotor Typ 60i (Festwinkel), Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
- **Chromatographie-Systems Äkta Purifier** (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) und **Software Unicorn 5.0** sowie **Frac-950 Fraktionierer**
- **Easyject Prima Elektroporator** (Equibio Limited, Kent, UK)
- **Elektrophorese-Netzgerät E835** (Consort N. V., Turnhout, Belgien)
- **Eppendorf MiniSpin® Tischzentrifuge** (Eppendorf AG, Hamburg)
- **Eppendorf Zentrifuge 5417R** (Einsatz F45-30-11 (Festwinkel), Eppendorf AG, Hamburg)
- **Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M mit Apotome und MRm Rev. 2D-Kamera und Software Axiovision Res 4.5** (Carl Zeiss MicroImaging GmbH,

Hamburg); **Luminescence spectrometer LS 50B** (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)

- **Fluoreszenzstereomikroskop Polypus SZX12 mit Olympus U-RFL-T- und Schott KL 1500 LCD-Lichtgebern** (Olympus Europa GmbH, Hamburg und Lighting and Imaging Schott AG, Mainz)
- **Inkubationsschrank TH30** (Edmund Bühler/Johanna Otto GmbH, Hechingen, bezogen von Hassa, Lübeck)
- **Inverses Mikroskop Leica DM IL** (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) **mit Mikromanipulator inklusive Joystick M/W** (Phyton-Elektronik GmbH, Gröbenzell) **und Labornetzgerät TNG 30** (Votcraft® zugehörig zu Conrad Electronic SE, Hirschau)
- **MALDI-TOF/TOF 4700 Proteomics analyzer workstation Massenspektrometer** (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)
- **Mastercycler EPGradient** (Eppendorf AG, Hamburg)
- **Mikrobiologischer Brutschrank B6000** (Heraeus®, heute Thermo Electron GmbH, Dreieich)
- **Mikrowelle** (Daewoo KOR-63A5, Butzbach)
- **Millipore-Anlage, Milli-Q Academic System Millipore** (Wasserfilteranlage, Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.)
- **NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer** (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)
- **Osmomat 030 cryoscopic-Osmometer** (Gonotec GmbH, Berlin)
- **Rotanta 460R** (Gestell 56724, Ausschwingrotoren), Hettich-Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen)
- **Sonotrode MS73 Sonoplus** (Bandelin Homogenisatoren HD 2070, Berlin)
- **SpeedVac® concentrator SPD series SPD131DDA** (Thermo Electron GmbH, Karlsruhe; gehört zu Thermo Fisher Scientific Ltd. & Co. KG)
- **Spektrophotometer Easyspec UV-Vis Spectroph.** (Safas, Monaco) mit **Dell-Computer Vostro 1000** und der Software **Easyspec//SAFAS SP 2000**
- **Stereomikroskop MDG35** (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar) **mit Lichtgeber KL 1500 LCD** (Lighting and Imaging Schott AG, Mainz)
- **Thermomixer compact und comfort** (Eppendorf AG, Hamburg)
- **Thermostatschrank AL428210** (Aqua®lytic, Dortmund)
- **Titertek Multiskan® MCC/340 P-Spektrometer** (Version 2.32; Flow Laboratories, Korea) **mit Analogschreiber Peacock**
- **Ultraschallreiniger Sonorex Super RK 106** (Bandelin Sonorex, Berlin)

- **Ultraspec 1100 pro-Spektrometer** (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)
- **Universal vacuum system with refrigerated vapour tap UVS400A-220** (Thermo Electron GmbH, Karlsruhe; gehört zu Thermo Fisher Scientific Ltd. & Co. KG)
- **Vortex Schüttler REAX 1** (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG)
- **Waage 1219MP** (Sartorius AG, Göttingen)
- **Wasseraufbereitungsanlage GenPure, TKA** (TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Niederelbert)

2.3 Kultivierung von *C. elegans*

2.3.1 Medien und Lösungen

NGM Agar:		finale Konz.
(<i>Nematode growth medium</i>)	3 g NaCl	51 mM
(Brenner, 1974)	17 g Agar-Agar	1,7 % (w/v)
	2,5 g Trypton (Pepton)	0,25 % (w/v)
NGM Agar:		finale Konz.
	mit H ₂ O auf 972 ml auffüllen, autoklavieren	
	1 ml Cholesterin in 95 % EtOH (5 mg/ml)	5 µg/ml
	1 ml 1M CaCl ₂ (in H ₂ O, autoklaviert)	1 mM
	1 ml 1M MgSO ₄ (in H ₂ O, autoklaviert)	1 mM
	25 ml 1M Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 (autoklaviert)	25 mM
	vor der Aushärtung in sterile Petrischalen gießen	
2xTY:		finale Konz.
(Guziewicz <i>et al.</i> , 2002)	16 g Trypton (Pepton)	1,7 % (w/v)
	10 g Hefe-Extrakt	1 % (w/v)
	5 g NaCl	0,5 % (w/v)

2xTY:	auf pH 7,0 einstellen mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren
KPO₄-Puffer: (1 M)	1 M K ₂ HPO ₄ in H ₂ O 1 M KH ₂ PO ₄ in H ₂ O auf pH 6,0 titrieren, autoklavieren (~ 1000 ml)
Gefrierlösung:	100 mM NaCl 50 mM KPO ₄ -Puffer 0,3 % (v/v) Glycerin in H ₂ O lösen, autoklavieren 0,3 mM MgSO ₄ (in H ₂ O, autoklaviert) hinzufügen

2.3.2 Kultivierung der Futterbakterien

Als Futterquelle für die Würmer wurden *E. coli* OP50 eingesetzt, ein Standardlaborstamm der vom CGC (*Caenorhabditis Genetic Center*, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) bezogen wurde (Brenner, 1974; Andrew und Nicholas, 1976). Als Stammkultur wurde *E. coli* OP50 in 20 ml 2xTY inokuliert. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C unter Rotation (220 rpm) kultiviert und diente als Ausgangsmaterial für das Beimpfen von NGM-Agar. Die Kultur wurde entweder kurzfristig bei 4 °C gelagert oder der Ansatz wurde mit 15 % (v/v) sterilem Glycerin vermischt und in Aliquots bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Stammpopulation von *C. elegans*

Es wurden ausschließlich *C. elegans* des N2-Stammes verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Wildtyp-Stamm, dessen Ursprung in Bristol (England) liegt. Er wurde von L. N. Staniland aus einem Champignon-Kompost isoliert und anfänglich von W. L. Nicholas kultiviert, schließlich von Sydney Brenner als Modellorganismus etabliert (Nicholas *et al.*, 1959; Brenner, 1974).

C. elegans lässt sich auf NGM-Agar in Petrischalen (9 cm Durchmesser) und *E. coli* OP50 als Futterquelle kultivieren. Dabei wurden 150 µl einer *E. coli* OP50-Übernachtskultur je Petrischale ausplattiert (steril) und 12-20 h bei RT inkubiert. Die Würmer wurden bei 20 °C gehalten und ein- bis zweimal wöchentlich auf neue Petrischalen umgesetzt (Brenner, 1974; Sulston und Brenner, 1974; Stiernagle, 1999). Das Umsetzen erfolgte mit einem sterilen Skalpell (Lewis und Fleming, 1995) oder beim Transferieren einzelner Tiere mit einer sterilen an einer Impföse oder Pipettenspitze geklebten Augenbraue.

Zum Sichern wichtiger Populationen oder Stämme wurden bei -80 °C Glycerin-Stammpopulationen angelegt. Hierfür wurden Würmer einer vollbewachsenen Petrischale mit M9-Puffer abgewaschen und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt, bei RT und 460 x g sedimentiert, der Überstand verworfen und mit frischem M9-Puffer wieder aufgefüllt. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde die überstehende Flüssigkeit vom Wurmse-diment entfernt und *ad* 3 ml mit der Gefrierlösung befüllt, resuspendiert, auf drei Kryogefäße verteilt und schonend (in einer speziellen Styroporbox) auf -80 °C gebracht.

2.4 DNA-Arbeiten

2.4.1 Medien und Lösungen

LB-Medium:	5 g Hefe-Extrakt	
	10 g Trypton (Pepton)	
	10 g NaCl	
	mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren	
LB-Agar:	15 g Agar-Agar zusätzlich zu den LB-Medium-Zutaten	
	mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren	
	vor der Aushärtung in sterile Petrischalen gießen	
M9-Puffer:		finale Konz.
(Brenner, 1974)	6 g Na ₂ HPO ₄	34 mM
	3 g KH ₂ PO ₄	22 mM

M9-Puffer:	5 g NaCl	86 mM
	mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren	
	1ml 1 M MgSO ₄ (autoklaviert)	1 mM
SOC-Medium: (Hanahan, 1983)	2 % (w/v) Trypton	
	0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt	
	10 mM NaCl	
	2,5 mM KCl	
	10 mM MgCl ₂	
	10 mM MgSO ₄	
	in H ₂ O lösen und autoklavieren	
	20 mM sterile Glukose hinzufügen	
Lysemix: (<i>Wormlysis and PCR</i>)	50 mM KCl	
	10 mM Tris pH 8,3	
	2,5 mM MgCl ₂	
	0,45 % (v/v) NP-40 (Nonidet 40)	
	0,45 % (v/v) Tween 20	
	in 500 µl H ₂ O ansetzen bei -20 °C lagern	
kurz vor Gebrauch	6 µl (20 mg/ml) Proteinase K hinzufügen	
		Lösungsmittel
IPTG:	200 µM	H ₂ O
	1 molare Lösung angesetzt, steril filtriert, bei -20 °C gelagert	
		Lösungsmittel
X-Gal:	40 µg/ml	DMF
	20 mg/ml angesetzt, steril filtriert, bei -20 °C gelagert	

2.4.2 Antibiotika

Antibiotikum	finale Konzentration	Lösungsmittel
Carbenicillin	50 µg/ml	70 % (v/v) EtOH
Kanamycin	20 µg/ml	H ₂ O

Die Suspensionen wurden in 1000facher Konzentration angesetzt, steril filtriert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.4.3 Restriktionsendonukleasen

<i>Age I (BshTI)</i>	200 U, 10 U/µl	A' CCGGT
<i>Nco I</i>	500 U, 10 U/µl	C' CATGG
<i>Pst I</i>	3000 U; U/µl	CTGCA' G
<i>Xho I</i>	2000 U; 10 U/µl	C' TGCAG

2.4.4 RNA-Isolierung

Die Würmer zweier vollbewachsener Petrischalen wurden mit 10 ml M9-Puffer abgewaschen und dreimal mit M9-Puffer gespült, wobei die Würmer jeweils für 5 min, 4 °C und 460 x g sedimentiert und der Überstand verworfen wurde. Danach erfolgte der Aufschluss der Cuticula durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff und Wasserbad (RT). Nach der Feuchtgewichtsbestimmung der Wurmmasse wurde mit TRIzol® *Reagent* gemäß den Herstellerangaben verfahren, ausschließlich die Inkubationszeit bei der Präzipitation und Trocknung auf mindestens 15 min verlängert. Die gewonnene RNA wurde in 15 µl H₂O (durch Millipore gefiltert) gelöst und die Konzentration photometrisch in einer mikro UV-Küvette (Plastibrand®, Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Ultrospec 1100 pro-Spektrometer) bei 260 nm bestimmt. Ebenso wurde eine gelelektrophoretische Analyse durchgeführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.4.5 cDNA-Synthese (Erst- und Zweitstrang)

Zunächst wurde durch das Verfahren der reversen Transkription einzelsträngige cDNA von der gewonnenen mRNA synthetisiert (Frohman *et al.*, 1988). Teile des Ansatzes wurden von der Firma Invitrogen (GmbH, Karlsruhe) und Fermentas (GmbH, Karlsruhe) bezogen. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind unter 8.1 aufgelistet.

Reaktionsansatz (1):	1 µl	10 mM (je)	dNTP-Mix
	1 µl	25 µM	3'-RACE-Oligonukleotid
	x µl	3,5 µg total	isolierte RNA
	x µl	s. RNA	RNase freies H ₂ O
	13 µl	Σ	

Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis gehalten und mit folgenden Zugaben ergänzt.

Reaktionsansatz:	13 µl	s. o.	Reaktionsansatz (1)
	4 µl	5 x	<i>First Strand Buffer</i>
	1 µl	100 mM	DTT
	1 µl		RNaseOut™
	1 µl	200 U/µl	SuperScript™- III
	20 µl	Σ	

Der vervollständigte Ansatz wurde 60 min bei 50 °C und abschließend 15 min bei 70 °C inkubiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die einzelsträngige cDNA bei -80 °C gelagert.

Die Synthese des Zweitstrangs wurde mit der sogenannte LA-PCR (*Long and Accurate PCR*) (Barnes, 1994) durchgeführt, bei diesem Vorgang wird die gesamte ss-cDNA amplifiziert. Die Pwo-DNA-Polymerase (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen; 1 U/µl) wurde in der

Taq-DNA-Polymerase von Fermentas (5 U/μl) 1 : 20 verdünnt). Die Pwo-DNA-Polymerase besitzt eine sogenannte „Korrekturlese“-Aktivität.

Reaktionsansatz:	5 μl	10 x	<i>Advantage Buffer</i> (Peqlab)
	4 μl	25 mM	MgCl ₂
	8 μl	10 mM (je)	dNTP-Mix
	1 μl	10 pmol/μl	Oligo-dT7-II-Oligonukl.
Reaktionsansatz:	1 μl	10 pmol/μl	CapFinder-Origin-PCR
	1 μl	n. b.	ss-cDNA
	0,5 μl	1:20	Pwo- in <i>Taq</i> -Polymerase
	33,5 μl		Millipore-H ₂ O
	50 μl	Σ	

Des Weiteren wurde nach folgendem Reaktionsprofil verfahren:

Reaktionsprofil:	1 x	94 °C	1 min
	30 x	94/58/68 °C	20"/20"/2 min 30"
	1 x	68 °C	5 min

Mit einem Aliquot der ds-cDNA wurde die erfolgreiche Synthese überprüft, indem 1 μl der ds-cDNA mit 9 μl H₂O und 2 μl 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert wurde. Nach Reinigung der Probe (2.4.6) wurde die Konzentration bestimmt.

2.4.6 DNA-Isolierung

Genomische DNA aus dem Wildtyp N2 von *C. elegans* wurde mittels des *Wormlysis-and-PCR*-Protokoll gewonnen (http://biologytools.net/protocols/elegans/worm_pcr.php; Zugriff: 06.03.2008). Bei diesem Verfahren werden 5-10 Würmer in einem 200 μl-Reaktionsgefäß mit 5-10 μl Lysemix zunächst bei -80 °C schockgefroren und wieder aufgetaut, um die Cuti-

cula aufzubrechen. Die Lyse erfolgt anschließend bei 60 °C für 1 h. Die im Lyseansatz enthaltene Proteinase K wird bei Erhitzen auf 95 °C für 15 min inaktiviert. Die genomische DNA wurde vor der Weiterverarbeitung nicht gesondert aus diesen Reaktionsansätzen extrahiert.

Die Reinigung der DNA von Begleitprodukten der PCR oder aus den Agarose-Ethidiumbromidgelen wurde mit Kits von verschiedenen Herstellern durchgeführt.

Die Reinigung der ds-cDNA und der Restriktionsansätze erfolgte mit *NucleoSpin® Extraction II-Kit* nach dem *PCR-Purification*-Protokoll.

DNA-Fragmente in Gelstücken wurden mit Hilfe von *E.Z.N.A.®-Gel-Extraction-Kit* (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen), *Spin Columns* ((Ambion) Applied Biosystems, Austin, TX, USA) oder *JETQUICK Gel Extraction Spin-Kit* (Genomed GmbH, Löhne) isoliert. Es wurde nach Angaben der Hersteller vorgegangen.

Plasmid-DNA aus Bakterien konnte mit dem *NucleoSpin® Quick Pure-Kit* und dessen Protokoll extrahiert werden (Macharey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

Doppelsträngige, gereinigte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.7 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Proben wurden in dem NanoDrop-Spektrophotometer gemessen. Als Referenz diente der jeweilige Puffer, in dem die Probe vorlag. Es erfolgte immer eine Zweifachbestimmung, bei der 1,5 µl je Messung eingesetzt wurden.

2.4.8 Agarose-Gelelektrophorese

1 x TAE-Puffer:	200 mM Tris-Acetat
	5 mM EDTA
	auf pH 8,0 einstellen
<hr/>	
6 x DNA-Ladepuffer:	50 % (v/v) Glycerin
	10 mM EDTA
	0,1 % SDS

6 x DNA-Ladepuffer:	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylencyanol

Zur Auftrennung der Moleküle wurde das horizontale Gelkammersystem von Peqlab®-Gelsystem (Modellnr.: 40-0708 bzw. 40-1214) verwendet (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Die Gele setzten sich aus 1,5 % Agarose in 1 x TAE-Puffer zusammen, zu denen nach dem Kochen je nach Gelgröße 3-6 µl Ethidiumbromid (1 %ig, 10 mg/ml) gegeben wurde. Die Gelelektrophorese (je Gel und Größe) erfolgte die ersten 30 min unter einer Spannung von 30-60 V und wurde sodann auf 70-120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, bevor die Lauffront auszulaufen begann. Die Ergebnisse wurden mittels UV-Licht eines Transilluminators (Phase, Lübeck) dokumentiert. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße wurden die Eichmoleküle des *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* mit je 5 µl in einer Spur jeden Gels aufgetragen.

2.4.9 Amplifikation kodierender DNA von ds-cDNA

Es wurden spezifische Oligonukleotide (s. 8.1), die in ihrer Sequenz eine Restriktionsschnittstelle enthielten, eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde statt einer DNA-Matrize Wasser verwendet. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen.

Reaktionsansatz:	5 µl	10 x	PCR-Puffer
	4 µl	25 mM	MgCl ₂
	1 µl	10 mM (je)	dNTP-Mix
	0,3 µl	10 pmol/µl	spez. Oligonukl. <i>forward</i>
	0,3 µl	10 pmol/µl	spez. Oligonukl. <i>reverse</i>
	1 µl	unterschiedl.	gereinigte ds-cDNA
	0,3 µl	1 : 20	Pwo- in <i>Taq</i> -Polymerase
	38,1 µl		H ₂ O
	50 µl	Σ	

Das Amplifizieren der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*) (Saiki *et al.*, 1988; Mullis und Faloona, 1987) und das Reaktionsprofil für *ilys-5* lautete weiter:

Reaktionsprofil:	1 x	94 °C	1 min
	30 x	94/60/68 °C	20"/30"/1 min 30"
	1 x	68 °C	5 min

Die PCR-Produkte wurden daraufhin mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Banden der gewünschten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht ausgeschnitten und gereinigt, die Konzentration mittels des Nanodrops ermittelt und schließlich in einen Klonierungsvektor ligiert.

2.4.10 Amplifikation kodierender DNA mit regulatorischen Bereichen von genomischer DNA

Die Reportergenkonstrukte für die Mikroinjektion wurden entweder kloniert oder mittels einer Fusions-PCR generiert. Dafür wurden zunächst die Promotorregion sowie die Introns bis einschließlich des zweiten Exons bzw. bis zum Ende (exklusive des Stoppcodons) des zu untersuchenden Gens amplifiziert. Prinzipiell wurde, wie unter 2.4.9 beschrieben, vorgegangen und die Oligonukleotide ebenfalls im Anhang aufgelistet (s. 8.1). Als DNA-Matrize diente die zuvor gewonnene genomische DNA. Je nachdem, ob ein PCR-Fusionsprodukt oder ein Fragment für die Klonierung in einen Vektor amplifiziert werden sollte, wurden unterschiedliche Oligonukleotide verwendet. Ferner wurde das Reaktionsprofil den Schmelztemperaturen der spezifischen Oligonukleotide und der benötigten Zeit für die Elongation der gewünschten DNA-Fragmente angepasst. DNA, die in einen GFP-Reportergenvektor kloniert werden sollte, wurde aus dem Agarosegel extrahiert und in den Klonierungsvektor (s. 2.4.12) ligiert. Das Verfahren der Fusions-PCR wird folgend beschrieben.

2.4.11 Fusions-Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Fusions-PCR (Polymerase-Kettenreaktion; *polymerase chain reaction*) werden zwei zuvor amplifizierte DNA-Fragmente während einer weiteren PCR fusioniert. In diesem Fall dient das Verfahren zur Generierung eines Reportergenkonstruktes für die Mikroinjektion und die anschließende Genexpressionslokalisation. Als DNA-Matrizen dienen einerseits das Amplikon eines zu untersuchenden Gens von genomischer DNA, wobei die Promotorregion und Teile des kodierende Bereichs vermehrt wurden, und andererseits der kodierende Bereich des *gfp*-Gens mit der 3'-UTR von dem Reportergenvektor (pPD95-77, *Addgene plasmid* 1426). Das Reportergen wurde dabei wie bereits beschrieben nach dem gängigen Verfahren amplifiziert. Beiden DNA-Fragmenten wurde bei den vorangegangenen PCRs durch spezielle Oligonukleotide ein Fusionsüberhang an die Ursprungssequenz angehängt. Dieser Überhang war genau 24 bp lang und revers komplementär zum jeweiligen Gegenstück am anderen Fusionspartner; die Oligonukleotide wurden dementsprechend synthetisiert. Die Sequenzen des zu untersuchenden Gens werden auf der 5'-Seite des offenen Leserahmens (*open reading frame*, ORF) von *gfp* fusioniert. Bei der eigentlichen Fusions-PCR werden wiederum „*nested*“ Oligonukleotide eingesetzt, die gegenüber den ursprünglich verwendeten weiter innen liegend mit der DNA-Matrize hybridisieren (Abb. 6). Bei der Entwicklung des 3'-gen-spezifischen Oligonukleotids B mit der enthaltenen Überhangsequenz musste darauf geachtet werden, dass der ORF des Reportergens (*gfp*) eingehalten wird. Die Fusions-PCR-Produkte wurden nicht weiter gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

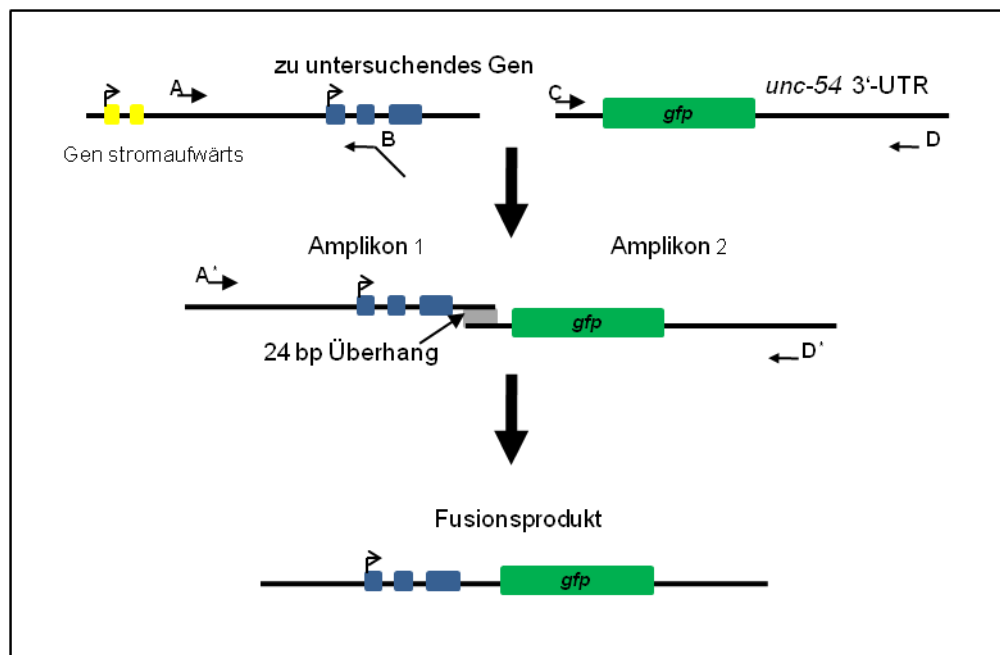


Abb. 6: Generierung eines C-terminalen translationalen PCR-Fusionsprodukts. Oligonukleotid A und B amplifizieren die genomische Region (Amplikon 1). Oligonukleotid C und D amplifizieren das Reportergen (*gfp*) und den 3'-UTR (Amplikon 2). Die nested Oligonukleotide A* und D* werden für die Fusion von Amplikon 1 und 2 verwendet (grauer Kasten: 24 bp-Überhang). Das resultierende Fusionsprodukt kann direkt injiziert werden. (verändert nach (Boulin *et al.*, 2006; <http://www.wormbook.org>; Zugriff: 31.07.2010).

2.4.12 Ligation in einen Klonierungsvektor

Bei allen verwendeten Konstrukten wurde nach dem Protokoll vom *Qiagen PCR cloning kit* vorgegangen und in den *pDrive*-Vektor ligiert (Qiagen, Hilden). Es wurden jeweils die amplifizierten und gereinigten DNA-Fragmente eingesetzt.

2.4.13 Transformation mittels Elektroporation

Zur Generierung elektrokompenter Bakterien wurden diese zunächst über Nacht in LB-Medium angezogen und folgend von dem jeweiligen Stamm ein Schikanekolben mit frischem LB inokuliert und bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,6 unter Rotation bei 37 °C kultiviert (Ultrospec 1100 pro-Spektrometer, $OD_{600} = 0,1$ entspricht $2,5 \times 10^7$ CFU/ml, RT). Bei den Expressionsbakterien (s. u.) wurde darüber hinaus Kanamycin zur Vorkultur gegeben, da diesem Stamm eine Resistenz eigen ist. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gehalten und

bei 2680 x g und 4 °C für 7 min zentrifugiert, das Sediment dann in 500 ml eiskaltem H₂O resuspendiert und erneut bei gleicher Einstellung präzipitiert. Wiederum wurde der Überstand verworfen und die Bakterien diesmal in 250 ml rückgelöst. Nach der dritten Wiederholung wurde das Präzipitat nur noch in 10 ml resuspendiert und für 5 min 1970 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Sedimentvolumen wurde 1 : 1 in sterilem eiskaltem Glycerin (10 % (v/v) in H₂O) gelöst, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Es wurden folgende Bakterienstämme in dieser Arbeit verwendet.

<i>Escherichia coli</i> -Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> DH5 α :	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>gal- phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) <i>pABlacI</i> ^Q :	[<i>pABlacI</i> ^Q], <i>lyc-pc55m</i>	Dr. J. Clos, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg

Wobei der erstgenannte Stamm zur Vermehrung der jeweiligen Plasmide und der letztgenannte zur heterologen Expression verwendet wurden. Die verwendeten Vektoren trugen Resistenzen gegen ein oder mehrere Antibiotika, die auf dem LB-Agar zuvor ausplattiert und dann bei 37 °C vorinkubiert wurden.

Um die erfolgreiche Transformation bei *E. coli* DH5 α zu überprüfen, wurde neben dem Einsatz von Antibiotikum (Carbenicillin) und zusätzlich zu einer PCR die so genannte „Blau-Weiß-Selektion“ durchgeführt. Hierfür wurde auf den nach der Transformation benötigten LB-Agar IPTG, der Induktor des *lac*-Operons (Laktose), und X-Gal, ein chromogenes, unphysiologisches Substrat der β -Galaktosidase, zusätzlich zum Carbenicillin ausplattiert. Verliefe die Klonierung und Transformation erfolgreich, so wurde das gewünschte DNA-Fragment in die kodierende Sequenz der β -Galaktosidase (α -Fragment) inseriert und das Enzym von den Bakterien nicht mehr synthetisiert, weswegen X-Gal nicht mehr zu einem blauen Farbstoff modifiziert werden kann.

Bei der Elektroporation wurden zunächst 0,5 μ l eines Ligationsansatzes oder eines Plasmides zu 50 μ l der gewünschten elektrokompenten Bakteriensuspension gegeben (aus -80 °C,

nicht ganz aufgetaut) und dann in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) überführt. Diese wurde dann trocken im *Easyject Prima*-Elektroporator einem kurzen elektrischen Impuls von 1800 V ausgesetzt, sofort danach mit 1 ml SOC-Medium vermengt, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und eine Stunde bei 37 °C und 450 rpm im *Thermomixer compact* inkubiert. Anschließend wurden 150 µl der jeweiligen Suspensionen auf den vorinkubierten Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Ohne die transformierten Plasmide sollten die Zellen nicht in der Lage sein, auf Carbenicillin zu wachsen. Da aber ungewollte Resistenzen relativ schnell auftreten können, wurde zusätzlich die „Blau-Weiß-Selektion“ bei den *E. coli* DH5α und eine PCR mit spezifischen Oligonukleotiden (s. 2.4.14) bei beiden Bakterienstämmen durchgeführt sowie anschließend mittels der Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.4.14 Überprüfen der erfolgreichen Transformation

Bei dieser so genannten *colony check*-PCR wurden 5-10 Klone von LB-Agar in einem 10 µl-PCR-Ansatz mit entweder für die in die Plasmide inserierten DNA-Fragmente spezifischen oder vektorspezifischen Oligonukleotiden überprüft. Die Vorgehensweise variierte demnach sowohl in der Zusammensetzung der Ansätze als auch im Reaktionsprofil (Schmelztemperatur und Zeiten) je nach DNA-Fragment und deren Größe. Hierfür wurden die Reaktionsansätze auf Eis vorgelegt. Anschließend wurde mit einer sterilen 2 µl-Pipetenspitze eine einzelne Kolonie je Ansatz auf frischem LB-Agar angeimpft und die Spitze dann in die 10 µl überführt, für 1-2 min auf Eis inkubiert und danach die Spitzen verworfen. Exemplarisch ist hier das Vorgehen dargestellt.

Reaktionsansatz:	40 µl	10 x	PCR-Puffer
(für 40 Kolonien)	32 µl	25 mM	MgCl ₂
	4 µl	10 mM (je)	dNTP-Mix
	4 µl	10 pmol/µl	spez. Oligonukl. <i>forward</i>
	4 µl	10 pmol/µl	spez. Oligonukl. <i>reverse</i>

Reaktionsansatz:	2 μ l	5 U/ μ l	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
	314 μ l		H ₂ O
	400 μ l	Σ	

Der Ansatz wurde auf 200 μ l-Reaktionsgefäße á 10 μ l verteilt und nach Inkubation mit den Bakterienkolonien kurz scharf zentrifugiert, bevor das Reaktionsprofil gestartet wurde. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne Hinzufügen einer Kolonie, als Positivkontrolle der leere Vektor als Matrize und vektorspezifische Oligonukleotide im Reaktionsansatz.

Reaktionsprofil:	1 x	94 °C	5 min
	17 x	94/60/72 °C	40''/30''/1 min 30''
	15 x	94/60/72 °C	40''/30''/1 min 30'' (+2''/Zyklus)
	1 x	72 °C	5 min

Bei den größeren DNA-Fragmenten für die GFP-Reportergerätenkonstrukte wurde ein Pwo- in *Taq*-Polymerase-Gemisch (1 : 20) genommen und die Elongation bei 68 °C und verlängerter Zykluszeit durchgeführt.

Die auf neuen LB-Agar überführten Kolonien wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden mit je 2 μ l 6 x DNA-Ladepuffer versetzt und gelelektrophoretisch analysiert. Bei erfolgreicher Transformation sollten DNA-Fragmente spezifischer Größe amplifiziert worden bzw. beim Einsatz von vektorspezifischen Oligonukleotiden die Fragmente um die spezifische Länge der inserierten Fragmente vergrößert sein. Positive Kolonien wurden daraufhin für die weitere Vorgehensweise in LB (mit Carbenicillin/Carbenicillin und Kanamycin) über Nacht unter Rotation bei 37 °C vermehrt und die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert (s. 2.4.6).

2.4.15 Klonierung in den Expressionsvektor

Nachdem die Richtigkeit der DNA-Fragmente im Klonierungsvektor durch eine Sequenzierung verifiziert worden war (s. 2.4.19), wurden diese zunächst aus dem *pDrive*-Vektor herausgeschnitten. Hierbei wurden die beiden Restriktionsendonukleasen genommen, deren Schnittstelle bereits in der Oligonukleotidsequenz integriert worden war. Es handelte sich hierbei um *Nco* I und *Xho* I. Zwischen den Inkubationsschritten mit je einem Enzym wurden die Ansätze von Salzen, Enzym und unerwünschten Spaltungsprodukten gereinigt (s. 2.4.6).

Reaktionsansatz:	2 µl	10 x	Tango-/R ⁺ -Puffer
(DNA-Fragmente)	2 µl	(10 U/µl)	<i>Nco</i> I/ <i>Xho</i> I
	x µl	~ 2 µg	Plasmid-DNA
	x µl		H ₂ O
	20 µl	Σ	

Die Ansätze wurden gemischt und für 2-4 h bei 37 °C gehalten. Nach der Prozessierung mit dem zweiten Enzym wurde der Gesamtansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Banden der spezifischen Fragmentlänge unter UV-Licht ausgeschnitten sowie die DNA daraus isoliert (s. 2.4.6).

Die Linearisierung und Restriktion des pET32a-Vektors erfolgte mit der Inkubation beider Enzyme in einem Ansatz.

Reaktionsansatz:	4 µl	10 x	Tango-Puffer
(Vektor)	2 µl	(10 U/µl)	<i>Nco</i> I
	2 µl	(10 U/µl)	<i>Xho</i> I
	x µl	~ 3 µg	pET32a-Vektor
	x µl		H ₂ O
	20 µl	Σ	

Es wurde genauso wie bei den DNA-Fragmenten verfahren, die Inkubationszeit in einigen Fällen auf 6-8 h verlängert.

Die Ligation schloss sich direkt an die Restriktionsversuche an, deren Ansätze sich wie folgt zusammensetzten.

Reaktionsansatz:	2 μ l	10 x	T4-DNA-Ligase-Puffer
(Ligation)	1 μ l	(5 U/ μ l)	T4-DNA-Ligase
	x μ l	~0,2 pmol	DNA-Fragment
	x μ l	~0,02 pmol	pET32a-Vektor
	x μ l		H ₂ O
	20 μ l	Σ	

Die Ligation wurde bei 4 °C mindestens über Nacht oder über mehrere Tage durchgeführt. Die Inaktivierung der Ligase erfolgte bei 70 °C für 10 min. Transformation, Überprüfung, Vermehrung und Isolierung erfolgten wie bereits oben beschrieben. Anschließend wurden die Konstrukte sequenziert (s. 2.4.19).

2.4.16 Klonierung in den GFP-Reportergenvektor

Es wurde wie unter 2.4.15 beschrieben vorgegangen. Auch die Inkubation mit den Endonukleasen verlief nach dem gleichen Protokoll, außer dass die Enzyme *Pst* I und *Age* I und der Vektor pPD95-77 (*Addgene plasmid* 1495) eingesetzt wurden. Die Selektion der *E. coli* DH5 α , in denen die Konstrukte vermehrt wurden, erfolgte durch Carbenicillin. Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde bereits oben beschrieben.

2.4.17 Grün-fluoreszierendes-Protein (GFP)-Reportergenkonstrukte

Für die Lokalisationsstudien wurden GFP-Reportergenkonstrukte kloniert bzw. Fusionsprodukte generiert. Die final eingesetzten DNA-Fragmente enthielten jeweils die DNA-Sequenz des so genannten GFP (*green fluorescent protein*; Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994). Mit Hilfe dieser DNA-Konstrukte wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, um die

Genexpression und Proteinsynthese der einzelnen i-Typ-Lysozyme räumlich in den Würmern zu lokalisieren (Kramer *et al.*, 1990; Mello *et al.*, 1991).

Es folgt eine Übersicht, da für die Mikroinjektion unterschiedliche Reaktionsansätze für die jeweiligen Expressionsanalysen der *ilys*-Gene verwendet wurden.

Behandeltes Gen:	Art des Konstrukts:
<i>ilys-1</i> (C45G7.1)	Fusions-PCR-Produkt
<i>ilys-2</i> (C45G7.2)	Plasmid
<i>ilys-3</i> (C45G7.3)	Fusions-PCR-Produkt
<i>ilys-4</i> (C55F2.2)	Plasmid
<i>ilys-5</i> (F22A3.6a)	Fusions-PCR-Produkt

Die Reportergenkonstrukte wurden direkt vor der Mikroinjektion in einem Gesamtvolumen von 50 µl in einem 200 µl-Reaktionsgefäß mit dem Koinjektionsmarker vermengt. Das Plasmid pRF4 trug das Markergen *rol-6* (*su1006*) sowie eine Ampicillin-Resistenz und wurde von Prof. Dr. Thomas Röder zur Verfügung gestellt. Damit injizierte transgene Würmer zeigen einen dominanten *Roller*-Phänotyp. Der Vektor wurde in üblicher Weise (s. o.) in Bakterien transformiert, somit vermehrt und anschließend gereinigt sowie dessen Konzentration bestimmt. Die Injektionsansätze enthielten 40 ng/µl des Reportergenkonstrukts (Fusions-PCR-Produkt oder Plasmid) und 60 ng/µl pRF4. Da die Proben in AE-Puffer (Reinigung nach Herstellerangaben) oder im Gesamt-PCR-Ansatz vorlagen, wurden sie *ad* 50 µl mit H₂O aufgefüllt. Die Ansätze konnten mehrfach verwendet und zwischenzeitlich bei -20 °C gelagert werden. Direkt vor dem Gebrauch wurde die Injektionsansätze jeweils für 15 min bei 4 °C und 20.817 x *g* zentrifugiert.

2.4.18 Sicherstellen der Konstrukte

Nach hinreichender Analyse der DNA-Konstrukte wurden Plasmide in Bakterien transformiert, kultiviert und als Kultur-Glycerin-Stamm bei -80 °C gelagert. Die Plasmide wurden

darüber hinaus auf *Whatman*-Papier (Schleicher & Schuell, Dassel) gegeben und bei -20 °C eingelagert.

2.4.19 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde bis zu einer Länge von 400 bp durch die Firma SeqLab (*Sequence Laboratories* Göttingen GmbH, Göttingen) durchgeführt. Alle weiteren Proben wurden von *Eurofins* MWG Operon (Ebersberg) sequenziert.

2.5 *Mikroinjektion der Reportergenkonstrukte in C. elegans*

2.5.1 Medien und Lösungen

Palmitinsäure:	30 mg/ml in EtOH
Präparierte Objektträger:	Standard-Glasobjektträger
jeweils 1-2 Tropfen	gekochte 2 % (w/v) Agarose in H ₂ O auf einen Objekttr. ca. 15 min bei 75 °C inkubieren
Rettungs-Puffer:	4 % (w/v) Glucose in M9-Puffer steril filtriert und aliquotiert

2.5.2 Praktische Vorgehensweise

Die gewebsspezifische Lokalisation der Genexpression und der Proteinsynthese wurde mit dem Wildtyp-Stamm N2 von *C. elegans* durchgeführt (Mello *et al.*, 1991). Hierfür wurden die Tiere bei normaler Haltung bei 17 °C herangezogen und am Abend vor der Mikroinjektion L4-Larven aus der Population auf neue NGM-Platten mit Futterbakterien überführt. 30 min vor Versuchsbeginn wurden die Tiere einzeln auf reine NGM-Platten ohne Futterquelle überführt. Damit die Würmer nicht von dem Agar flüchten konnten, wurde an den Rand des Agars Palmitinsäure geträufelt, welche *C. elegans* meidet. Auf diese Dekontaminationsplatten wurden je 30 Tiere transferiert und zu 17 °C gestellt. Die eigentliche Versuchsdurchführung erfolgte in einem klimatisierten Raum bei 20 °C. Die Injektionsan-

sätze mit den Reportergenkonstrukten wurden nach der Zentrifugation auf Eis gehalten und davon ca. 5 µl in eine Injektionsnadel überführt (sterile Femtotip® I-Mikroinjektions-Kapillaren und die Halterung dafür, Eppendorf AG, Hamburg) und in der Mikromanipulator-Apparatur, welche mit einem Joystick bedient wurde (Phyton-Elektronik GmbH, Gröbenzell), befestigt. Die Pressluftzufuhr betrug 2-3 bar je nach Durchlässigkeit der Injektionsnadel. Die Mikroinjektion an dem inversen Mikroskop DM IL (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar; Vergrößerung 40fach) mit der Mikroinjektions-Einrichtung wurde von Dr. Kerstin Isermann, Zoologisches Institut an der Christian-Albrechts-Universität, durchgeführt. Dafür wurden ihr zuvor 1-2 Würmer von einer Dekontaminationsplatte auf einem präparierten Objektträgern fixiert und mit Öl überschichtet (Voltalef® 10 S Öl, Arkema Inc., Philadelphia, PA, USA) sowie zur besseren Handhabung die Objektträger auf einer CD befestigt. Nach der erfolgreichen Injektion ins Syncytium der paarigen Gonaden von *C. elegans* wurde ein Tropfen Rettungs-Puffer auf die Würmer gegeben, damit diese sich von der Agaroseschicht lösen, und zur Rehydrierung einige Minuten in einer feuchten Kammer bei 25 °C inkubiert. Schließlich wurden die Würmer von dem Objektträger an den Rand von frischen NGM-Platten mit Futterbakterien transferiert, ohne dass sie in Ölrückständen oder Futterbakterien zum Liegen kamen. Nach 3-4 h bei 25 °C wurden die Würmer bei 20 °C oder die ersten zwei Tage bei 17 °C kultiviert. Die F1-Generation wurde daraufhin auf den dominanten Roller-Phänotyp selektiert und positive Transgene auf neue NGM-Platten überführt.

Transgene Tiere, die positiv auf die Koinjektion mit pRF4 identifiziert wurden, wurden dann unter einem Fluoreszenz-Stereomikroskop auf GFP-Signale hin untersucht. Des Weiteren wurden die transgenen Tiere nach Möglichkeit vermehrt und stetig selektiert, die Gewebslokalisation mittels mikroskopischer Methoden analysiert und Glycerin-Stammpopulationen sowie eine auf NGM-Platten gehälterte Stammpopulation angelegt.

2.6 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Die Analyse und Dokumentation der Expression der Reportergenkonstrukte und die Gewebslokalisation der generierten ILYS-GFP-Fusionsproteine erfolgte fluoreszenzmikroskopisch (verwendete Geräte s. 2.2). Die Würmer wurden dafür zuvor auf Dekontaminationsplatten

1 h inkubiert und anschließend in ~20 µl 10 mM NaN₃ in M9-Puffer getötet und in gleichem, frischen Volumen auf präparierten Objektträgern fixiert, eingedeckelt und mit gängigem farblosen Nagellack abgedichtet (s. a.2.5.1). Nach ungefähr 10 min endeten letzte Bewegungen in den Körpern der Würmer und die Fluoreszenzsignale wurden bei unterschiedlichen Vergrößerungen registriert und mit *Axiovision Res 4.5* dokumentiert.

Zur Identifizierung einiger GFP-positiver Neuronen wurden die Amphid- und Phasmidneuronen der Tiere im Vorwege mit dem Farbstoff DiI gefärbt. Hierfür wurden 0,8 µl einer 2 mg/ml DiI in DMF-Stammlösung in 200 µl einer *E. coli* OP50-Kultur gegeben (final 4 µg/ml) und für mindestens 4 h bei 4 °C gehalten. Die Bakterien wurden daraufhin auf NGM-Platten ausplattiert. Die *C. elegans*-Würmer, deren Neuronen näher identifiziert werden sollten, wurden über Nacht auf diesen Platten bei 20 °C kultiviert, um sie danach wie oben beschrieben unterm Mikroskop zu analysieren.

2.7 *Rekombinante Proteinsynthese und Präparation von ILYS-5*

2.7.1 Medien und Lösungen

Rezepte für bereits anderweitig gebrauchte Medien oder Lösungen werden hier nicht erneut aufgeführt (s. 2.4.1).

Waschpuffer:	20 mM Tris
1 xTBS	150 mM NaCl pH-Wert auf 7,5 einstellen, mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren
Eis-Ethanol-Bad	50 % (v/v) EtOH in Wassereis (1 : 2)
Solubilisierungspuffer:	8 M Urea 1 xTBS pH-Wert auf 8,0 einstellen, mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen

IMAC-Puffer:	
Äquilibrierungspuffer:	entspricht Solubilisierungspuffer
Elutionspuffer:	8 M Urea 1 xTBS 500 mM Imidazol pH-Wert auf 8,0 einstellen, mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen

Imidazol-Stammlösung:	5 M Imidazol in H ₂ O
------------------------------	----------------------------------

Dialysepuffer:	für IMAC-Eluate
Rückfaltung:	4 M Urea
I	1 xTBS, pH 8,0, 2000 ml
II	2 M Urea 1 xTBS, pH 8,0, 2000 ml
III	1 M Urea 4 mM DTT 1 xTBS, pH 8,0, 1500 ml
IV	50 mM Tris 0,1 mM Glutathion oxidiert 1 mM Glutathion reduziert pH-Wert auf 8,0 einstellen, <i>ad</i> 4500 ml mit H ₂ O
V	50 mM Tris auf pH 8,0 einstellen, <i>ad</i> 8000 ml mit H ₂ O
Umpuffern f. Chromatographie:	20 mM Tris
A	auf pH 6,0 einstellen, <i>ad</i> 2000 ml mit H ₂ O
B	20 mM NaCH ₃ CO ₂ , pH 4,5 aus Stammlösung, <i>ad</i> 3000 ml mit H ₂ O

NaAc-Stammlösung	1 M NaCH ₃ CO ₂
(NaCH₃CO₂)	auf pH 4,5 einstellen, mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen

2.7.2 Rekombinante Proteinsynthese

Die Expressionsbakterien *E. coli* BL21 (DE3) *pABlacI^Q* mit den entsprechenden Konstrukt wurden in LB mit Carbenicillin und Kanamycin über Nacht und Rotation bei 37 °C angezogen (s. auch 2.4.13). Am nächsten Morgen wurde die Bakterienkultur jeweils 1 : 125 in frischem LB-Medium mit Carbenicillin verdünnt, wobei das Medium auf 35 °C vorgewärmt wurde. Eine Expressionskultur umfasste in der Regel ein Volumen von 500-1000 ml und wurde in normale 500 ml- oder 1 l-Kulturkolben, die immer das doppelte Volumen der Kultur fassen konnten, überführt. Die Inkubation erfolgte in einem rotierenden Inkubationsschüttler bei 37 °C. Beim Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien ($OD_{600} = 0,4-0,6$) wurde die heterologe Expression durch IPTG induziert (0,4 mM final). Als Kontrolle dienten die gleichen Bakterien, die den leeren Expressionsvektor trugen (je 10 ml Kulturvolumen) und bei der Negativkontrolle nicht mit IPTG induziert wurden.

16 h nach Induktion und weiterer Kultivierung unter Rotation bei 37 °C wurden die Kulturen geerntet. Hierfür wurde das Kulturvolumen bei 4500 x g und 4 °C für 15 min präzipitiert. Der Kulturüberstand wurde verworfen und die Zellsedimente entweder direkt weiter verarbeitet oder bis dahin bei -80 °C gelagert. Außerdem wurde das Feuchtgewicht der Präzipitate bestimmt.

2.7.3 Extraktion der Einschlusskörperchen

Zuvor durchgeführte Versuche ergaben, dass die synthetisierten Proteine von den Bakterien in so genannten *inclusion bodies* oder Einschlusskörperchen eingelagert wurden. Daher erfolgte die eigentliche Extraktion unter denaturierenden Bedingungen, der aber mehrere Waschschriffe vorgeschaltet wurden. 500 ml Expressionskultur bzw. die Zellsedimente der Kultur wurden bei der Ernte in der Regel auf vier 50 ml-Reaktionsgefäße verteilt und bis nach der Ultrazentrifugation (s. u.) auch getrennt behandelt. Während des Verfahrens wurden 8 ml Lösungsmittel pro Gramm Feuchtgewicht eingesetzt. Zur Vorreinigung wurden die Bakterienzellen im Waschpuffer resuspendiert und dabei mehrfach gründlich durchmischt und geschüttelt (Vortexer). Darauffolgend wurden die Ansätze unter Kühlung im Eis-Ethanol-Bad mit der Sonotrode MS73 beschallt. Die Sonifikation erfolgte jeweils 0,7 s mit

Zwischenintervallen von 0,3 s über die Dauer von insgesamt 50 Sekunden bei 10 %iger Leistung. Zwischen insgesamt acht Wiederholungen dieser Prozedur wurden 20-sekündige Kühlungsphasen eingelegt.

Die Extraktionsansätze wurden danach bei 4 °C für 20 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Die Analyse des Überstandes ergab, dass darin keine Spuren des zu isolierenden Proteins enthalten waren, woraufhin der Überstand verworfen wurde. Das Lösen und Extrahieren löslicher Proteine mit dem Waschpuffer wurde zweimal wiederholt. Dabei wurden die Proben möglichst auf Eis gehalten. Die nach dem Waschen zurück gebliebenen unlöslichen Proteine, Membranrückstände, Fette und Einschlusskörperchen wurden im Solubilisierungspuffer extrahiert. Dabei wurde genauso wie bei den vorangegangenen Waschschritten verfahren, allerdings wurde bei RT agiert, um den Ausfall des Harnstoffs zu vermeiden. Da sich das gesuchte Protein im Überstand befand, wurde dieser gesammelt. Auch hier erfolgte mindestens eine Wiederholung, so dass die vollständige Extraktion des rekombinanten Fusionsproteins erreicht werden konnte. Die Sedimente wurden nach der Zentrifugation verworfen. Die Extrakte lagerten kurzzeitig bei RT oder längerfristig bei -20 °C.

2.7.4 Affinitätschromatographie

Die Konzentrierung und weitere Reinigung des Fusionsproteins erfolgte mit dem IMAC-Verfahren (Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie). Das Säulenmaterial bildete Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden), welches in eine Polypropylen-Säule mit Fritte gefüllt wurde. Je Säule wurden 4 ml Säulenmatrix genommen. Nach vier IMAC-Läufen wurde das Säulenmaterial nach Herstellerangaben regeneriert; zwischen den Läufen in 20 % (v/v) EtOH in H₂O bei 4 °C gelagert. Sofern ein anderes rekombinantes Protein als rILYS-5 bearbeitet wurde, wurden gesonderte Säulen benutzt, um Verunreinigungen auszuschließen.

Die synthetisierten Proteine enthielten durch die Verwendung des pET32a-Vektors drei verschiedene Fusionspartner: Thioredoxin, S-Protein und einen 6 x Histidinrest-Schwanz. Bei der IMAC bindet der Histidinrest-Fusionspartner an die Nickelionen in der Säulenmatrix, wodurch das Fusionsprotein konzentriert und gereinigt werden kann. Die Elution erfolgte mit Imidazol, welches als Bestandteil der Seitenkette von Histidin die His₆-Schwänze verdrängt. Das Arbeiten unter denaturierenden Bedingungen (8 M Urea) hatte die Vorteile, dass auch

Proteasen linearisiert vorlagen und die Histidin-Schwänze aufgrund fehlender Faltung der Proteine für die Ni²⁺-Ionen besser zugänglich waren. Vorversuche mit einem Imidazolgradienten im Äquilibriumspuffer ergaben das optimale Protokoll zur Reinigung des Fusionsproteins.

Das Säulenmaterial wurde dafür mit vier Säulenvolumen (*column volumes*, CV) Äquilibriumspuffer in die richtigen Pufferbedingungen überführt. Dann wurde der das Fusionsprotein enthaltende Extrakt in 3-4 ml Schritten geladen, 4 ml Puffer nachgegeben, jeweils dreimal mit 1 CV (5 ml) gewaschen (Äquilibriumspuffer) und mit 5-6 ml Elutionspuffer das teilgereinigte Fusionsprotein von der Säule gespült. Der Elutionsschritt wurde einmal wiederholt. Bevor erneut Extrakt auf die Säule geladen wurde, erfolgte eine Reäquilibriumierung mit 2-3 CV Puffer. Um das Verfahren zu beschleunigen, wurden drei IMAC-Chromatographiesäulen parallel eingesetzt und deren Eluate vereinigt. Die getrennt gehaltenen Elutionsschritte aber auch zunächst getrennt behandelt.

2.7.5 Rückfaltung des rekombinanten Fusionsproteins

Zur Überführung in den aktiven Zustand und zur korrekten Rückfaltung sowie zum Umpuffern nach der Prozessierung der Proteine wurde das Dialyseverfahren angewendet. Je nach vorliegendem Volumen wurden unterschiedlich breite Membranschläuche gebraucht. Zur Rehydratisierung wurden die Schläuche vor Gebrauch 30 min in H₂O inkubiert. Die Puffer wurden frisch angesetzt und gegebenenfalls vorgekühlt. Das Ausschlussmolekulargewicht der Membranschläuche (MWCO) betrug bei der Dialyse der Fusionsproteine 12.000-14.000 Da. Ferner umfassten die IMAC-Eluate 100-200 ml und wurden wie folgt unter Rühren dialysiert:

Dialysepuffer (IMAC-Eluate)	Temperatur	Volumen	Inkubationszeit
I	RT	2000 ml	16 h
II	4 °C	2000 ml	1,5 h
III	4 °C	1500 ml	1 h
IV	4 °C	4500 ml	2 h

Dialysepuffer (IMAC-Eluate)	Temperatur	Volumen	Inkubationszeit
V	4 °C	5000 ml	2 h
V	4 °C	3000 ml	1,5 h

Anschließend wurde die Gesamtproteinmenge der Dialysate ermittelt (s 2.8.1). Bis zur weiteren Verarbeitung lagerten die Proben bei -20 °C.

Ein weiteres Mal wurden die Proben nach der Prozessierung dialysiert, um sie in optimale Salz- und pH-Bedingungen für die Kationenaustauschchromatographie zu überführen. Da das gesuchte Protein bereits in maturer Form vorlag, wurde eine geringere Ausschlussgröße von 3.500 MWCO bei den Dialysemembranen verwendet. Ansonsten wurde wie oben beschrieben vorgegangen, die Pufferwechsel sind folgend aufgeführt:

Dialysepuffer (f. Chromatogr.)	Temperatur	Volumen	Inkubationszeit
A	4 °C	2000 ml	1,5 h
B	4 °C	1500 ml	16 h
B	4 °C	1500 ml	5 h

Bei diesem Protokoll kam es zu Ausfällen, die auch bei Änderung des Protokolls nicht verhindert werden konnten. Aufgrund dessen erfolgte nach dieser Dialyse ein Ultrazentrifugationsschritt für 30 min bei 20.000 x g und 4 °C. Die Überstände wurden für die Isolierung von rILYS-5 weiter verwendet.

2.7.6 Prozessierung des Fusionsproteins

Zum Abspalten des Fusionspartners vom Lysozym wurden die Proben mit der Endoprotease EKMax™ Enterokinase (1 U/μl) inkubiert. Trotz zahlreicher Testreihen konnte keine vollständige Spaltung der Fusionsproteine und deren Fusionspartner erreicht werden. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, sofern die Ansätze mindestens über Nacht, unter Schütteln und bei 37 °C sowie in kleineren Volumina bis zu 10 ml inkubierten. Dennoch bildete sich häufig ein Präzipitat, welches durch Zentrifugation von dem weiter verwendeten Überstand getrennt

wurde (10 min, 4 °C, 3.000 x g). Die eingesetzte Enzymmenge war variabel, sie lag zwischen 1-2 U/ml Proteingemisch, wobei die Proteinkonzentration immer weniger als 1,5 mg/ml betrug.

Nach der proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins wurden die Reaktionsansätze direkt dialysiert, mögliche entstandene Präzipitate sedimentiert (s. 2.7.5) und jeweils Aliquots von 20 µl mittels Gelelektrophorese und Färbung des Gels analysiert.

2.7.7 Isolierung von ILYS-5

Die Reinigung des rILYS-5 erfolgte mittels einer Kationenaustauschchromatographie mit Hilfe des Chromatographie-Systems *Äkta Purifier*. Vor Gebrauch wurden sämtliche Puffer zuvor filtriert und entgast.

Es wurde eine Resource™ S *prepacked column*-Säule (1 ml CV) der Firma *GE Healthcare Europe* GmbH (Freiburg bzw. München) verwendet.

Laufpuffer	20 mM NaCH ₃ CO ₂ in H ₂ O, pH 4,5 bzw. pH 5,0
Elutionspuffer	10 mM NaCH ₃ CO ₂ , 0,5 M NaCl in H ₂ O, pH 4,5 bzw. pH 5,0

Die prozessierte Proteinlösung mit dem maturen rILYS-5 wurde entweder direkt nach der Dialyse oder nach kurzzeitiger Lagerung bei -20 °C chromatographiert. Vor dem Beladen der Säule wurde das zu ladende Startmaterial mit einem 0,2 µm-Spritzenaufsatzfilter filtriert. Die Fließgeschwindigkeit während der Chromatographie betrug 1,5 ml/min. Die Säule wurde zuvor mit Laufpuffer äquilibriert. Bei dem eigentlichen Lauf mit dem *Äkta Purifier*-System wurde die Probe manuell mit einer 1 ml- oder 5 ml-Probenschleife auf die Säule geladen, zunächst mit 3 CV gewaschen und dann ein Gradient von 0-100 % Elutionspuffer gefahren. Die Elution der gebundenen Proteine durch den Gradienten umfasste 10 CV. Die Extinktion wurde sowohl bei 214 nm als auch bei 280 nm als mAU (*milli absorbance units*) dokumentiert. Die Fraktionen wurden kontinuierlich durch den Fraktionssammler Frac-950 aufgefangen, ebenso wie der Durchfluss. Der Lauf erfolgte bei 4 °C. Bei größeren Volumina des

Startmaterials wurden mehrere Läufe direkt hintereinander geschaltet und die resultierenden Fraktionen vereinigt.

Für eine Rechromatographie wurden die wiedervereinigten, aktiven Fraktionen (Volumen 4,5-5,5 ml) auf 80-100 ml mit dem Laufpuffer aufgefüllt und erneut auf die gleiche Säule geladen und wie zuvor chromatographiert. Durch die Verdünnung des Startmaterials wurde die NaCl-Konzentration wieder auf ein Minimum gesenkt, um eine vorzeitige Elution oder ein Nichtbinden der Proteine auszuschließen.

Die Reinheit der Probe wurde durch eine SDS-PAGE-Analyse eines 20 µl Aliquots jeder Fraktion eruiert. Gegebenenfalls mussten die Proteine lyophilisiert und in H₂O resuspendiert werden, sofern eine Detektion ohne Konzentrierung der Fraktionen nicht möglich war. Des Weiteren wurden die aktiven Fraktionen nach jeder Chromatographie mittels des Lysehofplattentests ermittelt. Die Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert oder lyophilisiert (s. 2.13).

Die final gereinigten Proteinfractionen wurden durch eine massenspektrometrische Analyse verifiziert (s. 2.8.8 und 2.8.9).

2.8 Proteinanalyse

2.8.1 Medien und Lösungen

Gelpuffer pH 8,45 (3 x):	3 M Tris 0,3 % (w/v) SDS mit 6 M HCl auf pH 8,45 einstellen
Ammoniumpersulfatlösung (APS) 40 % (w/v)	200 mg in 500 µl H ₂ O
Probenpuffer (2 x): <i>(2x-Tris-Glycine-SDS-Sample buffer)</i>	1,25 ml 1 M Tris pH 6,8 2,3 ml Glycerin (86 %) 4 ml 10 %iges (w/v) SDS 50 µl 10 %iges (w/v) Bromphenol-Blau (Natriumsalz, <i>for Elektrophorese</i>) mit H ₂ O auf 10 ml auffüllen

Probenpuffer: (final eingesetzt je Spur)	62,5 mM Tris pH 6,8 10 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 0,025 % Bromphenol-Blau
Polyacrylamidgele:	21,66 ml 30 %ige Acrylamid-Lösung (Verhältnis 37,5 : 1)
Trenngel (13 %):	10 ml Glycerin (86%) 15 ml 3 x Gelpuffer 3,32 ml H ₂ O 25 µl TEMED 60 µl 40 % (w/v) APS
Sammelgel (5 %):	1 ml 30 %ige Acrylamid 2K-Lösung (Verhältnis 32 : 1) 1,7 ml 3 x Gelpuffer 3,3 ml H ₂ O 3,5 µl TEMED 10 µl 40 % (w/v) APS
Kathodenpuffer pH 8,4 (10x):	121 g Tris 179 g Tricin 10 g SDS pH überprüfen, mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen
Anodenpuffer pH 8,9 (10x):	242 g Tris mit HCl auf pH 8,9 einstellen mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen
Kathodenpuffer pH 8,4 (1x):	0,1 M Tris 0,1 M Tricin
Kathodenpuffer pH 8,4 (1x):	0,1 % (w/v) SDS
Anodenpuffer pH 8,9 (1x):	0,2 M Tris

Silberfärbung:	nach Heukeshoven und Dernick, 1988
Lösung 1:	30 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) HAc
Lösung 2:	30 % (v/v) EtOH, 6,8 % (w/v) NaCH ₃ CO ₂ 3xH ₂ O, 0,2 % (w/v) NaS ₂ O ₃ x5H ₂ O, 0,125 % (v/v) Glutardialdehyd
Lösung 3:	H ₂ O
Lösung 4:	0,25 % (w/v) AgNO ₃ , 0,015 % (v/v) Formaldehyd
Lösung 5:	2,5 % (w/v) Na ₂ CO ₃ , 0,074 % (v/v) Formaldehyd
Lösung 6:	1,5 % (w/v) EDTA

Kolloidale CBB-Färbung	nach Kang <i>et al.</i>, 2002
CBB Stammlösung:	5 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G-250 in H ₂ O
Färbelösung (500 ml):	5 % (w/v) AMS 10 % (v/v) EtOH 2 ml CBB Stammlösung (final 0,02 % (w/v)) 2 % (v/v) ortho-Phosphorsäure (min. 85 %)

2.8.2 Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mithilfe der Biuret-Reaktion bestimmt (Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988). Dabei wurde das *Micro BCATM Protein Assay Kit* (Pierce, Verteiler: Bender & Hobein, u. a. München) verwendet. Als Proteinstandard diente BSA. Die Proben wurden nach dem Mikrotiterplatten-Verfahren des Herstellers in einer Mikrotiterplatte (*96-well, flat bottom*, Sarstedt) für 2 h bei 37 °C inkubiert und auf RT gebracht. Die Extinktion wurde bei 570 nm gemessen (Titertek Mutliskan® MCC/340).

Die Konzentrationsbestimmung bei final gereinigten Proteinen erfolgte auch photometrisch bei 280 nm in zwei unterschiedlichen Photometern (NanoDrop, Ultrospec 1100pro).

2.8.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Trennung von Proteinen im niedermolekularen Bereich wurde das Tricin-Gelsystem benutzt (Schägger und von Jagow, 1987). Die Gele setzten sich aus einem 13 %igen Trenngel und einem 5 %igen Sammelgel zusammen und waren 0,8 mm dick. Sie wurden nach dem Gießen mindestens über Nacht gelagert (4°C), um eine vollständige Polymerisation zu gewährleisten. Die aufzutragenden Proben wurden mit dem gleichen Volumen des zweifach konzentrierten Probenpuffers verdünnt und für 10 min bei 70 °C gehalten. Ferner wurde das Peqlab®-Gelsystem (Modellnr.: 45-10-10-i) verwendet (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen).

Die SDS-PAGE (je Gel) lief die ersten 30 min bei einer Stromstärke von 25 mA und wurde folgend auf 45 mA hochgestellt. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Lauffront aus-zulaufen begann.

2.8.4 Proteinstandard

Die Eichproteine zur Bestimmung der molekularen Masse in der SDS-PAGE (*BenchMark™ Protein Ladder*) wurden von der Firma Invitrogen (GmbH, Karlsruhe) bezogen. Dabei wurden 5 µl je Spur aufgetragen.

2.8.5 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Es wurde wie bei Heukeshoven und Dernick beschrieben vorgegangen (Heukeshoven und Dernick, 1988). Die Gele wurden 10 min in Lösung 1 fixiert und danach 10 min in Lösung 2 inkubiert. Anschließend wurden sie viermal für je 10 min mit Lösung 3 gewaschen. Zum Färben schwenkten die Gele 15-20 min in Lösung 4. Die Entwicklung erfolgte in Lösung 5, welche nach Erreichen des gewünschten Färbungsgrads mit Lösung 6 gestoppt wurde. Die Gele wurden bei sämtlichen Schritten in Petrischalen auf einem Taumeltisch und bei RT inkubiert. Die Lagerung erfolgte ebenfalls in Lösung 6 und Petrischalen bei RT. Zur Dokumentation wurden die Gele mittels eines Scanners digitalisiert.

2.8.6 Kolloidale Coomassie-Brillant-Blue-Färbung

Die Färbung wurde nach Kang *et al.* durchgeführt (Kang *et al.*, 2002). Die Färbelösung wurde vor Gebrauch jeweils frisch angesetzt. Die Inkubation mit der Lösung erfolgte in einer entsprechenden Petrischale für 15 bis 30 h bei RT auf einem Taumeltisch. Verändert nach Kang *et al.* wurde das Gel nach dem Lauf zunächst zweimal 5 min in Wasser geschwenkt und anschließend die Färbelösung hinzugefügt. Nach der Färbung der Proteine wurden die Gele in H₂O gewaschen, entfärbt und gelagert. Die Dokumentation erfolgte auch hier durch digitalisieren.

2.8.7 Reduktion und Alkylierung der Proteine für SDS-PAGE

Die Proben wurden mit Probenpuffer und 50 mM DTT versetzt und für 15 min bei 70 °C reduziert. Dann wurde bei RT IAA (1 M in H₂O) hinzugefügt, so dass es final in einer Konzentration von 150 mM vorlag. Nachdem die Proben weitere 15 min bei RT und unter Lichtausschluss alkyliert wurden, folgte die Auftragung auf ein Polyacrylamidgel und eine SDS-PAGE (s. 2.8.8).

2.8.8 Präparative Behandlung für Massenspektrometrie

Die Proben wurden vor der SDS-PAGE reduziert und alkyliert. Die Proteine wurden nach der Elektrophorese mit der kolloidalen Coomassie-Brillant-Blue-Methode (s. 2.8.6) im Gel angefärbt.

Das Ausschneiden der zu untersuchenden Banden erfolgte manuell mit einem Gel-Spotpicker (Labtech International GmbH, Burkhardtsdorf). Die so gewonnenen Gelstücke wurden dreimal mit Wasser (HPLC *gradient grade*) gewaschen, dann je Gelstück 100 µl 50 % (v/v) ACN mit 12,5 mM NH₄HCO₃ hinzu pipettiert sowie der Überstand nach Absetzen der Gelstücke entfernt. Dann wurden 100 µl ACN zugegeben, nach 2 min wieder entfernt und die Proben für 5 min stehen gelassen. Die tryptische Spaltung erfolgte mit 20 µl Trypsin (100 ng in 25 mM NH₄HCO₃) je Gelstück, wobei die Ansätze 30 min auf Eis und für weitere 15 h bei 37 °C inkubiert wurden. Durch Zugabe von 20 µl 0,3 % (v/v) TFA in ACN wurde das Trypsin inaktiviert. Die trypsinisierten Proben wurden 15 min in ein Ultraschallwasserbad

gegeben und die Überstände danach in ein neues Gefäß überführt. Die Gelstücke wurden anschließend mit 20 µl ACN weitere 15 min mit Ultraschall behandelt und die Überstände mit den vorherigen vereinigt und die Volumina in dem SpeedVac®-Konzentrator unter Vakuum für 60 min bei RT reduziert. Die Proteinfragmente wurden in je 0,8 µl Matrixlösung (5 mg/ml α -Hydroxycyanozimtsäure (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis Cedex, France) in 0,1 % (v/v) TFA in 80 %igem ACN) resuspendiert und auf eine Probenplatte überführt (siehe auch (Gelhaus *et al.*, 2005)). In den meisten Fällen wurden die Fragmente vor dem Auftragen auf die Probenplatte entsalzen. Hierfür wurden sogenannte Perfect Tip 10 µl Pipettenspitzen, die mit einer C18-Matrix versehen waren (Eppendorf AG, Hamburg), in ACN aktiviert und in 0,1 % (v/v) TFA in ACN äquilibriert, wobei die Lösungen jeweils dreimal aufgezogen und eluiert wurden. Anschließend wurden die zu messenden Proben mit diesen Spitzen in 10 µl 0,1 % (v/v) TFA in ACN aufgenommen und zweimal gewaschen (Entsalzen). Schließlich wurden die Fragmente mit 1,2 µl Matrixlösung direkt auf die Probenplatte aufgetragen. Die Massenspektrometrie und die Analyse der erhaltenen Massenspektren (*peptide mass fingerprint*) sowie die MS/MS-Analyse der Fragmentierung einzelner tryptischer Peptide aus den zu untersuchenden Proteinen erfolgte durch Dr. Christoph Gelhaus, Zoologisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

2.8.9 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Identifizierung und Bestimmung der molekularen Masse des gereinigten Proteins sowie das Tandem-Massenspektrometrie-Verfahren (MS/MS) wurden mit einem MALDI (*matrix-assisted-laser-desorption-ionization*)- TOF/TOF (*time of flight*) Massenspektrometer (4700 Proteomics Analyzer Workstation, Applied Biosystems; Framingham, MA, USA) und der Software 4000 Series Explorer V3.6. (Applied Biosystems) vorgenommen. Als *in house*-Datenbanken wurden sowohl die NCBI Datenbank (Stand 11.11.2009) als auch eine eigens hergestellte Datenbank mit den Proteinsequenzen der mutmaßlichen *C. elegans*-Lysozyme verwendet. Die Protein-Identifizierung erfolgte mit Hilfe der Suchmaschine MASCOT V.2.0 (Matrix Science, University of California, San Francisco, USA) und wurde von Dr. C. Gelhaus an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt (Schmidt *et al.*,

2009). Als interne Kalibrierung der Spektren dienten die autokatalytisch hervorgerufenen Fragmente des verwendeten Trypsins.

2.9 Aktivitätsbestimmung (Lysehofplattentest)

Sämtliche Proben wurden mit folgender Methode auf Aktivität getestet. Wenn im weiteren Verlauf der Arbeit von aktiven Fraktionen oder Proteinen gesprochen wird, bezieht sich die Aktivität auf die hydrolytische Spaltung von Zellwänden aus *Micrococcus luteus*.

Die Methode wurde von Ossermann und Lawlor etabliert (Osserman und Lawlor, 1966). Eine 50 mM NaAc-Pufferlösung mit dem pH-Wert 4,5 wurde hierfür mit 0,9 % Agarose und 0,5 mg/ml *Micrococcus luteus*-Zellwänden versetzt. Anschließend wurden je 10 ml des Ansatzes in eine Petrischale (Durchmesser 9 cm) gegeben. Mit einem sterilen Stanzrohr (Durchmesser 4 mm) wurden zwölf Löcher je Petrischale ausgehoben. Die Petrischalen konnten für mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden. Von der zu testenden Probe wurden je 10 µl in ein Loch (∅ 4 mm) pipettiert, die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und in einer feuchten Kammer für 16 h bei 37 °C inkubiert. Als Positivkontrolle diente HEWL, welches in 1 mM NaCl angesetzt wurde. Die Negativkontrolle war der jeweilige Puffer oder die jeweilige Lösung, in dem die Probe vorlag. Diese Methode wurde ausschließlich quantitativ verwendet, um aktive Fraktionen zu ermitteln oder gravierende Aktivitätsverluste o. ä. zwischen verschiedenen Arbeitsschritten auszuschließen.

2.10 Biochemische Charakterisierung von ILYS-5

2.10.1 Medien und Lösungen

Stammlösungen pH-Optimum:	1 M HAc (100 % (v/v) HAc mit H ₂ O <i>ad</i> 500 ml)
	0,5 M NaOH (Plättchen in 1000 ml H ₂ O)
	0,5 M NaH₂PO₄ (in 500 ml H ₂ O)
	0,2 M Na₂HPO₄ (in 500 ml H ₂ O)
	1 M NaCl (in 100 ml H ₂ O)

Stammlösungen pH-Optimum:	0,3 M H₃BO₃ (in 500 ml H ₂ O)
alle Stammlösungen:	steril filtriert mit 0,2 µm Porengröße
<i>M. luteus</i>-Zellwand-Stammlösung:	16 mg/ml Zellwände in H ₂ O
(für pH-Optimum, Ionenstärke)	jeweils nur wenige Tage bei 4 °C gelagert
Stammlösungen Chitinase-Test:	50 mM NaAc pH 4,5 in H ₂ O gelöst
Chitinase-Substrat	1 mg/ml 4-Nitrophenyl-N,N'-Diacetyl-β-D-Chitobiosid in 50 mM NaAc pH 4,5
Chitinase (<i>Streptomyces griseus</i>)	0,2 mg/ml in 50 mM NaAc pH 4,5 <i>ad</i> 1ml
Stammlösungen Cellulase-Test	50 mM NaAc pH 4,5 in H ₂ O
Cellulase-Substrat	1 mg/ml 4-Nitrophenyl-β-D-Cellobiosid in 50 mM NaAc pH 4,5
Cellulase (<i>Trichoderma viride</i>)	0,5 mg/ml (10 µM) in 50 mM NaAc pH 4,5 <i>ad</i> 1ml
Chitinase/Cellulase-Standard	10 mM <i>para</i> -Nitrophenol (pNP) in 50 mM NaAc pH 4,5
Stammlösungen Isopeptidase	50 mM MOPS pH 5,0 (mit NaOH) in H ₂ O
Ioseptidase-Substrat	200 µg/ml N-(<i>p</i> -Nitrophenyl)-L-glutamin Hydrochlorid in 50 mM MOPS pH 5,0
Ioseptidase-Standard	10 mM pNA in 50 mM MOPS pH 5,0
HEWL	1 mM in 1 mM NaCl <i>ad</i> 1 ml
Stopplösung (Chitin./Cellul./Iosept.)	200 mM Na ₂ CO ₃ in H ₂ O

2.10.2 pH-Optimum

Generell erfolgt die Bestimmung lysozymatischer Aktivität im Photometer über eine Methode, die von (Shugar, 1952) eingeführt wurde. Dabei wird die Extinktion bei 450 nm (Wolframlampe) ermittelt, wobei die Reaktionsansätze in einer 1 ml-Küvette vorliegen. Die Extinktionsänderung wird durch eine enzymatische Reaktion hervorgerufen, bei der die in einer variablen pH-Pufferlösung vorliegenden *M. luteus*-Zellwände gespalten werden und somit die Extinktion über die Inkubationszeit abnimmt. Die Enzymaktivität von *einem Unit* ist wie folgt definiert: Aktivität des Enzyms, die eine Änderung der Extinktion bei 450 nm und RT innerhalb einer Minute um 0,001 hervorruft.

Zur Bestimmung des optimalen pH-Milieus für die Aktivität von rILYS-5 wurde im Wesentlichen wie bei Xue *et al.* vorgegangen (Xue *et al.*, 2004). Die verwendeten Pufferlösungen wurden für diese Versuchsreihen genau titriert und vor Gebrauch zusätzlich mit Hilfe eines Osmometers überprüft (s. 2.11). Um den pH-Bereich von pH 3,5-10,5 abdecken zu können, wurden drei unterschiedlich Puffersysteme benutzt. Zwischen den jeweiligen Pufferlösungen lag ein Unterschied von pH 0,5 vor. Zunächst wurden hierfür diverse Stammlösungen angesetzt, welche dann nach Überprüfen durch Messung im Osmometer steril filtriert und zur Titration verwendet wurden. Die Titration und das damit verbundene Einstellen der Ionenstärke und des Endvolumens erfolgten in Glasmesskolben. Alle final benutzten Puffer wurden auf die Ionenstärke $I = 0,18$ eingestellt. Die Titrationsvolumina für die jeweiligen pH-Werte wurden im Vorwege mit folgender Formel berechnet:

$$\text{pH} = \text{p}K_s - \log\left(\frac{[\text{CHAc}]}{[\text{cAc}^-]}\right)$$

Der Term $\text{p}K_s$ ist definiert als Säurekonstante und wurde der Literatur entnommen (Hübschmann, Links, 1987). Aufgrund der Durchführung bei 20 °C wurde dementsprechend von Werten für diese Temperaturen ausgegangen. Der Term c steht für die Konzentration sowie HAc und Ac^- für die eingesetzte Säure und Base. Um weiterhin die gewünschte Ionenstärke in den Pufferlösungen zu erhalten, wurden die benötigten Molaritäten der Säure- und Basekomponente mit untenstehender Formel kalkuliert:

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i \times z_i^2$$

Dabei wurden die Lösungen zunächst auf $I = 0,16$ eingestellt, was bei praktischer Durchführung geringfügigen Schwankungen unterlag, und dann mit NaCl auf final $I = 0,18$ gebracht. Zudem wurde davon ausgegangen, dass sich die Borsäure (H_3BO_3) wie eine einprotonige Lewissäure verhält, da sie in Wasser gelöst wurde. Für die Analyse standen schließlich folgende Puffer zur Verfügung (alle $I = 0,18$):

Vorliegender pH im Medium:	Vorliegende Puffersubstanz:
3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5	Natriumacetat (HAc, NaOH)
6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5	Natriumphosphat (Na₂HPO₄, NaH₂PO₄)
9,0; 9,5; 10,0; 10,5;	Borat (H₃BO₃, NaOH)

Die Lösungen lagerten vor und zwischen dem Gebrauch bei RT. Die zur Analyse eingesetzte Suspension setzte sich aus einem dieser Pufferlösungen und der *M. luetus*-Stammlösung zusammen, die so in dem Puffer verdünnt wurde, dass sie final zu 0,8 mg/ml vorlag. Die photometrische Analyse der Extinktionskinetik erfolgte mit einem Spektrophotometer Easyspec, Safas) bei 450 nm und RT in 1 ml-Küvetten bei einer Schichtdecke von 10 mm. Dabei wurde über einen Zeitraum von 10 min, einer Bandbreite von 5 nm, einem Minimumintervall von 0,4 und einer Mittelwertszeit von 0,3 ms die Änderung der Extinktion erfasst. Beim Start der Kinetik wurden zunächst 750 µl des jeweiligen Puffers als Nullreferenz gemessen. Anschließend gab man in einer anderen Küvette vorliegende 730 µl entsprechende Zellwandsuspension ins Spektrophotometer. Nach Erreichen einer glatten Linie wurden schließlich 20 µl der zu untersuchenden Probe hinzugefügt und mit einem Rührstab die gesamten 750 µl durchmischt. Nach Schließen des Deckels konnte die Extinktionsabnahme verifiziert werden. Schließlich wurde mit Hilfe der Software (Easyspec//SAFAS SP 2000) mit „Linear fit“ die Kinetik über 5 min von Beginn der Extinktionsabnahme an bestimmt. Als Negativkontrolle diente eine Zellwandsuspension zu der 20 µl Puffer hinzugefügt wurden. Auf eine Positivkontrolle konnte verzichtet werden, da eine Extinktionsabnahme nur durch enzymatische Aktivität erfolgte. Die Lysozymproben wurden in verschiedenen Verdünnungen gemessen (jeweils in H₂O 1:2, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 und 1:200 von ursprünglich 1,75 mg/ml bzw. 130 µM)..

2.10.3 Einfluss der Ionenstärke

Prinzipiell wurde so wie bei der Bestimmung des optimalen pH-Werts für die Aktivität des rILYS-5 vorgegangen. Die Pufferlösung mit dem pH-Wert von 3,5 wurde jedoch zuvor derart verdünnt, dass $I = 0,1$ vorlag. Die Ionenstärke dieser Lösung wurde mit der NaCl-Stamm-

lösung versetzt, so dass eine zusätzliche Ionenstärke (zu dem Basispuffersystem) eingestellt war, bevor die Zellwände hinzugegeben wurden. Es wurde bei folgenden Ionenstärken die Abnahme der Extinktion registriert:

Vorliegende Ionenstärke im Medium:	Vorliegende Salzionen:
0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4	Natriumchlorid (NaCl)

Fernerhin erfolgten die Messungen genauso wie unter 2.10.2 beschrieben (s. o.)

2.10.4 Bestimmung der Chitinase-, Cellulase- und Isopeptidase-Aktivitäten

Ob rILYS-5 auch andere Zucker und Peptidbindungen hydrolytisch spalten kann, wurde mit nachfolgenden Experimenten verifiziert. Die drei verschiedenen Enzymaktivitäten wurden parallel getestet und gleichzeitig durchgeführt. Die Analyse erfolgte in einer 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatte (Sarstedt, Nürnberg), welche in einem Spektrophotometer bei RT und 405 nm ausgewertet wurde. Die Daten wurden mit einem Analogschreiber aufgezeichnet und nachträglich in einer Exceldatei bearbeitet (Titertek Multiskan® MCC/340-Spektrometer mit Analogschreiber). Die Reaktionsansätze wurden, mit Deckel und Parafilm verschlossen, in einem Thermomixer (Eppendorf, *comfort*) bei 37 °C und 450 rpm unter Lichtausschluss in zwei unabhängigen Experimenten und jeweils Dreifachbestimmung 30 min und 2 h inkubiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität durch Zugabe von 200 µl der Stopplösung (außer bei den Standard-Ansätzen) inhibiert und die Farbreaktion ausgelöst. Freigesetzte pNP oder pNA sind chromogene Substanzen, die sich in alkalischem Milieu gelb färben. Die damit einhergehende Änderung der Extinktion wurde photometrisch dokumentiert. Für die Chitinase- und Cellulaseaktivität wurden die gleichen Standards verwendet. Hierfür wurde die Standardlösung 1 : 200 in der Stopplösung verdünnt und je 300 µl in eine Vertiefung gegeben. Ebenso wurde der Standard für den Isopeptidase-Versuch auf gleiche Weise verdünnt und eingesetzt. Zusätzlich zum Standard wurde zu der jeweiligen Versuchs-

reihe 100 µl reine Substratlösung als Referenzwert dreifach pipettiert. Darüber hinaus wurden, um Artefakte auszuschließen, 100 µl der jeweiligen Pufferlösung angesetzt.

Beim Chitinase-Test wurde wie bei dem gewerblichen Chitinase-Assay CS0980 von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) vorgegangen; dieses Verfahren ähnelt auch dem Vorgehen von Josková *et al.* (Josková *et al.*, 2009). Als Positivkontrolle wurden 99 µl Chitinase-Substrat mit 1 µl Chitinase vermengt und in die Mikrotiterplatte gegeben. Das unverdünnte rILYS-5 (65 µM) wurde zu 10 µl mit 90 µl des Substrates inkubiert. Laut den Angaben bei Sigma-Aldrich® entspricht 1 U Chitinaseaktivität der Umsetzung von 1,0 µmol pNP vom Substrat pro min bei pH 4,8 und 37 °C. Trotz des in diesen Experimenten vorherrschenden pH-Werts von 4,5 und 5,0 wurde von dieser Definition ausgegangen. Für die rechnerische Ermittlung der Aktivität aus den Extinktionswerten wurde demnach folgende Formel angewendet:

$$U/ml = \frac{(E_{405} \text{ Probe} - E_{405} \text{ Referenz}) \times 0,05 \times 0,3 \times VF}{E_{405} \text{ Standard} \times \text{Zeit} \times \text{Probenvolumen}}$$

wobei:

E_{405} Probe:	Reaktionsansatz mit rILYS-5 bzw. der Positivkontrolle
E_{405} Referenz:	Reaktionsansatz mit Substratlösung
0,05:	µmol/ml pNP im Standardansatz befindlich
0,3:	finale Volumen nach Reaktionsstopp in ml
VF:	Verdünnungsfaktor (hier 1)
E_{405} Standard:	Reaktionsansatz mit Standardlösung
Zeit:	in min
Probenvolumen:	Volumen der Positivkontrolle bzw. rILYS-5 in ml

Die Mediane der Dreifachwerte dienten als Ausgangswerte für die Berechnung und aus beiden Experimenten wurde wiederum der Median aus den U/ml-Werten ermittelt. So wurde bei allen drei Versuchsreihen vorgegangen.

Die Überprüfung der Cellulaseaktivität wurde weitestgehend, wie bei Han *et al.* beschrieben, vorgenommen (Han *et al.*, 1995). Im eigentlichen Reaktionsansatz wurden 80 µl Substrat mit

20 µl Cellulase oder rILYS-5 (65 µM) vermischt. Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

Schließlich wurde die Isopeptidase-Aktivität von HEWL als Kontrolle, da keine spezifische Isopeptidase vorlag, und rILYS-5 jeweils in 50 µl Substratlösung in einem Gesamtvolumen von 100 µl überprüft (Josková *et al.*, 2009). Der Einfachheit halber wurde von der gleichen Unit-Definition und dem gleichen Rechenweg wie bei dem Chitinase-Assay ausgegangen.

2.11 Antibakterielles Spektrum von ILYS-5

Um inhibitorische und bakterizide Aktivität von ILYS-5 gegen unterschiedliche Bakterien-spezies zu ermitteln, wurde ein Mikrosuszeptibilitätstest durchgeführt (Fedders und Leippe, 2008). Dieser Versuch war bereits im Labor etabliert. Allerdings mussten die Tests mit teilweise neuen Bakterienstämmen erprobt werden und aufgrund des zu analysierenden Proteins eine neue Positivkontrolle eingesetzt werden. Daher wurden im Vorwege alle Bakterienstämme bei mindestens einem der beiden pH-Wert mit jeweils mehreren unterschiedlichen Konzentrationen von HEWL inkubiert und die Versuchsbedingungen angepasst.

2.11.1 Medien und Lösungen

Bereits genannte Medien oder Lösungen werden hier nicht weiter aufgeführt.

Glukose-Stammlösung	2 M α -D-(+)-Glukose in H ₂ O, steril filtriert (0,2 µm)
Basispuffer:	10 mM Natriumphosphatpuffer pH 5,2 bzw. pH 7,4 in H ₂ O
Blockierlösung:	0,1 % (w/v) BSA in H ₂ O, steril filtriert (0,2 µm)
Positivkontrolle:	lyophilisiertes Protein in 1 mM NaCl in H ₂ O gelöst
HEWL	vers. Konzentrationen 1 mM, 100 µM, 10 µM

2.11.2 Bakterienspezies

Bakterienspezies	genauere Identifikation	OD ₆₀₀ = 0,1 ≡
<i>Bacillus megaterium</i>	ATCC 14581	$2,8 \times 10^6$ CFU
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051	$2,2 \times 10^6$ CFU
Bakterienspezies	genauere Identifikation	OD ₆₀₀ = 0,1 ≡
<i>Bacillus thuringiensis</i>	NRRL B-18247	$4,8 \times 10^6$ CFU
<i>Escherichia coli</i>	K12 D31 YpCr (Streptomycin- und Amp.-Resistenz)	$2,5 \times 10^7$ CFU
<i>Micrococcus luteus</i>	DSM 20030	$1,4 \times 10^6$ CFU
<i>Photorhabdus luminescens</i>	(auch <i>Xenorhabdus l.</i>), JM12, <i>ssp. akhurstii</i>	$7,4 \times 10^6$ CFU
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA01	$6,3 \times 10^7$ CFU
<i>Serratia marcescens</i>	Db 11 (Streptomycin-Resistenz)	$5,0 \times 10^7$ CFU
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600	$6,1 \times 10^7$ CFU
<i>Xenorhabdus nematophila</i>	(auch <i>Enterobactericidae n.</i>), F1 (Erythromycin-Resistenz)	$1,0 \times 10^8$ CFU
<i>Yersinia enterocolitica</i>	96-C without plasmid, Serotyp 0:9	$2,8 \times 10^7$ CFU

Sofern die CFU-Werte bei einer OD₆₀₀ von 0,1 nicht bereits im Labor bekannt waren, wurden diese in zwei unabhängigen Experimenten mit je einer Dreifachbestimmung ermittelt oder der Literatur entnommen und durch einmaliges Auszählen überprüft (Boman *et al.*, 1974; Sicard *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Die Bakterienstämme *P. aeruginosa* PA01, *P. luminescens* JM12, *S. marcescens* Db11 und *X. nematophila* F1 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hinrich Schulenburg (Evolutionsökologie, Zoologisches Institut, Universität zu Kiel) zu Verfügung gestellt.

2.11.3 Mikrosuszeptibilitätstest

Überwiegend wurden die Bakterien in 5 ml LB inokuliert und über Nacht unter Rotation bei 37 °C angezogen. Bei *B. subtilis*, *M. luteus* und sofern die Kulturen ungenügend wuchsen, wurden dem Medium 20 mM Glukose final hinzugefügt. Auf den Einsatz von Antibiotika

wurde verzichtet. Am nächsten Morgen wurden 100 µl der Kulturen in 50 ml des gleichen Mediums verdünnt und weiter inkubiert bis sie die logarithmische Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ von 0,1-0,2 erreichten. Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) des rILYS-5 wurde in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit Rundboden (Sarstedt, Nürnbrecht) ermittelt. Die Vertiefungen der Platte wurden vor Beginn jeweils mit 200 µl Blockierlösung je Vertiefung bei RT inkubiert, um ungewollte Adhärenzen der Proteine an dem Plastikmaterial zu minimieren. Anschließend wurde die Blockierlösung verworfen und die Platte an der Luft getrocknet. Die eigentliche Analyse erfolgte mit einer seriellen 1 : 2-Verdünnung der Proben in dem Basispuffer mit dem pH-Wert von 5,2. Nur bei den Arbeiten mit *M. luteus* wurde ein pH-Wert von 7,4 zu Grunde gelegt, da diese Bakterienspezies ab einem pH von 6,2 nicht mehr wächst. Als Sterilkontrolle diente der die Probe enthaltende Puffer sowie der Basispuffer anstelle der Probe, als Positivkontrolle die etablierte HEWL-Konzentration in 1 mM NaCl. Zu den 90 µl der Sterilkontrollen wurden jeweils 10 µl steriles LB-Medium gegeben. Der vorliegenden Verdünnungsreihe mit Probe oder Positivkontrolle wurden 10 µl der auf 10.000 CFU reduzierten Bakteriensuspension je Vertiefung beigemischt. Jede Platte enthielt Sterilkontrollen und mindestens zweifach Positivkontrolle und zu testende Proteinlösung und wurde mit Deckel und Parafilm verschlossen in einer feuchten Kammer mindestens 16 h bei 37 °C inkubiert. Die MIC wurde definiert als die Proteinkonzentration, bei der kein Bakterienwachstum zu beobachten war, also keine Präzipitatbildung vorliegt. Um zu verifizieren, ob es sich auch um eine bakterizide Aktivität handelt, wurden aus der Vertiefung mit der MIC des Proteins 10 µl sowie aus den umliegenden 40 µl entnommen und auf LB-Agar ausplattiert. Dabei wurden zur leichteren Handhabung die Aliquots zuvor *ad* 100 µl mit sterilem LB vermischt. Nach 16-48 h bei 37 °C wurden die Platten auf CFU-Bildung hin überprüft. Die minimale bakterizide Konzentration (MBC) wurde definiert als diejenige, bei der keine CFU-Bildung auf LB-Agar stattfand. Als Sterilkontrolle wurde reines LB ausplattiert. Als Positivkontrolle und zur Gegenprobe der 10.000 CFU enthaltenden Bakteriensuspensionen wurden je 10 µl dieser Ansätze direkt auf LB-Agar ausplattiert und nach 24 h bei 37 °C die CFUs ausgezählt.

Die Analyse erfolgte je Bakterienspezies in mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Doppel- oder Dreifachbestimmung. Von den erhobenen Einzeldaten wurden die Mediane ermittelt.

2.12 Osmometer

Um die bei der biochemischen Charakterisierung verwendeten Pufferlösungen auf ihre exakte Molarität hin zu überprüfen, wurde deren Osmolalität mit Hilfe eines Osmometers bestimmt. Hierfür wurde das Gerät zunächst nach Herstellerangaben mit einer NaCl-Lösung kalibriert. Zwischen den einzelnen Messungen wurde der Messfühler jeweils mit H₂O gespült. Die Analyse erfolgte in 50 µl Volumina. Die ermittelten Werte entsprachen der Osmolalität, also bezogen auf 1 kg Lösungsmittel. Folglich wurde die Osmolarität, bezogen auf 1000 ml, je nach dem Teilchencharakter bzw. der Eigenschaft in Lösung, rechnerisch aus den Werten bestimmt.

2.13 Gefriertrocknung (Lyophilisation)

Die vollständige Trocknung der Proteine wurde mit der Gefriertrocknungsanlage Alpha 2-4 LSC von Christ (M. Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz) vorgenommen. Die Proben wurden zuvor bei -80 °C eingefroren. Das Vakuum betrug dabei 0,1-0,2 mbar, die Temperatur im Probenständer 12 °C. Die lyophilisierten Proben wurden im gewünschten Medium resuspendiert, wie jeweils angegeben.

2.14 Vergleich von Aminosäuresequenzen bekannter und mutmaßlicher Lyozyme

Die vorausgesagten Primärstrukturen (Aminosäuresequenzen) der vorhergesagten Lyozymgene aus *C. elegans* sind zusammen mit anderen Lyozymen des i-Typs (*invertebrate*) aus unterschiedlichen Organismen im Anhang aufgelistet (s.8.3). Die Sequenzen wurden von folgenden Datenbanken bezogen.

NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
WormBase	http://www.wormbase.org/db/searches/blat

Die weiterführenden Analysen wurden mit verschiedenen Software-Programmen durchgeführt, die unten aufgelistet sind. Zur Generierung der phylogenetischen Stammbäume diente das Programm „ClustalW“ der Internetseite von EMBL-EBI (*European Bioinformatics Institute*) (Thompson *et al.*, 1994) und „ClustalX“, beide in der Version 2.0 (Larkin *et al.*, 2007). Es wurden sogenannte *unrooted tree*-Stammbäume unter Anwendung des Neighbor-Joining-Algorithmus (Saitou und Nei, 1987) erstellt und nicht-parametrisch eine *Bootstrap*-Analyse (1000 Replikate) durchgeführt (Felsenstein, 1985; Efron, 1979). Die abschließende Visualisierung der Stammbäume erfolgte mit „TreeView version 1.6.6“ (Page, 1996). Die Sequenzen wurden, sofern vorhanden, ohne vorhergesagte Signalpeptid-Sequenzen der Analyse unterzogen (s. 8.3).

ClustalW2	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
ClustalX2 (herunter geladen)	http://www.clustal.org
TreeView (herunter geladen)	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html

2.15 Primärstrukturanalysen durch geeignete Software

Die Strukturanalysen bezüglich der Signalpeptide erfolgte mit dem Programm „SignalP 3.0 Server“ des CBS (*Center for Biological Sequence Analysis, University of Denmark*) (Nielsen *et al.*, 1997). Für sonstige Primärstruktur-Analysen wurde das Programm „Protein Calculator v.3.3“ des *Scripps Research Institutes* aus den USA und das „ProtParam-Tool“ des ExPASy-Servers des *Swiss Institute of Bioinformatics* ebenfalls aus den USA verwendet (Gasteiger *et al.*, 2003). Potentielle Glykosylierungsstellen wurden mit Hilfe von „NetNGlyc 1.0 server“ des *Center for Biological Sequence Analysis* aus Dänemark gesucht. Für die Auswertungen der Massenspektrometrie wurden auch andere Datenbanken genutzt (s. 2.8.9). Die bei *WormBase* angegebenen Proteindomänen sind unter „Pfam version 24.0“

des *Wellcome trust Sanger Institutes* (Cambridge, Großbritannien; (Finn *et al.*, 2010) näher erläutert. Der Vergleich der gängigen Codons unterschiedlicher Organismen im Zuge der rekombinanten Expression erfolgte bei dem *Graphical Codon Usage Analyzer* von Geneart AG (Regensburg) (Fuhrmann *et al.*, 2004).

SignalP 3.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Protein Calculator v3.3	http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html
ProtParam-Tool	http://www.us.expasy.org/tools/protparam.html
NetNGlyc 1.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
Pfam version 24.0	http://pfam.sanger.ac.uk/
GCUA version 2.0	http://gcua.de/

3 Ergebnisse

Dieser Arbeit liegen bereits experimentelle Ergebnisse zu Grunde, die hier kurz aufgeführt werden (Fuchs, 2006). Ziel der vorangegangenen Arbeiten war es, mutmaßliche Lysozyme aus *C. elegans* zu isolieren. Dafür wurde der Modellorganismus in Flüssigmassenkulturen gehalten, um ausreichend Ausgangsmaterial für die Proteinextraktion zu erhalten. Die Etablierung eines geeigneten Extraktionsprotokolls und anschließenden Reinigungsverfahrens ermöglichte die Teilreinigung und Identifizierung eines Lysozyms, von dem die Hauptaktivität ausging. Es handelte sich hierbei um ILYS-5, das eine Aktivität im sauren pH-Bereich zeigte. Es konnte sowohl die erwartete molekulare Masse, beruhend auf *In-silico*-Analysen, gelelektrophoretisch als auch die molekulare Identität massenspektrometrisch bestätigt werden. Für eine biochemische Charakterisierung oder umfangreiche funktionale Analyse stand allerdings nicht genügend Material des teilgereinigten natürlichen Proteins zur Verfügung. Lediglich die für Lysozym spezifische hydrolytische Spaltung von *Micrococcus luteus*-Zellwänden in Lösung wurde eruiert. Aufgrund der Vorversuche wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Charakterisierung des ILYS-5 und der anderen i-Typ-Lysozyme gerichtet.

3.1 *Primärstrukturvergleiche bekannter und mutmaßlicher Invertebraten-Lysozyme*

In den letzten Jahren wurden zahlreiche i-Typ-Lysozyme in unterschiedlichsten Organismen identifiziert. Für einen Überblick über die bisher identifizierten und anhand von Primärsequenzvergleichen anerkannten mutmaßlichen i-Typ-Lysozyme wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Hierfür wurden formulierte Sequenzen aus früheren Veröffentlichungen um weitere, bei dem *National Center for Biotechnology* (NCBI) freizugängliche Sequenzen, ergänzt (vgl. dazu Bachali *et al.*, 2002 und 2004; Ito *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2004, 2007 und 2010).

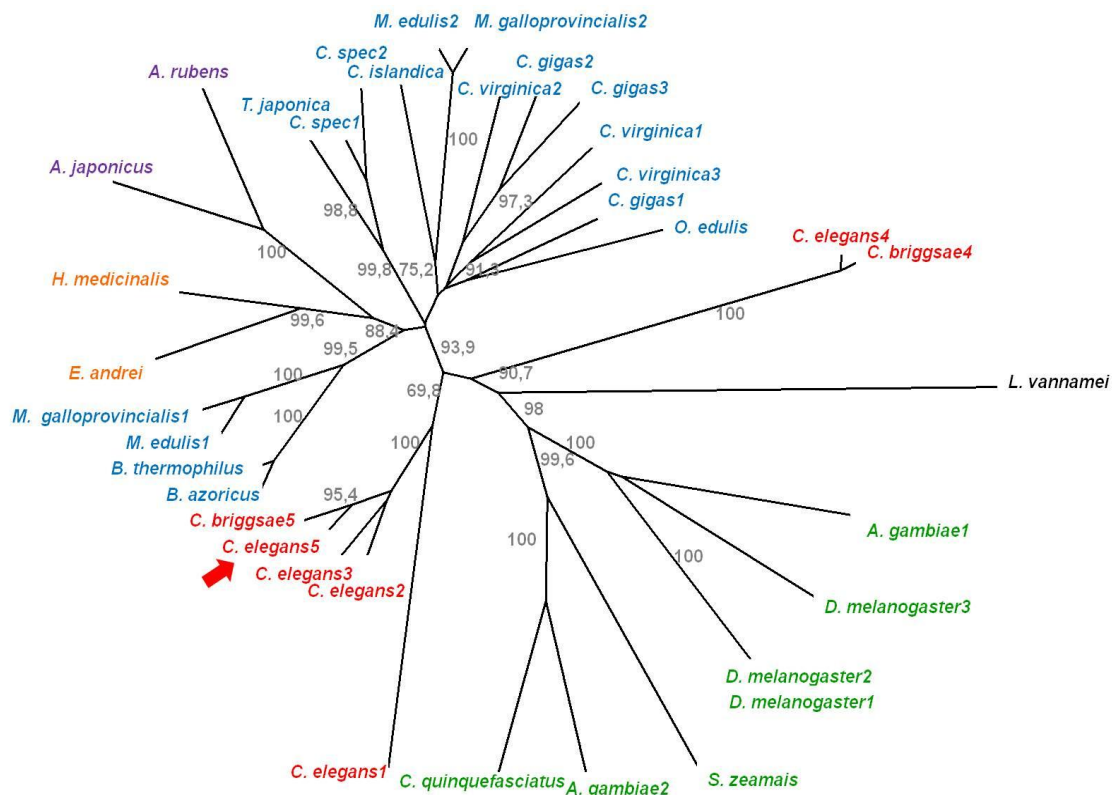


Abb. 7: Phylogenetischer Stammbaum bekannter i-Typ-Lysozyme verschiedener Organismen generiert anhand ihrer Primärstrukturen: Rot markierte Artnamen repräsentieren die Lysozymsequenzen aus Nematoden, blaue aus Mollusken (*Bivalvia*), lilafarbene aus Echinodermaten, orangefarbene aus Anneliden, grüne aus Insekten und der schwarze die aus einem Dekapoden (*Crustacea*). Der rote Pfeil zeigt das ILYS-5 aus *C. elegans*. Mit den Aminosäuresequenzen (im Anhang beigefügt 8.3) wurde ohne vorhergesagte Signalpeptide nach einer *Bootstrap*-Analyse (1000 Replikate) ein *unrooted* Cladogramm (*NeighborJoining*) erstellt. Die Zahlen zeigen die *Bootstrap*-Verhältnisse an, es sind nur Werte >70 % gezeigt. Die Bezeichnungen sind: *C. virginica1-3*: *Crassostrea virginica* (Amerikanische Auster), *C. gigas1-3*: *Crassostrea gigas* (Pazifische Felsenauster), *C. spec1-2*: *Calyptogena spec.* (Muschelgattung), *M. edulis1-2*: *Mytilus edulis* (Miesmuschel), *M. galloprovincialis1-2*: *Mytilus galloprovincialis* (Mittelmeer-Miesmuschel), *C. islandica*: *Chlamys islandica* (Kammuschel), *O. edulis*: *Ostrea edulis* (Europäische Auster), *B. azoricus* und *B. thermophilus*: *Bathymodiolus spec.* (Tiefseemuscheln), *T. japonica*: *Tapes japonica* (Japanische Teppichmuschel), *A. rubens*: *Asterias rubens* (Seestern), *A. japonicus*: *Apostichopus japonicus* (Seegurke), *H. medicinalis*: *Hirudo medicinalis* (Medizinischer Blutegel), *E. andrei*: *Eisenia andrei* (Kompostwurm), *L. vannamei*: *Litopenaeus vannamei* (Riesengarnele), *D. melanogaster1-3*: *Drosophila melanogaster* (Taufliege), *A. gambiae1-2*: *Anopheles gambiae* (Gambische Malaria mücke), *C. quinquefasciatus*: *Culex quinquefasciatus* (Südliche Hausmücke), *S. zeamais*: *Sitophilus zeamais* (Maiskäfer) sowie *C. elegans1-5* und *C. briggsae4-5*: *Caenorhabditis spec.* (Fadenwurm, Schwesterarten).

Die Primärstrukturen wurden ohne vorhergesagtes Signalpeptid, falls prognostiziert, in die Analyse einbezogen. Die verwendeten Sequenzen sind im Anhang unter 8.3 aufgeführt. Der phylogenetische Stammbaum wurde bei *ClustalW2* und *ClustalX2* kalkuliert sowie über *TreeView* visualisiert (Abb. 7). Die meisten bisher identifizierten i-Typ-Lysozyme stammen aus Mollusken, genauer gesagt Muscheln (*Bivalvia*). Häufig verfügen die Organismen über mehrere Lysozyme wie *C. virginica*, *C. gigas*, *Calyptogena spec.* und die beiden *Mytilus*-Arten. *Tapes japonica* wird heute unter *Venerupis philippinarum* geführt und die Tertiärstruktur des daraus isolierten Lysozyms wurde aufgeklärt (Goto *et al.*, 2007). *C. gigas* soll außerdem noch eine vierte Sequenz für ein i-Typ-Lysozym besitzen (Xue *et al.*, 2010), welches hier nicht in die Analyse mit einbezogen wurde. Auch eine beschriebene Sequenz aus *Saxidomus purpurata* (eine Venusmuschel) wurde hier nicht analysiert (Miyachi *et al.*, 2006). *E. andrei* wird auch unter *Eisenia foetida andrei*, *Apostichopus* auch unter *Stichopus* und *Litopenaeus* auch unter *Penaeus* geführt.

Aus der Gruppe der Crustaceen ist hier nur *L. vannamei* (auch *Penaeus*) für den Vergleich herangezogen worden. Eine Sequenz aus der Atlantischen Weißen Garnele *Penaeus setiferus* sowie zwei Sequenzen von *Penaeus monodon* (weitere Riesengarnele) wurden hier nicht verwendet.

Zwei der drei i-Typ-Lysozyme (1 = AAF57939.1 und 2 = CAA21317.1) von *D. melanogaster* unterscheiden sich in nur einem Aminosäurerest auf Primärstrukturebene. An Position 94 (abzgl. des vorhergesagten Signalpeptids Pos. 72) steht in der zweiten Sequenz ein Asparaginrest anstelle von einem Lysinrest.

Neben den fünf potentiellen i-Typ-Lysozymen von *C. elegans* sind welche seiner Schwestergruppe *C. briggsae* dargestellt. Mutmaßliche Lysozyme weiterer Schwesterarten wie *C. remanei* wurden hier nicht betrachtet. Hierzu sei auf die Arbeiten von Schulenburg und Böhnisch verwiesen (Schulenburg und Böhnisch, 2008).

Der erstellte Stammbaum spiegelt die phylogenetischen Verhältnisse wider. Die *Arthropoda* werden nach heute gängiger Systematik zusammen mit den *Nematoda* und anderen zu den *Ecdysozoa* gezählt und nicht wie früher mit den *Annelida* zu den *Articulata* zusammengefasst. Die mutmaßlichen Lysozyme der Nematoden, Dekapoden und Insekten sind sich in ihrer Primärstruktur zueinander ähnlicher als zu denen der Mollusken oder

Anneliden (siehe Abbildung). Die Sequenzen von *A. rubens* und *A. japonicus* sind die einzigen, die von Tieren stammen, die bei den *Deuterostomia* eingeordnet werden. Die restlichen vertretenen Organismen reihen sich unter den *Protostomia* ein.

Zum Teil wurden die Lysozyme, deren Primärstrukturen im Stammbaum aufgeführt wurden, auf Proteinebene nachgewiesen bzw. biochemisch charakterisiert. Aus den Organismen *M. galloprovincialis*, *O. edulis*, *B. azoricus*, *B. thermophilus*, *C. quinquefasciatus*, *S. zeamais*, *C. briggsae* und schließlich *C. elegans* ist dies jedoch bisher nicht gelungen.

Von den fünf potentiellen *C. elegans*-Lysozymen bilden ILYS-4 und ILYS-1 eigene Äste, hingegen ähneln sich die restlichen drei Primärstrukturen sehr. Die beiden mutmaßlichen Lysozyme aus *C. briggsae* sind denen aus *C. elegans* ähnlicher als die Sequenzen von *C. elegans* untereinander. So unterscheiden sich ILYS-4 und CBR-ILYS4 nur in fünf Aminosäureresten sowie der N-terminalen Region. ILYS-5 verfügt über 13 andersartige Aminosäurereste gegenüber der orthologen Sequenz in *C. briggsae*.

Für die Sequenzen von ILYS-1 aus *C. elegans*, CBR-ILYS-4 aus *C. briggsae*, das zweite Lysozym von *M. edulis* und die beiden Lysozyme aus *C. spec.* wurden keine Signalpeptide vorhergesagt.

Da der Fokus dieser Arbeit auf den potentiellen Invertebraten-Lysozymen von *C. elegans* lag, sind im Folgenden weitere Details über deren Sequenzen und Eigenschaften aufgeführt.

Tab. 1: Genomlokalisierung und ausgewählte Eigenschaften der potentiellen *C. elegans* i-Typ-Lysozyme

Name	Lokalisation (Chromosom)	Anzahl der Cysteine	Anzahl der negativ/positiv geladenen Aminosäuren	pI	Länge (AS)	Gewicht (kDa)
ILYS-1	IV	15	16/14	6,72	145	16,4
ILYS-2	IV	16	12/13	7,48	121	13,2
ILYS-3	IV	16	10/12	7,61	121	13,1
ILYS-4	IV	14	20/18	6,3	141	16,1
ILYS-5	X	16	10/12	7,63	121	13,2

Die Tabelle zeigt, dass *ilys-5* als einziges Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und alle anderen auf Chromosom IV liegen. Auch *cbr-ilys-5* ist in *C. briggsae* im Gegensatz zu den anderen Lysozymen auf dem X-Chromosom lokalisiert. Ferner weist die durch *ilys-1* kodierte Sequenz einer starken Abweichung in seiner Aminosäureabfolge zu den restlichen i-Typ-Lysozymen von *C. elegans* auf. Wie bereits erwähnt, wird kein Signalpeptid vorhergesagt, außerdem verfügt es über eine größere Insertion und mehr abweichende Aminosäurereste zu den anderen, obwohl es mit *ilys-1* und *ilys-2* in einem Cluster in gleicher Orientierung liegt. Eventuell handelt es sich hierbei um ein Pseudogen (Schulenburg und Boehnisch, 2008). Außerdem weicht auch ILYS-4 in seiner Primärstruktur von den übrigen ab, da selbst nach Abzug eines potentiellen Signalpeptids ein längerer N-Terminus vorliegt und auch die resultierende Aminosäuresequenz gegenüber ILYS-2, ILYS-3 und ILYS-5 mehr Abweichungen zeigt. Die Anzahl der Cysteinreste in der Primärstruktur von ILYS-1 und ILYS-4 könnten auf andere Konformationen der Sekundärstrukturen hinweisen, da weniger Disulfidbrücken ausgebildet werden können. Von den kalkulierten isoelektrischen Punkten (pI) ist der von ILYS-5 am höchsten und die von ILYS-1 und ILYS-4 deutlich niedriger als die übrigen. Einzig bei den beiden letztgenannten ist die Anzahl der negativ geladenen Aminosäuren höher als die der positiven, was ebenfalls auf geringfügig andere Konformationen hinweisen könnte. Weiterhin wurden bei einer *In-silico*-Analyse keine Glykosylierungsstellen in einer der Sequenzen gefunden (NetNGlyc 1.0-Server). Die Primärstrukturen der i-Typ-Lysozyme verfügen, außer im Falle von ILYS-1, außerdem über eine Destabilase-Domäne (PF05497).

Trotz der oft großen Unterschiede zwischen den Primärstrukturen in den verschiedenen Subtypen der Lysozyme oder innerhalb eines Typs, lassen sich zum Teil hoch konservierte Motive in den Sequenzen erkennen. Da mittlerweile die ersten i-Typ-Lysozyme charakterisiert und sogar die Tertiärstruktur des Lysozyms aus *T. japonica* röntgenkristallographisch aufgeklärt werden konnte (Goto *et al.*, 2007), soll ein Sequenzvergleich von ILYS-5 aus *C. elegans* mit dem bereits strukturell aufgeklärten Lysozym aus *Venerupis* bzw. *Tapes* dargestellt werden (Abb. 8). *V. philippinarum* wird mittlerweile als Synonym für *T. japonica* eingesetzt. Zwei unterschiedliche Arbeitsgruppen haben die jeweilige Sequenz identifiziert, Eigenschaften der resultierenden Proteine charakterisiert und im Falle von *T. japo-*

nica auch die Tertiärstruktur aufgeklärt. Die postulierten Primärstrukturen sind daher nahezu identisch. Das Signalpeptid des *Tapes*-Lysozyms umfasst elf Aminosäuren. Die Sequenz ist mit der des *Venerupis*-Lysozyms identisch. Sie besitzt jedoch eine um 42 Aminosäurereste verlängerte N-terminale Region, der wiederum ein Signalpeptid, bestehend aus 18 Aminosäureresten, vorausgeht. Einzig in dem vorletzten Aminosäurerest und einem weiteren an Position 145 (N, Asparagin) in der *Venerupis*-Sequenz und an Position 114 (S, Serin) der *Tapes*-Sequenz unterscheiden sie sich (s. unten). Das ILYS-5 aus *C. elegans* (Cele5) verfügt über eine Insertion, die in Lysozymen anderer Organismen nicht auftritt (s. Abb. 8). In der Abbildung wird oberhalb der Sequenzen die Sekundärstruktur des *Tapes*-Lysozyms dargestellt (aus Goto *et al.*, 2007 entnommen), sie besteht aus sechs α -Helices und zwei β -Faltblättern. Die Anordnung der Sekundärstruktur-Elemente, α 1-, α 3-, α 4-Helices und β -Faltblätter stimmt mit den α 2-, α 3-, α 4-Helices und β -Faltblättern von Lysozym aus Hühnereiweiß (*hen egg white lysozyme*, HEWL) überein. Generell verfügen i-Typ-Lysozyme über eine ungewöhnlich große Anzahl von Cysteinen. Die erste Kristallstruktur eines Lysozyms diesen Typs offenbarte, dass alle 14 Cysteinreste Disulfidbrückenbindungen untereinander ausbilden und auch innerhalb der Invertebraten-Lysozyme relativ konserviert sind. Inwieweit die sechzehn Cysteinreste von ILYS-5 Disulfidbrücken bilden, bleibt unklar, da im C-terminalen Bereich zwei Cysteinreste direkt nebeneinander lokalisiert und nicht in den i-Typ-Lysozymen anderer Organismen konserviert sind. Die Disulfidbrückenbindungen in den Sekundärstrukturen dieser Lysozyme weichen deutlich von dem Muster in HEWL ab. Die hier beschriebenen Motive und postulierten Aminosäurereste, die an der Katalyse beteiligt sein sollen, finden sich auch in anderen i-Typ-Lysozymen wie beispielsweise in denen von *E. andrei* (Josková *et al.*, 2009) und *S. japonicus* (Cong *et al.*, 2009).

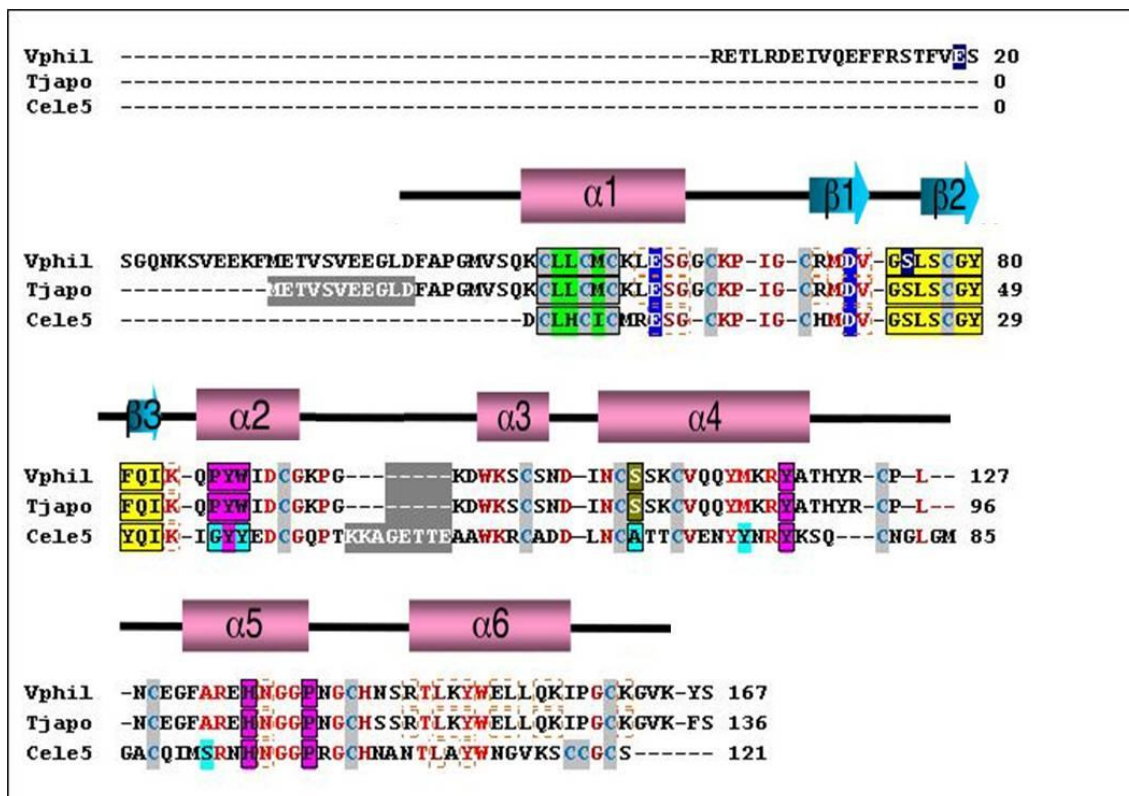


Abb. 8: Konservierte Motive und Sekundärstruktur von Lysozym aus *T. japonica* im Vergleich mit ILYS-5 aus *C. elegans* (Teile übernommen aus Goto *et al.*, 2007). Das Alignment wurde nach dem Erstellen in ClustalW2 zur Verdeutlichung der Motive modifiziert. Blau hinterlegt und in weißer Schrift sind die katalytischen Aminosäurereste der Glykosidasefunktion, in weißer Schrift oliv hinterlegt an der Isopeptidase-Aktivität beteiligte Aminosäurereste, in blauer Schrift und grau hinterlegt die Cysteinreste, in weißer Schrift dunkelgrau unterlegt zusätzliche Sequenzabschnitte, in hellroter Schrift konservierte, in dunkelroter Schrift zum Teil konservierte Aminosäurereste und türkis hinterlegt in ILYS-5 abweichende Aminosäurereste dargestellt. Eingerahmt wurden unterschiedliche Motive (grün und gelb: i-Typ-spezifisch, pink: Substratbindung, gestrichelt: beteiligt an der elektrostatischen Oberflächeninteraktion in der Dimerstruktur bei dem *Tapes*-Lysozym). Über den verglichenen Sequenzen sind Sekundärstruktur-Elemente des Mollusken-Lysozyms gezeigt. **Vphil** steht für *V. philippinarum*, **Tjapo** für *T. japonica* und **Cele5** für ILYS-5 aus *C. elegans*.

Zhao und seine Kollegen postulierten, dass i-Typ-Lysozyme drei an der katalytischen Aktivität beteiligte Aminosäurereste aufweisen (Glu/E, Asp/D und Ser/S; Zhao *et al.*, 2010), welche nur in der obersten Sequenz der Abbildung durch weiße Schrift und dunkelblauen Hintergrund hervorgehoben wurde. Die Arbeiten von Goto *et al.* erwähnten jedoch lediglich zwei Aminosäurereste (Glu/E und Asp/D), die an der katalytischen Reaktion beteiligt sein sollen, wobei ein identischer Asparaginsäurerest von beiden Gruppen beschrieben wurde. Sie sind in allen drei Sequenzen konserviert sowie auch in anderen i-Typ-Lysozymen beschrieben worden (Cong *et al.*, 2009). Die Tertiärstruktur des *Tapes*-Proteins

zeigte, dass die Aktivität-vermittelnden Aminosäurereste sich mit denen aus dem HEWL (Glu/E 35 und Asp/D 52, Phillips, 1966) deckten, und Mutationsmodelle bestätigten die Funktion bei der Katalysereaktion (Goto *et al.*, 2007). Deckungsgleich in den Tertiärstrukturen war zumindest die räumliche Lokalisation und Orientierung, obwohl der Asparaginsäurerest in HEWL in dem zweiten statt ersten β -Faltblatt der Sekundärstruktur positioniert ist.

Zwei spezifische Sequenz-Motive für Invertebraten-Lysozyme wurden mehrfach beschrieben (Goto *et al.*, 2007; Cong *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Ersteres umfasst die Folge Cystein, Leucin, Glutaminsäure oder Leucin oder Arginin oder Histidin, Cystein, Isoleucin bzw. Methionin und Cystein (CL(E/L/R/H)C(I/M)C) im aminoterminal Bereich der Sequenzen. Dieses Motiv ist auch in ILYS-5 konserviert. Das andere Motiv besteht aus Glycin, Serin, Leucin, Serin, Cystein, Glycin, Prolin oder Tyrosin, Phenylalanin, Glutamin und Isoleucin (GSLSCG(P/Y)FQI). Es ist ein hoch konserviertes Motiv, welches auch in anderen Lysozysubtypen wie bei den c-Typ-Lysozymen (GSTDYG(I/L)FQI) und α -Lactalbumin (GSTYEG(I/L)FQI) fast identisch vorkommt (Bachali *et al.*, 2002). Vereinzelt werden aminoterminal noch ein Methioninrest, der an der Katalyse beteiligte Asparaginsäurerest und ein Valinrest sowie C-terminal ein Lysinrest zu dem Motiv hinzugezählt (u. a. Cong *et al.*, 2009). Allerdings sind diese Aminosäurereste beispielsweise in Chlamysin aus der Kammuschel nicht konserviert. Auch in diesem Fall verfügt ILYS-5 über identische Aminosäurereste an gleicher Position.

Des Weiteren besteht das Motiv, das bei der Substratbindung und -fixierung eine Rolle spielen sollen, aus Prolin, Tyrosin, in einigem Abstand Tyrosin, nach weiterer Zwischensequenz Histidin und wiederum nach einigem Abstand Prolin (PY-Y-H-P). Da das Tryptophan (W) hinter dem ersten Tyrosin desgleichen in den meisten Sequenzen konserviert ist, wurde es ebenfalls hervorgehoben. In diesem Fall weicht die Sequenz aus dem Nematoden allerdings von den anderen ab (Abb. 8). Bei der Bildung des Enzym-Substratkomplexes wird das Substrat im aktiven Zentrum des Proteins angelagert. Dieses Zentrum in Form einer Spalte fixiert das Substrat über Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen (Goto *et al.*, 2007). Trotz der Unterschiede in den Primärstrukturen geht man von einer konservierten Faltung und Ausbildung

eines katalytisch aktiven Zentrums in Form einer Spalte bei der Sekundärstruktur-Anordnung innerhalb der Familie der Lysozyme und Chitinasen aus (Monzingo *et al.*, 1996). Bei der Interaktion der Proteine mit dem Substrat wurden Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen verifiziert, die in c-Typ- und i-Typ-Lysozyme anscheinend konserviert sind. Bei den i-Typ-Lysozymen spielt dabei ein Histidinrest (Position 94, innerhalb des Substratbindungs-Motivs) eine besondere Rolle, welches in der Tertiärstruktur deckungsgleich mit dem bei HEWL an der Interaktion beteiligten Tryptophanrest liegt (Phillips, 1966; Goto *et al.*, 2007). Der Sequenzvergleich ergab ein Histidinrest an gleicher Position in ILYS-5.

Grundsätzlich werden drei katalytische Mechanismen bei der Glykosidase-Reaktion vorgeschlagen. Ein so genannter *invertig* und zwei *retaining mechanisms*. Wobei hier auf eine detaillierte Beschreibung verzichtet und auf die Literatur verwiesen wird (Goto *et al.*, 2007; Cheetham *et al.*, 1992; Callewaert und Michiels, 2010). Goto und seine Mitarbeiter gehen bei dem von ihnen aufgeklärten Protein von einem kovalenten Enzym-Substrat-Intermediat (*retaining mechanism*) aus, wodurch sich der Funktionsmechanismus deutlich von dem bei HEWL unterscheidet, aber aus verschiedenen β -Glykosidasen bekannt ist. Bei der Katalyse selbst fungiert der Asparaginsäurerest als Nukleophil zur Bildung einer kovalenten Bindung mit dem Substrat.

Einige Autoren schreiben die unterschiedlichen Aktivitätsformen, als Lysozym und Isopeptidase, auch unterschiedlichen geographischen Regionen in den Primär- und Sekundärstrukturen zu. So sollen an der Isopeptidase-Aktivität die Aminosäurereste von Serin und Histidin beteiligt sein (Abb. 8). Der Serinrest, der maßgeblich an der Isopeptidase-Aktivität beteiligt sein soll, ist nicht in der Primärstruktur von ILYS-5 konserviert.

Die nicht-enzymatische antibakterielle Aktivität einiger Lysozyme konnte noch nicht genau aufgeklärt werden, wobei bei einem c-Typ-Lysozym die Aktivität durch Helix-Loop-Helix-Fragmente gezeigt werden konnte (Ibrahim *et al.*, 2001; Zavalova *et al.*, 2006). In dem Lysozym aus *S. japonicus* ist für diese nicht-enzymatische antibakterielle Aktivität wahrscheinlich eine Konformationsänderung verantwortlich, bei der eine „bakterizide Domäne“, die der Isopeptidase-Region entspricht, beteiligt ist (Cong *et al.*, 2009). Die hydrophoben Aminosäurereste in der C-terminalen Region sind innerhalb der i-Typ-Lyso-

zyme überwiegend konserviert und die C-terminale, helikale Region relativ einheitlich in dem Subtyp, jedoch signifikant von der Anordnung in HEWL abweichend (Goto *et al.*, 2007).

3.2 Lokalisation der Genexpression der i-Typ-Lysozyme aus *C. elegans*

Bisher ist über den Ort der Genexpression und der Proteinsynthese der i-Typ-Lysozyme von *C. elegans* wenig bekannt. Zuvor wurden noch keine Lokalisationsstudien mit Hilfe von Reporter genen durchgeführt. Reporter genkonstrukte ermöglichen die Erforschung gewebsspezifischer Genexpressionsmuster und gegebenenfalls Lokalisationsstudien der Proteinsynthese einzelner Gene. In dieser Arbeit wurde dabei das Reporter gen *gfp* verwendet. Das so genannte GFP (grün fluoreszierendes Protein oder *green fluorescent protein*) wurde ursprünglich in der Qualle *Aequorea victoria* von Osamu Shimomura beschrieben (Shimomura, 2005; Shimomura *et al.*, 1962) und besitzt eine stabile Struktur. GFP, welches bei Anregung mit ultraviolettem Licht grün fluoresziert, kann nahezu beliebig mit anderen Proteinen (genspezifisch) fusioniert und mit gängigen mikroskopischen Methoden sichtbar gemacht und dokumentiert werden (Prasher *et al.*, 1992; Chalfie *et al.*, 1994). Für die Lokalisationsstudien wurden zwei unterschiedliche Arten von Reporter genkonstrukten eingesetzt, zum einen klonierte Plasmide und zum anderen Fusions-PCR-Produkte. Dabei wurde jeweils ein 2000 bp langer Promotorbereich direkt an dem 5'-Ende des zu untersuchenden Gens sowie Teile des kodierenden Bereichs desselben amplifiziert. Bei der Klonierung von Reporter gen-Plasmiden bildet die Größe des zu inserierenden DNA-Fragments den limitierenden Faktor, die fertigen Konstrukte sind jedoch langlebiger, stabiler und oft effektiver. Daher wurden hierbei nur Teile der kodierenden Bereiche der Gene mit amplifiziert. Um dennoch möglichst viele potentielle *cis*-regulatorische Elemente einzuschließen, wurde das erste Intron integriert und die Sequenzen endeten jeweils im zweiten Exon. Die linear vorliegenden Fusions-PCR-Produkte können beliebige Größen haben und lassen sich schnell und problemlos generieren, sind über die Zeit aber weniger

stabil und schlechter weiterzuverarbeiten. Zur Fusionierung wurde neben der Promotorregion der gesamte kodierende Bereich einschließlich zwischengeschalteter Introns fusioniert. Lediglich das Stopcodon wurde ausgelassen, um die Translation des vollständigen Fusionsproteins gewährleisten zu können. Bei allen Reportergenkonstrukten wurde im ORF (offener Leserahmen, *open reading frame*) am 5'-Ende des *gfp*-Gens kloniert bzw. fusioniert.

Tab. 2: Art der Reportergenkonstrukte zur Genexpressionslokalisation der i-Typ-Lysozyme

Analysiertes Gen:	Art des GFP-Reporterkonstrukts:
<i>ilys-1</i> (C45G7.1)	Fusions-PCR-Produkt
<i>ilys-2</i> (C45G7.2)	Plasmid
<i>ilys-3</i> (C45G7.3)	Fusions-PCR-Produkt
<i>ilys-4</i> (C55F2.2)	Plasmid
<i>ilys-5</i> (F22A3.6a)	Fusions-PCR-Produkt

Bei der Klonierung der Reportergen-Plasmide wurde bei der Linearisierung und anschließenden Ligation des Gens samt regulatorischer Bereiche in den Vektor das artifizielle Intron entfernt. Demnach fehlte es in den Ansätzen für *ilys-2* und *ilys-4*, in denen auch kein vollständiges ILYS-GFP-Fusionsprotein generiert wurde (Tab. 2). Bei allen Konstrukten war allerdings die 3'-UTR des *unc-34*-Gens enthalten. Die übrigen i-Typ-Lysozyme (Tab. 2) sollten als ILYS-GFP-Fusionsproteine synthetisiert werden. Ferner wurden für die Injektion Würmer des Wildtyp-Stammes N2 eingesetzt (Mello *et al.*, 1991; Hobert, 2002). Die Plasmide wurden vor der Verwendung gereinigt, sequenziert und die Fusions-PCR-Produkte elektrophoretisch analysiert (Daten hier nicht gezeigt).

Als Koinjektionsmarker diente der pRF4-Vektor, welcher das Markergen *rol-6* (*su1006*) trägt und den dominanten *Roller*-Phänotyp bedingt (Kramer *et al.*, 1990). Die transgenen Tiere der Folgegeneration wurden mit Hilfe dieses Phänotyps selektiert und isoliert.

Die Mikroinjektion erfolgte in die distalen und syncytialen Gonaden später L4-Larven oder junger Hermaphroditen und wurde mit Hilfe von Dr. Kerstin Isermann (Zoologisches

Institut, CAU zu Kiel) durchgeführt. Nach Optimierung der Versuchsprotokolle konnte eine Überlebensrate der mikroinjizierten Würmer von bis zu 87 % erzielt werden. Je Mikroinjektionssitzung wurden 40-70 Würmer injiziert. Es konnten alle fünf Reportergenkonstrukte erfolgreich injiziert werden und die Expressionsprofile und räumliche Lokalisation der Fusionsproteine mikroskopisch dokumentiert werden. Die Ergebnisse werden für die *ilys*-Gene einzeln in folgenden Unterkapiteln dargelegt.

3.2.1 *ilys-1::gfp* exprimierende Würmer

Transgene Tiere, die nach der Mikroinjektion den *Roller*-Phänotyp zeigten, wurden isoliert und vermehrt. Die GFP-Fluoreszenzsignale wurden bei unterschiedlichen Vergrößerungen im Stereomikroskop registriert und dokumentiert.

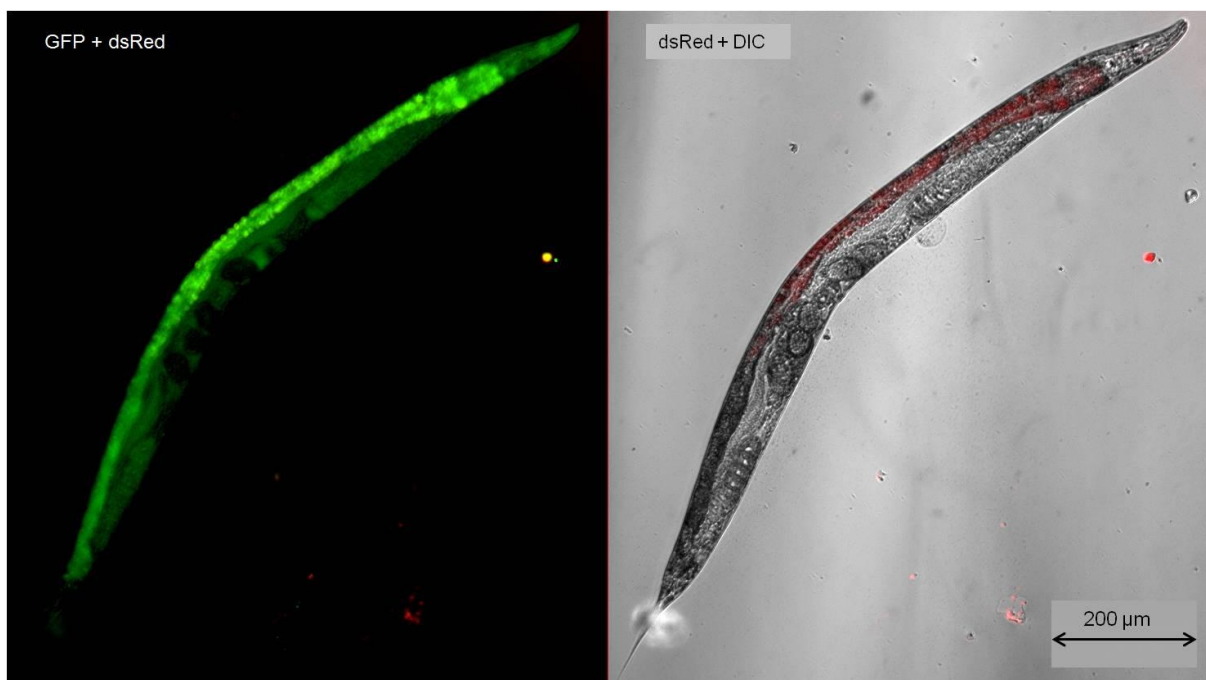


Abb. 9: Übersichtsbild eines *ilys-1::gfp* exprimierenden *C. elegans*. Dargestellt sind Aufnahmen eines Präparates in verschiedenen Kanälen mit unterschiedlichen Filtersätzen. Links wurden die Kanäle für die Detektion von GFP- (grün) und dsRed (rot)-Signalen überlagert, rechts das Durchlichtbild (DIC) und der dsRed-Kanal. Unten rechts ist durch den Balken das Größenverhältnis gezeigt.

Es ließen sich deutliche Fluoreszenzsignale im Darm und der gesamten Körperhöhle nachweisen (Abb. 9). Da bei *C. elegans* eine starke Autofluoreszenz im Darm und in den Kernen der Hypodermiszellen auftreten kann (Clokey und Jacobson, 1986), wurden die Fluoreszenzsignale mit denen von Wildtyp-Würmern verglichen und so verifiziert. Die mikroskopische Betrachtung verdeutlichte, dass das GFP-Signal über die Autofluoreszenz hinausging. Das *ilys-1*-Gen wird demnach im Darm und in der gesamten Körperhöhle, vermutlich der Hypodermis, exprimiert. Des Weiteren konnten GFP-Signale im Pharynx dokumentiert werden (Abb. 10).

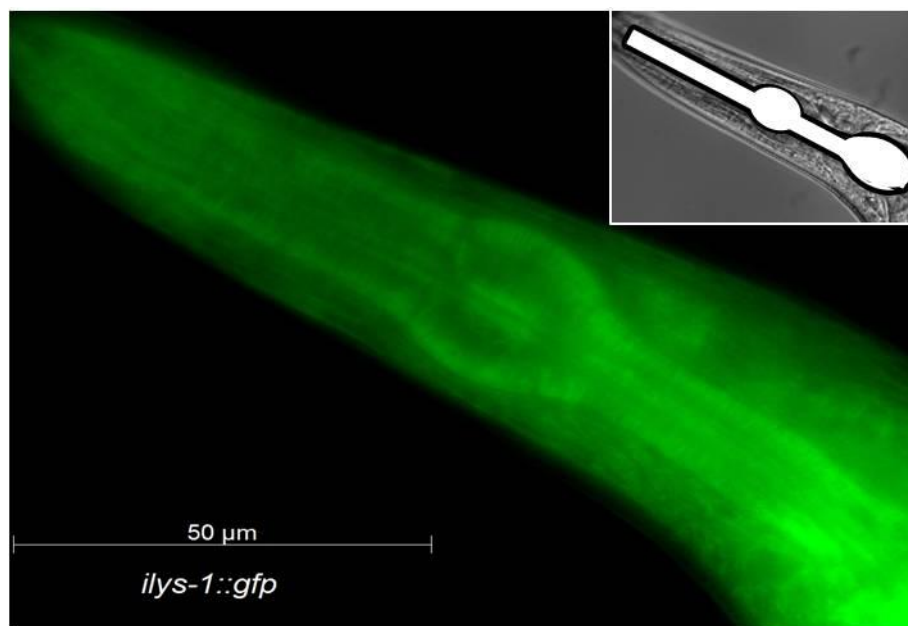


Abb. 10: Aufnahme des Kopfbereichs eines *ilys-1::gfp* exprimierenden *C. elegans*. Das aufgenommene GFP-Fluoreszenzsignal (grün) ist im großen Bild, die dazugehörige Durchlichtaufnahme (DIC) im kleinen Bildausschnitt gezeigt, darin wurde die Struktur des Pharynx schematisch hervorgehoben. Der Größenstandard ist unten links gezeigt.

Außer im Darm und der Hypodermis kommt es anscheinend auch im Pharynx vor. Ob ILYS-1 dabei in den Pharynxmuskeln oder Marginalzellen lokalisiert ist, konnte nicht differenziert werden. Ein weiterer Expressions- und Syntheseort von *ilys-1* und seinen Genprodukten konnte in verschiedenen Neuronen visualisiert werden (Abb. 11). Auch bei diesen Aufnahmen wurde deutlich, dass die GFP-Signale des Fusionsproteins über die

Autofluoreszenz hinausgehen und die Fluoreszenz der spezifischen Expression des Lysozyms zuzuschreiben ist.

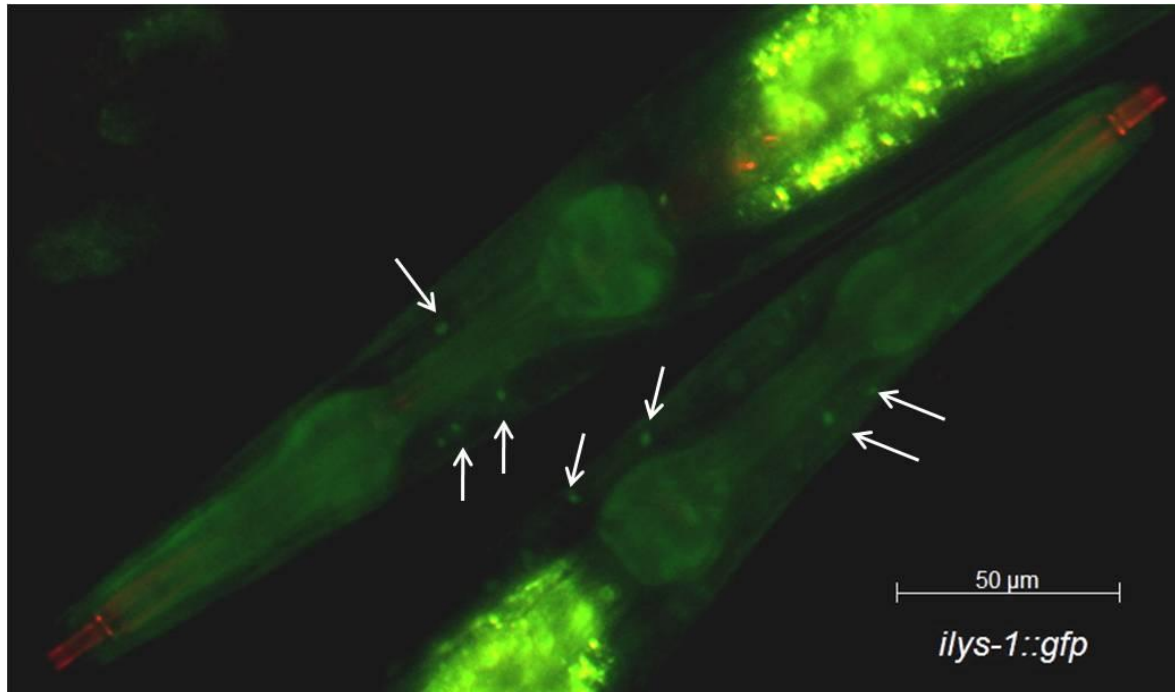


Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Kopfregion von *C. elegans* (*ilys-1::gfp*). Die Fluoreszenzsignale wurden mit zwei verschiedenen Filtern in unterschiedlichen Kanälen aufgenommen und überlagert (rot: dsRed; grün: GFP). Das dsRed-Signal stammt von kurz zuvor aufgenommenen DiI-gefärbten *E. coli*. Der Größenstandard ist unten rechts aufgeführt. Die Pfeile kennzeichnen Kopfneuronen.

Darüber hinaus lassen sich mehrere Neuronen bzw. deren Zellkörper erkennen, in denen ILYS-1::GFP lokalisiert ist (Abb. 11). Es handelt sich nicht um sensorische Amphidneuronen, allerdings wurden die Neuronen auch nicht näher identifiziert. Außer in Kopfneuronen wird *ilys-1* auch in weiteren Neuronen exprimiert, die ebenfalls nicht genau identifiziert werden konnten. Eventuell handelt es sich dabei um Motorneuronen oder Interneuronen. Das beschriebene Expressionsmuster ließ sich im gesamten Körper der transgenen Würmer nachweisen und deutet auf eine universelle Lokalisation in Motorneuronen hin (Abb. 12).

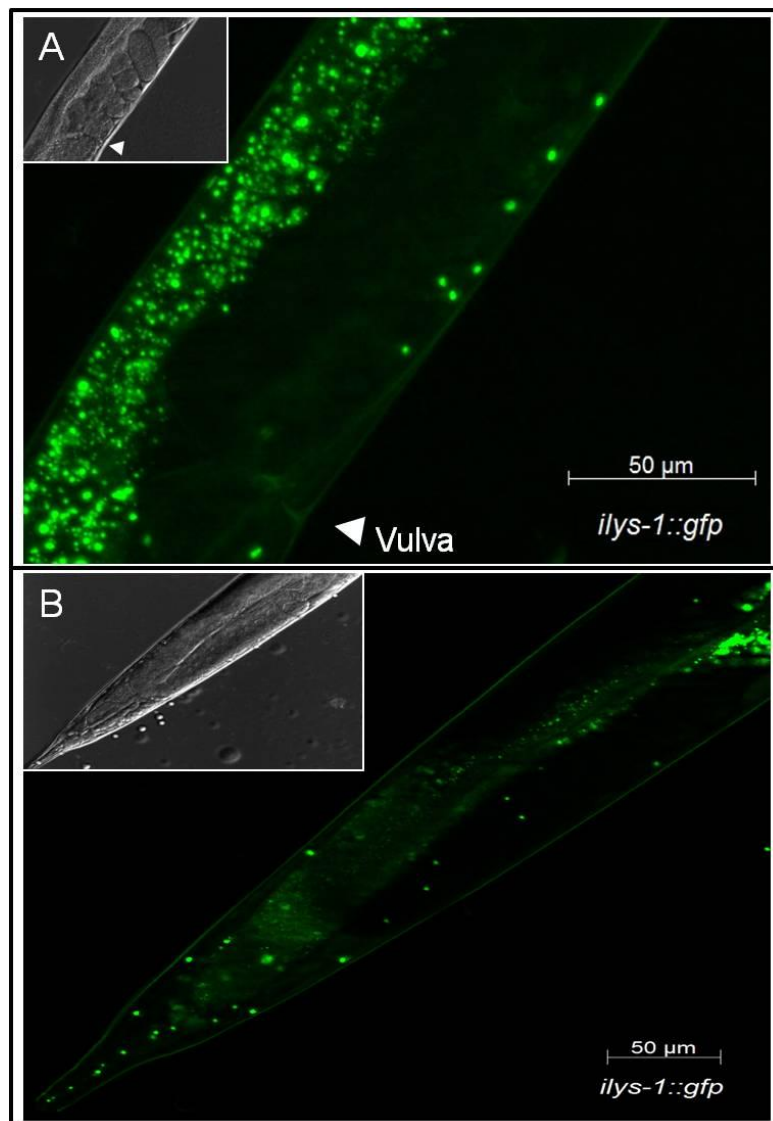


Abb. 12: Aufnahmen von Teilausschnitten transgener Hermaphroditen (*iIys-1::gfp*). Jeweils im großen Bildausschnitt ist die GFP-Fluoreszenz grün visualisiert und im kleineren Bildausschnitt das dazugehörige Durchlichtbild (DIC). Die Größenstandards sind jeweils unten rechts eingeblendet. **A:** Aufnahme des *Midbody* eines adulten Tieres. Der Pfeil zeigt die Vulva. **B:** Aufnahme der Schwanzregion eines Hermaphroditen.

Dass es sich bei den neuronalen Strukturen, in denen *iIys-1* exprimiert wird, um die Vulva innervierende Neuronen handelt, ließ sich bei einem Vergleich mit anatomischen Vorlagen des *Wormatlas* (www.wormatlas.org) ausschließen.

Bei einigen Tieren fluoreszierten ähnliche Strukturen wie in den Würmern, die *ilys-2::gfp* exprimieren (siehe unten). Es ist also möglich, dass die GFP-Signale nicht von Neuronen-Zellkörpern ausgingen sondern von mutmaßlichen Granula in den Hypodermis- oder den *Seam*-Zellen, welche als eine Gruppe von Zellen definiert werden, die entlang der apikalen Mittellinie der Hypodermis liegen. In jedem Falle stehen diese Gewebe im direkten Kontakt mit der Cuticula und somit indirekt mit der Außenwelt.

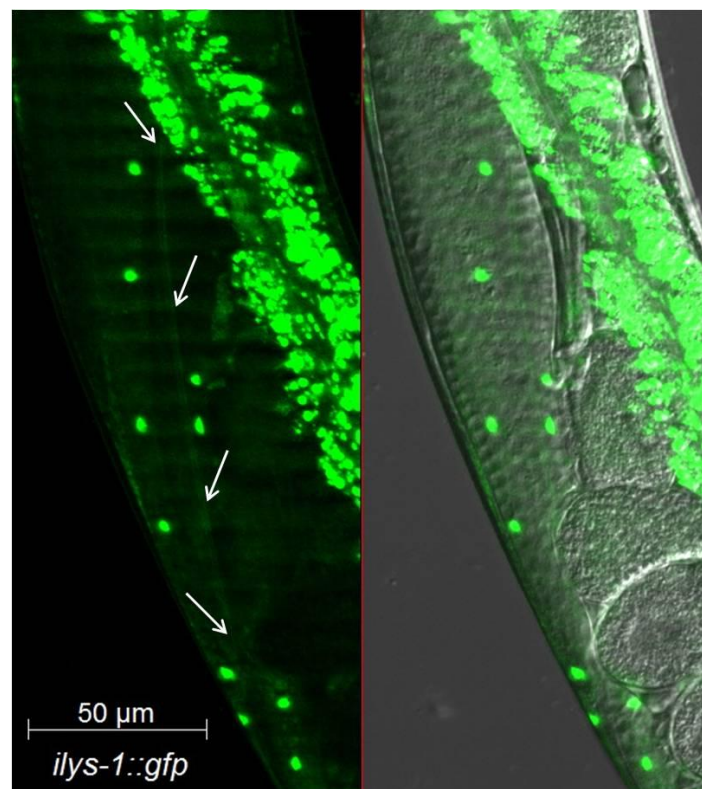


Abb. 13: Aufnahme der mittleren Körperregion eines *ilys-1::gfp*-exprimierenden Wurms. Auf der linken Seite sind der GFP-Kanal (grün), auf der rechten Seite dessen Überlagerung mit dem DIC-Kanal sowie der Größenstandard unten links dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen die Mittellinie der streifenartigen Struktur, von der ein GFP-Signal (neben den punktförmigen Strukturen) ausging.

Die gewebsspezifische Expression war weder in Strukturen des Reproduktions- noch in denen des Verdauungstraktes lokalisiert ist und erstreckte sich stattdessen diagonal darüber (Abb. 13). Es handelte sich um eine streifenartige Struktur mit einer klar definierten Mittellinie, entlang derer sich paarweise konzentrierte Fluoreszenzmaxima dokumentieren ließen, die in Zellkernen oder Granula generiert werden könnten. Da die Zellkerne der so

genannten *Seam*-Zellen in der Regel größer sind, handelt es sich vermutlich um Granula, in denen vermehrt ILYS-1-GFP-Fusionsproteine lokalisiert sind. Generell beschränkt sich das Expressionsprofil von *ilys-1* nicht auf ein spezifisches Gewebe oder eine Körperregion. Ferner zeigten die Lokalisationsstudien, dass es sich bei den *ilys-1::gfp*-exprimierenden Zellen um sehr unterschiedliche Gewebearten handelt, was auf unterschiedliche Funktionen des Lysozyms hindeuten könnte.

3.2.2 Genexpressionsanalyse von *ilys-2*

Um den Ort der Genexpression und der Proteinsynthese des zweiten i-Typ-Lysozyms aus *C. elegans* zu eruieren, wurden entsprechende Reportergenplasmide erfolgreich in Hermaphroditen mikroinjiziert. Wie auch bei ILYS-1 konnten ILYS-2-GFP-Fusionskonstrukte im Darm identifiziert werden (Abb. 14).

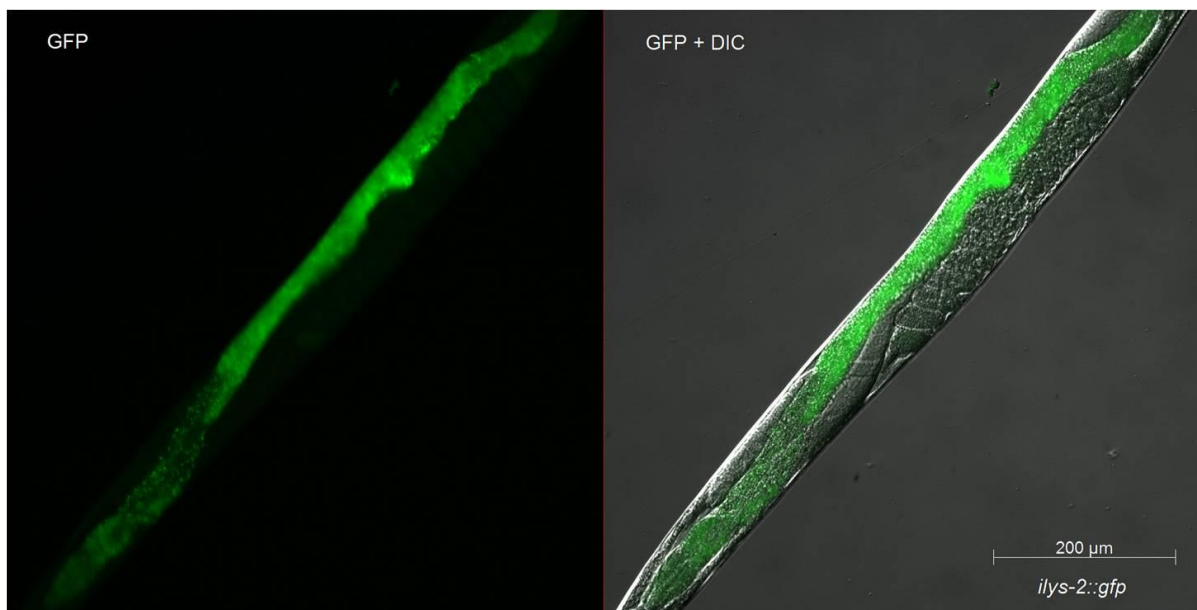


Abb. 14: Übersichtsaufnahme eines *ilys-2::gfp*-exprimierenden *C. elegans*. Gezeigt ist die mikroskopische Aufnahme eines Hermaphroditen im Fluoreszenzkanal (GFP-Filter, grün) und im Durchlichtkanal (DIC); links ist der GFP-Kanal, rechts die Überlagerung beider Kanäle dargestellt. Unten rechts ist der Größenstandard eingeblendet.

Ferner, wie ebenfalls für *ilys-1* beschrieben, wurde in den transgenen *ilys-2::gfp*-Tieren GFP-Fusionsprotein im gesamten Körper oberflächennah generiert, was auf eine Lokalisation in der Hypodermis und der ihr anhängenden Strukturen hindeutet (Abb. 15).

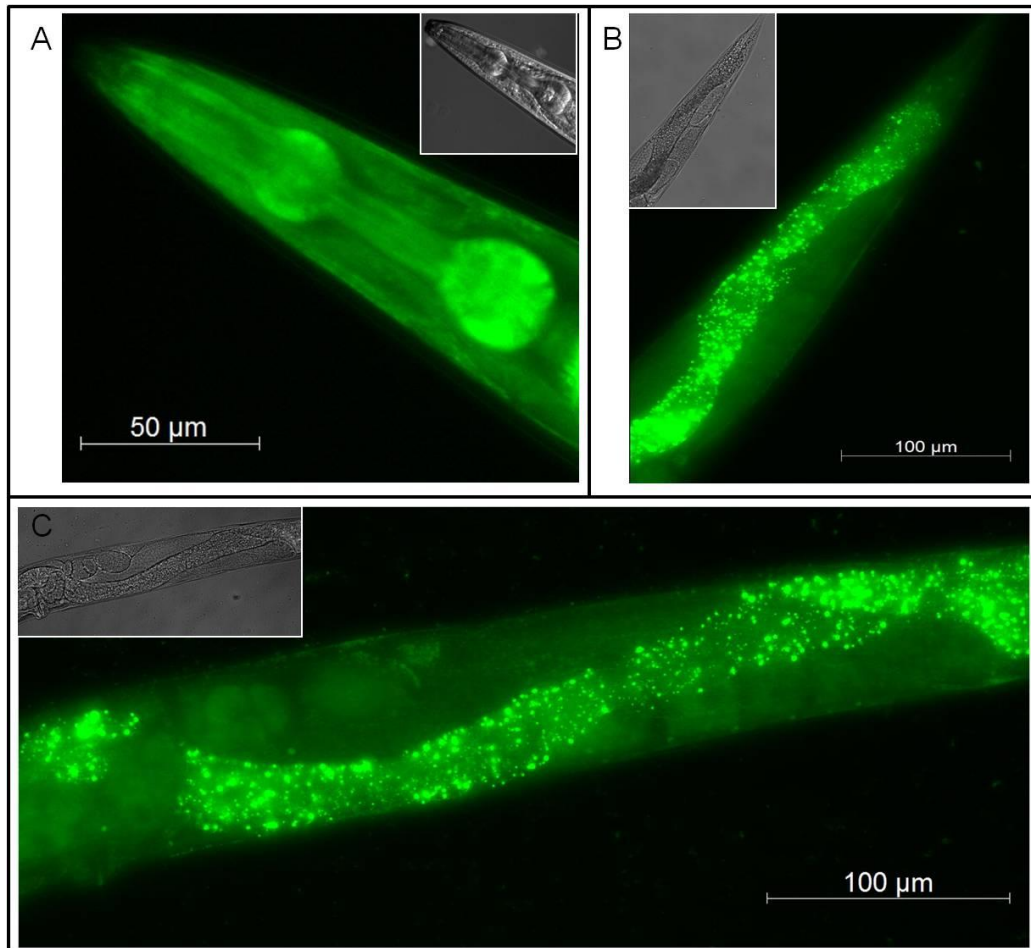


Abb. 15: Aufnahmen der Expression von *ilys-2::gfp* in verschiedenen Körperteilen von *C. elegans*. Jeweils der größere Bildausschnitt zeigt die Dokumentation der GFP-Fluoreszenz, der kleinere das dazugehörige Durchlichtbild (DIC) und die Balken die Größenverhältnisse. **A:** Kopf, **B:** Schwanz und **C:** *Midbody* eines adulten Hermaphroditen.

Die Fluoreszenzsignale gingen über die Autofluoreszenz in *C. elegans* hinaus und konnten eindeutig dem Reporter GFP zugeordnet werden (Abb. 15). Erneut ließ sich die Expression auch im Pharynxgewebe nachweisen, ohne den genauen Zelltyp zu identifizieren (Muskelzellen oder Marginalzellen). Übereinstimmend mit dem oben beschriebenen Expressionsprofil des erstens Lysozyms ließen sich Fluoreszenzsignale entlang einer Linie mit paari-

gen Erscheinungen an der Körperoberfläche erkennen, die wieder den *Seam*-Zellen zugeordnet wurden. Allerdings verwunderte die paarige Anordnung der potentiellen Granula, jedoch wurden bisher keine ähnlichen, zum Beispiel von Neuronen stammende, Strukturen beschrieben. Deswegen wurde weiterhin eine Expression in den *Seam*-Zellen angenommen, die mit der Hypodermis und Cuticula im direkten Kontakt stehen.

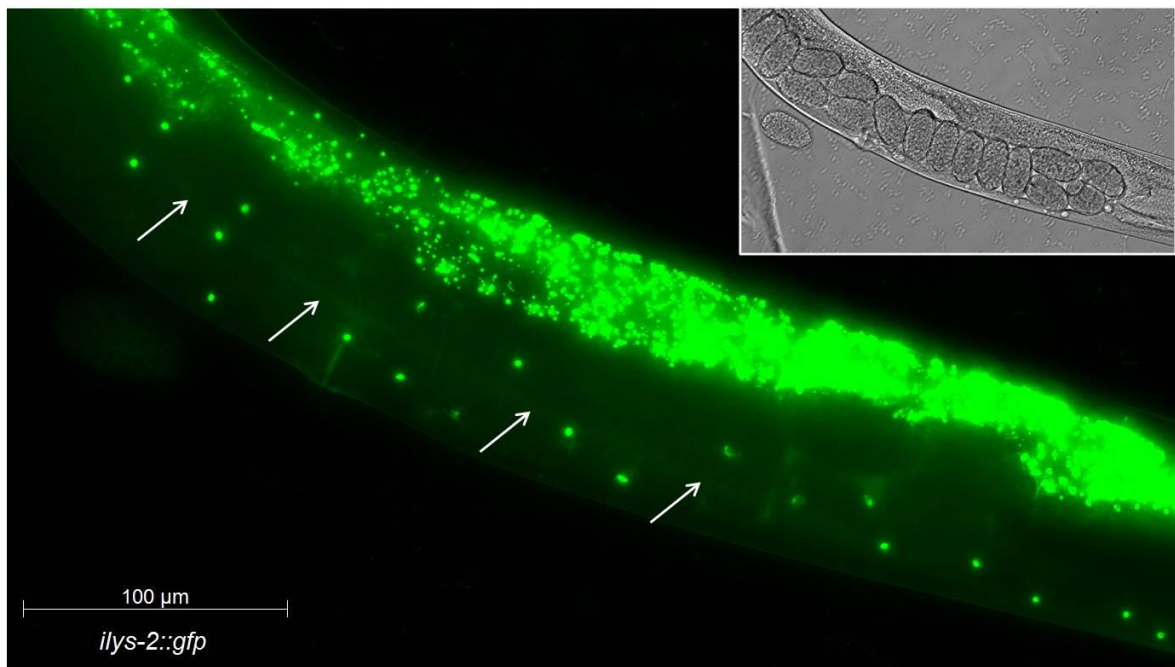


Abb. 16: Midbody eines transgenen *ilys-2::gfp*-Wurmes. Das visualisierte GFP-Signal ist in grün zusammen mit dem Größenstandard unten links und mit der dazugehörigen DIC-Aufnahme im kleinen Bildausschnitt dargestellt. Die Pfeile zeigen den Verlauf einer linienartigen Struktur, von der ebenfalls GFP-Signale ausgingen

Die Aufnahme des Signals der *ilys-2::gfp* exprimierenden Zellen in *C. elegans* bestätigen, dass es sich bei den beschriebenen Strukturen nicht um zum Reproduktionssystem oder Verdauungstrakt zugehöriges Gewebe handelt (Abb. 16). Eventuell wird ILYS-2 auch in einzelnen Neuronen des Kopf- und Schwanzbereiches exprimiert. Da die Fluoreszenz allerdings nur sehr schwach und somit die Detektion kaum möglich war, könnte es sich um geringe Expressionsraten handeln, was aber nicht genau verifiziert werden konnte.

Alles in Allem gleichen sich die Expressionsmuster der beiden i-Typ-Lysozyme *ilys-1* und *ilys-2* in hohem Maße.

3.2.3 Lokalisation von *ilys-3::gfp*-Fusionsprodukten

Anders als bei den vorangegangenen Linien fiel die *gfp*-Reporterexpression in den epithelialen Darmzellen *ilys-3::gfp*-exprimierender Tiere geringer aus, so dass sie sich nicht von der Autofluoreszenz abhob (Abb. 17). Daher wurde nur eine schwache bis gar keine Expression von *ilys-3* im Darm angenommen.

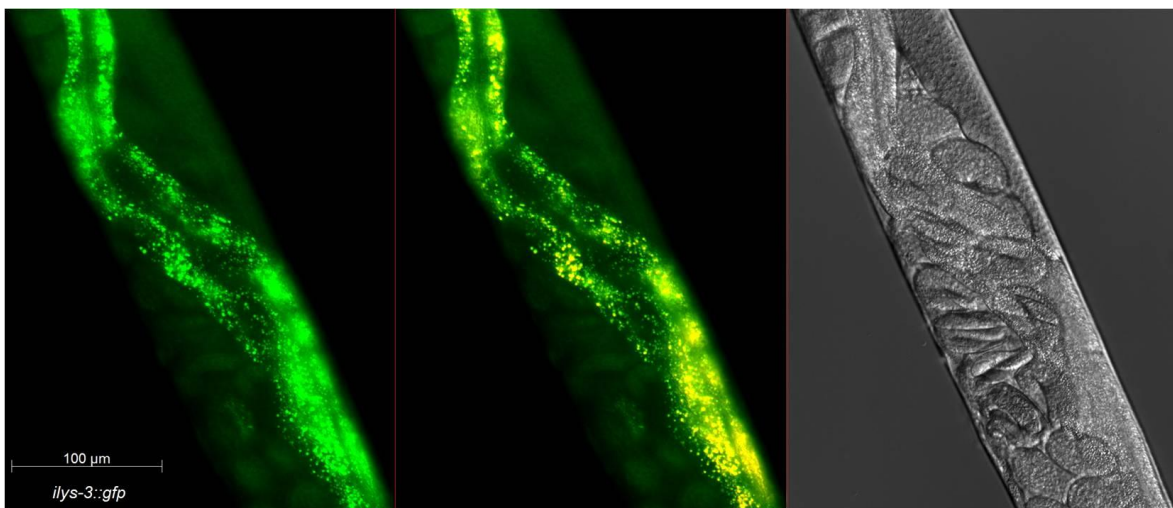


Abb. 17: Aufnahmen eines *ilys-3::gfp*-exprimierenden Hermaphroditen in mehreren Kanälen. Dargestellt sind die mittlere Körperregion und unten links das Größenverhältnis. Links wurde ausschließlich das GFP-Signal, in der Mitte die GFP- und dsRed-Kanäle (überlagert) sowie rechts der Durchlicht-Kanal (DIC) dargestellt.

Überdies war ein Expressionsmuster in der Hypodermis über den Wurmkörper verteilt nachzuweisen, vergleichbar mit dem der bereits beschriebenen Lysozymgene (Abb. 17). Darüber hinaus glichen sich die Orte der Expression im Falle des Pharynxgewebes (Abb. 18). Die universelle Expression nahe der Körperoberfläche konnte ebenfalls erneut illustriert werden (Abb. 18). Schließlich wurde ILYS-3 in Neuronen lokalisiert (Abb. 19). Deutlich ließ sich ein GFP-Reportersignal in den ventralen und dorsalen Nervensträngen erkennen. Um welche Neuronen es sich handelt, wurde nicht bestimmt.

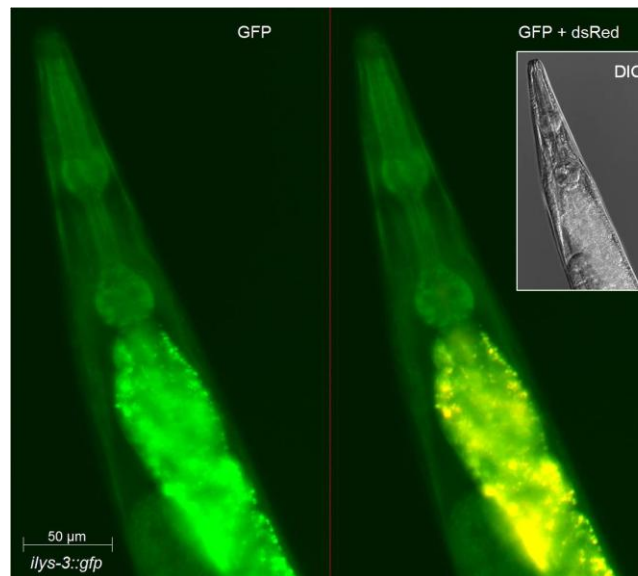


Abb. 18: Fluoreszenzaufnahme des Kopfes eines transgenen Tieres (*iIys-3::gfp*). Aufnahmen einzelner Kanäle (links) und deren Überlagerung (rechts) (GFP: grün, dsRed: rot) sowie DIC im kleinen Bildausschnitt rechts oben. Der Balken links unten gibt das Größenverhältnis an.

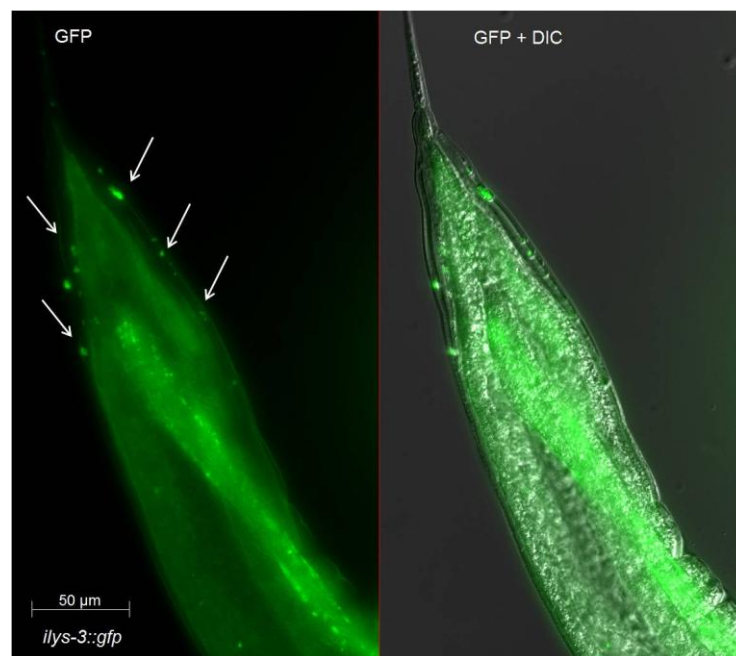


Abb. 19: Aufnahme der fluoreszierenden Schwanzregion eines transgenen *iIys-3::gfp*-Wurmes. Links ist der GFP-Kanal, rechts die Überlagerung des Durchlicht- und GFP-Kanals und unten links der Größenstandard aufgezeigt. Die Pfeile verdeutlichen den Verlauf der Nervenstränge.

3.2.4 Transgene *ilys-4::gfp*-Reporterlinien von *C. elegans*

Die Aufklärung des Genexpressionsmusters und die Lokalisation von ILYS-4 legten sowohl Gemeinsamkeiten als auch spezifische Abweichungen zu den übrigen Invertebraten-Lysozymen dar. Die transgenen Würmer der *ilys-4::gfp*-Linie zeigten die Synthese des Lysozyms im Darm (Abb. 20).

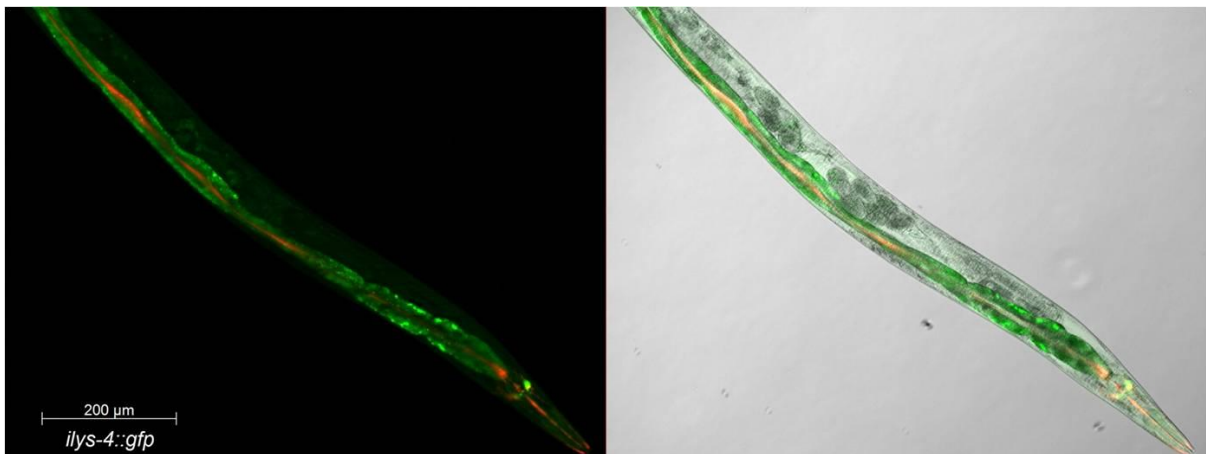


Abb. 20: Übersichtsaufnahme eines *ilys-4::gfp*-exprimierenden Hermaphroditen. In der linken Bildhälfte ist die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (GFP: grün, dsRed: rot) mit dem Größenstandard unten links und in der rechten Hälfte das Abbild aller drei Kanäle (GFP, dsRed, DIC) dargestellt. Der Hermaphrodit wurde zuvor mit DiI-gefärbten Bakterien gefüttert.

Die Expression dieses Lysozyms in der Hypodermis konnte nur schwache oder in einigen Tieren gar nicht ausgemacht werden. Die ILYS-4::GFP-Fusionsprodukte waren in den Darmepithelzellen lokalisiert (Abb. 20). Die Fluoreszenzsignale im Darmlumen, registriert durch den dsRed-Filter, gehen auf von dem Tier aufgenommenen *E. coli*-Futterbakterien zurück, die zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff DiI gefärbt wurden. Der Farbstoff wurde für Kolokalisationsstudien eingesetzt (siehe unten), mit dessen Hilfe die sensorischen Amphid- und Phasmidneuronen von *C. elegans* angefärbt werden. Diese chemosensorischen Neuronen stehen über spezifische Öffnungen in Kontakt zur Außenwelt. Nach Anregung mit Licht bestimmter Wellenlänge kann die Emission des DiI-Farbstoffs durch einen dsRed-Filter dokumentiert werden. Bei Überlappung der Fluoreszenzsignale im GFP- und dsRed-Kanal kann die Expression des zu untersuchenden Gens kolokalisiert und

so der Neuronentyp identifiziert werden. Dies schlägt sich in den Aufnahmen durch die gelbe Farbgebung in den spezifischen Zellen nieder.

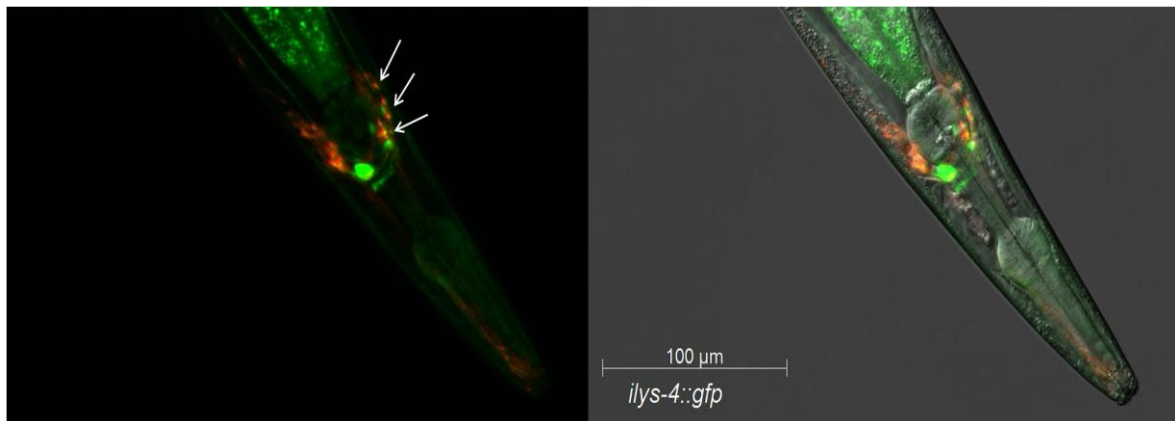


Abb. 21: Kolokalisation der *ilys-4::gfp*-Expression und DiI-gefärbten Amphidneuronen. In der linken Bildhälfte wurden die beiden Fluoreszenzkanäle (GFP: grün, dsRed: rot) und in der rechten zusätzlich der DIC-Kanal überlagert. Die Größenverhältnisse sind durch den Balken demonstriert. Es stellt die Pharynxregion eines Hermaphroditen mit den angefärbten Amphidneuronen (rot, mit Pfeilen indiziert) dar.

Neben der Kolokalisation konnten weitere prominente GFP-Signale in der Pharynxregion gezeigt werden, auf die später gesondert eingegangen werden soll (Abb. 21). Bei den Aufnahmen durch die Fluoreszenzfilter traten minimale Verschiebungen des Objekts auf, weswegen sich die Projektionen der beiden Kanäle nicht vollständig überdecken. Es konnte jedoch eindeutig eine Expression in zumindest drei Amphidneuronen am terminalen Bulbus des Pharynx identifiziert werden. Ferner lassen sich die rot gefärbten Dendriten dieser sensorischen Neuronen, die zu den am Mund gelegenen Amphidporen verlaufen, ausmachen. Die feinen Nervenfasern erscheinen in der Projektion rot, zeigten im Mikroskop aber auch ein schwaches GFP-Signal. Somit konnte die spezifische Expression von *ilys-4* in Amphidneuronen (Zellkörper und Dendriten) nachgewiesen werden. Außerdem gelang die Identifikation einer zellspezifischen *ilys-4::gfp*-Expression in den terminal gelegenen Phasmidneuronen, die sich ebenfalls mit DiI anfärben lassen und, wie oben erwähnt, zu den sensorischen Neuronen mit Öffnungen zur Außenwelt gehören. Die Kolokalisation des ILYS-4-GFP-Fusionsproteins konnte in allen drei Phasmidneuronen (PHA, PHB und PHC) erreicht werden (Abb. 22). Die Phasmidneuronen sind paarig angelegt.

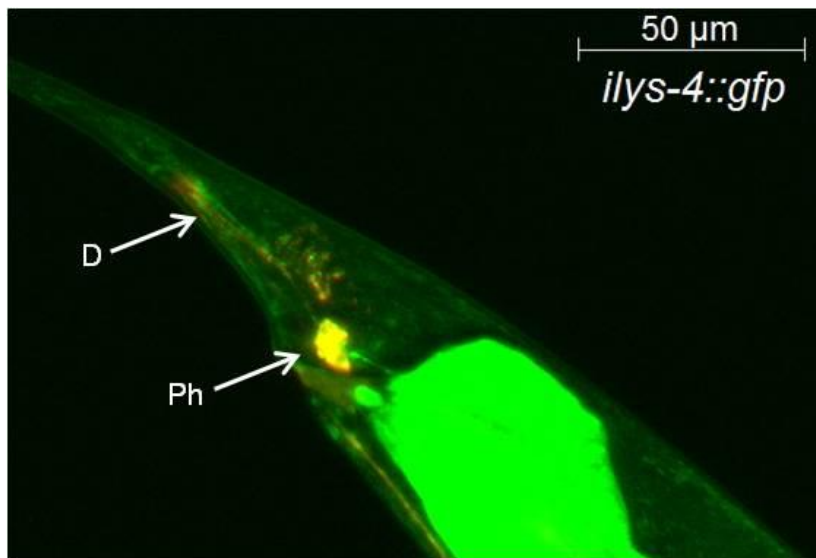


Abb. 22: Fluoreszenzaufnahme der Phasmidneuronen mit *ilys-4::gfp*-Expression. Dargestellt ist die Kollokalisation der DiI gefärbten Phasmidneurone (rot) und der ILYS-4::GFP-Fusionsproteine (grün). Die Detektion erfolgte über zwei Kanäle mit einem dsRed- und einem GFP-Filter, das Größenverhältnis wird durch den Balken rechts oben markiert. **D** weist auf die Dendriten der und **Ph** auf die Zellkörper der Phasmidneuronen hin.

In der Projektion zeichneten sich deutlich sichtbar die Dendriten der Phasmidneuronen rot ab, die ebenfalls ein GFP-Fluoreszenzsignal aufweisen.

Ein Expressionsmuster, welches ausschließlich in den *ilys-4::gfp*-exprimierenden Würmern gefunden wurde, zeigte die Lokalisation in spiralartigen Strukturen, die sich durch den ganzen Körper der Tiere zogen. An den feinen Linien-Strukturen traten wiederholt konzentrierte GFP-Signale auf. Wahrscheinlich gingen diese von Motorneuronen-Zellkörpern und deren Dendriten aus, da keine anderen Gewebe derartige Strukturen oder Muster in *C. elegans* bilden. Unterstützt wurde diese Hypothese durch mehrere Querverbindungen dieser Linien entlang der Körperachse, von denen ebenfalls ein GFP-Signal ausging (Abb. 23). Die Zellkörper, von denen ein GFP-Signal ausging, traten im Bereich der Vulva vermehrt auf.

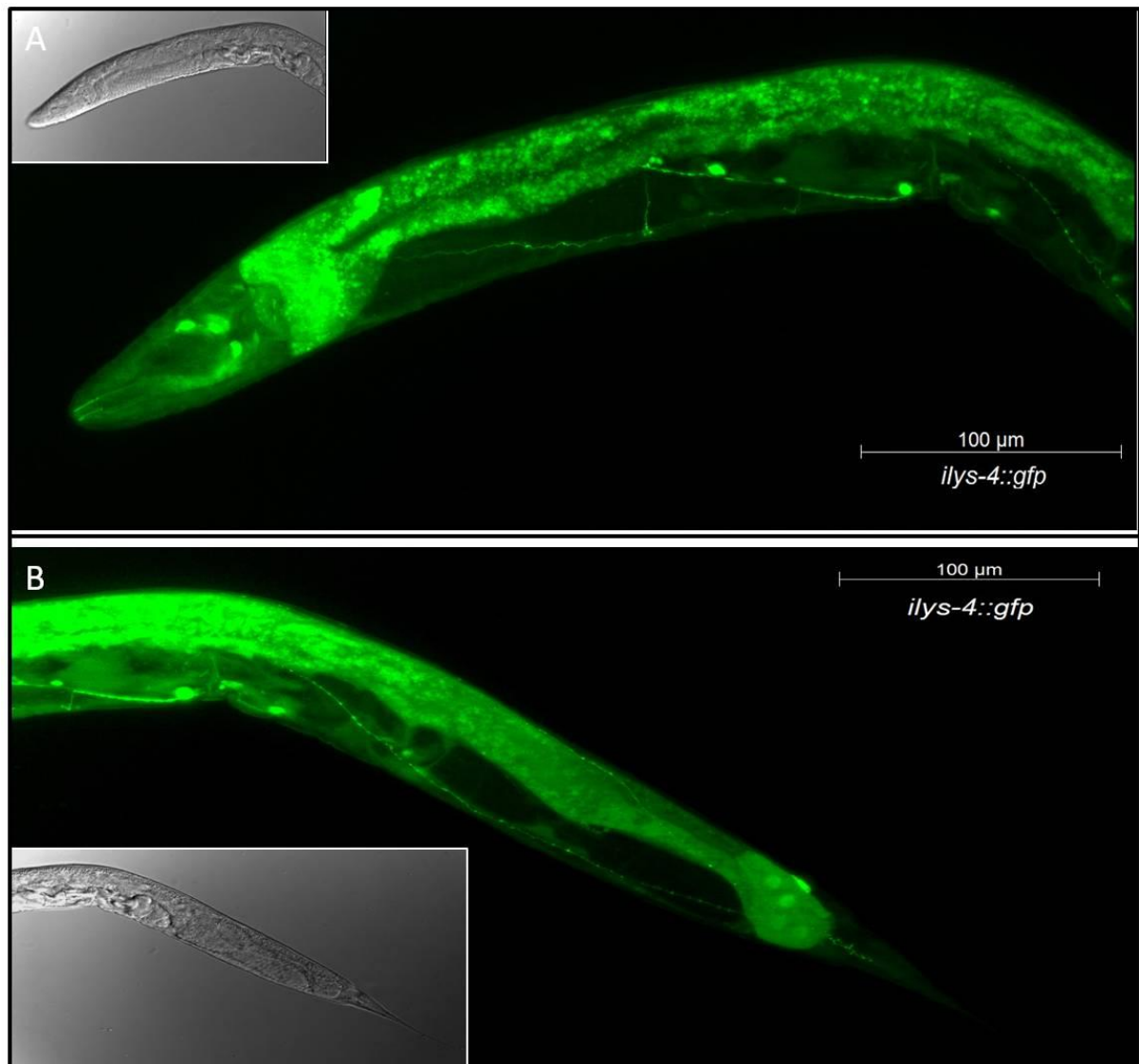


Abb. 23: Dokumentation der *ilys-4::gfp*-Expression in einem jungen Hermaphroditen. Die Detektion erfolgte über einen GFP-Filter, die Fluoreszenz ist grün dargestellt, jeweils in den kleinen Bildausschnitten die dazugehörigen DIC-Aufnahmen, die Größenverhältnisse in Form der Balken. **A:** Vorderer Körperabschnitt, **B:** Hinterer Körperabschnitt des Wurms.

Die mutmaßlichen Dendriten erstrecken sich bis weit in die Schwanzregion der Würmer und dessen ungeachtet, scheint das Fusionsprotein auch in den ventralen und dorsalen Nervensträngen vorzuliegen (Abb. 24). Die Nervenstränge durchziehen die Würmer apikal an der Körperwand und bündeln Dendriten mehrerer Neuronen.

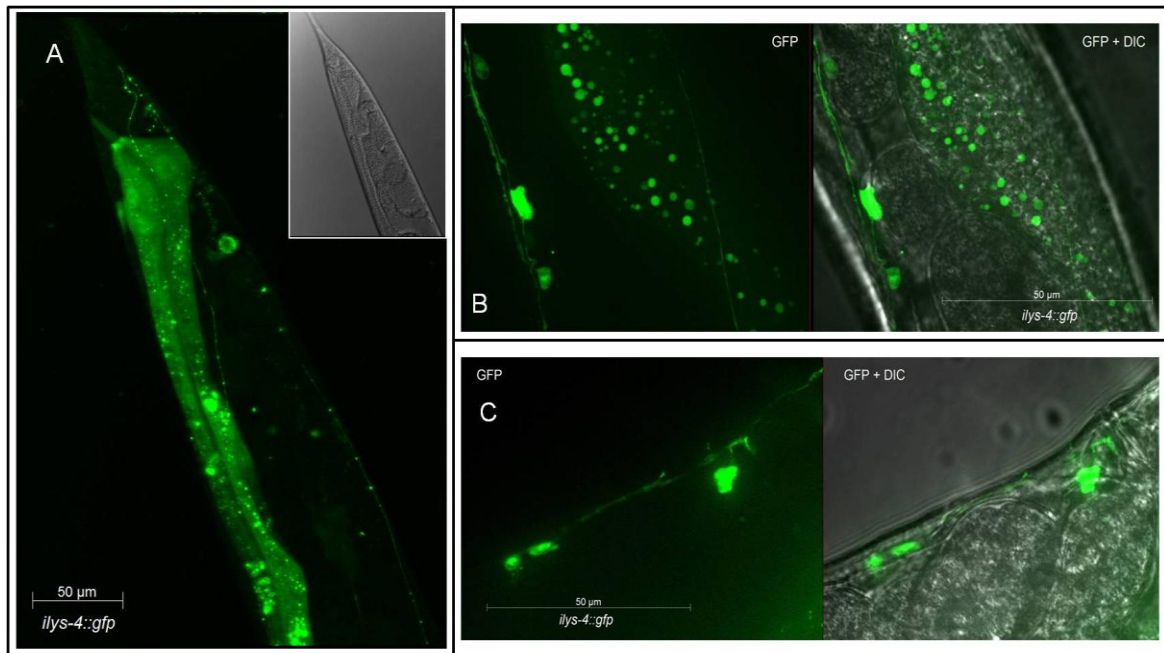


Abb. 24: Vergrößerungen neuronaler *ilys-4::gfp*-exprimierender Strukturen in *C. elegans*. Die Detektion des GFP-Signals ist grün dargestellt, die Größenverhältnisse als Balken integriert; in den Teilabbildungen **B** und **C** ist links der GFP-Kanal, rechts die überlagerte Projektion des GFP- und DIC-Kanals und in **A** der GFP-Kanal und im kleinen Bildausschnitt das dazugehörige DIC-Bild gezeigt. **A:** Schwanzregion, **B-C:** Vulvaregion eines Hermaphroditen.

Eine Besonderheit bildet die Lokalisation der *ilys-4::gfp*-Expression im Exkretionssystem, welches in *Caenorhabditis elegans* lediglich von fünf Zellen geformt wird (Abb. 25). Dazu gehören eine prominente exkretorische Zelle, eine Kanalzelle, eine Porenzelle und zwei paarig organisierte Drüsenzellen, die am terminalen Bulbus des Pharynx liegen und von denen das so genannte H-System und eine exkretorische Pore durch die Cuticula nach außen ausgehen. Die prominente exkretorische Zelle liegt dorsal von den restlichen und zweigt sich in die exkretorischen Kanäle des H-Systems auf. Die Zellausläufer und Zellkörper der paarigen Drüsenzellen sind unter der exkretorischen und der Kanal-Zelle lokalisiert. Die einzelnen Schnittbilder, die beim Durchfokussieren von dorsal nach ventral durch die Pharynxregion eines *ilys-4::gfp* exprimierenden, transgenen Wurms aufgenommen wurden, verdeutlichen die räumliche Lage der Fluoreszenzsignale entlang der dorso-ventralen Achse in zwei präparierten Hermaphroditen (Abb. 26).

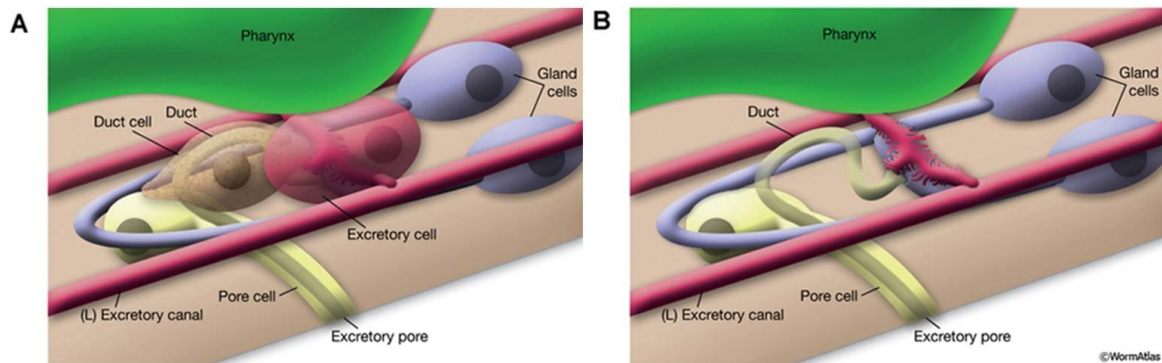


Abb. 25: Schematische Darstellung des Exkretionssystems von *C. elegans*. A und B zeigen unterschiedliche Ebenen im Körper. Dargestellt sind die fünf Zellen (Exkretorische, Kanal-, Poren-Zellen sowie die paarigen Drüsenzellen) des Exkretionssystems. Die Abbildung wurde *WormAtlas* entnommen und geringfügig verändert (<http://www.wormatlas.org>; Zugriff: 15.08.2010).

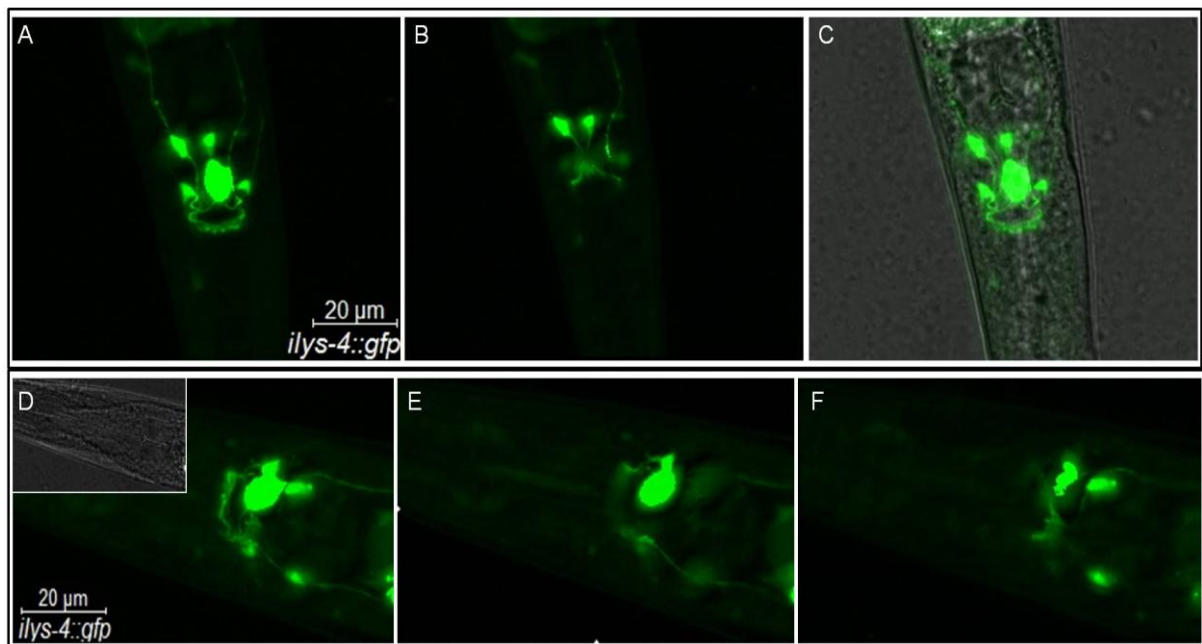


Abb. 26: GFP-Fluoreszenzaufnahmen verschiedener Schnittebenen von dorsal nach ventral in einem *ilys-4::gfp*-exprimierendem Exkretionssystem von *C. elegans*. Die Aufnahme erfolgte über einen GFP- (grün) und einem Durchlicht-Kanal (DIC). Jeweils die Aufnahmen von A-C und D-F zeigen Bilder ein und desselben Tieres. A: Überlagerte Projektion zweier Ebenen mit allen Zellen des Exkretionssystems, B: untere Ebenen mit den paarigen Drüsenzellen, C: Überlagerte Projektion beider Ebenen und dem dazugehörigen Durchlichtbild, D: Überlagerte Projektion der GFP-Signale beider Ebenen mit dem dazugehörigen DIC-Bild im kleinen Ausschnitt, E: dorsal gelegene Ebene mit der exkretorischen Zelle und deren Ausläufern und F: ventral gelegene Ebene mit den Ausläufern und Zellkörpern der paarigen Drüsenzellen sowie der Kanal- oder Porenzelle. Die beiden Balken zeigen die Größenverhältnisse.

Die Fluoreszenzsignale grenzten sich klar von den Signalen anderer Zelltypen wie zum Beispiel denen der Neuronen ab (Abb. 26). Die räumliche Struktur des Exkretionssystems lässt sich beim Fokussieren durch die verschiedenen Ebenen entlang der dorsoventralen Achse gut nachvollziehen. Die Signale in der exkretorischen Zelle waren teilweise so stark, dass sie andere überlagerten. Bei den Aufnahmen ließen sich ferner dendritische Ausläufer der Zellen des Exkretionssystems erkennen. Lediglich in den exkretorischen Kanälen des H-Systems konnten keine GFP-Signale registriert werden. Die gewebsspezifische Expression in spiralförmigen Motorneuronen und dem Exkretionssystem beschränkte sich auf das *ilys-4* von den fünf Genen für die mutmaßlichen i-Typ-Lysozyme aus *C. elegans*. Die Lokalisation der des Fusionsproteins im Darm stimmte mit den anderen Lysozymen überein. Die Identifikation der Genexpression und Proteinsynthese in Amphid- und Phasmidneuronen konnte auch für eine andere transgene Linie gezeigt werden (siehe unten).

3.2.5 Lokalisation der Genexpression und Proteinsynthese von ILYS-5

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Charakterisierung des ILYS-5 aus *Caenorhabditis elegans*. Um mögliche Funktionen dieses Proteins aufzudecken, ist es unabdingbar, den Ort der Genexpression bzw. der Proteinsynthese zu kennen. Wie bei den vorangegangenen Genen wurden auch in diesem Fall transgene Würmer, die ein *gfp*-Reportergenkonstrukt exprimierten, generiert. Es konnte eine starke Expression im Darmgewebe identifiziert werden, die auch in den Larvenstadien auftrat. Das *ilys-5*-Gen wird demnach anscheinend in allen Entwicklungsstadien konstitutiv im Darm exprimiert (Abb. 27). Bei den Larvalstadien von *C. elegans* gibt es nur geringfügige Autofluoreszenzerscheinungen. Das Fluoreszenzsignal im Darm adulter Hermaphroditen im Vergleich zu denen der anderen GFP-Reporter-Linien stärker, was eine höhere Expressions- und Syntheserate im Darmepithel vermuten lässt. Das ILYS-5 übernimmt augenscheinlich eine zentrale Rolle in diesem Gewebe. In der Hypodermis hingegen wird *ilys-5* nur schwach oder gar nicht exprimiert. Besonders prominent erschien das GFP-Signal im mittleren Bereich des Darms.

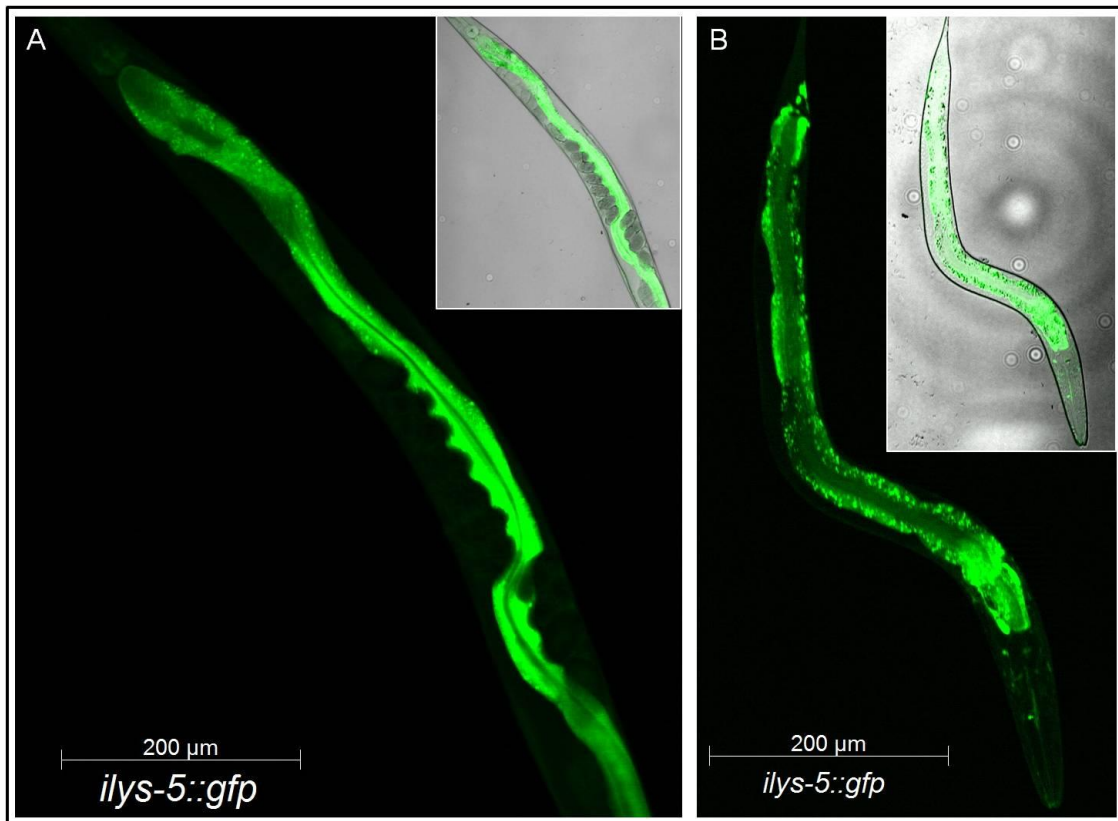


Abb. 27: Übersichtsbilder *i_{lys-5}::gfp*-exprimierender *C. elegans*. Dargestellt sind Aufnahmen eines Kanals mit einem GFP-Fluoreszenzfilter (grün) und jeweils im kleinen Bildausschnitt die Überlagerung dieses Bildes mit dem Bild des Durchlicht-Kanals (DIC). Der Größenstandard ist als Balken gekennzeichnet. **A:** Adulter Hermaphrodit, **B:** Larvenstadium.

Weniger prominent, aber durchaus abgehoben von möglicher Autofluoreszenz, war weiterhin die GFP-Fluoreszenz im Pharynxgewebe. Die *i_{lys-5}*-Genexpression im Pharynx fällt etwas schwächer aus als die der anderen Lysozymgene und konzentriert sich eher auf den terminalen Bulbus (Abb. 28).

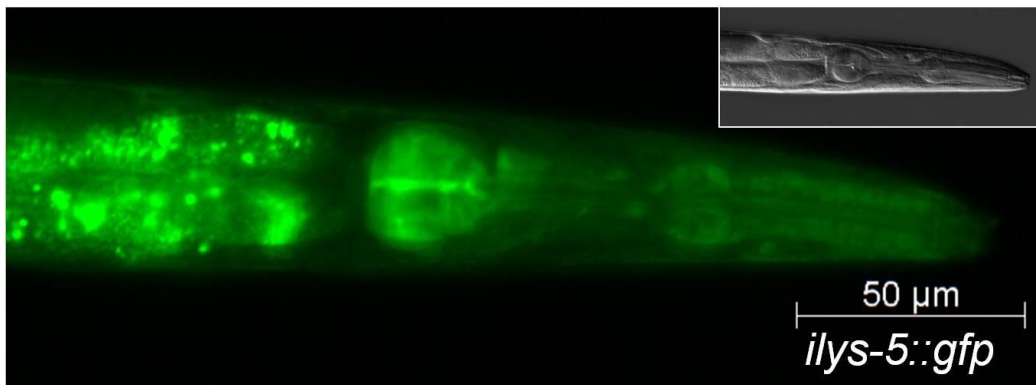


Abb. 28: Aufnahme des Kopfbereichs eines ILYS-5-GFP generierenden Wurms. Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe eines GFP-Fluoreszenzfilters (grün) und einem Durchlicht-Kanal (DIC, kleines Bild), der eingeblendete Balken zeigt das Größenverhältnis.

Ferner gelang die Analyse der Genexpression von *ilys-5* in der Schwanzregion eines *C. elegans*-Männchens (Abb. 29). In den so genannten Strahlen (*rays*) des Schwanzes eines Männchens verlaufen auch sensorische Neuronen, von denen wahrscheinlich das GFP-Signal ausging, was jedoch nicht verifiziert wurde.

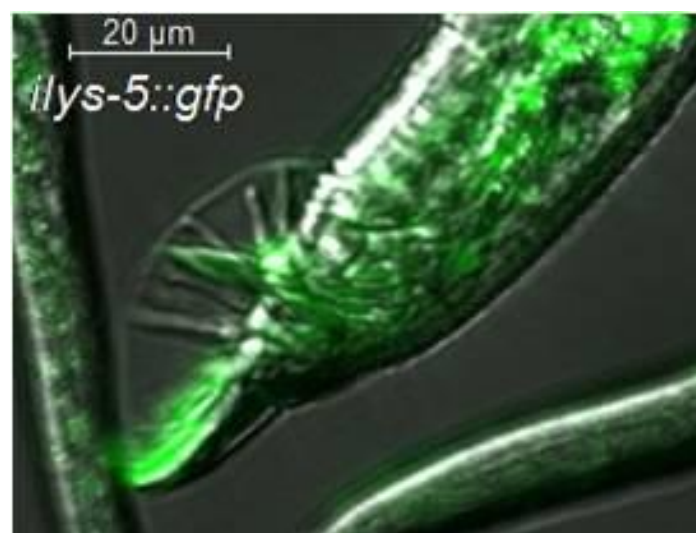


Abb. 29: Schwanz eines *ilys-5::gfp*-exprimierenden Männchens. Gezeigt ist ein Überlagerungsbild eines Durchlicht (DIC)- und eines GFP-Kanals, der Balken markiert das Größenverhältnis.

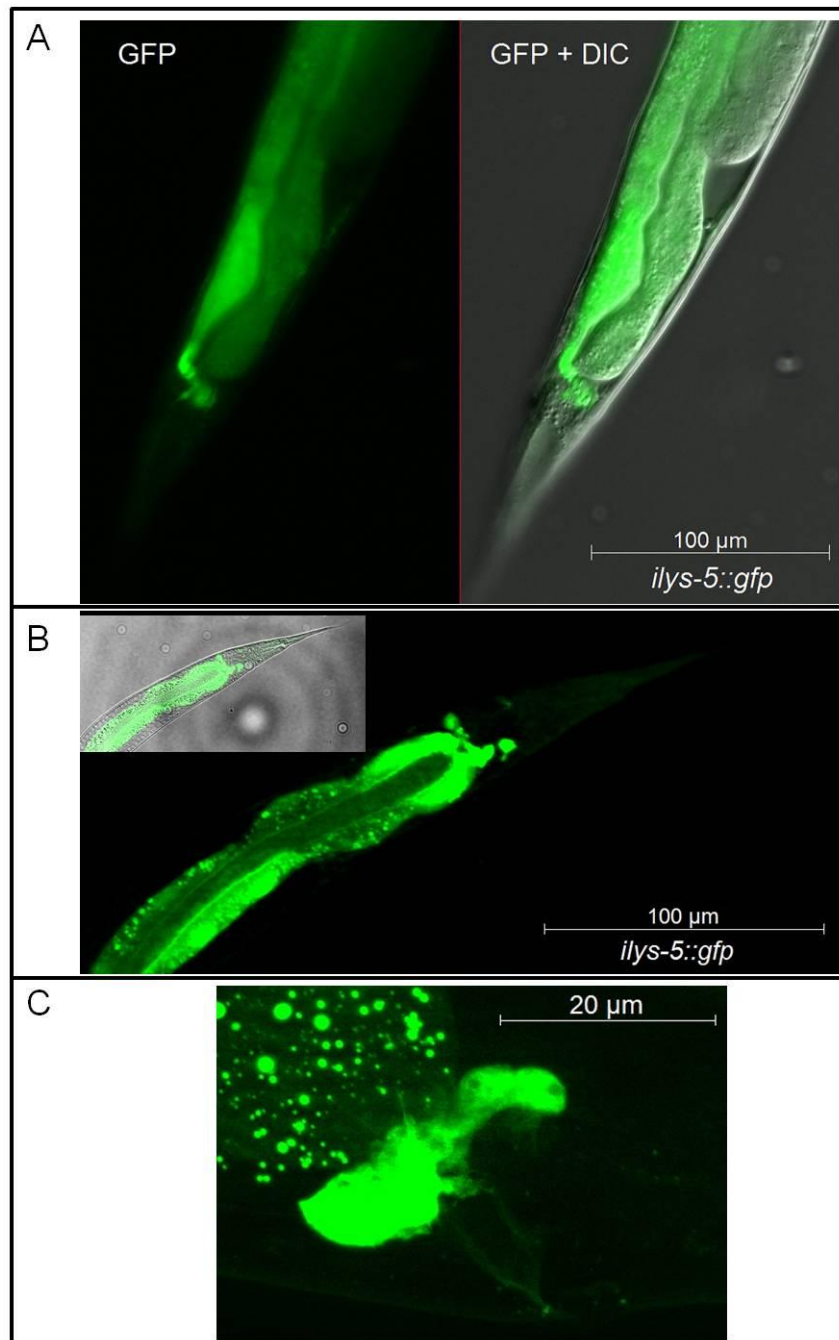


Abb. 30: Abbildungen der rektalen Drüsenzellen von *C. elegans* (*ilys-5::gfp*). Es ist der GFP-Filterkanal (grün), der Durchlicht-Kanal (DIC) und in Form eines Balkens der Größenstandard dargestellt. **A:** Schwanzregion mit Enddarm und rektalen Drüsenzellen eines Hermaphroditen, links GFP-Kanal, rechts Überlagerung beider Kanäle, **B:** gleicher Körperbereich wie A, anderes Tier und Überlagerungsprojektion im kleinen Bildausschnitt und **C:** Vergrößerungsansicht der rektalen Drüsenzellen eines Hermaphroditen (GFP-Filter).

Eine Besonderheit im Expressionsmuster von *ilys-5* war die Lokalisation in den rektalen Drüsenzellen des Darms (Abb. 30). Diese Drüsenzellen sind direkte Anhänge des Darms und in Afternähe organisiert. Es handelt sich um drei große Zellen (rect_D, rect_VR und rect_VL), die einen Ring um das rektale Ventil (*rectal valve*) bilden und in einer Ebene liegen. Sie sind posterior der Klappe (*valve*) direkt mit dem Darmlumen verbunden. Man schreibt ihnen sekretorische Funktionen zu, speziell von verdauungsspezifischen Enzymen, die sie ins caudale Lumen des Darms sezernieren sollen. Der Enddarm von *C. elegans* ist verglichen mit dem mittleren Teils des Darms geringfügig aufgebläht (www.wormatlas.org). ILYS-5 wird demnach möglicherweise in den Enddarm sezerniert. Die Synthese von ILYS-5 in dem beschriebenen Gewebe wird in folgender Abbildung illustriert. In der Vergrößerungsansicht der Abbildung lassen sich auch dendritenartige Anhänge erkennen, die jedoch nicht näher identifiziert wurden.

Weiterer Genexpressions- und Proteinsyntheseort von *ilys-5* und seiner Genprodukte waren Kopf- und Schwanzneuronen. Einige davon konnten nicht genau identifiziert werden, während es sich bei den anderen um alle drei Phasmid- und drei der Amphidneuronen handelte (Abb. 31). Dabei handelt es sich um die gleichen Amphidneuronen wie bei den *ilys-4::gfp*-exprimierenden Würmern. Die drei identifizierten Amphidneuronen liegen an dem terminalen Bulbus des Pharynx (Abb. 32). Bei der Aufnahme der Phasmidneuronen erkennt man ebenfalls die rektalen Drüsenzellen, die anterior der kolokalisierten Neuronen liegen (Abb. 32).

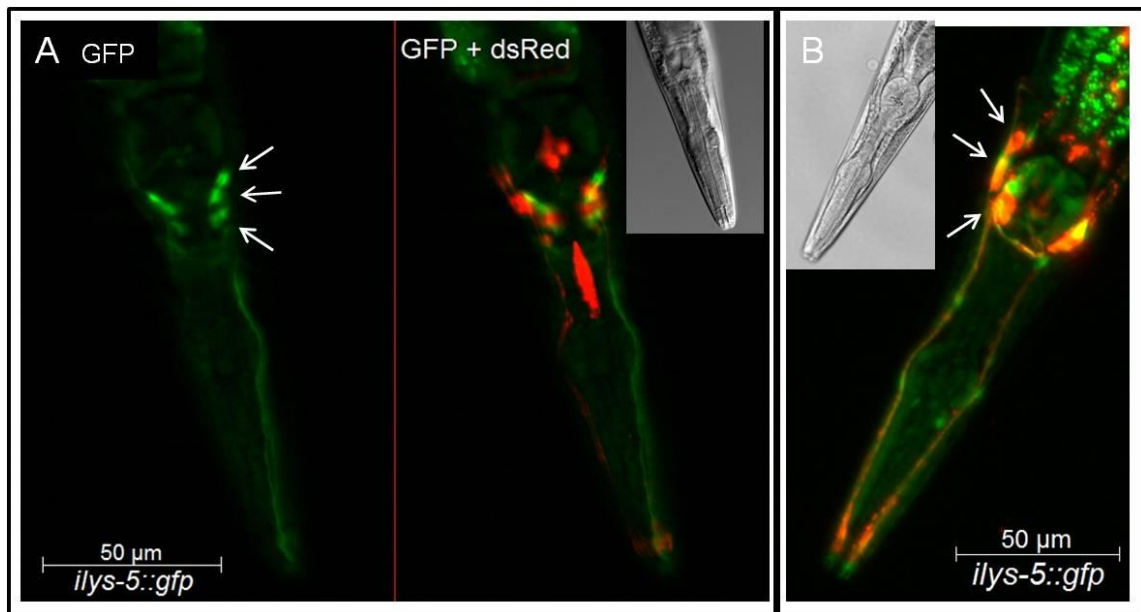


Abb. 31: Kolokalisation der DiI gefärbten Amphid- und der *iIys-5::gfp*-exprimierenden Neuronen. Es sind Aufnahmen der Kopfregionen zweier Hermaphroditen gezeigt. Die GFP-Signale (grün) und die DiI-Fluoreszenz (rot) wurden durch unterschiedliche Kanäle sowie die dazugehörigen DIC-Aufnahmen (jeweils im kleinen Bildausschnitt) und außerdem die Größenverhältnisse als Balken dokumentiert. Die Pfeile weisen auf die kolokalisierten Amphidneuronen.

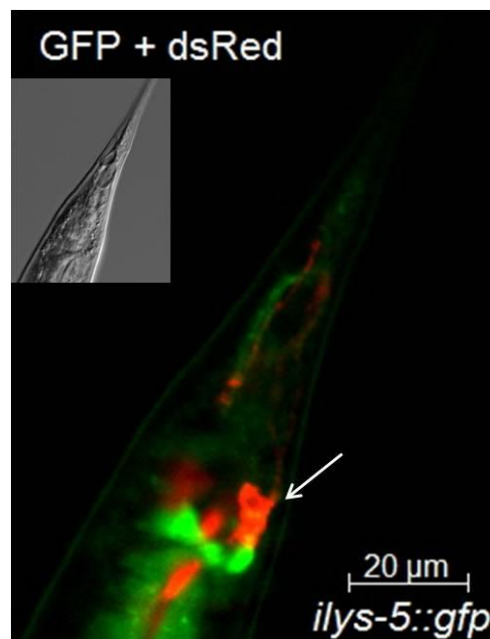


Abb. 32: Kolokalisation der DiI- und GFP-Fluoreszenz in der Schwanzregion eines *iIys-5::gfp*-Wurmes. Im großen Bildausschnitt wurden die GFP (grün)- und dsRed (rot)-Kanäle überlagert, der kleine Bildausschnitt zeigt die dazugehörige DIC-Aufnahme. Untern rechts ist der Größenstandard eingeblendet. Der Pfeil weist auf die nebeneinander liegenden Phasmidneuronen hin.

Zusätzlich zu der Lokalisation im Verdauungs- und Nervengewebe konnte die Expression des *ilys-5*-Gens also in einem weiteren Gewebe nachgewiesen werden. Dies konnte für keines der anderen i-Typ-Lysozyme gezeigt werden. Die Genexpression und Proteinsynthese von *ilys-5* im Reproduktionssystem stellt folglich eine Besonderheit im Expressionsprofil dar. Das GFP-positive Gewebe konnte eindeutig den Spermatheken (Samentaschen) zugeordnet werden (Abb. 33). Die Spermathek hat eine Akkordeon-ähnliche Struktur inne. Sie besteht aus 24 Zellen, die in zwei regionalen Gruppen organisiert sind. Acht von ihnen formen distal einen schmalen Flur und 16 proximal eine Taschen-ähnliche Kammer, welche die Spermien enthält.

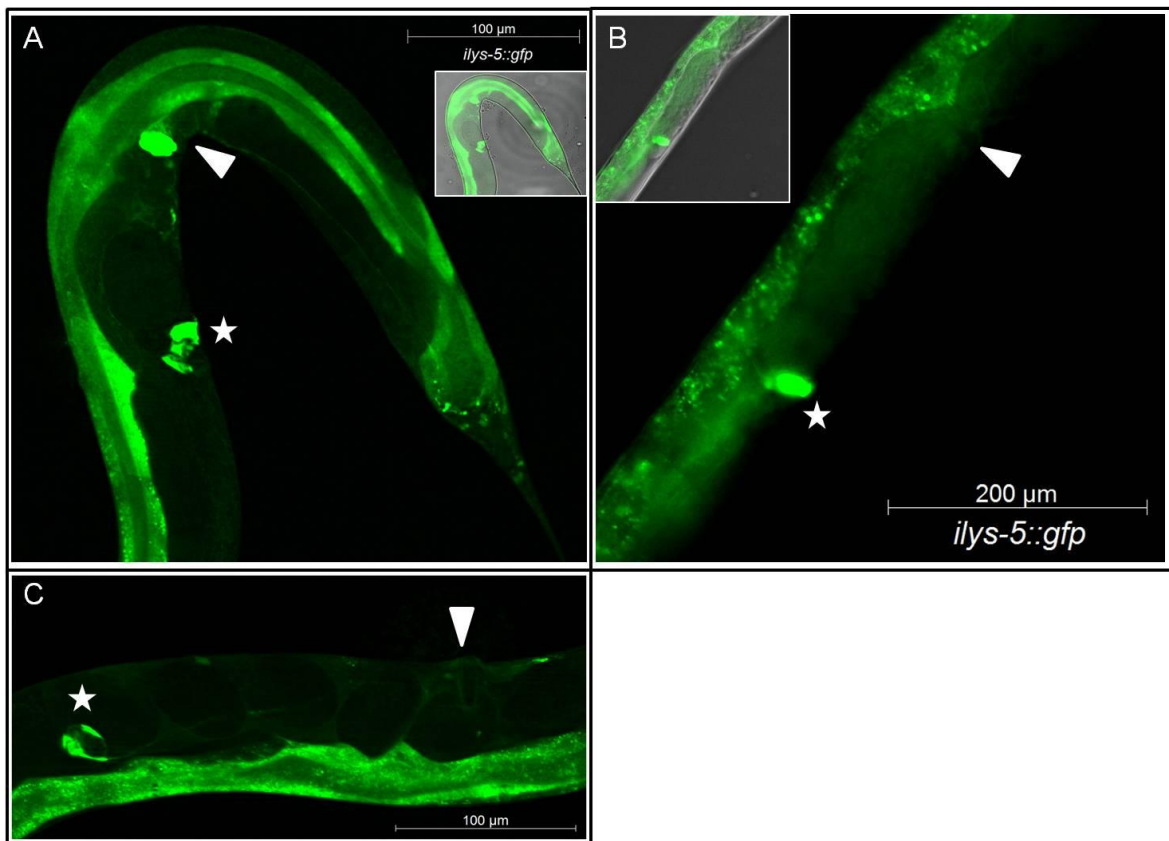


Abb. 33: Aufnahmen der Midbody-Regionen mehrerer *ilys-5::gfp* exprimierender Hermaphroditen. Dokumentiert wurde die GFP-Fluoreszenz über einen GFP-Filterkanal (grün) und die Durchlichtaufnahme (DIC). Jeweils als Balken sind die Größenverhältnisse und jeweils in den kleinen Bildausschnitten die Überlagerungsbilder beider Kanäle gezeigt. Die weißen Pfeile kennzeichnen die Vulva, die Sterne die Spermatheken. Die Bilder A-C sind Aufnahmen verschiedener Tiere.

In den Spermatheken findet die Fertilisation der Oocyten statt (Kimble und Hirsh, 1979; McCarter *et al.*, 1997). Die Rolle von ILYS-5 in diesen Organen ist bisher nicht bekannt.

Tab. 3: Gewebsspezifische Lokalisation der *ilys*-Genexpression und deren Genprodukten. Es sind die Gewebestrukturen angegeben, in denen die Detektion der GFP-Fluoreszenzsignale, ausgelöst durch die mit dem jeweiligen Genprodukt fusionierten Reportergerneprodukte, möglich war. √: Expression vorhanden.

Identifiziertes Gewebe	<i>ilys-1</i>	<i>ilys-2</i>	<i>ilys-3</i>	<i>ilys-4</i>	<i>ilys-5</i>
Darm	√	√	(√)	√	√
Pharynx	√	√	√	(√)	(√)
rektale Drüsenzellen					√
Hypodermis	√	(√)	√		
<i>Seam</i> -Zellen	√	(√)			
Kopf-/Schwanzneuronen	√	(√)	√	√	√
darunter Amphid-/Phasmidneuronen				√	√
Motorneuronen				√	
Exkretionssystem				√	
Spermatheken					√

Somit werden die *ilys*-Gene im Bereich des Darms, des Pharynx und der undefinierten Kopf- und Schwanzneuronen vermutlich gemeinsam, wobei die Expression von *ilys-3* nur schwach im Darm registriert wurde (vgl. Tab. 3). Ein deutliches GFP-Fluoreszenzsignal in dem dorsalen und ventralen Nervenstrang konnte nur in den *ilys-2::gfp*-, *ilys-3::gfp*- und *ilys-4::gfp*-Linien beobachtet werden, ist aber bei den anderen nicht ausgeschlossen. Schließlich scheint die Synthese von ILYS-5 in den rektalen Drüsenzellen und den Spermatheken ein einzigartiges und spezifisches Charakteristikum unter den i-Typ-Lysozymen zu sein.

3.3 *Rekombinante Synthese und Präparation von ILYS-5*

Bei vorangegangenen Versuchen konnte die enzymatische Hauptaktivität in Extrakten aus Flüssig-Massenkulturen von *C. elegans* einem i-Typ-Lysozym zugeordnet werden. Bei diesen Experimenten zur Isolierung von natürlichem Lysozym wurde das teilgereinigte, mutmaßliche Lysozym mit einer massenspektrometrischen Analyse als ILYS-5 identifiziert (Fuchs, 2006).

Weil es nicht gelang, eine vollständige Reinigung zu erzielen und für weiterführende Experimente nicht genügend Material zur Verfügung stand, fiel im Rahmen dieser Arbeit die Entscheidung, ILYS-5 rekombinant zu synthetisieren. Mit Hilfe des rILYS-5 sollten neue Erkenntnisse über dessen Funktionsweise und Rolle im Modellorganismus *C. elegans* gewonnen werden. Im folgenden Text wird rILYS-5 lediglich ILYS-5 genannt, da es sich im Weiteren immer um das rekombinant hergestellte Protein handelt.

Sequenzanalysen anhand der postulierten Primärstruktur von ILYS-5 aus *C. elegans* sagten ein Signalpeptid in der N-terminalen Region voraus. Bei der Generierung der spezifischen Oligonukleotide für die Amplifikation des kodierenden Bereichs des *ilys-5*-Gens wurde die Sequenz des mutmaßlichen Signalpeptids ausgeschlossen. Demnach wich die hier verwendete Sequenz von der von *WormBase* postulierten Sequenz um 18 Aminosäurereste ab (8.1 und 8.3.1).

Das fertige Konstrukt mit detaillierten Angaben zu der daraus resultierenden Primärstruktur ist in Abb. 34 aufgeführt. Der verwendete Expressionsvektor verfügte über drei verschiedene Fusionspartner, die translatiert und mit dem gewünschten Protein fusioniert wurden. Zum Abspalten der Fusionspartner von dem zu untersuchenden Protein ist in der Sequenz eine Schnittstelle der Endopeptidase Enterokinase enthalten. Die Enterokinase erkennt spezifisch drei aufeinanderfolgende Asparaginsäurereste und ein Lysinrest (DDDK). Die hydrolytische Spaltung durch das Enzym erfolgt hinter dem Lysin. Das translatierte Fusionsprotein besaß eine zu erwartende Größe von 30,5 kDa. Nach proteolytischer Spaltung hatte der Fusionspartner, bestehend aus Thioredoxin, S-Protein, His₆-Schwanz sowie verbindender Sequenzen, eine Größe von 17,1 kDa. Die Größe des murenen ILYS-5 umfasst schließlich eine Größe von 13,5 kDa.

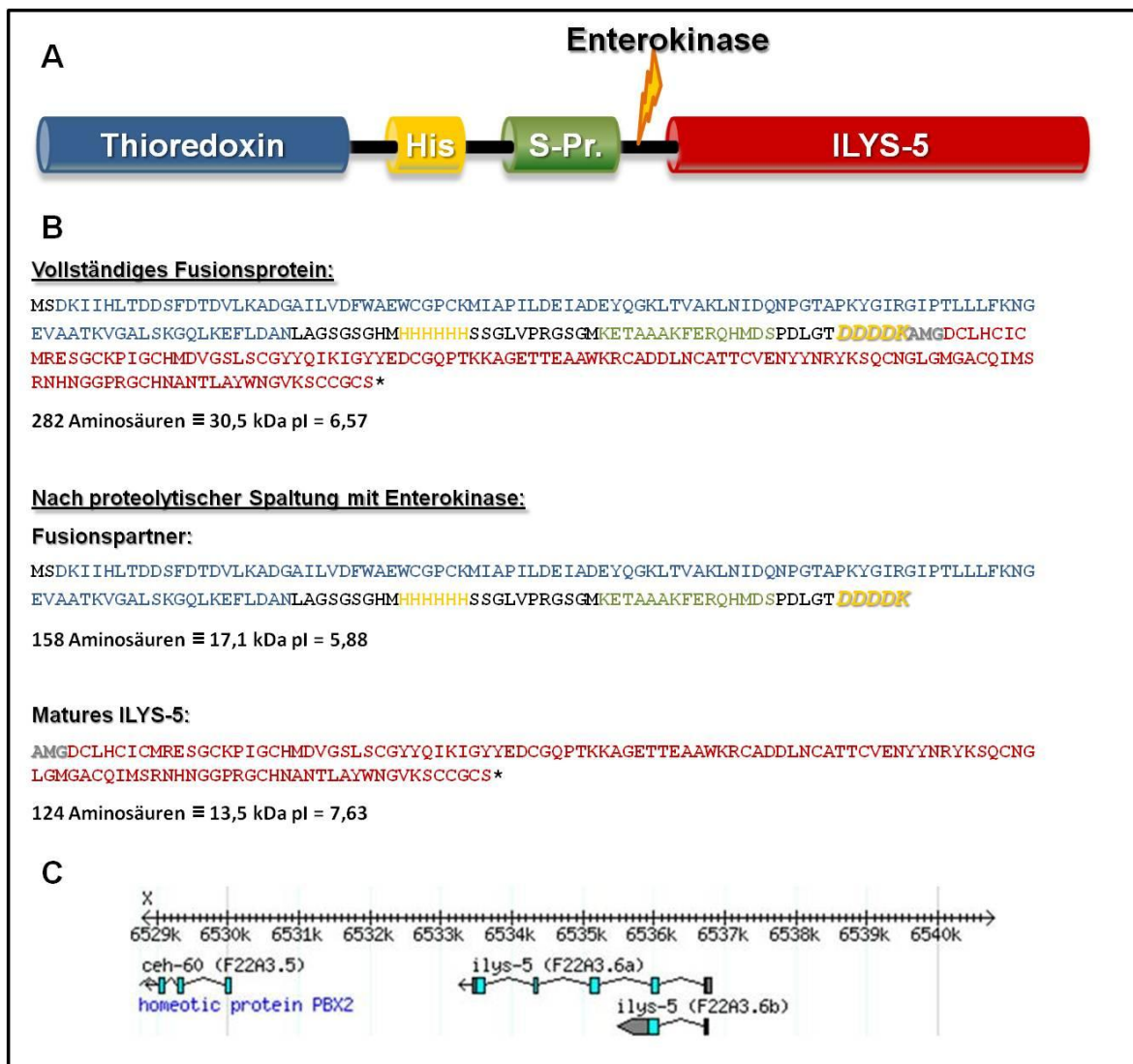


Abb. 34: Fusionskonstrukt für die heterologe Expression von ILYS-5. Das Fusionsprodukt setzt sich aus der Sequenz von ILYS-5 abzüglich des mutmaßlichen Signalpeptids und drei verschiedenen Fusionspartnern des Expressionsvektors zusammen. **A:** Organisation des Fusionproduktes mit den drei Fusionspartnern Thioredoxin, His₆-Schwanz und S-Protein sowie der Schnittstelle für die Prozessierung mit Enterokinase; **B:** Bei gleicher Farbkodierung wie in A die resultierenden Primärstrukturen vor und nach Prozessierung mit Enterokinase sowie ausgewählte Eigenschaften (grau hervorgehoben unechter N-Terminus des ILYS-5) und **C:** Genmodell von *ilys-5* und Lokalisation auf dem X-Chromosom, es wurde mit F22A3.6a gearbeitet (von www.wormbase.org).

Das mature, rekombinant hergestellte ILYS-5 enthielt N-terminal drei unechte Aminosäurereste (Alanin, Methionin, Glycin; AMG), die durch die Klonierung in den Expressionsvektor und der Generierung einer Protease-Erkennungssequenz vor dem Lysozym-Primärstrukturbeginn bedingt wurden. Die erwartete Größe des Lysozyms ohne vorhergesagtes

Signalpeptid entspricht der charakteristischen Größe von i-Typ-Lysozymen (13 kDa). Da im Vorwege die Gesamt-RNA aus N2-Wildtyp-Würmern isoliert und die cDNA-Synthese anhand der isolierten mRNA erfolgte, enthielt das zur Klonierung verwendete Amplikon keine Intron-Sequenzen sondern ausschließlich die Sequenz der muren mRNA.

Zur Übersicht soll die experimentelle Durchführung der heterologen Synthese und die weitere Versuchsvorgehensweise bei der Isolierung von ILYS-5 schematisch dargestellt werden (Abb. 35). Die einzelnen Zwischenschritte bei der Präparation von maturem ILYS-5 werden im Folgenden detaillierter beschrieben.



Abb. 35: Protokollübersicht für die Synthese und Präparation von rekombinanten ILYS-5.

Die heterologe Synthese erfolgte in einem *E. coli*-Expressionssystem. Bei den anfänglichen Expressionsversuchen erwiesen sich dafür mehrere *E. coli*-Stämme als brauchbar, schließlich wurde aber *E. coli* BL21 (DE3) *pABlacI^Q* verwendet (2.7.2 und 2.4.13). Eine Codon-Gebrauch-Analyse hatte zuvor ergeben, dass ein *Escherichia coli*-System für die Synthese des *C. elegans*-Proteins geeignet war (Fuhrmann *et al.*, 2004; Daten hier nicht gezeigt). Als Antibiotikum zur Selektion wurden Carbenicillin und Kanamycin verwendet. Da Carbenicillin ein Derivat des Ampicillins, dabei aber weniger lichtsensitiv, ist, wurde

es bei der Kultivierung eingesetzt. Bei der eigentlichen Expressionskultur wurde anders als bei der Vorkultur auf die Kanamycin-Selektion verzichtet, um die rekombinante Expressionsrate nicht negativ zu beeinflussen. Der Selektionsdruck war durch weitere Zugabe von Carbenicillin gegeben und ein Kontaminationsrisiko bei den Arbeiten unter sterilen Bedingungen verschwindend gering. Die Ausbeute an rekombinantem Protein fiel bei Verwendung von Erlenmeyer- oder Schikane-Kolben nicht unterschiedlich aus (Daten hier nicht gezeigt). Beste Ergebnisse wurden bei Induktion mit 0,4 mM IPTG während der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien und einer Dauer der induzierten Expression von 16 h erzielt. Da die Fusionsproteine in so genannten Einschlusskörperchen vorlagen, akkumulierten diese in den Bakterienzellen, und es traten keine toxischen Effekte durch synthetisiertes Fusionsprotein auf.

Bei dem Erarbeiten des Extraktionsprotokolls für ILYS-5 zeigte sich, dass keinerlei Fusionsprotein löslich im Cytosol oder Kulturmedium vorlag. Daher erfolgte die Extraktion unter denaturierenden Bedingungen aus den Einschlusskörperchen. Der Einsatz von Guanidinium-Hydrochlorid als Lösungsmittel erzielte keine höhere Ausbeute an Fusionsprotein, erschwerte jedoch die weitere Handhabung, weswegen 8 M Urea Verwendung fand. Dennoch waren mehrere Extraktionsschritte unter denaturierenden Bedingungen nötig, um die Fusionsproteine vollständig zu extrahieren (2.7.3).

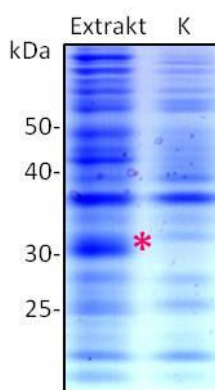


Abb. 36: Synthese und Extraktion von rILYS-5. Dargestellt sind die Proteinextrakte nach SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung und kolloidaler CBB-Färbung. In der linken Spur ist ein Aliquot des Extraktes aus den Einschlusskörperchen und in der rechten einer des Extraktes aus nicht induzierten Bakterien, die ansonsten gleich behandelt wurden (**K**), gezeigt. Es wurden gleiche Volumina aufgetragen und links die molekularen Massen indiziert. Der rote Stern kennzeichnet die Bande des Fusionsproteins mit der erwarteten Größe von 30,5 kDa.

Die erfolgreiche rekombinante Synthese und Extraktion der Einschlusskörperchen wird exemplarisch gezeigt (Abb. 36). In der rechten Spur wurde der Extrakt aus einer nicht

induzierten Bakterienexpressionskultur zum Vergleich aufgetragen. Die linke Spur der Abbildung wies eine prominente Bande der erwarteten Größe des Fusionsproteins und somit ~30,5 kDa auf, was bei einer anderen Expression auch massenspektrometrisch bestätigt werden konnte (Daten hier nicht gezeigt).

Die Vorreinigung der Fusionsproteine erfolgte durch eine Immobilisierte-Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) unter denaturierenden Bedingungen. Vorversuche ergaben, dass die Elution in zwei Schritten mit einer Imidazol-Konzentration von 500 mM im Elutionspuffer und zwei vorherigen Waschschritten mit Äquilibriumspuffer ohne Imidazol den geringsten Verlust sowie den größten Reinigungseffekt erzielten (vgl. 2.7.4; Daten hier nicht gezeigt).

Anschließend wurden die vorgereinigten Fusionsproteine in mehreren Schritten gegen Puffer mit sinkender Harnstoff-Konzentration und sinkendem pH-Wert dialysiert, um so die Rückfaltung und die Überführung in die aktive Form zu gewährleisten (2.7.5). Zusätzlich wurde eine weitere Reinigung der Fusionsproteine erzielt, da die Dialyseschläuche ein Ausschlussmolekulargewicht von 12-14 kDa besaßen und niedermolekulare Stoffe so entfernt wurden. Außerdem wurde die korrekte Rückfaltung der Proteine durch die Verwendung eines Glutathion-Redoxsystems unterstützt.

Um das mature ILYS-5 von den Fusionspartnern zu trennen, wurden die Fusionsproteine mit der Protease Enterokinase prozessiert. Das Fusionsproteingemisch lag nach der Dialyse im geeigneten Puffer vor. Zahlreiche Pilotreaktionen hatten gezeigt, dass ab einer gewissen Menge an Protein bzw. Volumen der Probe keine vollständige proteolytische Spaltung der Fusionsproteine möglich war. Zufriedenstellende Ergebnisse wurden erzielt, sofern die Ansätze mit 2 U/ml Proteingemisch (Proteinkonzentration < 1,5 mg/ml) und in kleinen Volumina bis maximal 10 ml bei 37 °C für mindestens 16 h inkubierten. Dennoch entstanden während der proteolytischen Spaltungsreaktion weiße Präzipitate. Zwischen Ausgangsprobe und der Probe nach Inkubation mit der Protease ließen sich keine Aktivitätsunterschiede erkennen. Daraus wurde geschlossen, dass im Präzipitat nur verschwindend geringe Konzentrationen an Fusionsprotein enthalten waren. Es wurde eine fast vollständige Trennung des rekombinanten ILYS-5 und der Fusionspartner unter Anwendung des erarbeiteten Protokolls erreicht (Abb. 37).

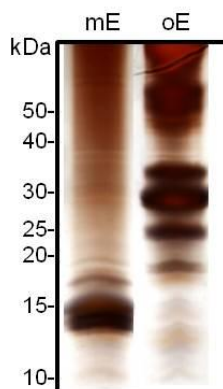


Abb. 37: Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins mit Enterokinase. Dargestellt ist der Vergleich eines Fusionsproteingemisches nach Inkubation mit (**mE**) und ohne Enterokinase (**oE**), jeweils SDS-gelelektrophoretisch getrennt und silbergefärbt. Der Proteinstandard (**M**) mit seinen molekularen Massen ist links gezeigt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C mit 2 U/ml Enterokinase bzw. ohne Zugabe des Enzyms.

Somit war in der linken Spur nur noch eine schwache Bande in der Höhe von 30 kDa, dem erwarteten Molekulargewicht des Fusionsproteins entsprechend, zu erkennen (Abb. 37). Des Weiteren sind in dieser Spur prominente Banden im molekularen Massenbereich von 13-17 kDa ersichtlich. Sie entsprachen also den erwarteten Größen von 17,1 kDa der Fusionspartner und 13,5 kDa des muren ILYS-5. Für die finale Reinigung wurden die Proben erneut dialysiert und so in die geeigneten Pufferbedingungen für die anschließende schnelle Protein-Flüssigchromatographie (*Fast protein liquid chromatography*; FPLC) überführt.

Das für die weitere Analyse verwendete ILYS-5 wurde über das Kationenaustauschchromatographie-Verfahren isoliert. Hierfür wurde eine Resource™ S *prepacked*-Säule (GE Healthcare Europe GmbH) mit einem Säulenmatrixvolumen von 1 ml und das Äkta Purifier-System benutzt. Überwiegend lagen die prozessierten Proben in größeren Volumina vor, weswegen mehrere Chromatographie-Läufe direkt hintereinander durchgeführt wurden. Dabei wurde jeweils nach dem gleichen Protokoll verfahren und die Fraktionen umgehend vereinigt. Die Fraktionen wurden anschließend SDS-gelelektrophoretisch analysiert und auf ihre Aktivität hin überprüft (s. a. 2.7.7).

Die biochemische Charakterisierung sowie die Analyse des antibakteriellen Spektrums von ILYS-5 wurden mit zwei Proben unterschiedlicher Versuchsansätze aus verschiedenen Reinigungen erreicht. Beide Ansätze stammen von derselben Expressionskultur, jedoch aus verschiedenen Extraktionsfraktionen, die im weiteren Verlauf geringfügig unterschiedlich behandelt wurden. Ein Chromatogramm von insgesamt drei durchgeführten Chromato-

graphien zur Isolierung des ILYS-5 aus einem Versuchsansatz ist in Abb. 38 exemplarisch aufgezeigt. Die vereinigten Fraktionen umfassten 3 ml. Da der Nachweis des Lysozyms in einer Fraktion in einem silbergefärbten Gel ohne Konzentrierung nicht möglich war, wurden sie zunächst lyophilisiert. Anschließend wurden die Proben in geringem Volumen entmineralisiertem und steril filtriertem Wasser rückgelöst. Die Fraktionen A4-A9 wurden jeweils in 200 μ l und die Fraktionen A10-A12 jeweils in 300 μ l H₂O resuspendiert. Für die SDS-PAGE wurden je 10 μ l-Aliquots in gleichem Volumen des Probenpuffers verwendet. Die mittels des Lysehofplattentests bestimmte Aktivität wurde als schwarzer Balken gekennzeichnet.

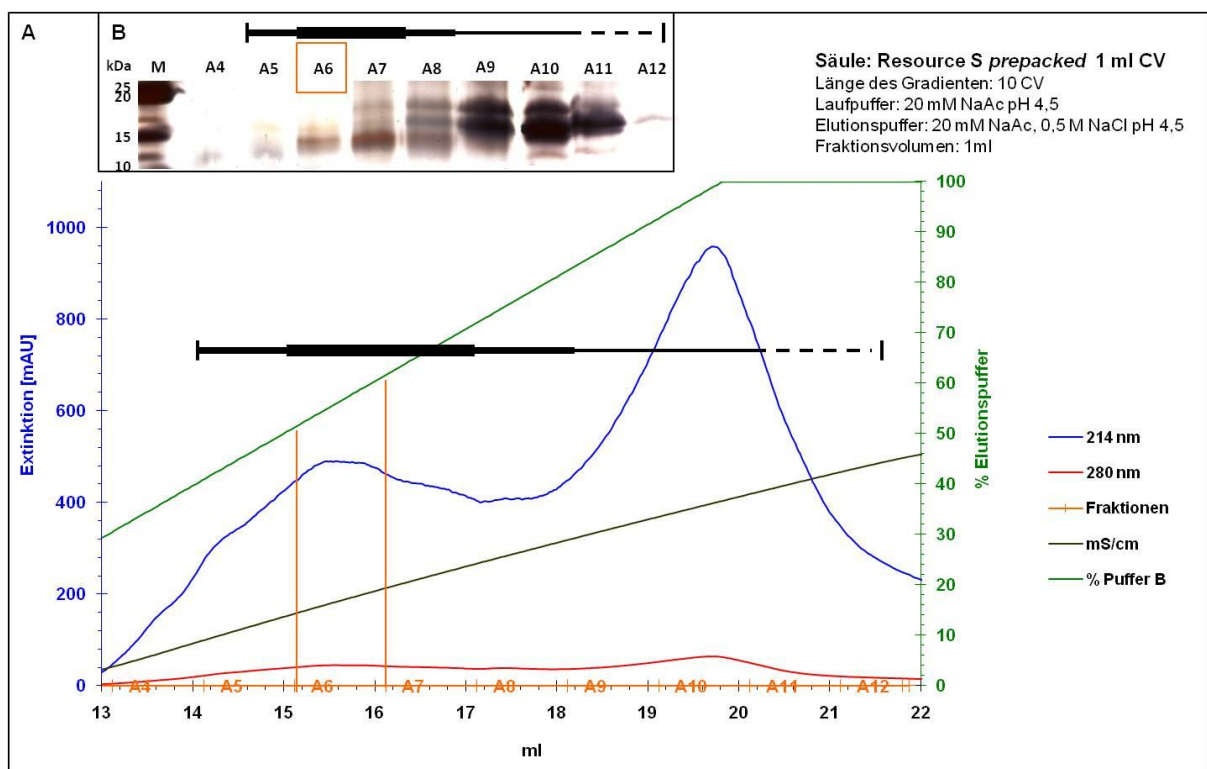


Abb. 38: Reinigung von ILYS-5. In **A** ist das Chromatogramm einer Kationenaustauschchromatographie dargestellt. Die Parameter sind rechts in der Legende angegeben bzw. farblich kodiert. **B** zeigt die SDS-gel-elektrophoretisch getrennten und silbergefärbten Proteine der einzelnen lyophilisierten und resuspendierten Fraktionen von insgesamt drei durchgeführten Chromatographien, bei denen, wie in **A** präsentiert, verfahren wurde. In der Spur **M** in **B** wurde der Größenstandard aufgetragen, dessen molekulare Massen links gekennzeichnet sind. Die schwarzen Balken in **A** und **B** indizieren die aktiven Fraktionen und den Grad der Aktivität. Die für weitere Analysen verwendete Fraktion wurde orange hervorgehoben.

Im Zuge dieser Arbeit wurden zahlreiche Chromatographie-Systeme zur finalen Reinigung von ILYS-5 getestet. Allerdings verlief die Trennung der Fusionspartner oder nicht proteolytisch geschnittenem Fusionsprotein von dem maturen Protein meist unvollständig. Durch das oben beschriebene Verfahren gelang es schließlich gereinigtes ILYS-5 in einzelnen Fraktionen zu gewinnen und von den Nebenprodukten erfolgreich zu separieren. Wie in der Abb. 38 dargestellt, beschränkte sich die Hauptaktivität auf die Fraktionen A6 und A7 innerhalb der gesammelten Fraktionen und somit auf das erste Extinktionsmaximum. Das mature ILYS-5 besitzt eine molekulare Masse von 13,5 kDa und die Fusionspartner eine Masse von 17,1 kDa. Die Fraktion A6 wies keine Bande in Höhe von 17 kDa auf, wohingegen in Fraktion A7 auch eine weniger prominente Bande in Höhe der zu erwartenden Größe der Fusionspartner ersichtlich war. Aufgrund dessen wurde die Fraktion A6 für weitere Experimente verwendet (s. unten). Die in dieser Fraktion gesammelten Proteine wurden bei einer Konzentration des Elutionspuffers von 52-62,5 % eluiert. Das an die Säulenmatrix gebundene Protein wurde demnach bei einer Konzentration der Kationen von 260-312 mM in der hochmolekularen Salzlösung des Elutionspuffers verdrängt. Dabei herrschte eine Konduktivität von 14,7-19,7 mS/cm vor und die Extinktion bei 214 nm betrug 455-490 mAU. Die Extinktion bei 280 nm war während des gesamten Laufes verschwindend gering. Das mature ILYS-5 lag somit, nach Lyophilisation und anschließender Resuspension, in Fraktion A6 isoliert vor. Trotz der hohen NaCl-Werte in der gereinigten Probe, die sich durch die Konzentrierung ergaben, konnte kein Ausfall des Proteins oder ein Aktivitätsverlust verzeichnet werden. Das in Fraktion A6 isolierte ILYS-5 wurde allerdings verdünnt in den weiterführenden Versuchen eingesetzt (3.6.1 und 3.6.2).

Mit gereinigtem ILYS-5 aus einem zweiten Versuchsansatz wurden die übrigen Charakterisierungsexperimente des i-Typ-Lysozyms durchgeführt. Die Präparation und Reinigung erfolgten wie bereits beschrieben, außer dass die aktiven Fraktionen zweier Kationenaustausch-Chromatographien wieder vereinigt und mit dem Laufpuffer auf die ursprünglich enthaltene Salzkonzentration verdünnt wurden. So wurde ein Nichtbinden beziehungsweise eine vorzeitige Elution von der Säulenmatrix des Kationenaustauschers verhindert. Die durch die Verdünnung entstandenen großen Volumina von 80 ml und 100 ml wurden manuell in 5 ml-Schritten auf die Säule geladen und während zweier Läufe in identischen

Fraktionen erneut gesammelt. Die Proteinkonzentrationen (in den aus den resultierenden aktiven Fraktionen genommenen) waren für den Nachweis über die Silberfärbung zu gering (hier nicht gezeigt). Da das Laufverhalten des murenen ILYS-5 bei gleichen Versuchsbedingungen jedoch reproduzierbar war, wurden dementsprechend ausgewählte aktive Fraktionen vereinigt (sechs Fraktionen á 1 ml). Rechromatographierte Fraktionen die laut der SDS-PAGE-Analyse zusätzliche Banden im molekularen Massenbereich von 17 oder 30 kDa aufwiesen und bereits in den vorliegenden Konzentrationen nachweisbar waren, wurden davon ausgeschlossen. Das Ergebnis der Rechromatographie war mit dem in der Abb. 38 vergleichbar.

Für die Charakterisierung des ersten i-Typ-Lysozyms lagen also Fraktionen mit isoliertem ILYS-5 aus zwei verschiedenen Präparationen vor. Einerseits standen 190 µl in der konzentrierten A6-Fraktion und andererseits 4,9 ml in den vereinigten Fraktionen mit niedrigerer Proteinkonzentration zur Verfügung. Als Ausgangsmaterial für die Charakterisierung wurden daraufhin die molekulare Identität der Proteine und deren genaue Konzentration eruiert.

3.4 Molekulare Identität des murenen ILYS-5

Zur Überprüfung der Identität des isolierten Proteins nach der Präparation wurde über die Abschätzung der molekularen Masse mittels der SDS-PAGE hinaus auch eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Überdies konnten dabei Erkenntnisse über den Reinheitsgrad gewonnen werden. Aus Abb. 39A wird ersichtlich, dass in den gereinigten Proben reproduzierbar immer noch Mehrfachbanden auftraten, die sich auch durch analytische Chromatographie-Verfahren nicht separieren ließen (Daten hier nicht gezeigt). Das Tandem-Massenspektrometrie-Verfahren (*MS/MS*), welches von Dr. Christoph Gelhaus an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt wurde, identifizierte jedoch alle auftretenden Banden als ILYS-5. Der angegebene Wert der Sequenzabdeckung beziffert den Sequenzanteil des rekombinanten Proteins, der durch das Tandem-Massenspektrometrie-Verfahren (*MS/MS*) und der damit verbundenen Sequenzierung einzelner Proteinfragmente identifiziert werden konnte.

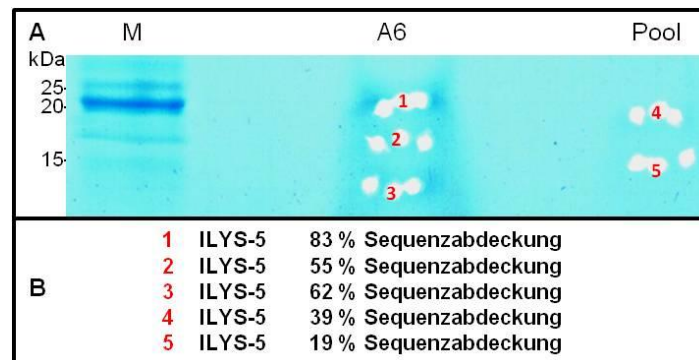


Abb. 39: Massenspektrometrische Analyse von dem gereinigten ILYS-5. In der Teilabbildung **A** ist das Gel nach der präparativen SDS-PAGE und kolloidalen CBB-Färbung mit den molekularen Massen (**M**) und entnommenen, nummerierten *Spots* gezeigt (**Pool**: vereinigte Fraktionen). **B** zeigt die Ergebnisse für die *Spots* aus **A** nach der massenspektrometrischen Analyse mit der prozentualen Sequenzabdeckung

Der unterschiedliche Prozentsatz bei der Sequenzabdeckung war höchstwahrscheinlich durch die variierende Bandenstärke und somit abweichende Proteinkonzentration in den Gelstücken begründet. Ferner wurden keinerlei Verunreinigungen durch andere Proteine oder nicht separierte Fusionspartner nachgewiesen, sondern lediglich ILYS-5 in den Banden verifiziert.

3.5 *Proteinkonzentrationsbestimmung in den gereinigten Proben*

Um die Proteinkonzentration in den gereinigten ILYS-5-Ansätzen möglichst genau zu ermitteln, wurden drei verschiedene Methoden der Konzentrationsbestimmung gewählt. Bei der Analyse des antimikrobiellen Spektrums wurde zur Kontrolle das bereits gut erforschte HEWL eingesetzt (3.7). HEWL lag in synthetischer Form gefriergetrocknet vor und wurde eingewogen. Dennoch wurde darin ebenfalls eine Proteinbestimmung vorgenommen, um die Methodengenauigkeit verifizieren zu können. Zwei der Methoden waren praktisch identisch, wurden aber an unterschiedlichen Geräten durchgeführt (2.8.2). Hierbei wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen und mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten der Proteine die Konzentration bestimmt. Der Koeffizient ergibt sich aus der Pri-

märstruktur eines Proteins, darin enthaltene aromatische Aminosäurereste werden bei 280 nm registriert. Des Weiteren fand die Biuret-Reaktion zur Konzentrationsbestimmung Verwendung. Jeder Ansatz wurde mindestens doppelt bestimmt. Die erhobenen Daten wurden als Mediane gemittelt. Schließlich ergaben die Messungen, dass die zu einem 1 mM eingewogene HEWL-Suspension eine Konzentration von 1,162 mM aufwies. Die ermittelten Proteinkonzentrationen aller Proben unterlagen daher einer gewissen Ungenauigkeit, die durch das dreifache Messverfahren aber bereits so klein wie möglich gehalten wurde. Die Analyse ergab, dass die Fraktion A6 aus erster Präparation gereinigtes ILYS-5 in einer Konzentration von 1,75 mg/ml bzw. 130 μ M enthielt. Die rechromatographierten und wiedervereinigten Fraktionen der zweiten Präparation wiesen eine Konzentration von 0,87 mg/ml und 65 μ M auf.

3.6 Biochemische Charakterisierung von ILYS-5

Die Lysozyme von *C. elegans* sind auf Proteinebene bisher nicht erforscht. Bei der Charakterisierung des ersten i-Typ-Lysozyms aus *C. elegans* wurden im Rahmen dieser Arbeit die optimalen pH-Bedingungen für die klassische Lysozymaktivität bestimmt. Darüber hinaus wurden erste Untersuchungen über den Einfluss der Ionenstärke auf ILYS-5 vorgenommen. Schließlich wurde das Protein bezüglich zusätzlicher spezifischer enzymatischer Aktivitäten analysiert, die zu den besonderen Eigenschaften einiger bekannter Lysozyme zählen.

3.6.1 pH-Optimum von ILYS-5

Experimentell wurde, wie unter 2.10.2 beschrieben, vorgegangen. Ausgangsmaterial für die Versuche waren verschiedene Verdünnungen der Fraktion A6 aus einer der beiden Präparationen, die hier in der Arbeit aufgeführt wurden (3.3). Das Verfahren sowie die verschiedenen Puffersysteme wurden an die Arbeiten zur Charakterisierung eines i-Typ-Lysozyms aus *C. virginica* (Amerikanische Auster) angelehnt (Xue *et al.*, 2004). Unter definierten Testbedingungen wurde die Aktivität im pH-Bereich von pH 3,5-10,5 ermittelt. Die

Aktivität wurde anhand der Extinktionskinetik bei 450 nm, bedingt durch den Lysozym-spezifischen Abbau von *M. luteus*-Zellwänden in Lösung, bestimmt. Die Messungen erfolgten bei konstanter Temperatur und einem festen Zeitintervall mit identischer Konzentration der Zellwandsuspension und jeweils gleichem Probenvolumen. Die Puffersysteme variierten lediglich im pH-Wert, nicht jedoch in der Ionenstärke. Um verfälschende Artefakte bei dem photometrischen Verfahren auszuschließen, wurde zwischen den Messungen eine Negativkontrolle, bestehend aus reiner Zellwandsuspension und Puffer, mit den Extinktionskinetiken aktiver Proben verglichen. Die Aktivität des murensen ILYS-5 fiel ab einem bestimmten pH-Bereich stark ab und differierte zudem sehr über den gesamten pH-Bereich (Abb. 40). Aufgrund dessen wurden bei dem Verfahren Verdünnungen von 1 : 2 bis 1 : 200 des Lysozyms eingesetzt, damit ein durch Messungenauigkeit auftretender Fehler möglichst gering ausfiel. Die Fraktion A6 besaß eine Proteinkonzentration von 1,75 µg/µl bzw. 130 µM (3.5). ILYS-5 zeigte im basischen pH-Bereich nur sehr geringe Aktivität, weswegen die Messungen bei einigen basischen pH-Werten ausgelassen wurden. Bei niedrigster Verdünnungsstufe des Lysozyms war die Detektion der Aktivität ab einem pH-Wert von pH 8,0 kaum mehr möglich. Dies war auch bei den pH-Werten pH 8,5 und pH 10,5 der Fall. Somit wurde auf die Aktivitätsbestimmung bei pH 9,0-10,0 verzichtet. Dabei wurde die Änderung der Extinktion jeder Messung in U/ml der Ausgangskonzentration von ILYS-5 umgerechnet. Eine *Unit* definierte sich folgendermaßen: Aktivität des Enzyms, die eine Änderung der Extinktion bei 450 nm und Raumtemperatur innerhalb einer Minute um 0,001 hervorruft. Aus Abb. 40 wird ersichtlich, dass ILYS-5 im sauren pH-Bereich die größte Aktivität aufweist und das Optimum bei pH 3,5 erreicht. Die einzelnen Messwerte unterlagen Schwankungen, die sich bei der Umrechnung in die finale Aktivität multiplizierten, was wiederum die Streuung der Messwerte erklärt. Aus technischen Gründen ließen sich diese allerdings nicht verhindern. Die Ergebnisse, ließen den Schluss zu, dass ILYS-5 im Bereich von pH 3,5 und pH 4,0 größtmögliche Aktivität aufweist. Danach sinkt die Aktivität mit steigendem pH-Wert rapide und ab einem pH-Wert von pH 7,0 ist sie verschwindend gering.

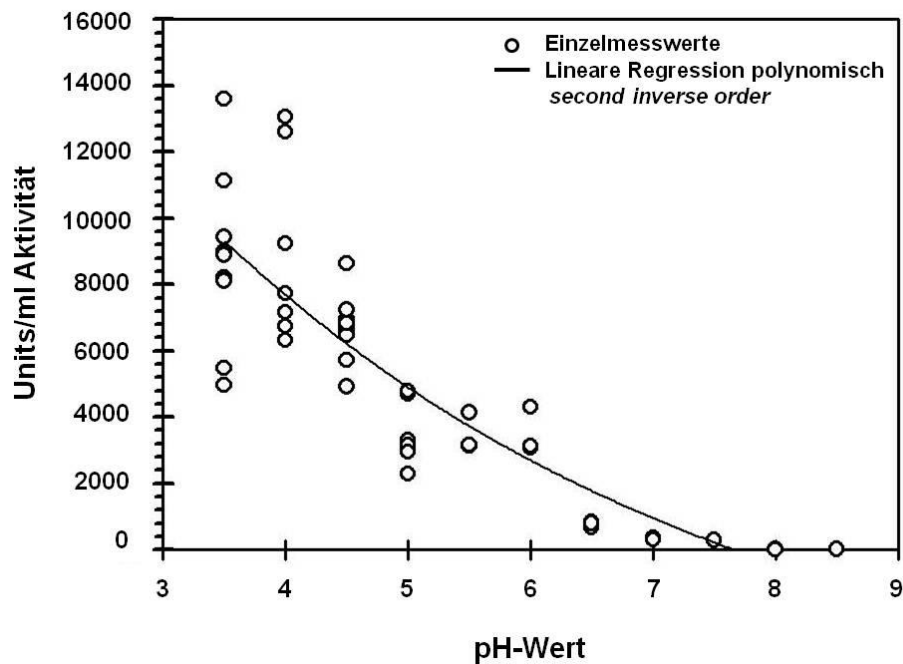


Abb. 40: Ermittlung des pH-Optimums von ILYS-5. Die Parameter sind an den Achsen und in der Legende aufgeführt. Die Graphik wurde mit dem Programm SigmaPlot 10.0 erstellt. Die Messungen erfolgten mit drei unterschiedlichen Puffersystemen mit jeweils einer Differenz von pH 0,5 und einer Ionenstärke von $I = 0,18$. Die Aktivität wurde anhand der hydrolytischen Spaltung von *M. luteus*-Zellwänden in Lösungen und der damit verbundenen Extinktionsabnahme bei 450 nm ermittelt. Ein Aktivitätsmaximum von ILYS-5 konnte bei pH 3,5 beobachtet werden.

Die spezifische Aktivität von ILYS-5 unter optimalen pH-Bedingungen von pH 3,5 entsprach gemittelt 4890 U/mg (Median). Zum Vergleich betrug die gemittelte spezifische Aktivität bei pH 4,0 4424 U/mg und bei pH 7,0 oder pH 8,5 nur noch 194 U/mg bzw. 11 U/mg. Die vereinigten Fraktionen der zweiten Präparation, die für die Untersuchung spezifischer Enzymaktivität und des antibakteriellen Spektrums herangezogen wurden, wiesen eine geringere spezifische Aktivität bei dem optimalen pH von 3,5 von 4160 U/mg auf (doppelt bestimmt und gemittelt). Die Lysozymaktivität in dem extrem sauren pH-Bereich von $\text{pH} < 3,5$ wurde hier nicht untersucht, da die Pufferkapazität der verwendeten Lösungen in diesem Bereich nicht gegeben war. Das ILYS-5 aus *C. elegans* besitzt demnach sein Aktivitätsmaximum in einem sehr sauren pH-Milieu.

3.6.2 Einfluss der Ionenstärke auf ILYS-5

Nachdem zuvor die optimalen pH-Bedingungen für das ILYS-5 verifiziert worden waren, wurde des Weiteren die Aktivität bei variierenden Salzkonzentrationen bestimmt. Während des Verfahrens lagen in den Ansätzen ungleiche Ionenstärken vor. Hierfür wurde der Basispuffer mit dem pH 3,5 zunächst auf $I = 0,1$ verdünnt und die gewünschte Ionenstärke (ungeachtet der im Puffersystem vorliegenden) mit einer NaCl-Lösung eingestellt. Es wurden Messungen bei Ionenstärken von $I = 0,025$; $0,05$; $0,1$; $0,2$ und $0,4$ vorgenommen und die Aktivität jeweils doppelt bestimmt (vgl. 3.6.1 bzw. 2.10.2; Xue *et al.*, 2004).

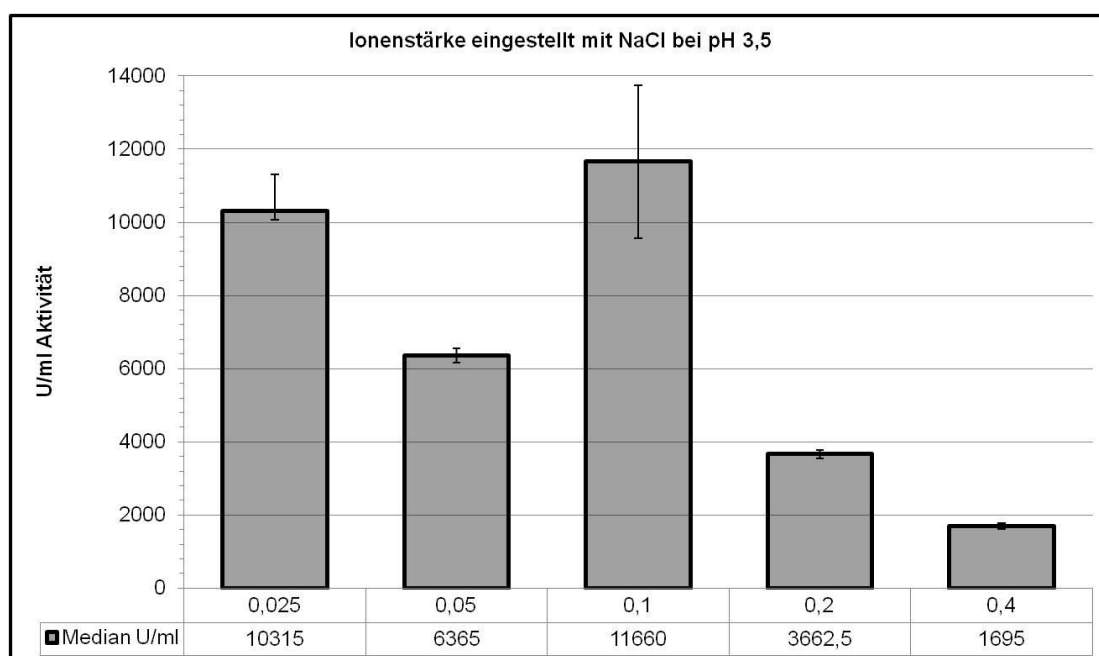


Abb. 41: Aktivität des ILYS-5 bei unterschiedlichen Ionenstärken und optimalen pH-Bedingungen. Die Lysozym-Aktivität wurde anhand der Extinktionsänderung bei 450 nm in einem Puffersystem unterschiedlicher Ionenstärke bei gleichem pH-Wert von pH 3,5 ermittelt. Dabei wurden spezifisch *M. luteus*-Zellwände abgebaut. Eingesetzt wurden $17,5 \mu\text{g/ml}$ bzw. $1,3 \mu\text{M}$ von ILYS-5. Der Median der doppelt bestimmten Aktivität ist jeweils unten angegeben. Die Fehlerbalken kennzeichnen den maximalen und minimalen gemessenen Wert.

Es konnte kein eindeutiges Aktivitätsmaximum bei einer der getesteten Ionenstärken ausgemacht werden. Zunächst schien die Aktivität von $I = 0,025$ bis $I = 0,4$ kontinuierlich nachzulassen. Die Aktivitätsabnahme bei ansteigender Ionenstärke verlief allerdings nicht

linear, da bei $I = 0,1$ ein weiteres Aktivitätsmaximum zu liegen schien. Es handelte sich um primäre Analysen, bei denen lediglich eine Doppelbestimmung je Ionenstärke durchgeführt wurde. Deshalb konnte nicht abschließend geklärt werden, ob ILYS-5 eine Plateau-Aktivität bei Ionenstärken von $I = 0,025-0,1$ besitzt. Weitere Messungen könnten auch das Aktivitäts-Maximum bei $I = 0,1$ relativieren. Ab einer Ionenstärke von $I = 0,2$ nahm die Aktivität des murenen *C. elegans* Lysozyms stark ab, was darauf hinwies, dass ILYS-5 nur bis zu dieser Ionenstärke salztolerant ist.

3.6.3 Chitinase-, Cellulase- und Isopeptidase-Aktivitäten von ILYS-5

Anders als bei den anderen Versuchen der biochemischen Charakterisierung wurde hier das gereinigte ILYS-5 aus dem zweiten Versuchsansatz verwendet. Dafür wurden Aliquots der rechromatographierten und wiedervereinigten Fraktionen á 6 ml unverdünnt eingesetzt (3.3). Die Proteinkonzentration lag dabei $0,87 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bzw. $65 \mu\text{M}$. Die spezifische Aktivität nach dieser Präparation betrug $4160 \text{ U}/\text{mg}$. Die genaue Vorgehensweise ist unter 2.10.4 aufgeführt.

Den i-Typ-Lysozymen wird eine Chitinase-Aktivität und mehreren Proteinen dieses Subtyps eine Isopeptidase-Aktivität zugeschrieben (s. bspw. Fradkov *et al.*, 1996). Erneut wurden die Aktivitäten photometrisch bestimmt, allerdings wurde die Extinktion bei 405 nm erfasst. Die bei der enzymatischen Umsetzung der Substrate entstehenden chromogenen Produkte *para*-Nitroanilin (pNP) und *para*-Nitrophenol (pNP) konnten so dokumentiert werden. pNA und pNP weisen im alkalischen Milieu eine gelbe Färbung auf. Die Inkubationszeit der Versuche wurde auf 2 h und 15 min begrenzt. Eventuell ließe sich bei längeren Inkubationszeiten eine über die vorliegenden Ergebnisse hinausgehende Aktivität nachweisen. Ziel dieser Untersuchung war es jedoch, eine deutliche Aktivität des murenen ILYS-5 bei der hydrolytischen Spaltung der spezifischen Zucker oder Peptidbindungen nachzuweisen. Wie zu erwarten war, zeigte ILYS-5 keinerlei Cellulaseaktivität. Ferner ließ sich auch keine Isopeptidase-Aktivität dokumentieren. In der Positivkontrolle mit HEWL wurde indessen eine deutliche Aktivität verzeichnet. Lediglich eine schwache Chitinase-Aktivität von ILYS-5 wurde verifiziert. Die Aktivität lag dabei an der Detektionsgrenze

und betrug 0,00423 U/mg. Die zur Kontrolle verwendete Chitinase verfügte unter den gegebenen Testbedingungen über eine spezifische Aktivität von 0,116 U/mg. Obschon das ILYS-5 aus *C. elegans* im Vergleich zu der Chitinase aus *Streptomyces griseus* nur schwach aktiv war, zeigt es dennoch eine für die i-Typ-Lysozyme charakteristische Chitinase-Aktivität.

3.7 Antibakterielles Spektrum von ILYS-5

Mit Hilfe des Mikrosuszeptibilitätstests sollten die minimale auf das Bakterienwachstum inhibitorisch wirkende und minimale tödliche Konzentration des rekombinant hergestellten Proteins erfasst werden. Es wurde die Wirkung von ILYS-5 gegen eine Reihe von gramnegativen und grampositiven Bakterien getestet. Darunter befanden sich sowohl Pathogene des Nematoden als auch des Menschen. Das Verfahren wurde für Peptide bereits erfolgreich angewandt (Fedders und Leippe, 2008), jedoch mit der Etablierung einer neuen Positivkontrolle den Versuchsbedingungen angepasst. Dabei diente das HEWL als Positivkontrolle, so dass die Konzentrationen des ILYS-5 mit denen eines anderen Lysozyms verglichen werden konnten. Außerdem wurden teilweise neue Bakterienstämme getestet. Da sich die Aktivität des rekombinanten Proteins aus *C. elegans* auf den sauren pH-Bereich beschränkte (3.6.1), wurden die Tests nur in diesem durchgeführt. In einem schwach sauren Milieu bei pH <6,2 war bei *M. luteus* kein Wachstum zu beobachten. Ebenfalls wuchsen sie pH 7,4 nur verzögert und unregelmäßig in dem Test. Da die Hydrolyse der Zellwände dieser Bakterienspezies anderweitig gezeigt werden konnte, wurde sie hier nicht mit in die Analyse einbezogen. Auch die Bakterienspezies *S. aureus* wuchs in dem vorliegenden pH 5,2 unregelmäßig und verhältnismäßig langsam, desgleichen *B. subtilis*. Die CFU-Werte bei einer $OD_{600} = 0,1$ von *B. thuringiensis* und *P. luminescens* wurden ermittelt (2.11). Der CFU-Wert für *X. nematophilum* bei einer $OD_{600} = 0,1$ der Literatur entnommen und einmalig überprüft (Wang *et al.*, 2008). Bei jedem Experiment wurde ein Aliquot der verwendeten Bakteriensuspension ausgestrichen und die gewachsenen Kolonien anschließend gezählt, um die Anzahl der im Test eingesetzten Kolonien zu überprüfen. Die Anzahl der ausgezählten Kolonien deckte sich überwiegend mit den

berechneten Werten. Lediglich bei *E. coli* wurden deutlich mehr Kolonien gezählt (Daten hier nicht gezeigt). Die minimale inhibitorische Konzentration (*minimal inhibitory concentration*) und die minimale bakterizide Konzentration (*minimal bactericidal concentration*) sind in untenstehender Tabelle in μM angegeben. Die maximale eingesetzte Konzentration der Proteine betrug $25 \mu\text{M}$. Neben der Sterilkontrolle wurden auch die für die Verdünnung und Lagerung der Proteine verwendeten Lösungen auf inhibitorische Effekte untersucht. Diese wiesen allerdings keinerlei Beeinflussung des Bakterienwachstums auf.

Tab. 4: Ergebnisse des Mikrosuszeptibilitätstests mit ILYS-5 und HEWL. Die bakteriostatische und bakterizide Aktivität der synthetischen Proteine wurde bei pH 5,2 verifiziert. Dargestellt sind die Mediane aus drei unabhängigen Experimenten mit Doppel- oder Dreifachbestimmungen und einer Divergenz von weniger als zwei Verdünnungsstufen. **MIC** beschreibt die wachstumshemmende und **MBC** die bakterizide Konzentration der Proteine. > indiziert, dass keine Inhibition oder Tötung bei der eingesetzten Konzentration auftrat.

MIC und MBC [μM] bei pH 5,2				
Bakterienspezies	ILYS-5		Kontrolle (HEWL)	
Grampositive	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>B. megaterium</i>	0,625	0,625	0,00146	0,00146
<i>B. subtilis</i>	0,625	0,625	0,00049	0,00049
<i>B. thuringiensis</i>	5	5	>25	>25
<i>S. aureus</i>	1,25	5	1,6	5,7
Gramnegative	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. coli</i>	0,703	0,859	>25	>25
<i>P. aeruginosa</i>	2,5	2,5	>25	>25
<i>P. luminescens</i>	5	5	>25	>25
<i>S. marcescens</i>	2,5	5	>25	>25
<i>X. nematophila</i>	1,25	1,25	>25	>25
<i>Y. enterocolitica</i>	1,25	1,25	0,0488	0,0781

ILYS-5 zeigte eine Aktivität gegen alle verwendeten Bakterien (Tab. 4). Lysozyme sind dafür bekannt, grampositive Bakterien zu töten. Die Aktivität des ILYS-5 gegen sämtliche gramnegativen Bakterien war daher umso bemerkenswerter. Die stärkste antimikrobielle Aktivität zeigte das i-Typ-Lysozym gegen *B. megaterium*, *B. subtilis* und *E. coli*, wobei die Konzentrationen im submikromolaren Bereich lagen. Allerdings lagen die Werte bei den *Bacillus*-Spezies deutlich über denen von HEWL. Wie erwartet, zeigte das HEWL keinerlei Wirkung gegen gramnegative Bakterien, außer gegen *Y. enterocolitica*, bei dem es sich aktiver als das ILYS-5 erwies. Beide Lysozyme wiesen eine unerwartete Aktivität gegen *S. aureus* auf. Dabei unterlagen die Ergebnisse bei Inkubationen mit HEWL großen Schwankungen. Wie bereits, erwähnt, wuchs *S. aureus* sehr unregelmäßig und die Auswertung konnte mehrfach erst nach verlängerten Inkubationszeiten erfolgen.

4 Diskussion

Die angeborene Immunität ist von essentieller Bedeutung bei der Abwehr von Pathogenen. Sowohl in Wirbellosen als auch in Wirbeltieren reagiert das angeborene Immunsystem schnell und sehr effektiv. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren sind die genauen Funktionsmechanismen des angeborenen Immunsystems vielfach noch nicht bekannt. Es zeigte sich, dass viele Strukturen des Immunsystems innerhalb des Tierreichs bis hin zum Menschen sehr konserviert sind. Evolutiv niedriger gestellte Modellorganismen und deren Immunsysteme bieten demnach eine Möglichkeit die Mechanismen der angeborenen Immunabwehr zu erforschen.

Wirbellose verfügen ausschließlich über ein angeborenes Immunsystem. Allerdings sind sie in ihrer natürlichen Umgebung von Unmengen an pathogenen Mikroorganismen umgeben, gegen die sie sich erfolgreich verteidigen können. *C. elegans* wird in seiner natürlichen Umgebung ständig mit Pathogenen konfrontiert und nimmt diese womöglich auch mit der Nahrung auf. Dennoch scheint ihm die zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems zu fehlen (Kurz und Ewbank, 2003). Auch andere hoch konservierte Moleküle wie NF- κ B, ein wichtiger Transkriptionsfaktor bei der Regulation von Immunantworten, sind in dem Fadenwurm absent (Pujol *et al.*, 2001). Ferner ist noch nicht genau bekannt, wie der Wurm zwischen Futterbakterien und Pathogenen unterscheidet bzw. Pathogene generell wahrnimmt. Es wurde postuliert, dass TOL-1 dabei eine wichtige Rolle spielt (Pradel *et al.*, 2007). Die chemosensorische Wahrnehmung von *C. elegans* sowie das daraus resultierende Vermeidungsverhalten gelangen deshalb mehr und mehr in den Fokus der Studien (Pujol *et al.*, 2001; Abalalay *et al.*, 2003; Pradel *et al.*, 2007; Schulenburg und Ewbank, 2007; Kawli *et al.*, 2010; Kawli und Tan, 2008; Zhang und Zhang, 2009).

Das Genom von *C. elegans* verfügt über zahlreiche Gene für potentielle Immuneffektoren, die im Falle einer Infektion vermehrt exprimiert werden können. Die Induktion der Genexpression wurde bereits für Vertreter unterschiedlicher Proteinfamilien gezeigt (Schulenburg *et al.*, 2008). Zu diesen Effektoren werden auch Lysozyme gezählt. Diese Proteinfamilie kommt universell in Protisten, Pflanzen und Tieren vor. Der Modellorganismus *C. elegans*

besitzt insgesamt 15 Gene, die potentiell für Lysozyme zweier Subtypen kodieren. Damit ist diese Proteinfamilie sehr umfangreich in dem Wurm vertreten, was daraufhin deutet, dass diese essentiell für den Organismus sein könnten. Zehn mutmaßliche Lysozyme aus *C. elegans* sind denen aus *E. histolytica* sehr ähnlich. Ihre Expression wurde zum Teil spezifisch bei Infektionen mit einer Bakterienspezies hochreguliert (Ewbank, 2006).

Im Fokus dieser Arbeit lagen jedoch die fünf potentiellen i-Typ-Lysozyme aus *C. elegans*. Über diesen Subtyp in dem Fadenwurm ist bisher weniger bekannt. Die Beteiligung an der Immunabwehr von Pathogenen wurde anhand von Expressionsanalysen nach Exposition mit *Microbacterium nematophilum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Photobacterium luminescens* beschrieben (O'Rourke *et al.*, 2006; Troemel *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007). Alle potentiellen Lysozyme von *C. elegans* wurden bisher nicht auf Proteinebene analysiert, so dass deren funktionale Rolle noch im Dunkeln liegt.

4.1 Primärstrukturvergleiche von i-Typ-Lysozymen

Nach bisherigem Kenntnisstand besitzt *C. elegans* die größte Anzahl an Lysozymgenen überhaupt in einem Organismus. Darüber hinaus wurden in keinem anderen Invertebraten so viele potentielle i-Typ-Lysozyme gefunden. Im Zuge dieser Arbeit wurde ein phylogenetischer Stammbaum der Primärstrukturen bereits charakterisierter i-Typ-Lysozyme und der mutmaßlichen Lysozyme aus *C. elegans* erstellt (Abb. 7). Die Kalkulation ohne vorhergesagte Signalpeptide barg den Vorteil, realistischere Vorhersagen über die Verwandtschaftsverhältnisse der Lysozyme zueinander treffen zu können, da der N-terminale Bereich dieser Lysozyme stark variiert und somit die Ergebnisse verfälschen kann.

Die Analyse der Primärstrukturen dieser Proteinfamilie bestätigte die gegenwärtige phylogenetische Einordnung der Organismen in *Ecdysozoa* und *Lophotrochozoa*.

Die Invertebraten-Lysozyme wurden bislang nur in Wirbellosen identifiziert. Die Lysozyme, die in der Seegurke *S. japonicus* und dem Seestern *A. rubens* entdeckt wurden, sind die einzigen, die den *Deuterostomia* zugeordnet werden können (Jollès und Jollès, 1975; Cong *et al.*, 2009). Sequenzanalysen bei Tunikaten (Manteltieren) zeigten, dass keine i-Typ-Lysozyme in deren Genom enthalten sind (Nilsen *et al.* 2003). Mögliche Lysozyme in Hemichordaten

wurden bisher noch nicht beschrieben. Die i-Typ-Lysozyme gingen demnach den Chordaten im Laufe der Evolution verloren bzw. entwickelten sich evolutiv erst nach Abspalten der Chordaten-Stammlinie. Die Arthropoden und Nematoden wiederum spalteten sich vermutlich zu unterschiedlichen Zeitpunkten von der bilateralen Stammlinie ab, weswegen in den jeweiligen Entwicklungslinien andere Subtypen verloren gingen. So fehlen in Insekten, wie beispielsweise *D. melanogaster* oder *A. gambiae*, eh-Typ-Lysozyme und in Nematoden die c-Typ-Lysozyme. In den gemeinsamen Vorläufern waren jedoch höchstwahrscheinlich sämtliche genannte Subtypen vorhanden. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass der Protist *D. discoideum* über vier verschiedene Subtypen verfügt, einschließlich des eh-Typs und des c-Typs (Müller *et al.*, 2005).

Die Primärstrukturen der einzelnen potentiellen Lysozyme aus den Schwesterarten *C. elegans* und *C. briggsae* einander ähnlicher als die der anderen i-Typ-Lysozyme des jeweiligen Genoms untereinander. So bildeten die ILYS-4- und ILYS-5-Sequenzen jeweils eigene Äste innerhalb des erstellten Stammbaums (Abb. 7). Überdies liegen ILYS-5 und die korrespondierende Sequenz aus *C. briggsae* beide auf dem Geschlechtschromosom. Vermutlich entstanden diese Lysozyme demnach vor Aufspaltung der beiden Schwesterarten. Bemerkenswert ist, dass ausschließlich *ilys-5* von allen fünfzehn Lysozymgenen auf dem Geschlechtschromosom (X) lokalisiert ist. Obwohl auf unterschiedlichen Chromosomen vorliegend, ist die Primärstruktur von ILYS-5 in *C. elegans* denen von ILYS-2 und ILYS-3 ähnlicher als der von ILYS-1, dagegen liegen die Gene *ilys-1*, *ilys-2* und *ilys-3* in einem Cluster auf Chromosom IV. Generell gleicht ILYS-1 wenig den restlichen Lysozymen in *C. elegans* und bildet ebenfalls eine eigene Abzweigung innerhalb des Stammbaums. Demzufolge könnte *ilys-1* später durch Genduplikation innerhalb des Clusters entstanden oder durch Mutationen nachträglich verändert worden sein. ILYS-1 und ILYS-4 variierten auch in weiteren Eigenschaften (Tab. 1). Unter anderem enthalten sie im Gegensatz zu den anderen mehr negative als positive Aminosäurereste. Es wurden für sie daher abweichende isoelektrische Punkte kalkuliert (niedriger als die der anderen, vgl. Tab. 1), obwohl sich die tatsächliche äußere Ladung korrekt gefalteter Proteine aufgrund ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur erheblich von den kalkulierten pI-Werten unterscheiden kann. Dennoch könnte es sich bei *ilys-1* und *ilys-4* um Pseudogene handeln (Schulenburg und Boehnisch, 2008). Gerade auf *ilys-1* könnte das zu-

treffen, da die Primärstruktur als einzige von den fünf Lysozymen keine Destabilase-Domäne aufweist.

Ein weiterer Sequenzvergleich des ILYS-5 mit bereits charakterisiertem i-Typ-Lysozym der Japanischen Teppichmuschel *T. japonica* sollte konservierte Motive aufdecken und Aussagen über den funktionalen Charakter des *C. elegans*-Lysozyms möglich machen (Abb. 8, Goto *et al.*, 2007). ILYS-5 verfügt über 16 Cysteinreste in seiner Sequenz, wobei zwei Cysteinreste im C-terminalen Bereich der Sequenz direkt nebeneinander liegen. Damit besitzt das mutmaßliche Lysozym sogar zwei Cysteinreste mehr als die meisten anderen i-Typ-Lysozyme. Ob diese beiden Cysteinreste Disulfidbrücken ausbilden, bleibt unklar. Zwei Cysteinreste direkt nebeneinander sind nicht in anderen i-Typ-Lysozymsequenzen außer denen von *C. elegans* konserviert. Lediglich ILYS-4 aus *C. elegans* besitzt diese beiden Cysteinreste nicht in seiner Sequenz. Grundsätzlich geht man bei Lysozymen jedoch trotz variierender Primärstrukturen von einer konservierten Faltung der Proteine aus, so dass in der Tertiärstruktur eine katalytisch aktive Spalte ausgebildet wird, in der das Substrat während der Spaltung fixiert wird.

Des Weiteren wurden die an der katalytischen Reaktion beteiligten Aminosäurereste in dem strukturell aufgeklärten Lysozym aus *T. japonica* identifiziert. Die Lage der beiden beschriebenen Aminosäurereste in der Tertiärstruktur deckte sich mit denen aus HEWL (Phillips, 1966). Sie waren auch in ILYS-5 konserviert. In einigen Veröffentlichungen wurden drei an der Katalyse beteiligte Aminosäurereste formuliert, und zwar, neben dem klassischen Glutaminsäure- und Asparaginsäurerest, ein Serinrest (Zhao *et al.*, 2010; Josková *et al.*, 2009; Bachali *et al.*, 2004). Auch der Serinrest ist in Sequenzen von i-Typ-Lysozymen hoch konserviert und wird zu dem für diese Lysozyme spezifischen Sequenzmotiv gezählt. Bisher konnte aber noch keine direkte Beteiligung dieses Aminosäurerestes an der Katalyse nachgewiesen werden. Ausschließlich in der Struktur eines ch-Typ-Lysozyms konnte die Beteiligung eines dritten Aminosäurerestes an dem Katalyse-Mechanismus gezeigt werden. Allerdings handelt es sich dabei nicht um einen Serinrest (Rau *et al.* 2001). Möglicherweise ist der Serinrest in den i-Typ-Lysozymen an der Substratbindung oder Isopeptidase-Aktivität beteiligt und nicht an der Glykosidase-Reaktion.

Ein weiteres, für die i-Typ-Lysozyme spezifisches, Motiv ist ebenfalls in der Sequenz von ILYS-5 enthalten. Dies stützt die Vermutung, dass dieses Motiv in mehreren Subtypen der Lysozyme bis auf einzelne Positionen indifferent auftritt. Es scheint von essentieller Bedeutung bei der Substratbindung oder Katalyse ist.

Ferner besteht ein spezifisch für die Substratbindung verantwortliches Motiv aus Prolin- und Tyrosinresten sowie einem Histidinrest, die in einigem Abstand voneinander in der Primärstruktur der i-Typ-Lysozyme verteilt liegen. Hier offenbarten sich jedoch Abweichungen in der Primärstruktur des ILYS-5. Der Histidinrest des i-Typ spezifischen Substratbindungsmotivs ist bei Überlagerung des Strukturmodells von dem *Tapes*-Lysozym mit dem an der Substratinteraktion beteiligten Tryptophanrest von HEWL deckungsgleich positioniert (Goto *et al.*, 2007). Der Histidinrest ist in ILYS-5 konserviert und hat anscheinend eine tragende Rolle bei der Substratbindung, wohingegen die übrigen Aminosäurereste nicht vollständig konserviert sind.

Der Mechanismus der Isopeptidase-Aktivität in Lysozymen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Art der Aktivität wurde für mehrere Lysozyme des i-Typs beschrieben. Am besten wurde er in der Destabilase aus dem medizinischen Blutegel untersucht (Zavalova *et al.*, 1996). Dieses Protein wurde in eine N-terminale Glykosidase-Region und eine C-terminale Isopeptidase-Region unterteilt, was auch für ein Lysozym aus *S. japonicus* formuliert wurde (Zavalova *et al.*, 1996; Cong *et al.*, 2009). Charakteristisch für die Isopeptidase-Aktivität sollen, ähnlich wie bei der Muramidase-Aktivität, zwei Aminosäurereste sein. So sollen ein Serin- und ein Histidinrest die enzymatische Reaktion vermitteln (Zavalova *et al.*, 1996). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation des *Tapes*-Lysozyms mit einem Serinprotease-Inhibitor die Isopeptidase-Aktivität gehemmt wurde (Takeshita *et al.*, 2003). Außerdem wurden verschiedene pH-Optima für die Chitinase- und Isopeptidase-Aktivität des Lysozyms aus *T. japonica* beschrieben, wobei die Isopeptidase-Aktivität eher im basischen Bereich auftritt. In der Primärstruktur von ILYS-5 steht an Stelle des vermutlich essentiellen Serinrestes jedoch ein Alaninrest (Abb. 8). Dies könnte ein Grund dafür sein, warum bei der biochemischen Charakterisierung von ILYS-5 keine Isopeptidase-Aktivität nachgewiesen werden konnte (4.3).

Eine nicht-enzymatische Wirkungsweise von Lysozymen ließ sich bereits in mehreren Subtypen beobachten. Diese nicht durch eine katalytische Reaktion vermittelte antibakterielle Eigenschaft wird vermutlich entweder durch amphipatische Wechselwirkungen oder den hochgradig kationischen Charakter der Proteine hervorgerufen. Die Interaktionen mit der Zelloberfläche der Bakterien sollen zur Lyse der Zellen führen. Es wurde unter anderem ein Helix-Loop-Helix-Motiv in der Sekundärstruktur von Lysozym für die von der Katalyse unabhängige Aktivität verantwortlich gemacht (Ibrahim *et al.*, 2001). Allerdings ist die Destabilase aus *H. medicinalis* auch ohne dieses Motiv nicht-enzymatisch aktiv (Zavalova *et al.*, 2006). Im Übrigen ist die Interaktion der Lysozyme mit den Bakterienzellen bei der nicht-enzymatischen, bakteriziden Aktivität nicht vollständig aufgeklärt. Die Sekundärstruktur von ILYS-5 ist nicht bekannt und mögliche nicht-enzymatische Aktivitäten wurden hier nicht experimentell überprüft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Tertiärstruktur von ILYS-5 nicht aufgeklärt. Zum besseren Verständnis des dreidimensionalen Aufbaus der i-Typ-Lysozyme könnten NMR-Spektren und die röntgenkristallographische Struktur des gereinigten maturen ILYS-5 beitragen. Es lässt sich jedoch festhalten, dass die Primärstruktur des ILYS-5 aus *C. elegans* die charakteristischen Sequenzmerkmale mit den bereits identifizierten i-Typ-Lysozymen teilt. Sowohl die für diesen Subtyp spezifischen Motive als auch die beiden höchstwahrscheinlich für die Katalyse verantwortlichen Aminosäurereste (Glu/E und Asp/D) sowie ein für die Substratbindung offenbar essentieller Histidinrest sind im ILYS-5 konserviert.

4.2 Lokalisation der *ilys*-Genexpression in *C. elegans*

Um die Funktion eines Proteins oder einer Proteinfamilie in einem Organismus aufklären zu können, ist das Wissen über den Ort der Genexpression bzw. Proteinsynthese von entscheidender Bedeutung. Die Expression in verschiedenen Geweben kann auf unterschiedliche Funktionen hindeuten. Ebenso können Expressionsprofile verschiedener Proteinfamilien miteinander verglichen werden, um eventuell ähnliche Funktionen oder eine gemeinsame Rolle in einem Organismus zu erkennen.

In dieser Arbeit wurden *gfp*-Reporter-genkonstrukte in Wildtyp-Würmer von *C. elegans* injiziert. Mit Hilfe der generierten transgenen Linien wurde so die Genexpression der *ilys*-Gene lokalisiert und der Ort der Proteinsynthese identifiziert.

Häufig werden bei *gfp*-Reporter-genkonstrukten nur die Promotorsequenzbereiche eines Gens verwendet und somit auch nur die Aktivität des entsprechenden Promotors nachgewiesen. Allerdings können sich *cis*-regulatorische Bereiche für ein bestimmtes Gen auch in Introns oder der 3'-UTR befinden. Ein transkriptionales Reporterkonstrukt sollte daher auch solche Sequenzbereiche abdecken. Sofern ein vollständiges translationales Reporterkonstrukt generiert werden soll, müssen sämtliche regulatorische Sequenzbereiche sowie die kodierende Sequenz eines Gens enthalten sein. Der in dieser Arbeit verwendete Reporter-genvektor wurde durch die Hersteller so manipuliert, dass die Transkription und Translation der Fusionssequenz unterstützt wird. Überdies ist das Genom von *C. elegans* sehr kompakt und die meisten *cis*-regulatorischen Sequenzen liegen innerhalb weniger Kilobasen strangaufwärts eines Gens. Es wurden jedoch auch Beispiele für kritische regulatorische Sequenzen in den Introns gefunden, vor allem bei besonders langen Intronsequenzen (Wenick und Hobert, 2004). Außergewöhnlich selten liegen derartige Bereiche jedoch weiter entfernt in flankierenden Sequenzen anderer Gene (Conradt und Horvitz, 1999; Wenick und Hobert, 2004). Neue Erkenntnisse aus den letzten Jahren machten schließlich deutlich, dass die posttranskriptionale Genregulation teilweise durch so genannte *microRNA* vermittelt wird. Es handelt sich dabei um kurze, nicht kodierende, RNA-Sequenzen, die bevorzugt in der 3'-UTR eines Gens binden und darüber die Translation beeinflussen können (Ambros, 2004). Alle in dieser Arbeit verwendeten Reporter-genkonstrukte, ob Plasmid oder PCR-Produkt, verfügten über die 3'-UTR des *unc-54* Gens aus *C. elegans*, das die schwere Myosinkette in Muskeln kodiert, wodurch die korrekte Translation und Prozessierung sichergestellt werden sollte. In die Plasmide wurden jeweils die Promotorsequenzen und das erste Intron der Gene kloniert (einschließlich des ersten und zweiten Exons; *ilys-2* und *ilys-4*). Die Gene *ilys-2* und *ilys-4* verfügen über drei bzw. vier Introns von unterschiedlicher Länge. Inwieweit in den nicht bei der Klonierung verwendeten Bereichen *cis*-regulatorische Bereiche liegen, ist nicht bekannt. Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass eine umfassende Genexpressionsanalyse mit den beiden Reportgenplasmiden für *ilys-2* und *ilys-4* erreichbar war. Bei den restlichen *ilys*-

Genen wurden neben der Promotorsequenz sämtliche Intron- und Exonbereiche mit dem *gfp*, dem artifiziellen Intron und der 3'-UTR von *unc-54* fusioniert. Es handelte sich demnach um über die Transkriptionsanalyse hinausgehende Reporterkonstrukte, die auch Aufschluss über den Ort der Proteinsynthese geben sollten.

Bei allen potentiellen i-Typ-Lysozymen wurde eine Expression im Darm nachgewiesen, wobei das *ilys-3::gfp*-Signal kaum von der gegebenen Autofluoreszenz der Würmer zu unterscheiden war. Bereits veröffentlichte Studien postulierten für *ilys-2*, *ilys-3* und *ilys-5* eine darmspezifische Expression, da diese Gene über eine Bindungsdomäne für ELT-2 verfügen (McGhee *et al.*, 2007; Pauli *et al.*, 2006). ELT-2 ist ein GATA-Transkriptionsfaktor, der die gewebsspezifische Expression bedingt. Eventuell wird *ilys-3* nicht konstitutiv im Darm exprimiert. Die Expression von *ilys-3* könnte als spezifische Reaktion auf eine Infektion durch ein Pathogen induziert werden. Bei Infektionen mit *M. nematophilum*, *P. luminescens* oder *S. aureus* wird die Expression beispielsweise induziert (O'Rourke *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007; Irazoqui *et al.*, 2010). Irazoqui und seine Kollegen beobachteten ebenfalls nur eine schwache Expression von *ilys-3::gfp* im Darm, obwohl deren qRT-PCR-Ergebnisse eine starke Induktion der Genexpression durch *S. aureus* ergaben. Obwohl die Gene *ilys-1* und *ilys-4* nicht über eine Bindungsdomäne für ELT-2 verfügen, konnte dennoch die Genexpression im Darm nachgewiesen werden. Demnach ist eine Bindungsdomäne für derartige Transkriptionsfaktoren weder ein garantierter Hinweis für die Expression im Darm noch ist sie zwingend notwendig. In manchen Fällen wurden unspezifische Fluoreszenzen in den posterior gelegenen Darmzellen durch GFP-Reporterkonstrukte, die die *unc-54-3'*-UTR trugen, beobachtet. Da sich die GFP-Signale in den Expressionsprofilen der potentiellen i-Typ-Lysozyme nicht auf den Enddarm beschränkten, konnte ein Artefakt hier ausgeschlossen werden. Neben den i-Typ-Lysozymen werden anscheinend auch die eh-Typ-Lysozyme sowie weitere mutmaßliche Immuneffektoren im Darm von *C. elegans* exprimiert. Von den potentiellen eh-Typ-Lysozymen werden alle, außer *lys-3* und *lys-9*, im Darm exprimiert, wobei einige Gene ebenfalls eine ELT-2-Bindungsdomäne besitzen (*lys-1* evtl., *lys-2* und *lys-4*) (Alper *et al.*, 2007; McGhee *et al.*, 2007; Pauli *et al.*, 2006; Shapira *et al.*, 2006; Mallo *et al.*, 2002; Mochii *et al.*, 1999). Eine besonders hohe Expressionsrate konnte dabei für *lys-1* und *lys-2* beschrieben werden. Es wird daher von einer konstitutiven Expression der beiden Gene

ausgegangen. Des Weiteren wurde die Lokalisation dieser Genprodukte in apikalen Vesikeln der Darmzellen formuliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch nicht bestimmt werden, in welchen Zellbestandteilen oder Bereichen der Zelle die *ilys*-Gene exprimiert werden oder deren Genprodukte lokalisiert sind. Weitere Immuneffektor-Moleküle, für die eine Genexpression im Darm angenommen wird, sind unter anderem die Caenopores und ABF-Proteine (Alper *et al.*, 2007). Die Expression von SPP-1 und SPP-5 (beides Caenopores) beschränkt sich dabei ausschließlich auf den Darm (Alper *et al.*, 2007; Roeder *et al.*, 2010). Eine Expression im Darm bei *C. elegans* muss nicht automatisch für eine Verdauungsfunktion sprechen. Die Fadenwürmer nehmen mit der Nahrung auch potentielle Pathogene auf, und Infektionen werden durch verschiedene Bakterienspezies über das Darmepithel verursacht. Daher ist es ebenso wahrscheinlich, dass Immuneffektoren in den Epithelzellen des Verdauungstraktes produziert und bei Infektionen gegebenenfalls sezerniert werden.

Die Aufnahme von Futterbakterien oder pathogenen Mikroorganismen erfolgt in *C. elegans* über den muskulösen Pharynx. Proteine, die in den Muskel- oder Marginalzellen des Pharynx synthetisiert werden, könnten eventuell in das Pharynxlumen sezerniert werden, um dort verdauende oder immunologische Funktionen zu übernehmen. Die Expression im Pharynxgewebe konnte wiederum für alle *ilys*-Gene gezeigt werden (Tab. 3). Allerdings fielen die Fluoreszenzsignale bei *ilys-4::gfp*- und *ilys-5::gfp*-exprimierenden Würmern nur schwach aus und waren auf den terminalen Bulbus konzentriert. Auch in diesem Gewebe wurde darüber hinaus die Expression anderer Immuneffektor-Gene beschrieben. Beispielsweise wird *lys-8* in den Drüsenzellen des terminalen Bulbus des Pharynx exprimiert (Smit *et al.*, 2008). Ferner konnten die Transkripte von *abf-1* und *abf-2* im Pharynx lokalisiert werden (Kato *et al.*, 2002).

Des Weiteren war die Expression in verschiedenen Kopf- und Schwanzneuronen den *ilys*-Genen gemein. Diese wurden jedoch nicht genau identifiziert. Außerdem lagen die GFP-Signale in den *ilys-2::gfp*-exprimierenden Würmern an der Nachweisgrenze. Demnach sind die i-Typ-Lysozyme anscheinend in drei verschiedenen Gewebearten universell lokalisiert. Indessen konnte anhand der Expressionsanalyse nicht geklärt werden, ob es sich bei den Neuronen um den Pharynx oder Darm innervierende Neuronen handelte.

Über die nicht definierten Neuronen hinaus gelang eine Kollokalisierung der GFP-Fusionsprodukte von *ilys-4* und *ilys-5*. Durch die Exposition der transgenen Würmer mit diI-gefärbten *E. coli* OP50 ließen sich die chemosensorischen Amphid- und Phasmidneuronen sichtbar machen (Tab. 3). Auch in diesem Fall überschritten sich die Expressionsmuster mit denen eines eh-Typ-Lysozyms, nämlich *lys-1*, und den Immuneffektoren *abf-1* und CUB-Domäne kodierenden Genen (Alper *et al.*, 2007). Die chemosensorischen Amphid- und Phasmidsensillen stehen in Kontakt zur Außenwelt. Welche Rolle den i-Typ-Lysozymen in diesen Neuronen dabei zukommt, ist gänzlich unbekannt. Es wären Abwehrfunktionen gegen durch die Öffnungen der Sensillen eintretende Pathogene ebenso denkbar, wie eine Degradation von Bakterienzellen außerhalb des Wurms durch sezernierte Lysozyme, deren Spaltprodukte entweder die Immunabwehr oder eine einfache Futterreaktion auslösen könnten.

Die Expression verschiedener Immuneffektorgene in Neuronen scheint ein generelles Phänomen in *C. elegans* zu sein. Caenopores (*spp-7*), Caenacine (*cnc-2*) oder CUB-Domäne tragende Proteine sind da nur ausgewählte Beispiele. Mechanismen, die bei Infektionen mit Hilfe von Neuropeptiden eine Immunantwort und damit die Expression von Effektormolekülen induzieren, sind in *C. elegans* nur anfänglich verstanden (Zhang und Zhang, 2009; Zugasti und Ewbank, 2009; Kawli und Tan, 2008). Zwar konnte in mehreren Fällen gezeigt werden, dass durch das neuronale System eine Immunantwort über Neuropeptide ausgelöst wird, allerdings wurden die jeweiligen Immuneffektoren in anderen Geweben als den Neuronen exprimiert. Dennoch konnte in dem medizinischen Blutegel gezeigt werden, dass antimikrobielle Peptide direkt in Neuronen exprimiert werden und wesentlich an der Wundheilung und Abwehr von Pathogenen beteiligt sind (Schikorski *et al.*, 2008).

In einem weiteren Neuronentyp wurden ausschließlich die Genprodukte eines i-Typ-Lysozyms nachgewiesen. So wurde *ilys-4::gfp* in spiralförmigen Strukturen entlang der gesamten Körperachse exprimiert. Diese Strukturen wiesen Dendriten-artige Ausläufer bis weit in die Schwanzregion sowie konzentrierte, punktförmige GFP-Signale, vergleichbar mit neuronalen Zellkörpern, auf. Vermutlich handelt es sich dabei um Motorneuronen (Tab. 3). In einer anderen Reporter-gen-Studie wurden ähnliche Strukturen beschrieben, dabei aber sechs mechanosensorischen Neuronen zugeordnet. Aufgrund der Ähnlichkeit der Expressionsprofile könnte *ilys-4* auch in sensorischen Neuronen exprimiert werden, was eine Kollokalisierung mit

tol-1 bedeuten würde (Pujol *et al.*, 2001). In welchem Neuronentyp das Expressionsmuster von *ilys-4* vorliegt, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Eine weitere Besonderheit von *ilys-4* ist seine Expression im Exkretionssystem. Das exkretorische Gewebe steht über eine Pore in der Cuticula im direkten Kontakt zur Außenwelt. Die Zellen sind unterhalb des terminalen Bulbus des Pharynx mit der Porenöffnung zur ventralen Seite organisiert. Wie zuvor in den anderen Geweben wird auch in dem Exkretionssystem ein Gen (*abf-2*), das für einen weiteren Vertreter aus der Gruppe der Immuneffektormoleküle kodiert, exprimiert (Kato *et al.*, 2002). ABF-2 besitzt unter anderem eine antimykotische Aktivität. Darüber hinaus lagern sich für *C. elegans* pathogene Pilze an dessen Cuticula an und die eindringenden Hyphen verursachen anschließend Infektionen. Demnach schützt sich der Wurm möglicherweise gegen invadierende Pilzhyphen über die exkretorische Pore durch die Synthese von Immuneffektoren wie dem ABF-2 und ILYS-4. In diesem Gewebe übernimmt das mutmaßliche ILYS-4 demzufolge voraussichtlich Funktionen bei der Immunabwehr.

Im Gegensatz dazu wurde die Expression für drei der fünf i-Typ-Lysozymgene in einem weiteren körperoberflächennahen Gewebe nachgewiesen. Die Hypodermis und ihr angelagerte Strukturen liegen direkt unter der von ihr sezernierten Cuticula. Bei der Hypodermis handelt es sich um ein syncytialen Epithel. Neben der schützenden kollagenen Cuticula bildet die Hypodermis die Körperhülle. Von den Nuklei der Hypodermiszellen kann teilweise natürlich vorkommende Autofluoreszenz ausgehen, was bei den dokumentierten Fluoreszenzen jedoch ausgeschlossen werden konnte. Von ihr sezernierte Effektormoleküle bilden wahrscheinlich Schutz gegen Infektionen durch schadhafte Stellen in der Cuticula oder bei offenen Wunden. Die Expression von Immuneffektoren wie Neuropeptid-ähnliche Proteinen und Caenacinen (v. a. NLP-29) bei Verwundung und Pilzinfektionen wurde bereits beschrieben (Couil-lault *et al.*, 2004; Pujol *et al.*, 2008; Zugasti und Ewbank, 2009). Die Granula-ähnlichen Strukturen entlang einer Linie nahe der Körperoberfläche, in denen die Fusionsprodukte konzentriert waren, wurden wiederum den *Seam*-Zellen zugeordnet. Die Expressionsmuster von *ilys-1* und in geringerem Maße auch *ilys-2* deckten sich nicht mit der Morphologie von Motorneuronen oder anderen Nervenzellen. Darüber hinaus unterschieden sie sich von der

Morphologie *gfp*-exprimierender Epidermiszellen bekannter transgenen Linien. Außerdem verlief die linienartige Struktur diagonal und nicht deckungsgleich mit dem Darm oder den Gonaden. Höchstwahrscheinlich lagen die Expressionsprodukte in Granula der *Seam*-Zellen vor, da ganze Zellen oder die Zellkerne größer ausfallen. Diese Zellen sind der Hypodermis assoziiert und ebenfalls an der Bildung der Cuticula beteiligt. In Granula gespeicherte Effektorproteine könnten möglicherweise gezielt bei Infektionen sezerniert werden.

Schließlich wurde ILYS-5::GFP außer in den bereits genannten Geweben auch in zwei weiteren distinkten Geweben beobachtet (Tab. 3). Die Lokalisation in den rektalen Drüsenzellen und den Spermatheken traf nur auf dieses Lysozym zu. Bei den drei Drüsenzellen handelt es sich um dem Darm anhängende Zellen in Anusnähe. Ihnen wird eine sekretorische Funktion von nahrungsspezifischen Enzymen zugesprochen. Allerdings wurde noch nicht aufgeklärt, ob sie neben der mutmaßlich primär verdauungsfördernden Funktion auch Aufgaben bei der Immunabwehr innehaben. Die rektalen Drüsenzellen könnten auch spezifisch Immuneffektoren gegen über den Anus eindringende Pathogene sezernieren. *M. nematophilum* heftet sich beispielsweise an die Cuticula im Bereich des Enddarms an. Dabei führt eine Infektion mit diesem Bakterium zum Anschwellen der hypodermalen Zellen des Rektums. Neben *ilys-5* werden auch *lys-7*, *abf-3* sowie CUB-Domäne kodierende Gene in diesen Zellen exprimiert (Alper *et al.*, 2007). Die Expression von *lys-7* wird (neben anderen Lysozymgenen) laut Microarray-Analysen durch die Infektion mit *M. nematophilum* induziert, für *ilys-5* wurde dies jedoch nicht postuliert (O'Rourke *et al.*, 2006). Die Expression in rektalen Drüsenzellen kann demnach sowohl auf Funktionen bei der Verdauung als auch der Immunantwort hindeuten. Außerdem wurde ILYS-5 in dem Reproduktionssystem lokalisiert. Die Detektion eines starken GFP-Signals in den transgenen Würmern ließ auf eine hohe Expressionsrate von *ilys-5* in diesen Organen schließen. In den Spermatheken werden die Samen gespeichert. In ihnen findet die Befruchtung der Oocyten statt. Die gewebsspezifische Expression in diesen Strukturen spricht in diesem Fall eindeutig gegen eine Funktion bei der Verdauung. Das ist bislang das erste Expressionsprofil eines Immuneffektors, das auch eine Lokalisation in dem Reproduktionssystem oder den Spermatheken umfasst. Wie bereits für andere i-Typ-Lysozyme beschrieben, verfügt ILYS-5 auch über eine Chitinase-Aktivität. Die Eier von *C. elegans* werden unter anderem von einer schützenden Chitinschicht ummantelt. Diese

Eihülle wird nach der Fertilisation gebildet, somit in den Spermatheken oder in der direkten Umgebung im Uterus (Zhang *et al.*, 2005). Möglicherweise übernimmt ILYS-5 in diesem Gewebe eine Funktion bei Regulation der Reproduktion bzw. Eihüllenbildung

Interessanterweise wurden auch *ilys-5::gfp*-exprimierende Männchen gefunden, in denen ein Signal im Darm und den Strahlen des Schwanzes dokumentiert werden konnte. ILYS-5 wird demnach in beiden Geschlechtern exprimiert und besitzt anscheinend eine wichtige Rolle in *C. elegans*.

Abschließend lässt sich feststellen, dass für alle i-Typ-Lysozyme eine multilokale Expression nachgewiesen werden und jedes der fünf Gene und deren Genprodukte jeweils in verschiedenen Gewebetypen lokalisiert werden konnte. Überdies überlagerten sich die Expressionsprofile in mehreren Fällen. Des Weiteren überschneiden sich die Expressionsmuster der i-Typ-Lysozyme mit denen anderer Immuneffektoren. Auffallend oft wurde die Genexpression von anderen Lysozymen und den ABFs in identischen Geweben beobachtet. Synergistische Funktionsweisen von Effektormolekülen wurden bereits mehrfach für verschiedene Organismen und auch für *C. elegans* vorgeschlagen (Chalk *et al.*, 1994; Leippe, 1999; Roeder *et al.*, 2010). Aufgrund der kolokalisierten Expressionsprodukte von *ilys*- und *abf*-Genen wären synergistische Wechselwirkungen zwischen diesen Proteinen vorstellbar. Bislang wurden solche Effekte in *C. elegans* für Lysozyme und Caenopores vorgeschlagen (Roeder *et al.*, 2010).

Die Lokalisation der GFP-Fusionsprodukte in Darmtrakt-spezifischen Geweben trifft auf zahlreiche potentielle Immuneffektoren zu. Zunächst würde demnach eine Verdauungsfunktion vermutet. Besonders *ilys-5* zeigte eine hohe Expressionsrate im Darm, sogar in Larvalstadien und Männchen. Anders als für SPP-1 oder SPP-5 gezeigt, ist die Expression dieses potentiellen Lysozyms jedoch nicht auf dieses Gewebe beschränkt gewesen. Der Darm wird auch nicht direkt von Neuronen innerviert, weswegen sich die Expression in Neuronen dadurch ebenfalls nicht darauf zurückführen lässt. Welche Funktionen Lysozyme und andere Immuneffektoren im Darm übernehmen, konnte mit Hilfe der Genexpressionsanalysen nicht abschließend geklärt werden. Voraussichtlich übernehmen die potentiellen i-Typ-Lysozyme unterschiedliche Funktionen in den verschiedenen Geweben, in denen sie exprimiert und syn-

thetisiert werden. Es kann jedoch angenommen werden, dass sich deren Rolle nicht auf die Verdauung beschränkt. Außerdem weisen die vorliegenden Resultate daraufhin, dass sowohl die Funktion als auch die Regulierung der einzelnen i-Typ-Lysozyme spezifisch in den einzelnen Geweben erfolgt. Schließlich stellen die in dieser Arbeit generierten transgenen Reporterlinien eventuell nicht die vollständigen Expressionsmuster der untersuchten Gene dar. Zur Absicherung der Ergebnisse müssten zukünftig so genannte gewebs- oder zellspezifische *Rescue*-Experimente, Mosaik-Analysen oder die Identifikation über spezifische Antikörperfärbungen durchgeführt werden. Dadurch ließen sich die Gewebsstrukturen ebenfalls genau identifizieren. Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Konstrukte geben aber erste Eindrücke über die Lokalisation der Genexpression bzw. Proteinsynthese und deren mögliche Funktion.

4.3 Molekulare Charakterisierung von ILYS-5

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals die Charakterisierung eines Lysozyms auf Proteinebene von *C. elegans*. Zuvor wurde noch kein Lysozym aus einem Nematoden proteinbiochemisch analysiert. Die molekulare Charakterisierung des iTyp-Lysozyms erfolgte auf Basis eines in Bakterien rekombinant hergestellten Proteins. Die gewonnenen Erkenntnisse lassen sich dennoch auf das natürliche Lysozym übertragen, da diese Effektorproteine über konservierte Aktivitätsmechanismen verfügen und in der Regel sehr stabile und konservierte Faltungen eingehen. Die drei, durch die heterologe Synthese bedingten, N-terminal vorgelagerten Aminosäurereste hatten höchstwahrscheinlich keine beeinflussenden Effekte. Darüber hinaus wurde in vorausgegangenen Arbeiten das natürliche, aktive ILYS-5 identifiziert.

Bei der Etablierung des Synthese- und Präparationsprotokolls von ILYS-5 wurden bei den Dialyseschritten und nach der Prozessierung durch Enterokinase wiederholt Präzipitate ausgemacht. Da dieser Ausfall nicht mit Aktivitätsverlusten einherging, handelte es sich vermutlich um Membranbestandteile, Lipide oder andere Proteine. Die Extraktionsgemische wurden von denaturierenden Bedingungen in native überführt. Demzufolge sind Sedimente nur von ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen löslichen Molekülen zu erwarten. Außerdem wurde durch den Einsatz von einem Glutathion-Redoxsystem und behutsamen Vorgehen

bei pH-, Salz- und Stoffkonzentrations-Wertveränderung zwischen den verwendeten Puffern die Sedimentbildung möglichst klein gehalten.

Problematisch erwies sich weiterhin die Trennung der Fusionspartner von dem murenen ILYS-5 bzw. der Mehrfachbanden des Lysozyms. Auch der Einsatz mehrerer analytischer Chromatographie-Verfahren brachte keinen Erfolg. Vielfach wurde ILYS-5 gar nicht oder nur schwach an die dabei verwendeten Säulen gebunden (Daten wurden hier nicht vorge stellt). Allerdings zeigte sich bei der Analyse der molekularen Identität, dass die Mehrfachbanden nicht durch Verunreinigungen auftraten. So wurden in jeglichen Banden das ILYS-5 identifiziert (Abb. 39). Die massenspektrometrische Analyse des nicht trypsinisierten ILYS-5 hingegen verlief auch bei mehrmaliger Wiederholung leider nicht erfolgreich. Das Phänomen der Mehrfachbanden lässt sich außerdem nicht auf Dimer-, Trimer- oder Tetramerbildung der Lysozyme zurückführen, ebenso nicht auf verbliebene Sekundärstrukturen während der SDS-PAGE. Die Proben wurden vor der präparativen Gelelektrophorese reduziert und alkyliert. Wenn derartige Strukturen vorgelegen hätten, wäre die tryptische Spaltung der Proteine vermutlich ebenfalls nicht erfolgreich gewesen. Außerdem wurde ILYS-5 in einem anderen Ansatz über die Dauer von zwei Stunden unter unterschiedlichen Temperaturbedingungen reduziert und alkyliert worden (Daten nicht gezeigt). Die Bandenmuster veränderten sich selbst nach zweistündiger Reduktion der Proteine nicht. Bei zukünftigen Präparationen könnte eine Gelfiltrations-Chromatographie, die auf die molekulare Größe der multiplen Banden abgestimmt ist, weitere Erkenntnisse bringen. Allerdings müssten danach auch sensitive Protein-Färbemethode als die Silberfärbung eingesetzt werden. Eine Gelfiltration wurde innerhalb dieser Arbeiten jedoch nicht durchgeführt. Aufgrund der hohen Anzahl der Cysteinreste in der Primärstruktur von ILYS-5 können allerdings Artefakte bei dem Laufverhalten in einem SDS-Polyacrylamidgel auftreten. Eventuell waren die Banden deswegen auf Höhe von größeren Massen als den erwarteten positioniert. Inwieweit freie Cysteinreste in dem murenen Protein vorgelegen haben, könnte durch eine Inkubation mit der sogenannten *Ellman's-Reagenz* (DTNB) und anschließender Gelelektrophorese untersucht werden (O'Keefe, 1994). Bei diesem Verfahren werden Sulfhydryl-Gruppen ([-SH]) gemessen. Des Weiteren ließe sich die strukturelle Integrität auch durch Inkubation des Proteins mit *Mono-bromobimane* überprüfen. Dieses Reagenz reagiert ebenfalls mit Thiolgruppen, so dass freie

Cysteinreste unter UV-Licht sichtbar gemacht werden (Riener *et al.*, 2002). Diese Verfahren könnten im Übrigen Aufschluss darüber geben, ob bei der aktiven Form des ILYS-5 alle Cysteinreste Disulfidbrücken untereinander ausbilden (4.1). Ob es sich bei den verschiedenen Banden um mehrere Isoformen des Proteins handelte, konnte nicht geklärt werden. Eine vollständige Sequenzierung der Proteine in den einzelnen Banden würde mögliche Unterschiede in der Primärstruktur aufdecken. Zuvor müssten diese dessen ungeachtet isoliert werden, was bisher nicht gelang.

In beiden für die molekulare Charakterisierung verwendeten Fraktionen mit ILYS-5 wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die verbleibenden potentiellen Abweichungen zu der realen Konzentration können methodisch nicht verhindert werden. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten sowie die MIC- und MBC-Werte repräsentieren aber die tatsächlichen Werte. Demnach kann der Unterschied zwischen den spezifischen Aktivitäten der beiden zur Charakterisierung verwendeten Fraktionen in Wirklichkeit auch geringer als 730 U/mg betragen. Zudem kommt der durch die Kalkulation bedingte Fehler bei den bestimmten Aktivitäts-Units zum Tragen.

Abschließend ist noch zu erwähnen, dass im Rahmen dieser Arbeit auch drei potentielle Lysozyme des eh-Typs rekombinant synthetisiert und massenspektrometrisch identifiziert werden konnten. So wurden LYS-1, LYS-7 und LYS-8 heterolog exprimiert und auf Proteinebene eindeutig identifiziert (Daten nicht gezeigt). Erste Versuche der Isolierung und Prozessierung verliefen jedoch nicht erfolgreich. Bisher konnte keine Lysozym-Aktivität in den eh-Typ-Lysozymen verifiziert werden. Demnach gelang es nicht, die Proteine in die aktive Form zu überführen oder zumindest den pH-Bereich zu ermitteln, in der eine Aktivität des Lysozyms möglich ist.

Das pH-Optimum für die Aktivität des maturen ILYS-5 lag bei pH 3,5 und reichte bis zu einem Wert von pH 4,0. Dieses Lysozym aus *C. elegans* besitzt demnach sein Aktivitätsmaximum in einem sehr sauren pH-Milieu, was so bisher für kein anderes i-Typ-Lysozym gezeigt wurde. Ausschließlich Lysozyme des eh-Typs und c-Typs besitzen auch in diesem pH-Bereich die höchste Aktivität (Callewaert und Michiels, 2010; Terra, 1988; Jacobs und Leippe, 1995; Nickel *et al.*, 1998). Andere Lysozyme des i-Typs wiesen aber auch im sauren

pH-Bereich maximale Aktivitäten auf (Nilsen *et al.*, 1999). Ähnlich wie bei den Lysozymen aus *E. histolytica* fiel die Aktivität von ILYS-5 stark ab, sobald neutrale Bedingungen herrschten. Im basischen Bereich war nahezu keine Lysozymaktivität nachweisbar. Dies war auch bei einem eh-Typ-Lysozym bei einem Wert von pH 8,0 der Fall (Jacobs und Leippe, 1995).

Des Weiteren zeigte sich, dass ILYS-5 bis zu einer Ionenstärke von $I = 0,2$ salztolerant zu sein scheint. Allerdings liegen in diesem Fall nur anfängliche Ergebnisse vor. Das Aktivitätsmaximum konnte anhand der vorliegenden Daten nicht exakt bestimmt werden. Ferner wurde nur der Zusammenhang von der Ionenstärke von NaCl mit der Aktivität von ILYS-5 verglichen und die Untersuchung nicht auf andere, beispielsweise zweiwertige Ionen, ausgeweitet. Immerhin konnte der Bereich der Ionenstärke, in dem die glykosidische Aktivität nicht maßgeblich negativ beeinflusst wird, ermittelt werden. Dieser ähnelte Toleranzbereichen, bereits bekannter Proteine. Bei dem i-Typ-Lysozym aus *T. japonica* wurde indessen gezeigt, dass über die vorherrschenden Salzbedingungen unterschiedliche Aktivitätsmechanismen des Enzyms reguliert wurden (Goto *et al.*, 2007). Bei niedrigen Salzkonzentrationen bildeten die Proteine Dimere aus, in denen die $\alpha 6$ -Helix des einen Monomers sich in die Spalte des anderen Monomers legte. Die Chitinase-Aktivität wurde dadurch inhibiert. Da Lysozyme in der Regel nur als Monomere aktiv sind, wurde auch hier gezeigt, dass die Dimerbildung salzabhängig war. Die Dimerstruktur konnte sich nur unter niedermolaren Salzkonzentrationen ausbilden, was wahrscheinlich eine Möglichkeit der Aktivitäts-Regulation über die Quartärstruktur in den Muscheln ermöglicht. Die an den elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Dimerbildung beteiligten Aminosäurereste konnten nur vereinzelt in ILYS-5 gefunden werden (Abb. 8). Da es sich bei *T. japonica* um einen marinen Mollusken handelt, wird bei der Nahrungsaufnahme salzhaltiges Meerwasser aufgenommen, wodurch potentielle Verdauungsenzyme aktiviert werden könnten. Auch würde im Falle einer Verwundung oder Infektion Meerwasser in die Gewebe gelangen und so gegebenenfalls die Aktivität der Proteine induziert (Goto *et al.*, 2007). Es ist bisher nicht bekannt, ob ILYS-5 Dimere ausbildet. Dagegen ist eine Regulation der Aktivität dieses Lysozyms über vorherrschende Salzbedingungen eher unwahrscheinlich. Der Fadenwurm ist im Gegensatz zu marinen Wirbellosen in seiner natürlichen Umgebung keinen extremen Salzbedingungen ausge-

setzt, noch ist bekannt, dass in den Geweben, in denen *ilys-5* exprimiert wird (Tab. 3), starke osmotische Schwankungen auftreten.

Wie für die aus anderen Organismen charakterisierten i-Typ-Lysozyme beschrieben, weist auch das mature ILYS-5 eine Chitinase-Aktivität auf. Die schwache Aktivität liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die Versuchsansätze dieser Arbeit nur etwas über zwei Stunden inkubiert wurden und ein pH-Wert von pH 4,5 vorlag. Die maximale Chitinase-Aktivität könnte demnach, wie die Muramidase-Aktivität, im Bereich von pH 3,5 liegen. Im Gegensatz zu den Mollusken, zu deren Nahrung auch Crustaceen mit einem chitinhaltigen Exoskelett gehören oder Insekten, die teilweise selbst ein solches besitzen, ernährt sich *C. elegans* vermutlich hauptsächlich von Mikroben. Chitinöse Strukturen kommen jedoch auch in Zellwänden von Pilzen vor. Der Wurm wurde von kompostierendem Material isoliert, in dem auch zahlreiche Pilzspezies vorhanden sind (Barriere und Felix, 2007; Hodgkin und Partridge, 2008). Schließlich könnten Chitinasen eine Rolle bei der Abwehr von pathogenen Pilzen spielen. Infektionen mit *D. craniospora* und *C. neoformans* wurden bei *C. elegans* bereits beobachtet und deren Induktion von Immuneffektoren beschrieben (Pujol *et al.*, 2008b; Mylonakis *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde die Expression von *ilys-5* in Geweben lokalisiert, die vermutlich an der Bildung der chitinösen Hülle befruchteter Eier beteiligt sind (Spermatheken, s. o.). Inwieweit ILYS-5 darin integriert sein könnte, ist nicht bekannt.

Eine Isopeptidase-Aktivität konnte für ILYS-5 nicht gezeigt werden. Dennoch ist eine schwache, erst nach Tagen nachweisbare Aktivität nicht auszuschließen. Bei der Charakterisierung anderer i-Typ-Lysozyme hatte sich gezeigt, dass der Nachweis der Isopeptidase-Aktivität erst nach 24-48 h möglich war (Josková *et al.*, 2009). Überdies wurde für diese Lysozyme festgestellt, dass die Chitinase- und Isopeptidase-Aktivität, jeweils unabhängig voneinander, bei unterschiedlichen pH-Bedingungen auftreten (Takeshita *et al.*, 2003). Das Lysozym aus *E. andrei* war in einem eher sauren pH-Bereich als Lysozym und bei Werten von pH 7-8 als Isopeptidase aktiv. Die mutmaßliche Isopeptidase-Aktivität von ILYS-5 wurde jedoch nicht im basisch-neutralen Bereich getestet. Schließlich ergab die Primärstrukturanalyse von ILYS-5 aus *C. elegans*, dass ein Serinrest, der für die Isopeptidase-Aktivität wesentlich sein soll, nicht in diesem Protein konserviert ist (s o.). Die Funktion einer potentiellen Isopeptidase-Eigenschaft von Lysozymen ist vielfach noch nicht bekannt. Bei der Destabilase

führt eine spontane Depolymerisation des stabilisierten Fibrins zur Inhibition des letzten kritischen Schritts in der Blutkoagulation, weshalb diese Isopeptidasen auch Destabilasen genannt werden (Baskova und Nikonov, 1991; Doolittle, 1984). Bei Blut-verdauenden Organismen wie dem Blutegel oder Stechmücken, wird ihnen demnach die Gerinnungshemmung zugeschrieben (Paskewitz *et al.*, 2008; Zavalova *et al.*, 1996; Baskova und Nikonov, 1991). Auch in Peptidoglykan treten Isopeptidbindungen zwischen einem D-Glutaminsäurerest und einem Lysinrest auf (Takeshita *et al.*, 2003). Ob diese aufgrund der Isopeptidase-Aktivität eines Lysozyms gespalten werden können, konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Das mature ILYS-5 verfügte über ein weitreichendes antibakterielles Spektrum. Das rekombinant synthetisierte Protein war in der Lage sowohl grampositive als gramnegative Bakterienarten zu eliminieren. So zeigte sich nicht ein einziges der getesteten Bakterien resistent gegen das i-Typ-Lysozym. Über das natürliche Habitat von *C. elegans* ist nur sehr wenig bekannt. Es können nur spekulative Aussagen darüber gemacht werden, welche Bakterienarten zu seiner Nahrung gehören. Bei *C. elegans*-Isolaten wurden unter anderem *Bacillus*- und *Pseudomonas*-Arten mit dem Wurm assoziiert vorgefunden (Grewal, 1991). Allerdings war die Reproduktionsrate über mehrere Generationen beispielsweise auf monoxenischen *B. subtilis* und *P. aeruginosa*-Kulturen stark rückläufig. Andere Autoren formulierten jedoch eine längere Lebensdauer von *C. elegans*, die auf *B. subtilis* kultiviert wurden als diejenigen, die auf *E. coli*-OP50 gehalten wurden (Garsin *et al.*, 2003). Die Kultivierung von *C. elegans* im Labor wird seit Jahrzehnten erfolgreich mit *E. coli* durchgeführt. Dabei gehört diese Spezies höchstwahrscheinlich nicht zu seiner natürlichen Futterquelle. *E. coli* kann bei älteren Würmern auch pathogene Effekte haben (Garsin *et al.*, 2001; Gems und Riddle, 2000). Allerdings kann nach abertausenden Generationen von *C. elegans* auf *E. coli* OP50 eine Adaption der Laborstämme wie N2 an diese unnatürliche Futterquelle vorausgesetzt werden (Caswell-Chen, 2005). Der Fadenwurm lebt in seiner natürlichen Umgebung in diverse Mikroben enthaltenden Böden und ernährt sich vermutlich nicht ausschließlich von Bakterien, sondern auch von Protisten wie *D. discoideum* (Kessin *et al.* 1996).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Mikrosuszeptibilitätstests war ILYS-5 in besonders geringen Konzentrationen gegen *B. subtilis*, *B. megaterium* und *E. coli* aktiv (Tab. 4). Die beiden *Bacillus*-Stämme kommen in gleichen Bodenhabitaten wie *C. elegans* vor, eventuell

bieten sie daher eine natürliche Nahrungsquelle für die Tiere. Allerdings können sie anscheinend auch pathogen auf den Modellorganismus wirken (Andrew und Nicholas, 1976; Garsin *et al.*, 2001). Die hohe Wirksamkeit gegen *E. coli* könnte weiterhin eine Adaption an die Laborkultivierung und eine Anpassung der Verdauung an die ausschließliche Futterquelle über Generationen hinweg bedeuten.

Des Weiteren könnte der Fadenwurm im Boden mit allen übrigen Spezies, außer *Y. enterocolitica*, in Kontakt kommen. Inkubationsstudien von *C. elegans* mit diesem Stamm deckten auf, dass er nicht pathogen für den Wurm ist (Joshua *et al.* 2003). *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. marcescens* und *Y. enterocolitica* sind auch opportunistische Pathogene des Menschen, die vor allem immunsupprimierte oder prädisponierte Personen infizieren (Sheagren, 1984; Fink, 1993; Kurz *et al.*, 2003). Derweil sind *B. thuringiensis*, *P. luminescens* und *X. nematophilum* Pathogene von Nematoden und Insekten (Marroquin *et al.*, 2000; Couillault und Ewbank, 2002; Sicard *et al.*, 2007). *P. aeruginosa* kann auf zweierlei Arten *C. elegans* töten. Einerseits wird die Pathogenität durch Toxine vermittelt, andererseits durch die Kolonisation des Darms (Tan *et al.*, 1999; Darby, 2005; Hodgkin und Partridge, 2008). Bei Infektionen mit diesem gramnegativen Bakterium werden Immuneffektorgene induziert (darunter auch Lysozyme). Die Expression von *ilys-5* wurde bei Infektionen mit *P. aeruginosa* allerdings reprimiert (Troemel *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde keine differentielle Expression von *ilys-5* bei Expositionen mit den bisher für Studien verwendeten Bakterien- und Pilzspezies berichtet, demnach auch nicht mit den bei dem Mikrosuszeptibilitätstest eingesetzten. Dennoch ist ILYS-5 in der Lage alle getesteten Bakterienstämme zu vernichten.

Die Fähigkeit neben grampositiven auch gramnegative Bakterien zu töten, wurde von diversen Lysozym-Subtypen beschrieben, darunter auch i-Typ-Lysozyme aus verschiedenen Tiergruppen (Nilsen *et al.*, 1999; Zavalova *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2007; Cong *et al.*, 2009). Bei einigen Lysozymen werden die Zellen aber nicht durch katalytische Mechanismen vermittelt, sondern durch kationische oder amphipatische Wechselwirkungen mit den Zellmembranen (Zavalova *et al.*, 2006; Ibrahim *et al.*, 2001; Düring *et al.*, 1999). Der zugrundeliegende Mechanismus für die bakteriostatische und bakterizide Aktivität von ILYS-5 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert. Zukünftig könnte die biochemische Analyse mit einem mutierten ILYS-5, in dem die potentiell an der Katalyse-Reaktion beteiligten Amino-

säurereste ausgetauscht würden, wiederholt werden. Außerdem wäre eine posttranslationale chemische Seitenkettenmodifikation einzelner Aminosäurereste von ILYS-5 denkbar. So ließe sich die Aktivität jeweils den katalytischen oder nicht-enzymatischen Mechanismus zuzuordnen.

Im Vergleich zu anderen Lysozymen führten durchweg geringere ILYS-5-Konzentrationen zur Wachstumshemmung bzw. zur Lyse der gramnegativen Spezies (siehe hierzu bspw. (Nilsen *et al.*, 1999). Demnach handelt es sich bei dem Lysozym aus *C. elegans* um ein hoch effizientes Effektmolekül gegen zahlreiche Bakterienspezies. Ferner trat anscheinend keine Aktivitätsminderung durch mögliche i-Typ-Lysozym-Inhibitoren auf, die beispielsweise von *S. marcescens* bekannt sind (Van Herreweghe *et al.*, 2010). Die Aktivität des Kontrollproteins HEWL gegen *Y. enterocolitica* verwunderte zunächst, entsprach aber eventuell einer nicht-enzymatischen Aktivität bzw. wurde auch zuvor beschrieben (Nakimbugwe *et al.*, 2006). Zudem ließe sich über die nicht-enzymatische Aktivität die bakterizide Wirkung gegen *S. aureus* erklären (Ibrahim *et al.*, 2001). Weder c-Typ noch i-Typ-Lysozyme sind dafür bekannt, die O-acetylierten Zucker in den Zellwänden von *S. aureus* zu lysieren. Unter den gegebenen Testbedingungen unterlag das Wachstum dieses Stamms allerdings starken Schwankungen. Der relativ saure pH-Bereich oder die Puffersubstanzen bedingten anscheinend erheblichen Stress für die Zellen. Aufgrund dessen sind die Ergebnisse für *S. aureus* weniger aussagekräftig, als die restlichen. Dennoch konnten für ILYS-5 konstante und reproduzierbare MIC- und MBC-Werte gegen diese Spezies ermittelt werden.

Erste Versuche mit *M. nematophilum* offenbarten zusätzlich das Potential dieses Lysozyms, jene Bakterien sowohl in ihrem Wachstum zu hemmen als auch zu eliminieren (Daten hier nicht gezeigt).

Die Präferenz des ILYS-5 für drei der getesteten Bakterienspezies könnte darauf hinweisen, dass *C. elegans* dieses Effektmolekül gezielt gegen potentielle Pathogene oder Futterbakterien einsetzt. Indessen verfügt das Lysozym gleichzeitig über eine antibakterielle Aktivität gegen eine Reihe von verschiedenen Bakterienspezies, was eine generelle eher unspezifische Funktion darüber hinaus nicht ausschließen lässt.

Die molekulare Charakterisierung des ersten Lysozyms aus einem Nematoden und außerdem das erste aus dem Modellorganismus *C. elegans* ergab, dass es sich bei um ILYS-5 ein vielseitiges und wirkungsvolles antibakterielles Protein handelt. Die multilokale Expression in differenten Geweben, die unterschiedlichen Katalyse-Mechanismen und schließlich das breit gefächerte antibakterielle Spektrum lassen eine essentielle Rolle des i-Typ-Lysozyms in *C. elegans* vermuten. In dem Wurm lassen sich nur unwesentlich Mikroben in seinem Darm finden, was bedeutet, dass die überwiegende Mehrheit der Mikroorganismen, die in den Darm gelangen, getötet wird. Jedoch wird das Abtöten nicht ausschließlich mechanisch durch den Grinder gewährleistet, sondern wahrscheinlich auch durch im Darm vorliegende Effek-tormoleküle. Auf der anderen Seite verlaufen die meisten Infektionen bei diesen Tieren über das Darmepithel und den Darm kolonisierenden Pathogenen (Schulenburg und Ewbank, 2007). Außerdem bildet der Darmtrakt das zentrale Organ der Verdauung. Von allen *ilys*-Genen wurde *ilys-5* am stärksten im Darm exprimiert. Der vorliegende pH-Wert im Verdauungstrakt ist überwiegend schwach sauer (Pfeiffer *et al.*, 2008). Das saure pH-Optimum der Lysozymaktivität von ILYS-5 von pH 3,5-4,0 entspricht also in etwa dem vorherrschenden pH-Wert von pH ~4,1 im Darm. Zunächst weisen diese Kriterien auf eine Funktion bei der Futterverwertung im Darm hin. Lysozyme, die Funktionen bei der Verdauung übernehmen, besitzen in der Regel eine saures pH-Optimum und einen niedrigen pI-Wert (Terra, 1990; Prager und Jollès, 1996; Cançado *et al.*, 2007). Ferner verfügen beim Auftreten mehrerer Lysozyme oder sogar mehrerer Lysozymsubtypen in einem Organismus die einzelnen Proteine häufig über unterschiedliche Funktionen, überwiegend auch eine bei der Verdauung. Welche Rolle Lysozyme ursprünglich in einem Organismus einnehmen, lässt sich schwerlich aufklären. Sofern während der evolutiven Entwicklung jedoch vermehrt Genduplikationen bei Lysozymgenen auftreten oder eben mehrere unterschiedliche Lysozyme präsent sind, haben einige davon erfahrungsgemäß Funktionen bei der Ernährung inne (Paskewitz *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2010). Da es sich bei ILYS-5 um das erste auf Proteinebene analysierte Lysozym handelt, kann nicht abschließend geklärt werden, ob mögliche unterschiedliche Aufgaben mit den verschiedenen Subtypen korrelieren. Eine Rolle innerhalb der Ernährung wurde bereits mehrfach für i-Typ-Lysozyme vorgeschlagen (Paskewitz *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2007; McHenery *et al.*, 1979).

Neben dem *ilys-5* wird eine Reihe von Genen, die für Immuneffektormoleküle kodieren, im Darm exprimiert. Nicht zuletzt wurden auch die anderen vier i-Typ-Lysozyme dort lokalisiert. Synergistische Effekte bei dem Vernichten von Bakterien wurden postuliert und könnten sowohl bei der Ernährung als auch bei der Immunabwehr auftreten (Chalk *et al.*, 1994; Leippe, 1999; Roeder *et al.*, 2010). Zum Beispiel wurden synergistische Funktionen von Caenopores und Lysozymen in *C. elegans* vorgeschlagen. Die Charakterisierung von SPP-1 und SPP-5 hat wiederum gezeigt, dass sie ausschließlich im Darm synthetisiert werden (Roeder *et al.*, 2010).

Die vorliegenden Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass die Funktion der i-Typ-Lysozyme und vor allem von ILYS-5 höchstwahrscheinlich nicht auf die Verdauung reduziert ist. Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten innerhalb der i-Typ-Lysozyme scheinen die funktionalen Eigenschaften voneinander abzuweichen. Wie eindrucksvoll im Falle des ILYS-5 nachgewiesen werden konnte, ist es nicht nur gegen potentielle Futterbakterien aktiv. Außerdem werden *C. elegans* überwiegend über den Darm infiziert. Proteine der Immunabwehr müssen also auch in dem sauren pH-Milieu des Darmtrakts aktiv sein können. Deshalb können Lysozyme oder andere antimikrobielle Proteine ein gleiches pH-Optimum besitzen, obwohl sie differente Funktionen einnehmen. Ein Aktivitätsmaximum im sauren pH-Bereich oder ein niedriger pI-Wert ist also kein sicheres Indiz für eine Verdauungsfunktion. Ob antimikrobielle Proteine, die im Darm von *C. elegans* vorliegen, immunologisch aktiv sind oder der Ernährung dienen, kann nur bedingt differenziert werden. Vor allem solange die Ökologie der natürlichen Umgebung dieses Modellorganismus nicht ausreichend aufgeklärt ist.

Die gewebsspezifische Lokalisation von ILYS-5 in den Spermatheken, Neuronen und mit dem Darm assoziierten Strukturen lassen neben einer möglichen Funktion bei der Ernährung auf immunologische Funktionen bei der Abwehr von Pathogenen schließen. Aufgrund der großen Zahl von Lysozymgenen im Genom von *C. elegans* wird von einer gewissen Redundanz ausgegangen. Demnach fungiert ILYS-5 in dem Wurm als Effektormolekül gegen potentielle Futterquellen und Pathogene, war für die Hauptaktivität in natürlichen Extrakten aus *C. elegans* verantwortlich. Allerdings wurden Koinkubationsversuche von verschiedenen Bakterienspezies, darunter alle im Mikrosuszeptibilitätstest verwendeten außer *P. luminescens*, *X. nematophilum* und *Y. enterocolitica*, mit der *ilys-5*-Knock-out-Mutante durchgeführt

(Daten nicht gezeigt). Die Mutante zeigte dabei keine gravierenden Phänotypen und war im gleichen Maße wie Wildtyp-Würmer überlebensfähig. Unabhängig davon, ob ILYS-5 Funktionen bei der Ernährung oder der Immunabwehr übernimmt, kann *C. elegans* den Verlust eines seiner 15 mutmaßlichen Lysozyme anscheinend bis zu einem gewissen Grad kompensieren. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, welche genaue Rolle das ILYS-5 aus *C. elegans* in den verschiedenen Geweben übernimmt. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass es in den unterschiedlichen Geweben spezifische Funktionen übernehmen könnte. Je nachdem, in welchen Geweben das Lysozym synthetisiert wird, könnte es über verschiedene Funktionen verfügen.

5 Zusammenfassung

Der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* ist ein etablierter Modellorganismus, an dem unter anderem die Mechanismen der angeborenen Immunabwehr in Wechselwirkung mit Pathogenen erforscht werden. Zu den Effektoren des Immunsystems zählen auch die Lysozyme. Trotz langjähriger Forschung ist die biologische Rolle dieser Effektormoleküle in einem Organismus in vielen Fällen noch nicht aufgeklärt. Über die genauen Mechanismen der Abwehr von pathogenen Bakterien oder der Ingestion harmloser Bakterienspezies in *C. elegans* fehlen vor allem auf Proteinebene Erkenntnisse zum besseren Verständnis. In welcher Art und Weise die fünfzehn potentiellen Lysozyme aus *C. elegans*, die zu zwei unterschiedlichen Subtypen gehören, an diesen Mechanismen beteiligt sind, ist bisher nicht bekannt.

In vorangegangenen Arbeiten gelang es, ein lytisch aktives natürliches Invertebraten-Lysozym aus Proteinextrakten von *C. elegans* weitestgehend zu reinigen und zu identifizieren. Aufgrund dessen lag der Fokus dieser Arbeit auf der molekularen Charakterisierung der i-Typ-Lysozyme mit besonderer Berücksichtigung des zuvor identifizierten ILYS-5.

Genexpressionsanalysen mit Hilfe von *gfp*-Reportergenkonstrukten konnten erstmalig eine multilokale Expression aller fünf *ilys*-Gene in unterschiedlichen Geweben, darunter dem Verdauungstrakt zugehörigen, zeigen. Die Expressionsprofile der einzelnen mutmaßlichen Lysozyme überschneiden sich sowohl untereinander als auch mit denen anderer Immuneffektoren. Gleichzeitig deckten sie gewebsspezifische Besonderheiten der Lysozyme auf. Die Expression der Gene in mehreren distinkten Geweben lässt auf unterschiedliche Funktionen der ILYS in den verschiedenen Geweben schließen. Möglicherweise ist ihre Regulation und Funktion spezifisch für den Ort der Synthese.

Weiterführende *In-silico*-Analysen der Primärstruktur eines strukturell aufgeklärten i-Typ-Lysozyms aus *T. japonica* und der von ILYS-5 ließen spezifische konservierte Sequenzmotive und potentiell katalytisch aktive Aminosäurereste in der Aminosäuresequenz aus *C. elegans* erkennen.

Das Protein ILYS-5 wurde in einem bakteriellen Expressionssystem synthetisiert und anschließend isoliert, um es biochemisch zu charakterisieren. Das mature Protein zeigte seine

enzymatischen Fähigkeiten, ein Aktivitätsmaximum in einem sauren pH-Bereich sowie erste Resultate über dessen Salztoleranz auf. Außerdem zeigte sich bei einem Mikrosuszeptibilitätstest mit verschiedenen Bakterien, dass es über ein breit gefächertes antibakterielles Spektrum verfügt. ILYS-5 war in der Lage sowohl grampositive als auch gramnegative Bakterien zu töten. Keine der eingesetzten Bakterienspezies konnte im Beisein des Lysozyms überleben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein Lysozym aus *C. elegans* auf Proteinebene charakterisiert und somit gleichzeitig das erste aus einem Nematoden. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich um ein effizientes Effektormolekül handelt, das höchstwahrscheinlich nicht nur eine Funktion in der Verdauung einnimmt, sondern auch Funktionen bei der Abwehr von Pathogenen übernehmen könnte. Die genaue physiologische Rolle der i-Typ-Lysozyme in *C. elegans* konnte nicht abschließend geklärt werden. Dennoch bieten die vorliegenden Ergebnisse die Grundlage für weitere Analysen und einen Ausgangspunkt für das bessere Verständnis der Ernährungsweise und des Immunsystems von diesem Modellorganismus.

6 Summary

The nematode *Caenorhabditis elegans* is an established model organism to study innate immune defense mechanisms against pathogens. Lysozymes are important effectors of the immune system. Albeit, there has been extensive research on these effector molecules their exact role within some organisms remains uncertain. In particular, the defense mechanisms against pathogenic bacteria as well as the ingestion of harmless species in *C. elegans* at the protein level are not well understood. The specific contributions of the fifteen potential lysozymes from two subtypes of *C. elegans* on the aforementioned mechanisms are unknown to date.

Previous research achieved the identification of a partially isolated natural invertebrate lysozyme from protein extracts of *C. elegans* which showed lytic activity. Therefore, the focus of this thesis was on the molecular characterization of i-type lysozymes with special emphasis on the previously identified ILYS-5.

For the first time a multi-local expression of all five *ilys* genes has been shown in different tissues, amongst them the intestinal tract. This was achieved by *gfp*-reporter construct profiling. The gene expression pattern of the individual putative lysozymes overlapped among each other as well as with other immune effectors. At the same time these profiles revealed specific tissue features of the lysozymes. The localization in multiple tissues indicated a diverse function of the i-type lysozymes in various tissues. Possibly, the site of expression and synthesis determines their regulation and function.

The primary structure of an i-type lysozyme from *T. japonica* - with determined tertiary structure - and the primary structure of ILYS-5 were compared within *in silico*-analysis. Specific motifs of invertebrate lysozymes as well as possible counterparts of the catalytic amino acid residues are conserved in the *C. elegans* sequence.

The protein ILYS-5 was recombinantly synthesized in a bacterial expression system and purified. The biochemical characterization of the mature protein revealed its enzymatic abilities and its maximal activity at acidic pH. Furthermore, the results provided preliminary insights regarding its salt tolerance. Additionally, Microdilution susceptibility assays with

various bacterial species and ILYS-5 revealed a broad antimicrobial spectrum. ILYS-5 was able to kill both gram-positive and gram-negative bacteria. None of the examined species survived in the presence of this lysozyme.

For the first time a lysozyme of *C. elegans* received an initial characterization at the protein level. In this thesis it was demonstrated that it is an efficient effector molecule most likely not restricted to digestive functionality. Moreover, the first proven i-type lysozyme from a nematode could play a role in the defense against pathogens. The exact function of the i-type lysozymes in *C. elegans* could not be verified in entirety. Nevertheless, the results of this thesis can represent a basis for deeper analysis and a source for better understanding of the model organism in respect to digestion as well as immune system.

7 Literaturverzeichnis

- Aballay, A. und Ausubel, F. M. (2001) Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (5): 2735-2739.
- Aballay, A., Drenkard, E., Hilbun, L. R und Ausubel, F. M. (2003) *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Current Biology* 13 (1):47–52.
- Agrawal, A., Eastman, Q. M. und Schatz, D. G. (1998) Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* 394: 744-751.
- Albert, P. S und Riddle, D. L. (1988) Mutants of *Caenorhabditis elegans* that form dauer-like larvae. *Developmental Biology* 126 (2): 270–293.
- Albertson, D. G. und Thomson, J. N. (1976) The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 275 (938): 299-325.
- Alder, M. N. (2005) Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science* 310 (5756): 1970-1973.
- Alegado, R. A. und Tan, M.-W. (2008) Resistance to antimicrobial peptides contributes to persistence of *Salmonella typhimurium* in the *C. elegans* intestine. *Cellular microbiology* 10 (6): 1259–1273.
- Alegado, R. A., Campbell, M. C., Chen, W. C., Slutz, S. S. und Tan, M.-W. (2003) Characterization of mediators of microbial virulence and innate immunity using the *Caenorhabditis elegans* host-pathogen model. *Cellular Microbiology* 5 (7): 435-444.
- Alper, S., McBride, S. J., Lackford, B., Freedman, J. H. und Schwartz, D. A. (2007) Specificity and complexity of the *Caenorhabditis elegans* innate Immune response. *Molecular and Cellular Biology* 27 (15): 5544-5553.
- Alper, S., McElwee, M. K., Apfeld, J., Lackford, B., Freedman, J. H. und Schwartz, D. A. (2009) The *Caenorhabditis elegans* germ line regulates distinct signaling pathways to control lifespan and innate immunity. *Journal of Biological Chemistry* 285 (3): 1822-1828.

- Ambros, V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431 (7006): 350-355.
- Andrew, P. A. und Nicholas, W. L. (1976) Effect of bacteria on dispersal of *Caenorhabditis elegans* (Rhabditidae). *Nematologica* 22 (4): 451-461.
- Ausubel, F. M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nature Immunology* 6: 973-979.
- Bachali, S., Bailly, X., Jollès, J., Jollès, P. und Deutsch, J. S. (2004) The lysozyme of the starfish *Asterias rubens*. *European Journal of Biochemistry* 271 (2): 237-242.
- Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jollès, P. und Fiala-Medioni, A. (2002) Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *Journal of Molecular Evolution* 54 (5): 652-664.
- Bányai, L. und Patthy, L. (1998) Amoebapore homologs of *Caenorhabditis elegans*. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1429 (1): 259-264.
- Bargmann, C. I. (2006) Chemosensation in *C. elegans*. In: *WormBook* (herausgegeben von *C. elegans* Research Community), WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Barnes, W. M. (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (6): 2216-2220.
- Barr, M. M. und Garcia, L. R. (2006) Male mating behavior. In: *WormBook* (herausgegeben von *C. elegans* Research Community), WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Barriere, A. und Felix, M.-A. (2005) High local genetic diversity and low outcrossing rate in natural populations. *Current Biology* 15 (13): 1176-1184.
- Barriere, A. und Felix, M.-A. (2007) Temporal dynamics and linkage disequilibrium in natural *Caenorhabditis elegans* populations. *Genetics* 176 (2): 999-1011.
- Baskova, I. P. und Nikonov, G. I. (1991) Destabilase, the novel epsilon-(gamma-Glu)-Lys isopeptidase with thrombolytic activity. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 2 (1): 167-172.
- Beintema, J. J. und Terwisscha van Scheltinga, A. C. (1996) Plant lysozymes. *Exs.* 75: 75-86.
- Bera, A., Biswas, R., Herbert, S. und Gotz, F. (2006) The presence of peptidoglycan O-acetyltransferase in various staphylococcal species correlates with lysozyme resistance and pathogenicity. *Infection and Immunity* 74 (8): 4598-4604.

- Blake, C. C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C. und Sarma, V. R. (1965) Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* 206: 757-761.
- Bolla, R. I., Weinstein, P. P. und Cain, G. D. (1972) Fine structure of the coelomocyte of adult *Ascaris suum*. *The Journal of Parasitology* 58 (6): 1025-1036.
- Boman, H. G., Nilsson-Faye, I., Paul, K. und Rasmuson, T. Jr. (1974) Insect immunity I. Characteristics of an inducible cell-free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia cynthia* pupae. *Infection and Immunity* 10 (1): 136.
- Boulin, T., Etchberger, J. F., Hobert, O. und Hughes, H. (2006) Reporter gene fusions. In: *WormBook* (herausgegeben von *C. elegans* Research Community), WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Bräu, B., Hilgenfeld, R., Schlingmann, M., Marquardt, R., Birr, E., Wohlleben, W., Aufderheide, K. und Pühler, A. (1991) Increased yield of a lysozyme after self-cloning of the gene in *Streptomyces coelicolor* "Müller". *Applied Microbiology and Biotechnology* 34 (4): 481-487.
- Brenner, S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77 (1):71-94.
- Brew, K. und Campbell, P. N. (1967) The characterization of the whey proteins of guinea-pig milk: The isolation and properties of α -lactalbumin. *Biochemical Journal* 102 (1): 258-264.
- Byerly, L., Cassada, R. C. und Russell, R. L. (1976) The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental Biology* 51 (1): 23-33.
- Callewaert, L. und Michiels, C. W. (2010): Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences* 35 (1): 127-160.
- Cançado, F. C., Valério, A. A., Marana, S. R. und Barbosa, J. A. R. G. (2007) The crystal structure of a lysozyme c from housefly *Musca domestica*, the first structure of a digestive lysozyme. *Journal of structural biology* 160 (1): 83-92.
- Canfield, R. E. und McMurry, S. (1967) Purification and characterization of a lysozyme from goose egg white. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 26 (1): 38-42.
- Canfield, R. E. (1963) The amino acid sequence of egg white lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry* 238: 2698-707.

- Cassada, R. C. und Russell, R. L. (1975) The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 46 (2): 326-342.
- Caswell-Chen, E. P. (2005) Revising the standard wisdom of *C. elegans* natural history: ecology of longevity. *Science of Aging Knowledge Environment* 2005 (40), p30: 1-7.
- C. elegans* sequencing consortium (1998) Genome sequence of the neamtode *C. elegans*: a platform for investigation biology. *Science* 282 (5396): 2010-2018.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. und Prasher, D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263 (5148): 802-805.
- Chalk, R., Townson, H., Natori, S., Desmond, H. und Ham, P. J. (1994) Purification of an insect defensin from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 24 (4): 403-410.
- Cheetham, J. C., Artymiuk, P. J. und Phillips, D. C. (1992) Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy. Hen egg-white lysozyme and tri-N-acetylchitotriose at 1.75 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 224 (3): 613-628.
- Chitwood, B. G. und Chitwood, M. B. (1950) Introduction to Nematology. In: *University Park Press*, Baltimore, USA.
- Clokey, G. V. und Jacobson, L. A. (1986) The autofluorescent. *Mechanisms of ageing and development* 35 (1): 79-94.
- Cong, L., Yang, X., Wang, X., Tada, M., Lu, M., Liu, H. und Zhu, B. (2009) Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein. *Journal of bioscience and bioengineering* 107 (6): 583-588.
- Conradt, B. und Horvitz, H. R. (1999) The TRA-1A sex determination protein of *C. elegans* regulates sexually dimorphic cell deaths by repressing the egl-1 cell death activator gene. *Cell* 98 (3): 317-327.
- Couillault, C. und Ewbank, J. J. (2002) Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infection and immunity* 70 (8): 4705-4707.
- Couillault, C., Pujol, N., Reboul, J., Sabatier, L., Guichou, J.-F., Kohara, Y. und Ewbank, J. J. (2004) TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nature Immunology* 5: 488-494.

- Daffre, S., Kylsten, P., Samakovlis, C. und Hultmark, D. (1994) The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded gene family adapted for expression in the digestive tract. *Molecular and General Genetics* 242 (2): 152–162.
- Darby, C. (2005) Interactions with microbial pathogens. In: *WormBook* (herausgegeben von *C. elegans* Research Community), WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- de-la-Re-Vega, E., García-Galaz, A., Díaz-Cinco, M. E. und Sotelo-Mundo, R. R. (2006) White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) recombinant lysozyme has antibacterial activity against Gram negative bacteria: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Fish & Shellfish Immunology* 20 (3): 405-408.
- Dobson, D. E., Prager, E. M. und Wilson, A. C. (1984) Stomach lysozymes of ruminants. I. Distribution and catalytic properties. *Journal of Biological Chemistry* 259 (18): 11607-11616.
- Doolittle, R. F. (1984) Fibrinogen and fibrin. *Annual Review of Biochemistry* 53: 195-229.
- Drickamer, K., Dodd, R. B. (1999) C-Type lectin-like domains in *Caenorhabditis elegans*: predictions from the complete genome sequence. *Glycobiology* 9 (12):1357-69.
- Düring, K., Porsch, P., Mahn, A., Brinkmann, O. und Gieffers, W. (1999) The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *Federation of European Biochemical Society letters*. 449 (2-3): 93-100.
- Efron, B. (1979) Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *The Annals of Statistics* 7 (1): 1-26.
- Emmons, S. W. (2005) Male development. In: *WormBook* (herausgegeben von *C. elegans* Research Community), WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Engström, P., Carlsson, A., Engström, A., Tao, Z. J. und Bennich, H. (1984) The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *The European Molecular Biology Organization Journal* 3 (13): 3347-3351.
- Evans, E. A., Kawli, T., Tan, M.-W. und Ausubel, F. M. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* suppresses host immunity by activating the DAF-2 Insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Public Library of Science Pathogens* 4 (10): 1-18.
- Ewbank, J. J. (2006) Signaling in the immune response. In: *WormBook* (herausgegeben von *C. elegans* Research Community), WormBook, <http://www.wormbook.org>.
- Fares, H. und Greenwald, I. (2001) Genetic analysis of endocytosis in *Caenorhabditis elegans*: coelomocyte uptake defective mutants. *Genetics* 159 (1): 133-145.

- 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. *Developmental and Comparative Immunology* 32 (3): 286-298.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791.
- Fink, R. B. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* the opportunist: Pathogenesis and disease. *Chemical Rubber Company Press*, Boca Raton, USA.
- Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R. und Bateman, A. (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 38 (Database issue): D211-222.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 (6669): 806-811.
- Fleming, A. (1922) One remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 93 (653): 06-317.
- Fradkov, A., Berezhnoy, S., Barsova, E., Zavalova, L., Lukyanov, S. und Sverdlov, E. D. (1996) Enzyme from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) that specifically splits endo- ϵ (- γ -Glu)-Lys isopeptide bonds: cDNA cloning and protein primary structure. *Federation of European Biochemical Societies letters* 390 (2): 145-148.
- Frohman, M. A., Dush, M. K. und Martin, G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (23): 8998-9002.
- Fuchs, S. (2006) Charakterisierung der Lysozym-ähnlichen Proteine von *Caenorhabditis elegans*. Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Christian-Albrechts-Universität, Kiel, 125 S.
- Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schödl, T., Heitzer, M. und Hegemann, P. (2004) Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Molecular Biology* 55 (6): 869-881.
- Garsin, D. A., Sifri, C. D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K. V., Murray, B. E., Calderwood, S. B. und Ausubel, F. M. (2001) A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19): 10892-10897.

- Garsin, D. A., Villanueva, J. M., Begun, J., Kim, D. H., Sifri, C. D., Calderwood, S. B., Ruvkun, G. und Ausubel, F. M. (2003) Long-lived *C. elegans* daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science* 300 (5627): 1921.
- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D. und Bairoch, A. (2003) ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research* 31 (13): 3784-3788.
- Gelhaus, C., Fritsch, J., Krause, E. und Leippe, M. (2005) Fractionation and identification of proteins by 2-DE and MS: towards a proteomic analysis of *Plasmodium falciparum*. *Proteomics* 5 (16): 4213-4222.
- Gems, D. und Riddle, D. L. (2000) Genetic, behavioral and environmental determinants of male longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 154 (4): 1597-1610.
- Gordon, S. (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111 (7): 927-930.
- Goto, T., Abe, Y., Kakuta, Y., Takeshita, K., Imoto, T. und Ueda, T. (2007) Crystal structure of *Tapes japonica* lysozyme with substrate analogue: structural basis of the catalytic mechanism and manifestation of its chitinase activity accompanied by quaternary structural change. *Journal of Biological Chemistry* 282 (37): 27459-27467.
- Gravato-Nobre, M. J. und Hodgkin, J. (2005) *Caenorhabditis elegans* as a model for innate immunity to pathogens. *Cellular microbiology* 7 (6): 741-751.
- Grewal, P. S. (1991) Influence of bacteria and temperature on the reproduction of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: *Rhabditidae*) infesting mushrooms (*Agaricus Bisporus*). *Nematologic*, 37 1 (4): 72-82.
- Grütter, M. G., Weaver, L. H. und Matthews, B. W. (1983) Goose lysozyme structure: an evolutionary link between hen and bacteriophage lysozymes?. *Nature* 303 (5920): 828-831.
- Guziewicz, M., Vitullo, T., Simmons, B. und Kohn, R. E. (2002) Analyzing defects in the *Caenorhabditis elegans* nervous system using organismal and cell biological approaches. *Cell Biology Education* 1 (1): 18-25.
- Han, S. J., Yoo, Y. J. und Kang, H. S. (1995) Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. *Journal of Biological Chemistry* 270 (43): 26012-26019.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557-580.

- Hash, J. H. (1963): Purification and properties of staphylolytic enzymes from *Chalaropsis spec.*. *Archives of biochemistry and biophysics* 102 (3): 379–388.
- Hedgecock, E. M. und White, J. G. (1985) Polyploid tissues in the nematode *Caenorhabditis elegans* In: *Developmental biology*. 107 (1), S. 128–133.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9 (1): 28–32.
- Hikima, J., Minagawa, S., Hirono, I. und Aoki, T. (2001) Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein. *Biochemica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression* 1520 (1): 35–44.
- Hobert, O. (2002) PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. *BioTechniques* 32 (4): 728-730.
- Hodgkin, J. und Partridge, F. A. (2008) *Caenorhabditis elegans* meets microsporidia: The nematode killers from Paris. *Public Library of Science Biology* 6 (12): 2634-2637.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway Jr, C. A. und Ezekowitz, R. A. B. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284 (5418): 1313-1318.
- Hope, I. (1999): *C. elegans: a practical approach*. Oxford University Press, New York, USA , 273 S..
- Hübschmann, U. und Links, E. (1987) Einführung in das chemische Rechnen: Lehrbuch und Sammlung von Übungsaufgaben für Ausbildung und Beruf. 6. Aufl. Neubearb., Handwerk und Technik, Hamburg, 324 S..
- Huffman, D. L., Abrami, L., Sasik, R., Corbeil, J., Van Der Goot, F. G. und Aroian, R. V. (2004) Mitogen-activated protein kinase pathways defend against bacterial pore-forming toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (30): 10995-11000.
- Hultmark, D. (2003) Drosophila immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology* 15 (1): 12-19.
- Ibrahim, H. R., Matsuzaki, T. und Aoki, T. (2001) Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *Federation of European Biochemical Society letters* 506 (1): 27–32.

- Ibrahim, H. R. (2001) A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *Journal of Biological Chemistry* 276 (47): 43767-43774.
- Ideo, H., Fukushima, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Dejima, K., Nomura, K. und Yashita, K. (2009) A *Caenorhabditis elegans* glycolipid-binding galectin functions in host defense against bacterial infection. *Journal of Biological Chemistry* 284 (39): 26493-26501.
- Imoto, T., Johnson, L. N., North, A. C. T., Phillips, D. C. und Rupley, J. A. (1972): Vertebrate lysozymes. In: *The Enzymes* (herausgegeben von Boyer, P. D.), 3. Aufl., Academic Press, New York, USA: 665-868.
- Irazoqui, J. E., Troemel, E. R., Feinbaum, R. L., Luhachack, L. G., Cezairliyan, B. O. und Ausubel, F. M. (2010) Distinct pathogenesis and host Responses during infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *Public Library of Science Pathogens* 6 (7): 1-24.
- Ito, Y., Yoshikawa, A., Hotani, T., Fukuda, S., Sugimura, K. und Imoto, T. (1999) Amino acid sequences of lysozymes newly purified from invertebrates imply wide distribution of a novel class in the lysozyme family. *European Journal of Biochemistry* 259 (1-2): 456-461.
- Jacobs, T. und Leippe, M. (1995) Purification and molecular cloning of a major antibacterial protein of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* with lysozyme-like properties. *European Journal of Biochemistry* 231 (3): 831-838.
- Janeway, C.A. und Medzhitov, R. (2002) Innate recognition. *Annual Review of Immunology* 20 (1): 197-216.
- Jeong, P.-Y., Jung, M., Yim, Y.-H., Kim, H., Park, M., Hong, E., Lee, W., Kim, Y.-H., Kim, K. und Paik, Y.-K. (2005) Chemical structure and biological activity of the *Caenorhabditis elegans* dauer-inducing pheromone. *Nature* 433 (7025): 541-545.
- Jollès, J. und Jollès, P. (1975) The lysozyme from *Asterias rubens*. *European Journal of Biochemistry* 54 (1): 19-23.
- Jollès, J., Jaureguiadell, J., Bernier, I. und Jollès, P. (1963) La structure chimique du lysozyme de blanc d'oeuf de poule: étude détaillée. *Biochimica et Biophysica Acta* 78 (4): 668-689.
- Jollès, J. und Jollès, P. (1961) Chemical structure of the lysozyme of chicken egg white: the developed formula. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De l'Académie Des Sciences* 253: 2773-2775.

- Jollès, P. (1969) Lysozymes: a chapter of molecular biology. *Angewandte Chemie International Edition in English* 8 (4): 227–239.
- Jollès, P. und Jollès, J. (1984) What's new in lysozyme research?. *Molecular and Cellular Biochemistry* 63 (2): 165–189.
- Joshua, G. W. P., Karkyshev, A. V., Smith, M. P., Isherwood, K. E., Titball, R. W. und Wren, B. W. (2003) A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. *Microbiology* 149 (11): 3221–3229.
- Josková, R., Silerova, M., Procházková, P. und Bilej, M. (2009) Identification and cloning of an invertebrate-type lysozyme from *Eisenia andrei*. *Developmental & Comparative Immunology* 33 (8): 932–938.
- Kang, D., Gho, Y. S, Suh, M. und Kang, C. (2002) Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin-Korean Chemical Society* 23 (11): 1511–1512.
- Kato, Y., Aizawa, T., Hoshino, H., Kawano, K., Nitta, K. und Zhang, H. (2002) abf-1 and abf-2, ASABF-type antimicrobial peptide genes in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical Journal* 361 (Pt 2): 221–230.
- Kato, Y. und Komatsu, S. (1996) ASABF, a novel cysteine-rich antibacterial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. *Journal of Biological Chemistry* 271 (48): 30493–30498.
- Kawli, T., He, F. und Tan, M.-W. (2010) It takes nerves to fight infections: insights on neuro-immune interactions from *C. elegans*. *Disease Models & Mechanisms*: 1–11.
- Kawli, T. und Tan, M.-W. (2008) Neuroendocrine signals modulate the innate immunity of *Caenorhabditis elegans* through insulin signaling. *Nature Immunology* 9 (12): 1415–1424.
- Kessin, R. H., Gundersen, G. G., Zaydfudim, V. und Grimson, M. (1996) How cellular slime molds evade nematodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (10): 4857–4861.
- Kim, D. und Ausubel, F. M. (2005) Evolutionary perspectives on innate immunity from the study of. *Current Opinion in Immunology* 17 (1): 4–10.
- Kim, D. H., Liberati, N. T., Mizuno, T., Inoue, H., Hisamoto, N., Matsumoto, K. und Ausubel, F. M. (2004) Integration of *Caenorhabditis elegans* MAPK pathways mediating immunity and stress resistance by MEK-1 MAPK kinase and VHP-1 MAPK phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (30): 10990–10994.

- Kim, T. I., Jin, S. H., Kang, E. H., Shin, S. K., Choi, K. Y. und Kim, W. H. (2002) The role of mitogen-activated protein kinases and their relationship with NF- κ B and PPAR γ in indomethacin-induced apoptosis of colon cancer cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 973 (1): 241-245.
- Kimble, J. und Hirsh, D. (1979) The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 70 (2): 396–417.
- Kiontke, K., Gavin, N. P., Raynes, Y., Roehring, C., Piano, F. und Fitch, D. H. A. (2004) *Caenorhabditis* phylogeny predicts convergence of hermaphroditism and extensive intron loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (24): 9003-9008.
- Koch, R., van Luenen, H. G. A. M., van der Horst, M., Thijssen, K. L. und Plasterk, R. H. A. (2000) Single nucleotide polymorphisms in wild isolates of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research* 10 (11): 1690-1696.
- Koga, M., Zwaal, R., Guan, K. L., Avery, L., Ohshima, Y. (2000) A *Caenorhabditis elegans* MAP kinase kinase, MEK-1, is involved in stress responses. *The European Molecular Biology Organization Journal* 19 (19): 5148–5156.
- Kornegay, J. R., Schilling, J. W. und Wilson, A. C. (1994) Molecular adaptation of a leaf-eating bird: stomach lysozyme of the hoatzin. *Molecular Biology and Evolution* 11 (6): 921-928.
- Kramer, J. M., French, R. P., Park, E. C. Johnson, J. J. (1990) The *Caenorhabditis elegans* rol-6 gene, which interacts with the *sqt-1* collagen gene to determine organismal morphology, encodes a collagen. *Molecular and cellular biology* 10 (5): 2081-2089.
- Kuroki, R., Yamada, H., Moriyama, T. und Imoto, T. (1986) Chemical mutations of the catalytic carboxyl groups in lysozyme to the corresponding amides. *Journal of Biological Chemistry* 261 (29): 13571-13574.
- Kurz, C. L. und Ewbank, J. J. (2003) *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity. *Nature Reviews Genetics* 4 (5): 380–390.
- Kurz, C. L., Chauvet, S., Andrès, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, G. P. F., Uh, M., Celli, J., Filloux, A., De Bentzemann, S., Steinmetz, I., Hoffmann, J. A., Finlay, B. B., Gorvel, J.-P., Ferrandon, D. und Ewbank, J. J. (2003) Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *The European Molecular Biology Organization Journal* 22 (7): 1451–1460.

- Laible, N. J. und Germaine, G. R. (1985) Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infection and immunity* 48 (3): 720-728.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. und Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (21): 2947-2948.
- Leippe, M. (1999) Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa - effector molecules of primitive phagocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 23 (4-5): 267-279.
- Leung, B. (1999) Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* Intestine. *Developmental Biology* 216 (1): 114-134.
- Lewis, J. A. und Fleming, J. T. (1995) Basic culture methods. *Methods in Cell Biology* 48: 3-29.
- Lin, K., Hsin, H., Libina, N. und Kenyon, C. (2001) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nature genetics* 28 (2): 139-145.
- Loris, R. (2002) Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1572 (2-3): 198-208.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.-W., Rahme, L. G. und Ausubel, F. M. (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96 (1): 47-56.
- Mallo, G. V., Kurz, C. L., Couillault, C., Pujol, N., Granjeaud, S., Kohara, Y. und Ewbank, J. J. (2002) Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Current Biology* 12 (14): 1209-1214.
- Marroquin, L. D., Elyassnia, D., Griffiths, J. S., Feitelson, J. S. und Aroian, R. V. (2000) *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 155 (4): 1693-1699.
- Masschalck, B. und Michiels, C. W. (2003) Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology* 29 (3): 191-214.
- Matthews, B. W. und Remington, S. J. (1974): The three dimensional structure of the lysozyme from bacteriophage T4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71 (10): 4178-4182.

- Maupas, E. (1900) Modes et formes de reproduction des nematodes. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale* 8: 463-624.
- McCarter, J., Bartlett, B., Dang, T. und Schedl, T. (1997) Soma-germ cell interactions in *Caenorhabditis elegans*: multiple events of hermaphrodite germline development require the somatic sheath and spermathecal lineages. *Developmental Biology* 181 (2): 121-143.
- McElwee, J. J., Schuster, E., Blanc, E., Thomas, J. H. und Gems, D. (2004) Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae and long-lived daf-2 mutants implicates detoxification system in longevity assurance. *Journal of Biological Chemistry* 279 (43): 44533-44543.
- McGhee, J. D., Sleumer, M. C., Bilenky, M., Wong, K., McKay, S. J., Goszczynski, B., Tian, H., Krich, N. D., Khattra, J., Holt, R. A., Baillie, D. L., Kohara, Y., Marra, M. A., Jones, S. J. M., Moerman, D. G. und Robertson, A. G. (2007) The ELT-2 GATA-factor and the global regulation of transcription in the *C. elegans* intestine. *Developmental biology* 302 (2): 627-645.
- McHenry, J. G., Birkbeck, T. H. und Allen, J. A. (1979): „The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 63 (1): 25-28.
- Means, T. K., Mylonakis, E., Tampakakis, E., Colvin, R. A., Seung, E., Puckett, L., Tai, M. F., Stewart, C. R., Pukkila-Worley, R., Hickman, S. E., Moore, K. J., Calderwood, S. B., Hacohen, N., Luster, A. D. und Houry, J. E. (2009) Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *The Journal of Experimental Medicine* 206 (3): 637-653.
- Mehlhorn, H. und Piekarski, G. (2002) Grundriss der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere. 6. Aufl., *Spektrum*, Heidelberg, 516 S..
- Mello, C. C., Kramer, J. M., Stinchcomb, D. und Ambros, V. (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *The European Molecular Biology Organization journal* 10 (12): 3959-3970.
- Miyauchi, K., Matsumiya, M. und Mochizuki, A. (2006) Purification and characterization of lysozyme from purple washington clam *Saxidomus purpurata*. *Fisheries science* 72 (6): 1300-1305.
- Mochii, M., Yoshida, S., Morita, K., Kohara, Y. und Ueno, N. (1999) Identification of transforming growth factor- β -regulated genes in *Caenorhabditis elegans* by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (26): 15020-15025.

- Monchois, V., Abergel, C., Sturgis, J., Jeudy, S. und Claviere, J.-M. (2001) *Escherichia coli* ykfE ORFan gene encodes a potent inhibitor of c-type lysozyme. *Journal of Biological Chemistry* 276 (21): 18437-18441.
- Monzingo, A. F., Marcotte, E. M., Hart, P. J. und Robertus, J. D. (1996) Chitinases, chitosanases, and lysozymes can be divided into procaryotic and eucaryotic families sharing a conserved core. *Nature Structural Biology* 3 (2): 133-140.
- Morita, T., Hara, S. und Matsushima, Y. (1978) Purification and characterization of lysozyme produced by *Streptomyces erythraeus*. *Journal of Biochemistry* 83 (3): 893-903.
- Müller, I., Subert, N., Otto, H., Herbst, R., Rühling, H., Maniak, M. und Leippe, M. (2005) A *Dictyostelium* mutant with reduced lysozyme levels compensates by increased phagocytic activity. *Journal of Biological Chemistry* 280 (11): 10435-10443.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- 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. *The Journal of Lipid Research* 36 (8): 1653-1663.
- Murphy, C. T., McCarroll, S. A., Bargmann, C. I., Fraser, A., Kamath, R. S., Ahringer, J., Li, H. und Kenyon, C. (2003) Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 424 (6946): 277-283.
- Mylonakis, E., Ausubel, F. M., Perfect, J. R., Heitman, J. und Calderwood, S. B. (2002) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (24): 15675-1568.
- Mysliwy, J., Dingley, A. J., Stanisak, M., Jung, S., Lorenzen, I., Roeder, T., Leippe, M. und Grötzinger, J. (2010) Caenopore-5: The three-dimensional structure of an antimicrobial protein from *Caenorhabditis elegans*. *Developmental & Comparative Immunology* 34 (3): 323-330.
- Nakimbugwe, D., Masschalck, B., Deckers, D., Callewaert, L., Aertsen, A. und Michiels, C. W. (2006) Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts. *Federation of European Microbiological Societies microbiology letters* 259 (1): 41-46.

- Nathoo, A. N., Moeller, R. A., Westlund, B. A. und Hart, A. C. (2001) Identification of neuropeptide-like protein gene families in *Caenorhabditiselegans* and other species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (24): 14000-14005.
- Nelson, F. K. und Riddle, D. L. (1984) Functional study of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system using laser microsurgery. *Journal of Experimental Zoology* 231 (1): 45-56.
- Nicholas, H. R. und Hodgkin, J. (2004a) Responses to infection and possible recognition strategies in the innate immune system of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular immunology* 41 (5): 479–493.
- Nicholas, H. R. und Hodgkin, J. (2004b) The ERK MAP kinase cascade mediates tail swelling and a protective response to rectal infection in *C. elegans*. *Current Biology* 14 (14): 1256–1261.
- Nicholas, W. L., Dougherty, E. C. und Hansen, E. L. (1959) Axenic cultivation of *C. briggsae* (Nematoda: *Rhabditidae*) with chemically undefined supplements; comparative studies with related nematodes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 77: 218-236.
- Nickel, R., Jacobs, T. und Leippe, M. (1998) Molecular characterization of an exceptionally acidic lysozyme-like protein from the protozoon *Entamoeba histolytica*. *Federation of European Biochemical Society letters*. 437 (1-2): 153–157.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. und von Heijne, G. (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *International Journal of Neural Systems* 8 (5-6): 581-599.
- Nilsen, I. W., Øverbo, K., Sandsdalen, E., Sandaker, E., Sletten, K. und Myrnes, B. (1999) Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity. *Federation of European Biochemical Society letters* 464 (3): 153–158.
- Nilsen, I. W., Myrnes, B., Edvardsen, R. B., und Chourrout, D. (2003) Urochordates carry multiple genes for goose-type lysozyme and no genes for chicken- or invertebrate-type lysozymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60 (10): 2210-2218.
- Nitta, K.; Tsuge, H., Shimazaki, K. und Sugai, S. (1988) Calcium-binding lysozymes. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 369 (2): 671-676.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L. (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews* 198 (1): 49–266.

- O'Brien, J. S. und Kishimoto, Y. (1991) Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 5 (3): 301-308.
- O'Keefe, D. O. (1994) Quantitative Electrophoretic Analysis of Proteins Labeled with Monobromobimane. *Analytical Biochemistry* 222 (1): 86-94.
- Olsen, Ø. M., Nilsen, I. W., Sletten, K. und Myrnes, B. (2003) Multiple invertebrate lysozymes in blue mussel (*Mytilus edulis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 136 (1): 107–115.
- Ookuma, S., Fukuda, M. und Nishida, E. (2003) Identification of a DAF-16 transcriptional target gene, scl-1, that regulates longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*. 13 (5): 427–431.
- O'Rourke, D., Barban, D., Demidova, M., Mott, R. und Hodgkin, J. (2006) Genomic clusters, putative pathogen recognition molecules, and antimicrobial genes are induced by infection of *C. elegans* with *M. nematophilum*. *Genome Research*. 16 (8): 1005-1016.
- Osche, G. (1952) Systematik und Phylogenie der Gattung *Rhabditis* (Nematoda). *Zoologische Jahrbücher - Abt. Zool. Phys. der Tiere* 81: 190-280.
- Osserman, E. F. und Lawlor, D. P. (1966) Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *The Journal of Experimental Medicine* 124 (5): 921-951.
- Page, R. D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12 (4): 357-358.
- Pancer, Z., Mayer, W. E., Klein, J. und Cooper, M. D. (2004) Prototypic T cell receptor and CD4-like coreceptor are expressed by lymphocytes in the agnathan sea lamprey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (36): 13273-13278.
- Paskewitz, S. M., Li, B. und Kajla, M. K. (2008) Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. *Insect molecular biology* 17 (3): 217–225.
- Patterson, G. I., Padgett, R. W. (2000) TGF β -related pathways: roles in *Caenorhabditis elegans* development. *Trends in Genetics* 16 (1): 27–33.

- Pauli, F.; Liu, Y.; Kim, Y. A.; u. a. (2006): „Chromosomal clustering and GATA transcriptional regulation of intestine-expressed genes in *C. elegans*“. In: *Development*. 133 (2), S. 287-295, doi: 10.1242/dev.02185.
- Peixoto, C. A., Kramer, J. M. und de Souza, W. (1997) *Caenorhabditis elegans* cuticle: a description of new elements of the fibrous layer. *The Journal of Parasitology* 83 (3): 368-372.
- Pfeiffer, J., Johnson, D. und Nehrke, K. (2008) Oscillatory transepithelial H⁺ flux regulates a rhythmic behavior in *C. elegans*. *Current Biology* 18 (4): 297-302.
- Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M. und Schneider, D. S. (2007) A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *Public Library of Science Pathogenesis* 3 (3): 1-8.
- Phillips, D. C. (1966) The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Scientific American* 215 (5): 78-90.
- Pradel, E., Zhang, Y., Pujol, N., Matsuyama, T., Bargmann, C. I. und Ewbank, J. J. (2007) Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (7): 2295-2300.
- Prager, E. M. und Jollès, P. (1996) Animal lysozymes c and g: an overview. *Experientia supplementia* 75: 9-31.
- Prager, E. M., Wilson, A. C. und Arnheim, N. (1974) Widespread distribution of lysozyme g in egg white of birds. *Journal of Biological Chemistry* 249 (22): 7295-7297.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. und Cormier, M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111 (2): 229-233.
- Pujol, N., Cypowyj, S., Ziegler, K., Millet, A., Astrain, A., Goncharov, A. und Jin, Y. (2008a) Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Current Biology* 18 (7): 481-489.
- Pujol, N., Link, E. M., Liu, L. X., Kurz, C. L., Alloing, G., Tan, M.-W., Ray, K. P., Solari, R., Johnson, C. D. und Ewbank, J. J. (2001) A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 11 (11): 809-821.

- Pujol, N., Zugasti, O., Wong, D., Couillault, C., Kurz, C. L., Schulenburg, H., Ewbank, J. J. und Ausubel, F. M. (2008b) Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. *Public Library of Science Pathogens* 4 (7): 1-12.
- Qasba, P. K. und Safaya, S. K. (1984) Similarity of the nucleotide sequences of rat alpha-lactalbumin and chicken lysozyme genes. *Nature* 308 (5957): 377-380.
- Rau, A., Hogg, T., Marquardt, R. und Hilgenfeld, R. (2001) A New Lysozyme Fold. *Journal of Biological Chemistry* 276 (34): 31994-31999.
- Regel, R., Matioli, S. R. und Terra, W. R. (1998) Molecular adaptation of *Drosophila melanogaster* lysozymes to a digestive function. *Insect biochemistry and molecular biology* 28 (5-6): 309-319.
- Ren, M., Feng, H., Fu, Y., Land, M. und Rubin, C. S. (2009) Protein kinase D is an essential regulator of *C. elegans* innate immunity. *Immunity* 30 (4): 521-532.
- Riener, C. K., Kada, G. und Gruber, H. J. (2002) Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 (4-5): 266-276.
- Roeder, T., Stanisak, M., Gelhaus, C., Bruchhaus, I., Grötzinger, J. und Leippe, M. (2010) Caenopores are antimicrobial peptides in the nematode *Caenorhabditis elegans* instrumental in nutrition and immunity. *Developmental & Comparative Immunology* 34: 203-209.
- Sadd, B. M. und Schmid-Hempel, P. (2006) Insect immunity shows specificity in protection upon secondary pathogen exposure. *Current Biology* 16 (12): 1206-1210.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K. und Ehrlich, H. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839): 487-491.
- Saitou, N. und Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 (4): 406-425.
- 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. *Analytical Biochemistry* 166 (2): 368-379.
- Schedl, T. (1997) Developmental genetics of the germ line, Kapitel 10. In: *C. elegans II* (herausgegeben von Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. und Priess, J. R.), *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

- Schikorski, D., Cuvillier-Hot, V., Leippe, M., Boidin-Wichlacz, C., Slomianny, C., Macagno, E., Salzet, M. und Tasiemski, A. (2008) Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *The Journal of Immunology* 181 (2): 1083-1095.
- Schlegel, H. (1981) Allgemeine Mikrobiologie. 5. Aufl., *Thieme*, Stuttgart, 559 S..
- Schmidt, H., Gelhaus, C., Latendorf, T., Nebendahl, M., Petersen, A., Krause, S., Leippe, M., Becker, W.-M. und Janssen, O. (2009) 2-D DIGE analysis of the proteome of extracts from peanut variants reveals striking differences in major allergen contents. *Proteomics* 9 (13): 3507-3521.
- Schulenburg, H., Hoepfner, M. P., Weiner III, J. und Bornberg-Bauer, E. (2008) Specificity of the innate immune system and diversity of C-type lectin domain (CTLD) proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Immunobiology* 213 (3-4): 237-250.
- Schulenburg, H., Kurz, C. L. und Ewbank, J. J. (2004) Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunological reviews* 198 (1): 36-58.
- Schulenburg, H. und Boehnisch, C. (2008) Diversification and adaptive sequence evolution of *Caenorhabditis* lysozymes (Nematoda: *Rhabditidae*). *BioMed Central Evolutionary Biology* 8 (114): 1-19.
- Schulenburg, H. und Ewbank, J. J. (2007) The genetics of pathogen avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Microbiology* 66 (3):63-570.
- Schulenburg, H., Kurtz, J., Moret, Y. und Siva-jothy, M. T. (2009) Introduction. Ecological immunology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1513): 3-14.
- Shapira, M., Hamlin, B. J., Rong, J., Chen, K., Ronen, M. und Tan, M.-W. (2006) A conserved role for a GATA transcription factor in regulating epithelial innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (38): 14086-14091.
- Sheagren, J. N. (1984) *Staphylococcus aureus*. *New England Journal of Medicine* 310 (21): 1368-1373.
- Shimomura, O. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy* 217 (1): 3-15.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. und Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59: 223-239.

- Shugar, D. (1952) The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochimica Et Biophysica Acta* 8 (3): 302-309.
- Sicard, M., Hering, S., Schulte, R., u. a. (2007) The effect of *Photorhabdus luminescens* (*Enterobacteriaceae*) on the survival, development, reproduction and behaviour of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda: *Rhabditidae*). *Environmental microbiology* 9 (1): 12–25.
- Sicard, M., Brugirard-Ricaud, K., Pagès, S., Lanois, A., Boemare, N. E., Brehélin, M. und Givaudan, A. (2004) Stages of infection during the tripartite interaction between *Xenorhabdus nematophila*, its nematode vector, and insect hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (11): 6473-6480.
- Smit, R. B., Schnabel, R., Gaudet, J. und Mango, S. E. (2008) The HLH-6 transcription factor regulates *C. elegans* pharyngeal gland development and function. *Public Library of Science Genetics* 4 (10): 1-15.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. 1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 (1): 76-85.
- Sönnichsen, B., Koski, L. B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.-M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., Heinkel, R., Röder, M., Finell, J., Häntsch, H., Jones, S. J. M., Jones, M., Piano, F., Gunsalus, K. C., Oegema, K., Gönczy, P., Coulson, A., Hyman, A. A. und Echeverri, C. J. (2005) Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 434 (7032): 462-469.
- Stein, L. D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M. R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., Coulson, A., D'Eustachio, P., Fitch, D. H. A., Fulton, L. A., Fulton, R. E., Griffiths-Jones, S., Harris, T. W., Hillier, L. W., Kamath, R., Kuwabara, P. E., Mardis, E. R., Marra, M. A., Miner, T. L., Minx, P., Mullikin, J. C., Plump, R. W., Rogers, J., Schein, J. E., Sohrmann, M., Spieth, J., Stajich, J. E., Wei, C., Willey, D., Wilson, R. K., Durbin, R. und Waterston, R. H. (2003) The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *Public Library of Science Biology* 1 (2): 166-192.
- Stewart, C. B., Schilling, J. W. und Wilson, A. C. (1987) Adaptive evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters. *Nature* 330 (6146): 401-404.
- Stiernagle, T. (1999) Maintenance of *C. elegans*. In: *C. elegans: a practical approach* (herausgegeben von Hope, I.), *Oxford University Press*, New York, USA: 51–67.

- Sulston, J. E. (1983) Neuronal cell lineages in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 48 Pt 2: 443-452.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. und Thomson, J. N. (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 100 (1): 64-119.
- Sulston, J. E., Albertson, D. G. und Thomson, J. N. (1980) The *Caenorhabditis elegans* male: postembryonic development of nongonadal structures. *Developmental Biology* 78 (2): 542-576.
- Sulston, J. E. und Brenner, S. (1974) The DNA of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77 (1): 95-104.
- Sulston, J. E. und Hodgkin, J. (1988) Methods. In: *The nematode Caenorhabditis elegans* (herausgegeben von Wood, W. B. und The Community of *C. elegans* Researchers), *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, USA: : 587-606.
- Sulston, J. E. und Horvitz, H. R. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology* 56 (1): 110-156.
- Takeshita, K., Hashimoto, Y., Ueda, T. und Imoto, T. (2003) A small chimerically bifunctional monomeric protein: *Tapes japonica* lysozyme. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60 (9): 1944-1951.
- Tan, M.-W. (2001) Genetic and genomic dissection of hostpathogen interactions using a *P. aeruginosa*-*C. elegans* pathogenesis model. *Pediatric Pulmonol* 32: 96-97.
- Tan, M.-W., Mahajan-Miklos, S. und Ausubel, F. M. (1999) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (2): 715-720.
- Tanford, C., Aune, K. C, und Ikai, A. (1973) Kinetics of unfolding and refolding of proteins: III. Results for lysozyme. *Journal of molecular biology* 73 (2): 185-197.
- Tenor, J. L. und Aballay, A. (2008) A conserved Toll-like receptor is required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *European Molecular Biology Organization reports* 9 (1): 103-109.
- Terra, W. R. (1988) Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 21 (4): 675-734.
- Terra, W. R. (1990) Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomolgy* 35: 181-200.

- Thammasirirak, S., Torikata, T., Takami, K., Murata, K. und Araki, T. (2001) Purification and characterization of goose type lysozyme from Cassowary (*Casuarius casuarius*) egg white. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 65 (3): 584-592.
- Thomas, J. H. (2006) Adaptive evolution in two large families of ubiquitin-ligase adapters in nematodes and plants. *Genome Research* 16 (8): 1017-1030.
- Thompson, J .D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22 (22): 4673-4680.
- Troemel, E.R., Chu, S. W., Reinke, V., Lee, S. S., Ausubel, F. M. und Kim, D. H. (2006) p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *Public Library of Science Genetics* 2 (11): 1725-1739.
- Tsugati, A. und Ikeya-Oeda, Y. (1972) T2 and T4 phage lysozyme and phage λ endolysin. In: *Proteins: Structure and Function* (herausgegeben von Fumatsu, M.), *Kodansha Limited*, Tokio, Japan.
- Van Herreweghe, J. M., Vanderkelen, L., Callewaert, L., Aertsen, A., Compennolle, G., Declerck, P. J. und Michiels, C. W. (2010) Lysozyme inhibitor conferring bacterial tolerance to invertebrate type lysozyme. *Cellular and Molecular Life Sciences* 67 (7): 1177-1188.
- Vanderkelen, L., Herreweghe, J. M., Vanoirbeek, K. G. A., Baggerman, G., Myrnes, B., Declerck, P. J., Nilsen, I. W., Michiels, C. W., Callewaert, L. (2010) Identification of a bacterial inhibitor against g-type lysozyme. *Cellular and Molecular Life Sciences*, <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00018-010-0507-3>.
- Vogel, B. E. und Hedgecock, E. M. (2001) Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions. *Development* 128 (6): 883-894.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., Joris, Charlier, P. und Foster, S. (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *Federation of European Microbiological Societies microbiology reviews* 32 (2): 259–286.
- Wang, Y.-H., Li, Y.-P., Zhang, Q. und Zhang, X. (2008) Enhanced antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* by medium optimization. *Bioresource Technology* 99 (6): 1708-1715.

- Ward, S., Thomson, N., White, J. G. und Brenner, S. (1975) Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*?. *The Journal of Comparative Neurology* 160 (3): 313-337.
- Waterston, R. H. (1988) 10 Muscle. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, New York, USA (17): 281-335.
- Weaver, L. H., Grütter, M. G., Remington, S. J., Gray, T. M., Isaacs, N. W. und Matthews, B. W. (1985) Comparison of goose-type, chicken-type, and phage-type lysozymes illustrates the changes that occur in both amino acid sequence and three-dimensional structure during evolution. *Journal of molecular evolution* 21 (2): 97-111.
- Wenick, A. S. und Hobert, O. (2004) Genomic cis-regulatory architecture and trans-acting regulators of a single interneuron-specific gene battery in *C. elegans*. *Developmental Cell* 6 (6): 757-770.
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., Southgate, E., Thomson, J. N. und Brenner, S. (1983) Factors that determine connectivity in the nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 48 Pt 2: 633-640.
- Wiechelman, K. J., Braun, R. D. und Fitzpatrick, J. D. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* 175 (1): 231-237.
- Wong, D., Bazopoulou, D., Pujol, N., Tavernarakis, N. und Ewbank, J. J. (2007) Genome-wide investigation reveals pathogen-specific and shared signatures in the response of *Caenorhabditis elegans* to infection. *Genome Biology* 8 (9): R194:1-18.
- Wylie, T., Martin, J. C., Dante, M., Mitreva, M. D., Clifton, S. W., Chinwalla, A., Waterston, R. H., Wilson, R. K. und McCarter, J. P. (2004) Nematode.net: a tool for navigating sequences from parasitic and free-living nematodes. *Nucleic Acids Research* 32 (Database issue): D423-426.
- Xue, Q.-G., Schey, K. L., Volety, A. K., Chu, F. L. E. und La Peyre, J. F. (2004) Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 139 (1): 11-25.
- Xue, Q.-G., Itoh, N., Schey, K. L., Li, Y.-L., Cooper, R. K., Peyre, J. F. (2007) A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 (1): 82-95.

- Xue, Q.-G., Hellberg, M. E., Schey, K. L., Itoh, N., Eytan, R. I., Cooper, R. K. und La Peyre, J. F. (2010) A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BioMed Central Evolutionary Biology* 10 (1), 213:1-17.
- Zavalova, L., Lukyanov, S., Baskova, I., Snezhkov, E., Akopov, S., Berezhnoy, S., Bogdanova, E., Barsova, E. und Sverdlov, E. D. (1996) Genes from the medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) coding for unusual enzymes that specifically cleave endo- ϵ (γ -Glu)-Lys isopeptide bonds and help to dissolve blood clots. *Molecular and General Genetics* 253 (1): 20–25.
- Zavalova, L. L., Baskova, I. P., Lukyanov, S. A., Sass, A. V., Snezhkov, E. V., Akopov, S. B., Artamonova, I. I., Archipova, V. S., Nesmeyanov, V. A., Kozlov, D. G., Benevolensky, S. V., Kiseleva, V. I., Poverenny, A. M. und Sverdloy, E. D. (2000) Destabilase from the medicinal leech is a representative of a novel family of lysozymes. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1478 (1): 69–77.
- Zavalova, L.L., Yudina, T.G., Artamonova, I.I. und Baskova, I. P. (2006) Antibacterial non-glycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and of its helical amphipathic peptides. *Chemotherapy* 52 (3): 158-160.
- Zhang, H. und Kato, Y. (2003) Common structural properties specifically found in the CS $\alpha\beta$ -type antimicrobial peptides in nematodes and mollusks: evidence for the same evolutionary origin?. *Developmental & Comparative Immunology* 27 (6-7):499–503.
- Zhang, X. und Zhang, Y. (2009) Neural-immune Communication in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Host & Microbe* 5 (5): 425-429.
- Zhang, Y., Foster, J., Nelson, L., Ma, D. und Carlow, C. (2005) The chitin synthase genes *chs-1* and *chs-2* are essential for *C. elegans* development and responsible for chitin deposition in the eggshell and pharynx, respectively. *Developmental Biology* 285 (2): 330-339.
- Zhao, J., Qiu, L., Ning, X., Chen, A., Wu, H. und Li, C. (2010) Cloning characterization of an invertebrate type lysozyme from *Venerupis philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 156: 56-60.
- Zhao, J., Song, L., Li, C., Zou, H., Ni, D., Wang, W. und Xu, W. (2007) Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein. *Molecular Immunology* 44 (6): 1198-1208.
- Zugasti, O. und Ewbank, J. J. (2009) Neuroimmune regulation of antimicrobial peptide expression by a noncanonical TGF- β signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* epidermis. *Nature Immunology* 10 (3): 249-256.

III Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** *C. elegans* und seine Feinde. Darstellung der Anatomie eines Hermaphroditen mit einer Auswahl von Pathogenen und deren Infektionswege, mit denen *C. elegans* unter Laborbedingungen koinkubiert wurde. (Abbildung verändert nach (Hodgkin und Partridge, 2008)..... 6
- Abb. 2:** Peptidoglykanstruktur von *Escherichia coli*. Die aus einer alternierenden Folge von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) bestehenden heteropolymeren Ketten sind untereinander peptidisch verknüpft. Auf der linken Bildseite ist das rechts oben eingerandete Muropeptid vergrößert wiedergegeben (Dpm = Diaminopimelinsäure). Die roten Pfeile deuten auf die durch Lysozym (Muramidase) und durch eine spezifische Muroendopeptidase spaltbaren Bindungen. Das Bild rechts unten vermittelt einen perspektivischen Eindruck von dem aus GlcNAc (G) und MurNAc (M) quervernetzten Holmen (Abbildung unverändert übernommen aus Schlegel, 1981)..... 10
- Abb. 3:** Die Struktur des i-Typ-Lysozyms aus *Tapes japonica*. Dargestellt ist die Tertiärstruktur des Lysozym-Monomers, welches mit dem Substrat (NAG)₃ (dunkelblau) einen Komplex bildet (verändert n. Goto *et al.*, 2007)..... 13
- Abb. 4:** Entwicklungszyklus von *C. elegans* mit alternativem Dauerstadium bei 22 °C. Abbildung mit englischer Beschriftung unverändert entnommen. (Quelle: <http://www.wormatlas.org/handbook/>; Zugriff: 05.09.2010)..... 18
- Abb. 5:** Anatomie von *C. elegans*. Die anatomischen Einheiten und Größenverhältnisse sind direkt gekennzeichnet. Im kleinen Bildausschnitt sind die spezifischen Strukturen eines männlichen Schwanzes dargestellt..... 21
- Abb. 6:** Generierung eines C-terminalen translationalen PCR-Fusionsprodukts. Oligonukleotid A und B amplifizieren die genomische Region (Amplikon 1). Oligonukleotid C und D amplifizieren das Reportergen (*gfp*) und den 3'-UTR

(Amplikon 2). Die nested Oligonukleotide A* und D* werden für die Fusion von Amplikon 1 und 2 verwendet (grauer Kasten: 24 bp-Überhang). Das resultierende Fusionsprodukt kann direkt injiziert werden. (verändert nach (Boulin *et al.*, 2006; <http://www.wormbook.org>; Zugriff: 31.07.2010)..... 38

Abb. 7: Phylogenetischer Stammbaum bekannter i-Typ-Lysozyme verschiedener Organsimen generiert anhand ihrer Primärstrukturen: Rot markierte Artnamen repräsentieren die Lysozymsequenzen aus Nematoden, blaue aus Mollusken (*Bivalvia*), lilafarbene aus Echinodermaten, orangefarbene aus Anneliden, grüne aus Insekten und der schwarze die aus einem Dekapoden (*Crustacea*). Der rote Pfeil zeigt das ILYS-5 aus *C. elegans*. Mit den Aminosäuresequenzen (im Anhang beigefügt 8.3) wurde ohne vorhergesagte Signalpeptide nach einer *Bootstrap*-Analyse (1000 Replikate) ein *unrooted* Cladogramm (*NeighborJoining*) erstellt. Die Zahlen zeigen die *Bootstrap*-Verhältnisse an, es sind nur Werte >70 % gezeigt. Die Bezeichnungen sind: *C. virginica*1-3: *Crassostrea virginica* (Amerikanische Auster), *C. gigas*1-3: *Crassostrea gigas* (Pazifische Felsenauster), *C. spec*1-2: *Calyptogena spec.* (Muschelgattung), *M. edulis*1-2: *Mytilus edulis* (Miesmuschel), *M. galloprovincialis*1-2: *Mytilus galloprovincialis* (Mittelmeer-Miesmuschel), *C. islandica*: *Chlamys islandica* (Kammuschel), *O. edulis*: *Ostrea edulis* (Europäische Auster), *B. azoricus* und *B. thermophilus*: *Bathymodiolus spec.* (Tiefseemuschn), *T. japonica*: *Tapes japonica* (Japanische Teppichmuschel), *A. rubens*: *Asterias rubens* (Seestern), *A. japonicus*: *Apostichopus japonicus* (Seegurke), *H. medicinalis*: *Hirudo medicinalis* (Medizinischer Blutegel), *E. andrei*: *Eisenia andrei* (Kompostwurm), *L. vannamei*: *Litopenaeus vannamei* (Riesengarnele), *D. melanogaster*1-3: *Drosophila melanogaster* (Taufliege), *A. gambiae*1-2: *Anopheles gambiae* (Gambische Malariamücke), *C. quinquefasciatus*: *Culex quinquefasciatus* (Südliche Hausmücke), *S. zeamais*: *Sitophilus zeamais* (Maiskäfer) sowie *C. elegans*1-5 und *C. briggsae*4-5: *Caenorhabditis spec.* (Fadenwurm, Schwesterarten). 73

- Abb. 8: Konservierte Motive und Sekundärstruktur von Lysozym aus *T. japonica* im Vergleich mit ILYS-5 aus *C. elegans* (Teile übernommen aus Goto *et al.*, 2007). Das *Alignment* wurde nach dem Erstellen in ClustalW2 zur Verdeutlichung der Motive modifiziert. Blau hinterlegt und in weißer Schrift sind die katalytischen Aminosäurereste der Glykosidasefunktion, in weißer Schrift oliv hinterlegt an der Isopeptidase-Aktivität beteiligte Aminosäurereste, in blauer Schrift und grau hinterlegt die Cysteinreste, in weißer Schrift dunkelgrau unterlegt zusätzliche Sequenzabschnitte, in hellroter Schrift konservierte, in dunkelroter Schrift zum Teil konservierte Aminosäurereste und türkis hinterlegt in ILYS-5 abweichende Aminosäurereste dargestellt. Eingerahmt wurden unterschiedliche Motive (grün und gelb: i-Typ-spezifisch, pink: Substratbindung, gestrichelt: beteiligt an der elektrostatischen Oberflächeninteraktion in der Dimerstruktur bei dem *Tapes-Lysozym*). Über den verglichenen Sequenzen sind Sekundärstruktur-Elemente des Mollusken-Lysozyms gezeigt. Vphil steht für *V. philippinarum*, Tjapo für *T. japonica* und Cele5 für ILYS-5 aus *C. elegans*. 78**
- Abb. 9: Übersichtsbild eines *ilys-1::gfp* exprimierenden *C. elegans*. Dargestellt sind Aufnahmen eines Präparates in verschiedenen Kanälen mit unterschiedlichen Filtersätzen. Links wurden die Kanäle für die Detektion von GFP- (grün) und dsRed (rot)-Signalen überlagert, rechts das Durchlichtbild (DIC) und der dsRed-Kanal. Unten rechts ist durch den Balken das Größenverhältnis gezeigt. 83**
- Abb. 10: Aufnahme des Kopfbereichs eines *ilys-1::gfp* exprimierenden *C. elegans*. Das aufgenommene GFP-Fluoreszenzsignal (grün) ist im großen Bild, die dazugehörige Durchlichtaufnahme (DIC) im kleinen Bildausschnitt gezeigt, darin wurde die Struktur des Pharynx schematisch hervorgehoben. Der Größenstandard ist unten links gezeigt. 84**
- Abb. 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Kopfregion von *C. elegans* (*ilys-1::gfp*). Die Fluoreszenzsignale wurden mit zwei verschiedenen Filtern in unterschiedlichen Kanälen aufgenommen und überlagert (rot: dsRed; grün: GFP). Das dsRed-Signal stammt von kurz zuvor aufgenommenen DiI-gefärbten**

- E. coli*. Der Größenstandard ist unten rechts aufgeführt. Die Pfeile kennzeichnen Kopfneuronen..... 85
- Abb. 12:** Aufnahmen von Teilausschnitten transgener Hermaphroditen (*ilys-1::gfp*). Jeweils im großen Bildausschnitt ist die GFP-Fluoreszenz grün visualisiert und im kleineren Bildausschnitt das dazugehörige Durchlichtbild (DIC). Die Größenstandards sind jeweils unten rechts eingeblendet. **A:** Aufnahme des *Midbody* eines adulten Tieres. Der Pfeil zeigt die Vulva. **B:** Aufnahme der Schwanzregion eines Hermaphroditen. 86
- Abb. 13:** Aufnahme der mittleren Körperregion eines *ilys-1::gfp*-exprimierenden Wurms. Auf der linken Seite sind der GFP-Kanal (grün), auf der rechten Seite dessen Überlagerung mit dem DIC-Kanal sowie der Größenstandard unten links dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen die Mittellinie der streifenartigen Struktur, von der ein GFP-Signal (neben den punktförmigen Strukturen) ausging. 87
- Abb. 14:** Übersichtsaufnahme eines *ilys-2::gfp*-exprimierenden *C. elegans*. Gezeigt ist die mikroskopische Aufnahme eines Hermaphroditen im Fluoreszenzkanal (GFP-Filter, grün) und im Durchlichtkanal (DIC); links ist der GFP-Kanal, rechts die Überlagerung beider Kanäle dargestellt. Unten rechts ist der Größenstandard eingeblendet. 88
- Abb. 15:** Aufnahmen der Expression von *ilys-2::gfp* in verschiedenen Körperteilen von *C. elegans*. Jeweils der größere Bildausschnitt zeigt die Dokumentation der GFP-Fluoreszenz, der kleinere das dazugehörige Durchlichtbild (DIC) und die Balken die Größenverhältnisse. **A:** Kopf, **B:** Schwanz und **C:** *Midbody* eines adulten Hermaphroditen..... 89
- Abb. 16:** *Midbody* eines transgenen *ilys-2::gfp*-Wurmes. Das visualisierte GFP-Signal ist in grün zusammen mit dem Größenstandard unten links und mit der dazugehörigen DIC-Aufnahme im kleinen Bildausschnitt dargestellt. Die Pfeile zeigen den Verlauf einer linienartigen Struktur, von der ebenfalls GFP-Signale ausgingen..... 90

- Abb. 17:** Aufnahmen eines *ilys-3::gfp*-exprimierenden Hermaphroditen in mehreren Kanälen. Dargestellt sind die mittlere Körperregion und unten links das Größenverhältnis. Links wurde ausschließlich das GFP-Signal, in der Mitte die GFP- und dsRed-Kanäle (überlagert) sowie rechts der Durchlicht-Kanal (DIC) dargestellt..... 91
- Abb. 18:** Fluoreszenzaufnahme des Kopfes eines transgenen Tieres (*ilys-3::gfp*). Aufnahmen einzelner Kanäle (links) und deren Überlagerung (rechts) (GFP: grün, dsRed: rot) sowie DIC im kleinen Bildausschnitt rechts oben. Der Balken links unten gibt das Größenverhältnis an..... 92
- Abb. 19:** Aufnahme der fluoreszierenden Schwanzregion eines transgenen *ilys-3::gfp*-Wurmes. Links ist der GFP-Kanal, rechts die Überlagerung des Durchlicht- und GFP-Kanals und unten links der Größenstandard aufgezeigt. Die Pfeile verdeutlichen den Verlauf der Nervenstränge. 92
- Abb. 20:** Übersichtsaufnahme eines *ilys-4::gfp*-exprimierenden Hermaphroditen. In der linken Bildhälfte ist die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle (GFP: grün, dsRed: rot) mit dem Größenstandard unten links und in der rechten Hälfte das Abbild aller drei Kanäle (GFP, dsRed, DIC) dargestellt. Der Hermaphrodit wurde zuvor mit DiI-gefärbten Bakterien gefüttert. 93
- Abb. 21:** Kolokalisation der *ilys-4::gfp*-Expression und DiI-gefärbten Amphidneuronen. In der linken Bildhälfte wurden die beiden Fluoreszenzkanäle (GFP: grün, dsRed: rot) und in der rechten zusätzlich der DIC-Kanal überlagert. Die Größenverhältnisse sind durch den Balken demonstriert. Es stellt die Pharynxregion eines Hermaphroditen mit den angefärbten Amphidneuronen (rot, mit Pfeilen indiziert) dar. 94
- Abb. 22:** Fluoreszenzaufnahme der Phasmidneuronen mit *ilys-4::gfp*-Expression. Dargestellt ist die Kolokalisation der DiI gefärbten Phasmidneurone (rot) und der ILYS-4::GFP-Fusionsproteine (grün). Die Detektion erfolgte über zwei Kanäle mit einem dsRed- und einem GFP-Filter, das Größenverhältnis wird durch den

- Balken rechts oben markiert. D weist auf die Dendriten der und Ph auf die Zellkörper der Phasmidneuronen hin..... 95
- Abb. 23: Dokumentation der *ilys-4::gfp*-Expression in einem jungen Hermaphroditen.** Die Detektion erfolgte über einen GFP-Filter, die Fluoreszenz ist grün dargestellt, jeweils in den kleinen Bildausschnitten die dazugehörigen DIC-Aufnahmen, die Größenverhältnisse in Form der Balken. A: Vorderer Körperabschnitt, B: Hinterer Körperabschnitt des Wurms..... 96
- Abb. 24: Vergrößerungen neuronaler *ilys-4::gfp*-exprimierender Strukturen in *C. elegans*.** Die Detektion des GFP-Signals ist grün dargestellt, die Größenverhältnisse als Balken integriert; in den Teilabbildungen B und C ist links der GFP-Kanal, rechts die überlagerte Projektion des GFP- und DIC-Kanals und in A der GFP-Kanal und im kleinen Bildausschnitt das dazugehörige DIC-Bild gezeigt. A: Schwanzregion, B-C: Vulvaregion eines Hermaphroditen. 97
- Abb. 25: Schematische Darstellung des Exkretionssystems von *C. elegans*.** A und B zeigen unterschiedliche Ebenen im Körper. Dargestellt sind die fünf Zellen (Exkretorische, Kanal-, Poren-Zellen sowie die paarigen Drüsenzellen) des Exkretionssystems. Die Abbildung wurde *Wormatlas* entnommen und geringfügig verändert (<http://www.wormatlas.org>; Zugriff: 15.08.2010)..... 98
- Abb. 26: GFP-Fluoreszenzaufnahmen verschiedener Schnittebenen von dorsal nach ventral in einem *ilys-4::gfp*-exprimierenden Exkretionssystem von *C. elegans*.** Die Aufnahme erfolgte über einen GFP- (grün) und einem Durchlicht-Kanal (DIC). Jeweils die Aufnahmen von A-C und D-F zeigen Bilder ein und desselben Tieres. A: Überlagerte Projektion zweier Ebenen mit allen Zellen des Exkretionssystems, B: untere Ebenen mit den paarigen Drüsenzellen, C: Überlagerte Projektion beider Ebenen und dem dazugehörigen Durchlichtbild, D: Überlagerte Projektion der GFP-Signale beider Ebenen mit dem dazugehörigen DIC-Bild im kleinen Ausschnitt, E: dorsal gelegene Ebene mit der exkretorischen Zelle und deren Ausläufern und F: ventral gelegene Ebene mit den Ausläufern und

- Zellkörpern der paarigen Drüsenzellen sowie der Kanal- oder Porenzelle. Die beiden Balken zeigen die Größenverhältnisse. 98
- Abb. 27:** Übersichtsbilder *ilys-5::gfp*-exprimierender *C. elegans*. Dargestellt sind Aufnahmen eines Kanals mit einem GFP-Fluoreszenzfilter (grün) und jeweils im kleinen Bildausschnitt die Überlagerung dieses Bildes mit dem Bild des Durchlicht-Kanals (DIC). Der Größenstandard ist als Balken gekennzeichnet. A: Adulter Hermaphrodit, B: Larvenstadium. 100
- Abb. 28:** Aufnahme des Kopfbereichs eines ILYS-5-GFP generierenden Wurms. Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe eines GFP-Fluoreszenzfilters (grün) und einem Durchlicht-Kanal (DIC, kleines Bild), der eingeblendete Balken zeigt das Größenverhältnis. 101
- Abb. 29:** Schwanz eines *ilys-5::gfp*-exprimierenden Männchens. Gezeigt ist ein Überlagerungsbild eines Durchlicht (DIC)- und eines GFP-Kanals, der Balken markiert das Größenverhältnis. 101
- Abb. 30:** Abbildungen der rektalen Drüsenzellen von *C. elegans* (*ilys-5::gfp*). Es ist der GFP-Filterkanal (grün), der Durchlicht-Kanal (DIC) und in Form eines Balkens der Größenstandard dargestellt. A: Schwanzregion mit Enddarm und rektalen Drüsenzellen eines Hermaphroditen, links GFP-Kanal, rechts Überlagerung beider Kanäle, B: gleicher Körperbereich wie A, anderes Tier und Überlagerungsprojektion im kleinen Bildausschnitt und C: Vergrößerungsansicht der rektalen Drüsenzellen eines Hermaphroditen (GFP-Filter)..... 102
- Abb. 31:** Kolokalisation der DiI gefärbten Amphid- und der *ilys-5::gfp*-exprimierenden Neuronen. Es sind Aufnahmen der Kopfregionen zweier Hermaphroditen gezeigt. Die GFP-Signale (grün) und die DiI-Fluoreszenz (rot) wurden durch unterschiedliche Kanäle sowie die dazugehörigen DIC-Aufnahmen (jeweils im kleinen Bildausschnitt) und außerdem die Größenverhältnisse als Balken dokumentiert. Die Pfeile weisen auf die kolokalisierten Amphidneuronen. 104

- Abb. 32: Kolokalisation der DiI- und GFP-Fluoreszenz in der Schwanzregion eines *ilys-5::gfp*-Wurmes. Im großen Bildausschnitt wurden die GFP (grün)- und dsRed (rot)-Kanäle überlagert, der kleine Bildausschnitt zeigt die dazugehörige DIC-Aufnahme. Untern rechts ist der Größenstandard eingeblenet. Der Pfeil weist auf die nebeneinander liegenden Phasmidneuronen hin..... 104**
- Abb. 33: Aufnahmen der *Midbody*-Regionen mehrerer *ilys-5::gfp* exprimierender Hermaphroditen. Dokumentiert wurde die GFP-Fluoreszenz über einen GFP-Filterkanal (grün) und die Durchlichtaufnahme (DIC). Jeweils als Balken sind die Größenverhältnisse und jeweils in den kleinen Bildausschnitten die Überlagerungsbilder beider Kanäle gezeigt. Die weißen Pfeile kennzeichnen die Vulva, die Sterne die Spermatheken. Die Bilder A-C sind Aufnahmen verschiedener Tiere..... 105**
- Abb. 34: Fusionskonstrukt für die heterologe Expression von ILYS-5. Das Fusionsprodukt setzt sich aus der Sequenz von ILYS-5 abzüglich des mutmaßlichen Signalpeptids und drei verschiedenen Fusionspartnern des Expressionsvektors zusammen. A: Organisation des Fusionproduktes mit den drei Fusionspartnern Thioredoxin, His₆-Schwanz und S-Protein sowie der Schnittstelle für die Prozessierung mit Enterokinase; B: Bei gleicher Farbkodierung wie in A die resultierenden Primärstrukturen vor und nach Prozessierung mit Enterokinase sowie ausgewählte Eigenschaften (grau hervorgehoben unechter N-Terminus des ILYS-5) und C: Genmodell von *ilys-5* und Lokalisation auf dem X-Chromosom, es wurde mit F22A3.6a gearbeitet (von www.wormbase.org). 108**
- Abb. 35: Protokollübersicht für die Synthese und Präparation von rekombinanten ILYS-5. 109**
- Abb. 36: Synthese und Extraktion von rILYS-5. Dargestellt sind die Proteinextrakte nach SDS-gelelektrophoretischer Auftrennung und kolloidaler CBB-Färbung. In der linken Spur ist ein Aliquot des Extraktes aus den Einschlusskörperchen und in der rechten einer des Extraktes aus nicht induzierten Bakterien, die ansonsten**

- gleich behandelt wurden (K), gezeigt. Es wurden gleiche Volumina aufgetragen und links die molekularen Massen indiziert. Der rote Stern kennzeichnet die Bande des Fusionsproteins mit der erwarteten Größe von 30,5 kDa..... 110
- Abb. 37: Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins mit Enterokinase.** Dargestellt ist der Vergleich eines Fusionsproteingemisches nach Inkubation mit (mE) und ohne Enterokinase (oE), jeweils SDS-gelelektrophoretisch getrennt und silbergefärbt. Der Proteinstandard (M) mit seinen molekularen Massen ist links gezeigt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 37 °C mit 2 U/ml Enterokinase bzw. ohne Zugabe des Enzyms..... 112
- Abb. 38: Reinigung von ILYS-5.** In A ist das Chromatogramm einer Kationenaustauschchromatographie dargestellt. Die Parameter sind rechts in der Legende angegeben bzw. farblich kodiert. B zeigt die SDS-gelelektrophoretisch getrennten und silbergefärbten Proteine der einzelnen lyophilisierten und resuspendierten Fraktionen von insgesamt drei durchgeführten Chromatographien, bei denen, wie in A präsentiert, verfahren wurde. In der Spur M in Abb. B wurde der Größenstandard aufgetragen, dessen molekulare Massen links gekennzeichnet sind. Die schwarzen Balken in A und B indizieren die aktiven Fraktionen und den Grad der Aktivität. Die für weitere Analysen verwendete Fraktion wurde orange hervorgehoben..... 113
- Abb. 39: Massenspektrometrische Analyse von dem gereinigten ILYS-5.** In der Teilabbildung A ist das Gel nach der präparativen SDS-PAGE und kolloidalen CBB-Färbung mit den molekularen Massen (M) und entnommenen, nummerierten *Spots* gezeigt (Pool: vereinigte Fraktionen). B zeigt die Ergebnisse für die *Spots* aus A nach der massenspektrometrischen Analyse mit der prozentualen Sequenzabdeckung 116
- Abb. 40: Ermittlung des pH-Optimums von ILYS-5.** Die Parameter sind an den Achsen und in der Legende aufgeführt. Die Graphik wurde mit dem Programm SigmaPlot 10.0 erstellt. Die Messungen erfolgten mit drei unterschiedlichen Puffersystemen mit jeweils einer Differenz von pH 0,5 und einer Ionenstärke von

- I = 0,18. Die Aktivität wurde anhand der hydrolytischen Spaltung von *M. luteus*-Zellwänden in Lösungen und der damit verbundenen Extinktionsabnahme bei 450 nm ermittelt. Ein Aktivitätsmaximum von ILYS-5 konnte bei pH 3,5 beobachtet werden. 119**
- Abb. 41: Aktivität des ILYS-5 bei unterschiedlichen Ionenstärken und optimalen pH-Bedingungen. Die Lysozym-Aktivität wurde anhand der Extinktionsänderung bei 450 nm in einem Puffersystem unterschiedlicher Ionenstärke bei gleichem pH-Wert von pH 3,5 ermittelt. Dabei wurden spezifisch *M. luteus*-Zellwände abgebaut. Eingesetzt wurden 17,5 µg/ml bzw. 1,3 µM von ILYS-5. Der Median der doppelt bestimmten Aktivität ist jeweils unten angegeben. Die Fehlerbalken kennzeichnen den maximalen und minimalen gemessenen Wert. 120**

IV Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Genomlokalisierung und ausgewählte Eigenschaften der potentiellen <i>C. elegans</i> i-Typ-Lysozyme	75
Tab. 2: Art der Reportergenkonstrukte zur Genexpressionslokalisierung der i-Typ-Lysozyme	82
Tab. 3: Gewebsspezifische Lokalisierung der <i>ilys</i>-Genexpression und deren Genprodukten.....	106
Tab. 4: Ergebnisse des Mikrosuszeptibilitätstests mit ILYS-5 und HEWL.	123

8 Anhang

8.1 Verwendete Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden jeweils von der Firma biomers.net GmbH, Ulm, synthetisiert und bezogen.

Allgemeine Oligonukleotide zur Kontrolle

pDrive-Vektor	M13 <i>forward</i> (-20)	5'-gtaaacgacggccagt-3'
	M13 <i>reverse</i>	5'-aacagctatgacatg -3'
	Sp6	5'-catttaggtgacactatag -3'
pET32a-Vektor	T7 <i>forward</i>	5'-taatacgactcactataggg-3'
	T7-Terminator	5'-gctagttattgctcagcgg-3'
pPD95_77-Vektor	<i>Primer C</i>	5'-agcttgcctgcctgcaggtcg-3'
	<i>Primer D</i>	5'-aaggcccgtacggccgacta-3'
	<i>Primer D*</i>	5'-ggaaacagttatgtttgtata-3'

Oligonukleotide für die cDNA-Synthese von der mRNA

Erststrangsyn.	3'-RACE	5'-gactcgagtcgacatcgat-3'
Zweitstrangsyn.	<i>CapFinder-Origin-PCR</i>	5'-aagcagtggtatcaacgcagagtgccattacggccg-3'
	<i>Oligo-dT7-II</i>	5'-gagagaggatccaagtactaatacgactcactatagg-3'

Spezifische Oligonukleotide zur Amplifikation des kodierenden Bereichs eines Gens

<i>ilys-5</i>	<i>ilys-5_pET32a_for</i>	5'-catgc' <i>catgggcgactgcctccac</i> -3'
	<i>ilys-5_pET32a_rev</i>	5'-ccgc' <i>tcgagttaagagcatccacagcagctt</i> -3'

Spez. Oligonukleotide zur Amplifikation eines Gens samt regulatorischer Bereiche
ilys-5

F22A3.6a_genomSense	5'-gagactgcagGAACATCTGCTGTTCAAGTACAATTTCC-3'
F22A3.6a_genS_nested	5'-GAGTTTGTCTCAACTGAGTCTTCAGC-3'
F22A3.6a_genGFP_fusion	5'-agtcgacCTGCAGGCATGCAAGCTgagcatccacagc-3'

ilys-4

C55F2.2_genomSense	5'-gagactgcagGCCATTGGTTCGATGGCAATCTGC-3'
C55F2.2_genomAS_Ex2	5'-ctctaccggtAGCAGACATGGATGATCGTCTTCC-3'

ilys-3

C45G7.3_genomSense	5'-gagactgcagTCATAAGATGGCTGATCAAACCTTGTC-3'
C45G7.3_GenS_nested	5'-CGATGAGTCTCGACGAACCACAAACTGG-3'
C45G7.3_GFP_fusion	5'-agtcgacCTGCAGGCATGCAAGCTTgagcatccgcaac-3'

ilys-2

C45G7.2_genomSense	5'-gagactgcagGCCGTTTGCCGGAAATCAATTGGACGG-3'
C45G7.2_genAS_Ex2	5'-ctctaccggtCAAGAAAGCGATCCAACATCC-3'

ilys-1

C45G7.1_genomSense	5'-gagactgcagGGAAGCCTAGGTAGCATCACAGACC-3'
C45G7.1_GenS_nested	5'-CCCATACTACGAAGACTGCGGTC-3'
C45G7.1_GFP_fusion	5'-agtcgacCTGCAGGCATGCAAGCTTcaagatccaccacaac-3'

8.2 *Verwendete Plasmide*

Name	Verwendung	Herkunft
pDrive	Klonierung	Qiagen, Hilden
pET32a	Rekombinante Synthese	Novagen, Nottingham, UK
pPD95_77 (plasmid 1495)	Genexpressionslokalisation (GFP-Reportergenkonstrukte)	Addgene (Fire), Cambridge, MA, USA
pRF4	Koinjektionsmarker	von Prof. Dr. T. Röder zur Verfügung gestellt

8.3 *Verwendete Aminosäuresequenzen*

8.3.1 *Aminosäuresequenzen der i-Typ-Lysozyme aus *C. elegans**

In nachstehender Liste sind die potentiellen und bereits identifizierten *C. elegans*-Lysozyme des i-Typs aufgelistet. In der Liste, wie auch in allen folgenden, sind die fett gedruckten Abkürzungen für die Sequenzvergleiche verwendet worden. Folgend steht jeweils die Zugangsnummer bei NCBI sowie mögliche zusätzliche Bezeichnungen (ggf. Wormbase) und der Artname in kursiv. Die mutmaßlichen Signalpeptide wurden grau unterlegt, falls vorhanden. Das in dieser Arbeit charakterisierte Lysozym ist rot hervorgehoben.

>**Ce1**/CE17548/NP_5002208.1/ILYS-1/C45G7.1<
MKIHSLFKSHVEASWGISDQCMHMCMLGNFVIKLPYYIDCGEPGKQRGESTESAWKRCADDLDCAETCMMNYHR
YKSQCNGLGMSECEASFQNYHRYKSQC DGLGMGECEVFARNHNGGPTGCRNPGTLEYWQSIQKCCGGSC

>**Ce2**/CE17549/NP_500207.1/ILYS-2/C45G7.2<
MFVKAI~~LLLL~~SI~~AVAYASA~~DCLHCICMRESGCKPIGCHMDVGLSLSCGYQIKIPYEDCGQPGKKHGESTEVAWKR
CADDLKCATNCVENYYNRYKHECAGTGQGACEVMARNHNGGPRGCHASGTLGYWKGVHSCCGCS

>**Ce3**/CE24850/NP_500206.1/ILYS-3/C45G7.3<
MFVKS~~LVFL~~TI~~AVAYASA~~DCLHCICMRESGCKPIGCNMDVGLSLSCGYQIKLPYEDCGQPTKKSGETTEAAWKR
CANDLSCATTVCVENYYNRYKSQCAGTGQGACEVMARNHNGGPRGCKHSGTLGYWNGIKSCCGCS

>**Ce4**/CE31458/NP_501313.2/ILYS-4/C55F2.2<
MLIVT~~VT~~VI~~SLLVSVTH~~QLLMFDKVEDDHPCLLAMCDQDSGCVPLGCSVDQFDRIGCGYFRLNIYQFQQCYQPGK
KDEDTENEAWMNCAQDYQCSASCIRTLATKFRVKCYGKSECETIARIHDGGANGCRDRGTIGYWKVRVDRSCGPEC
NKPIFTRHF

>**Ce5**/CE0442/NP_001024595.1/ILYS-5/F22A3.6a<
MFVKS~~LLLL~~SVAIAYVSA~~DCLHCICMRESGCKPIGCHMDVGLSLSCGYQIKIGYYEDCGQPTKKAGETTEAAWKR~~
CADDLNCATTVCVENYYNRYKSQCNGLGMGACQIMSRNHNGGPRGCHNANTLAYWNGVKSCCGCS

8.3.2 *Aminosäuresequenzen der i-Typ-Lysozyme aus *C. briggsae**

>**Cb5**/XP_002644900.1/CBR-ILYS-5/*C. briggsae*<
MFVKS~~LLLL~~SVAIAYVSA~~DCLHCICMRESQCKPIGCHMDVGLSLSCGYQIKIGYYEDCGQPGKKSGESTEA~~AWKR
CADDLSCSTTCVENYYNRYKSQCNGLGMGACQIMARNHNGGPRGCHNGGTQAYWNGVHACCGCS

>**Cb4**/XP_002634350.1/CBR-ILYS-4/*C. briggsae*<
TGSQILSLIKSFSVYFCISHLFFSSRLQYWSNKRHRSSGQTKAWRRTAAHRKKKSLLRKRRSEGPEGLHTFAHS
SISHLIRYLIPATLILLISVTSQLLMFDKVEDDHPCLLSMCDQDSGCVPLGCSVDQFERIGCGYFRLNIYQFQQ
CYQPGKKDEETENEAWMNCAQDYQCSASCIRTLASKFRVKCYGKSDCETIARIHDGGANGCRDRGTIGYWKVRVDR
SCGPECNKPIFTRHFY

8.3.3 Aminosäuresequenzen von i-Typ-Lysozymen aus anderen Invertebraten

>Ba/AAN16208.1/Lysozyme/*Bathymodiolus azoricus*<
 MFVKMSPLVYLVLVLLLPFMSQVCSTLDIVENFEIEFEQIDVEVQPNDLVSPKCMSCICQVESHCLPIGCRMDVGSLS
 SCGPFQIKKGYWTDGSPGGDYETCTRDYTCSEYARINHGGRGCTNPNTMGY
 WKKMESKGCTPYS

>Bt/AAN16209.1/Lysozyme/*Bathymodiolus thermophilus*<
 MFVKMSPPVYLVLVLLLPFVSQVCSTLDIVENFKIEFEQIDVEVQPNDLVSPKCMGCICQVESHCLPIGCRMDVGSLS
 SCGPFQIKKGYWTDGSPGGDYETCTKDYTCSEYARINHGGRGCTNPNTLGY
 WNKMESKGCTPDS

>Ca1/AAN16211.1/Lysozyme/*Calyptogena sp.* SB2001_1<
 QAQLRCICLKESKCRATGCVMDVGSLSGCGYFQIKKAYWIDCGQPCKDWKTCANDITCSSTCVQNYMKRYAKRSGC
 PLICEGFAREHNGGRGCHNPNTLKYWLAVQSVPGCKGVQ

>Ca2/AAN16212.1/lysozyme/*Calyptogena sp.* SB2001_2<
 LVYKQNVSSIGKVFESWYEDISDDEGFTFAQGMVSAQLRCICMRESSCMPIGCVMDVGSLSGCGYFQIKKAYWID
 CGLDWKTCANDITCSSTCVQNYMKRYAVHYRCLICEGFAREHNGGRGCHNSNTWNYWLAVQRVPGCKGVQ

>Ci/CAB63451.1/chlamysin/*Chlamys islandica*<
 MMYFVLFCLLAAGTTYGSHNFATGIVPHSCLEICKTESGCRAIGCKFDVYSDSCGYFQLKQAYWEDCGRPGGSL
 TSCADDIHCSQVQHYMSRYIGHTSCSRTCESYARLHNGGPHGCEHGSTLGYWGHVQGHGC

>Cv1/P83673.3/LYS1_CRAVI/*Crassostrea virginica*<
 MNGLILFCVAVFATAVCTYGSADAPCLRAGGRCQHDSITCSGRYRTGLCSGGVRRRCVPSSSNSGSFSTGMVSQQ
 CLRCICNVEGCRPIGCHWDVNSDSCGYFQIKRAYWIDCGSPGGDWQTCANNLACSSRCVQAYMARYHRRSGCSN
 SCESFARIHNGGRGCRNSNTEGYWRRVQAQGCN

>Cv2/Q1XG90.1/LYS2_CRAVI/*Crassostrea virginica*<
 MNFLILFCVVASASVVYSISDQCLRCICEVESGCRAIGCHWDVYNSNCGYFQIKQGYWTDGSPGHSMESCADN
 YNCASGCVRSYMDHYIKYNGCADTCESYARMHNGGPNCGCKSSHHHATDNYWRLVQAKGCS

>Cv3/BAG41979.1/lysozyme 3/*Crassostrea virginica*<
 MNGLFLFCVATTAALAYGSDAPCTNSGGVCQDDHLACHNGHYQSGLCTGGAHRRCCLTASHTGSFSTGI
 VSQQCLQCICNVEGCKAIGCHFVNSDSCGYFQIKEGYWHDCGSPGSSWRSCANDLACASKCVQAYMSR
 YIGFSGCSHSCESYARINHGGRGCHNPNTLGYWSHVHAQGCNSK

>Cg1/BAD19059.1/Lysozyme/*Crassostrea gigas*<
 MQRLLSIVILATVFTFCEATISSACLRCICNVEGCRPIGCHYDVYSYSCGYFQIKENYWEDCGKPGTSS
 FKACANDYTCAASNCVRAIMKRYIGSSGCPANCESSYARINHGGRGCRHPSTLRYWEKVHQGCNVNS

>Cg2/BAF48044.2/lysozyme 2/*Crassostrea gigas*<
 MRNIKNIVVVFASLFFVFGEGAISSTCLQCICEVESGCRAIGCRWDVNSESCGYQIKENYWTDCHSPGSS
 LSQCADDFTCATNCVKSYMISHYIKYNGCTANCESYARMHNGGPSACKSTSSMHDRTNNYWRDVQAKGCDA
 NS

>Cg3/BAF94156.1/lysozyme 3/*Crassostrea gigas*<
 MRNIQNIAVVFAGIFVYCEGTISSRCLRCICEVESGCKAIGCNWDVNSESCGYQIKQNYWIDCKRPGSSLSWCG
 DNSTCSTNCVKNYSRYIKSNGCTANCESYARMHNGGPKACDPNHMHGRTNNYWRKVQAKGCNSSS

>Me1/AAN16207.1/Lysozyme/Mytilus edulis<

MMTELKMSVALFFALLCGLNVCCGLKEIILESYKVEFEQREVDVESDEPASDDSIDSNGLVSDKCMRCICMVESH
NNNIGCRMVDSLSCGPFQIKKAYWIDCGQPKGDYKTCANDYSAYNCIQTVMARYIGHSGCPKNCESYARIHNG
GPRGCTNPNTIGYWNKIKQQGCTIYS

>Me2/ABB76765.1/Lysozyme/Mytilus edulis<

ATGVVSDKMCQICDLESGCRPLDCRWDVNSNSCGYMQIKQVYWDGCGKPGGSLEACSKDKHCASQCVQKYMFRY
INHYGCAHNCESYARMPNGGPAGCKHINTLGYGSHIQSKGCSANS

>Mg1/AAN16210.1/Lysozyme/Mytilus galloprovincialis<

MMTELKMSVALFFALLCGLNVCCGLKEIVESYKVEFEQREVDVESEGLVSGDLNESNGLVSDKCMRCICMVESH
NNNIGCRMVDSLSCGPFQIKKAYWIDCGQPKGDYKACANDYACAYNCIETYMARYIGHSGCPKGCESYARIHNG
GPRGCTNPNTIGYWNKIKQQGCTIYS

>Mg2/BAF63423.1/lysozyme 2/Mytilus galloprovincialis<

MVGYFLILSVIVATARANISGHIATGSCVVCVTGSTVNARHTASIHGHIVGTVHSGECYKYNHMHMTADGY
TWYQLQHVHGQLAYVAGSLLQTSTASHCSVSTHSGTFATGVVSDKCMQCICDLESGCRPLDCKWDVNSNS
CGYMQIKQVYWDGCGKPGGSLEACSKDKHCASQCVQKYSRYINHYGCAHNCESYARMHNGGPAGCKHTN
TLGYWSHIQSQCASANS

>Lv/AAN86086.1/Lysozyme/Litopenaeus vannamei<

MRVLPALALLGALLAASDAKVFVGKCEFAELLKRDYLSNDDIKNWVCAIEFESSFNTAAINRNRNRSTDYG
IFQINNKYWCGSDYKGNVCKIPCSDLMSDDITEALRCAETIRRDTERFRGRGKGYSAWVAYNKCKNRDL
DQYMAECWSHGSNSVFPF

>Oe/BAD19060.1/Lysozyme/Ostrea edulis<

MSAVLVLALVLLSLTCVTDAISDACLTCICKQESYGCTQIGCRMGRSLSCGYFQIKKSYWIDCGRLGSSWEACA
DDYNCAVRCVRAYMKKYIGKSGTANCKNYARLHNGGPKGCTKPSTLTYWNAVKNQGCASINS

>Tp/Tjapo/BAC15553.1/Lysozyme/Venerupis philippinarum/Tapes japonica<

METVSVVEEGLDFAPGMVSQKCLLCMCKLES GGCKPIGCRMVDSLSCGYFQIKQPYWIDCGKPGKDWKSCSNDIN
CSSKCVQQYMKRYATHYRCPLNCEGFAREHNGGPNCHSSRTLKYWELLQKIPGCKGVKFS

>Vphil/ACU83237.1/Lysozyme/Venerupis philippinarum<

MTRAVIVCFILLTTICAAARETLRDEIVQEFRSTFVSSGQNKSVVEEFMETVSVVEEGLDFAPGMVSQK
LLCMCKLES GGCKPIGCRMVDSLSCGYFQIKQPYWIDCGKPGKDWKSCSNDINCSSKCVQQYMKRYATH
YRCPLNCEGFAREHNGGPNCHNSRTLKYWELLQKIPGCKGVKYS

>Ea/ABC68610.1/Lysozyme/Eisenia Andrei<

MFIYFALSICILATAAAQISENCLNCICQIEGCESQIGKCRMVDSLSCGPFQIKEPYWIDCGRPGGDWKSCTTQM
DCSRTCVRSYMKRYGTCTGGRAPTQDYARIHNGGPKGCQHASTVGYWNKVKQCCSSKPGGCGLDHEVLRFEV
DIEEDTVYRQ

>Hm/AAA96144.1/destabilase I/Hirudo medicinalis<

MIIAIYVSLALLIASVEVNSQFTDSCLRCICKVEGCDSQIGKCGMDVDSLSCGPYQIKKPYWIDCGKPGGGYESC
TKNKACSETCVRAYMKRYGTCTGGRPTCQDYARIHNGGPRGCKSSATVGYWNKVKQCLR

>Ag1/AAT51799.1/lysozyme i-1/Anopheles gambiae<

MVPKSLLLVCLIAIGVSSVLAADVSHIAPPQQQLEDPVTDVCLSCICEASSGCDASLRCSGDVCGMFAITWAYWAD
AGKPVQQGSDPSQONAYANCANEPYCAARTVQGYMRKFGQDCNGDGRIDCFDHAIVHKLGGYNCKNAVPIVYQSK
IDECIQRKAIEYSAARQ

>**Ag2**/ABP35929.1/lysozyme i-2/*Anopheles gambiae*<
MHPFGLSLLLLLSLATVNGAFLSNLNATCFRCICEASTGCSTSTTCRQSYCGPFSISRAYWMDAGRLVLPADDEPT
RWGAFEDCANDYDCATGIVTQYMEKYGTDCNGDGLVDCVDYTMLHVNGGPRCQGALGGTFASRFYQCLREGKRDS
SRTFG

>**Cug**/XP_001850854.1/lysozyme i-1/*Culex quinquefasciatus*<
MKLLTLLALLVAAPWSTEAIFLSNLNATCFRCICEASTGCSTSTTCRQSYCGPFSISRAYWIDSGKVVQPQDDPN
RFGAYEECANQYDCSTNIITQYMEKYGKDCNNDGRVDCVDYAMLHINGGPTCHLALNADFARKFATCLRSNQRG
RD

>**Dm1**/AAF57939.1/CG6421/*Drosophila melanogaster*<
MRVFLLYSIYLLLVLSPSLVQGGHVLDPKPVTELCITCICEAISGCNATAICTSAEKGACGIFRITWGYWVDAGK
LTVNGEHPDSEKAFINCAKDPHCAADLVQNYMKKFNQDCNDDGEMDCHDYARIHKLGGYGCQADMPYNFQSVFEE
CIERYEDEGFE

>**Dm2**/CAA21317.1/EG:EG0003.8/*Drosophila melanogaster*<
MRVFLLYSIYLLLVLSPSLVQGGHVLDPKPVTELCITCICEAISGCNATAICTSAEKGACGIFRITWGYWVDAGK
LTVNGEHPDSEKAFINCAKDPHCAADLVQNYMKKFNQDCNDDGEMDCHDYARIHKLGGYGCQADMPYNFQSVFEE
CIERYEDEGFE

>**Dm3**/AAF57940.2/CG6426/*Drosophila melanogaster*<
MAANKLCTLAIGALLCLGFAALIQAQDKPVTDVCLGCICEAISGCNTRYCGGGVCGLFRIWAYWADGGKLTLL
GNESEQSEDAYANCVNDPYCAANTIQNYMTKFGQDCNGDNAIDCYDFAAIHKLGGYGCQADMPYNFQSVFEE
SFQQIDVRSSI

>**Sz**/ABZ80670.1/i-type Lysozyme/*Sitophilus zeamais*<
MLGLLFLRHLVLLVEMKILLVFLVLIVSQGRESLCEVVEFVEPLLRLPNLHRQCMRCLCHVATECDLTRGCEKG
YCGPYKISKIYWKDASQVTLPPDDKERAGAYEDCALSYQCAQRIVLNYIAKYGRDCNNDGITDCDDYMMINFNGG
YQCHPPLNRSEAGVGWLQRYKACNPKLY

>**Aj**/ABK34500.1/Lysozyme/*Apostichopus japonicas*<
MIPQITRSVLLLLIVMAASGQVPSDCLKICFVESTCTIPSPPLCHMDVGSLSGCPYQIKLGYWDARLKGGSLDG
DWQKCSATFDCGERAVQGYMARYATYARLEHNPTCEDFARIHNGGPNPFGKNPAAEKYWLVRVKKCLDMSNN

>**Ar**/AAR29291.1/lysozyme/*Asterias rubens*<
MIGLHLLVFCSTVAFAMLGNVPSVTSSGPVPSGLRCICVVEGCRMPNPVCRMDVGSLSGCPYQIKKGYWSDAT
LKGGSLMGDWKKTATSPCSEAAVQGYMERYAVQGRGLGHPPTCEDFARIHNGGPNPFGYKNPATFGYWLKVKACLMA
NETKI

9 Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch den Betreuer Prof. Dr. M. Leippe – nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden.

Diese Arbeit wird erstmals im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den 01. Oktober 2010

Silja Lena Fuchs

10 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Matthias Leippe für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie seiner konstruktiven Kritik und wissenschaftlichen Anleitung bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hinrich Schulenburg für die Bereitschaft zur Übernahme des Koreferats.

Besonderer Dank gilt Dr. Kerstin Isermann für die Unterstützung bei den Mikroinjektionsexperimenten und den dabei währenden freundschaftlichen Umgang. Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Röder für seine Hilfe bei den mikroskopischen Aufnahmen und seiner geduldigen Beratung.

Bei Dr. Christoph Gelhaus möchte ich mich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und die darüber hinausgehenden stets kompetenten Ratschläge bedanken.

Für die Hilfestellung bei der Etablierung der MICs mit HEWL soll Heidrun Ließegang, und für die Unterstützung in allen Lebenslagen sollen sie und Heidrun Wegner besondere Erwähnung finden. Ich danke Euch.

Ebenso bedanken, möchte ich mich bei der „alten“ wie „neuen“ Doktorandengeneration für das gute und hilfsbereite Arbeitsverhältnis sowie die gewonnenen Freundschaften. Vor allem Dr. Christina Wagner, Dr. Mareike Stanisak und Aylin Kademci danke ich für die tatkräftige Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung und immerwährende Hilfe Zeit meines Lebens.

Kiitän lämpimästi kaikkia joka uskoi minuun ja siksi ovat auttaneet minua ei anna periksi. Kiitos Ystävät, jänikset ja minun perhe!

11 Wissenschaftlicher Werdegang

Name:		Silja Lena Fuchs
geboren am:		28. Oktober 1980 in Bad Oldesloe
Staatsangehörigkeit:		deutsch
Doktorarbeit:	02/2007-10/2010	Abteilung Zoophysiologie, Zoologisches Institut Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Diplomarbeit:	01/2006-01/2007	Abteilung Zoophysiologie, Zoologisches Institut Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Studium:	10/2000-01/2007	Studium der Biologie mit Abschluss Diplom an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Schule:	2000-1991	Theodor-Mommsen-Schule mit Abschluss Abitur in Bad Oldesloe
	1991-1987	Grund- und Hauptschule Masurenweg in Bad Oldesloe