

Das komplexe Netzwerk Apoptose regulierender Proteine in Hydra

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Anna Maria Margherita Lasi
aus
München

München
2009

Dissertation eingereicht am 03.08.2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger
2. Gutachter: Prof. Dr. Ute Vothknecht

Tag der mündlichen Prüfung: 18.09.2009

Ehrenwörtliche Versicherung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen. Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, den 03.08.2009

Margherita Lasi

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Apoptose	8
1.2. Apoptose in <i>C.elegans</i>	8
1.3. Apoptose in <i>D.melanogaster</i>	9
1.4. Apoptose in Mammalia	10
1.4.1. Caspasen	11
1.4.2. Der intrinsische, durch Mitochondrien vermittelte Apoptoseweg	12
1.4.3. Der extrinsische, rezeptorvermittelte Signalweg	13
1.5. Die Bcl-2 Familie	14
1.5.1. Die Bcl-2 Familie im Allgemeinen	14
1.5.2. Die antiapoptotische Subfamilie	15
1.5.3. Die proapoptotische Subfamilie der Bax-ähnlichen Proteine	16
1.5.4. Die BH3- <i>only</i> Subfamilie	17
1.5.5. BNip Proteine	18
1.6. Regulation der Mitochondrienmorphologie	18
1.6.1. Die Mitochondrienmorphologie regulierende Proteine	19
1.6.2. Einfluss der Bcl-2 Familie auf die Mitochondrienmorphologie	19
1.7. Der Modellorganismus <i>Hydra vulgaris</i>	20
1.8. Apoptose in Hydra	22
1.9. Der Insulin-Signalweg	23
1.9.1. Struktur und Prozessierung von Insulin	24
1.9.2. Der Insulin Signalweg in Vertebraten	25
1.9.3. Der Insulin Signalweg in Invertebraten	26
1.9.4. Komponenten des Insulin Signalweges in Hydra	28
1.10. Forkhead-Box Transkriptionsfaktoren	29
1.10.1. FOXO	29
1.10.2. Beteiligung von FOXO an der Regulation von Apoptose	30
1.10.3. FOXO in den Invertebraten <i>C.elegans</i> und <i>D.melanogaster</i>	31
1.11. Ziel dieser Arbeit	31
2. Ergebnisse	32
2.1. Die Hydra Bcl-2 Familie	32
2.1.1. Identifikation von neuen Mitgliedern der Hydra Bcl-2 Proteinfamilie	32

2.1.2. Analyse der Hydra Bcl-2- <i>like</i> Proteinsequenzen	33
2.1.3. Analyse der Exon-Intron Struktur der HyBcl-2- <i>like</i> Proteine	36
2.1.4. Untersuchung der Lokalisation der Hydra Bcl-2 Proteine	38
2.1.5. Die mitochondriale Lokalisation ist abhängig von der C-terminalen Transmembrandomäne	43
2.1.6. Antikörper gegen HyBcl-2- <i>like</i> 1 und HyBak- <i>like</i> 1	45
2.1.7. Untersuchung der Funktion der HyBcl-2- <i>like</i> Proteine	47
2.1.8. Untersuchung antiapoptotischer Eigenschaften	51
2.1.9. Interaktionen im <i>Yeast-Two-Hybrid</i> Versuch	54
2.1.10. Suche nach BH3- <i>only</i> Proteinen	57
2.1.11. Hydra APAF-1	59
2.1.12. Lokalisation von APAF-1 in Hydra	63
2.1.13. Cytochrom _c in Hydra	65
2.2. Untersuchung der Mitochondrienmorphologie	67
2.2.1. Klonierung von HyFis1	69
2.2.2. Lokalisation von HyFis1 in Hydraxellen	70
2.2.3. Klonierung von HyMitofusin	71
2.2.4. Lokalisation von HyMitofusin in Hydraxellen	73
2.2.5. <i>MitoTracker-Färbung</i> von Hydra Einzelzellen	74
2.2.6. Ko-Expression von HyMfn und HyBcl- <i>like</i> Proteinen	76
2.3. Untersuchungen am Insulin Signalweg	80
2.3.1. Herstellung von Antikörpern gegen Hydra Insulin 1, 2 und 3	80
2.3.2. Überexpression der HyInsulin Gene in Hydra	82
2.3.3. HyFOXO	85
2.3.4. HyIns1 hemmt HyFOXO und Wortmannin induzierte Apoptose	89
3. Diskussion	91
3.1. Die Hydra Bcl-2 Familie enthält neun Mitglieder	91
3.2. Hydra Bcl-2 Proteine sind an den Mitochondrien und am ER lokalisiert	92
3.3. Hydra Bcl-2 Proteine wirken pro- oder antiapoptotisch	94
3.4. Hydra Bcl-2 Proteine können miteinander interagieren	94
3.5. Es sind Gene für BH3-<i>only</i> Proteine im Genom von Hydra vorhanden	95
3.6. Hydra besitzt ein APAF-1 Homolog	95
3.7. Fis1 und Mitofusin regulieren die Mitochondrienmorphologie in Hydra	97
3.8. Hydra Bcl-2 Proteine zeigen Effekte auf die Wirkung von HyMitofusin	98
3.9. Hydra Proinsulin 1, 2 und 3 sind in sekretorischen Vesikeln lokalisiert	99
3.10. HyFOXO ist an der Regulation der Apoptose in Hydra beteiligt	100
3.11. Apoptose in Hydra ähnelt den Mechanismen in Vertebraten	101
4. Zusammenfassung	104
5. Material und Methoden	106
5.1. Material	106
5.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen	106
5.1.2. Allgemeine Lösungen und Puffer	108

5.1.3. Lösungen für Bakterienaufschluss	109
5.1.4. Lösungen für Hydrenantikörperfärbung, – fixierung, Dissoziation	109
5.1.5. Lösungen für Polyacrylamid-Gelelektrophorese	110
5.1.6. Lösungen für Coomassie-Färbung	111
5.1.7. Lösungen für Western Blot Analysen	111
5.1.8. Lösungen für Agarosegel-Elektrophorese	112
5.1.9. Proteaseinhibitoren	112
5.1.10. Medien für Bakterien	113
5.1.11. Medien für die Kultur von <i>S.cerevisiae</i>	113
5.1.12. Lösungen für die Transformation von <i>S.cerevisiae</i>	114
5.1.13. Medien für <i>Hydra vulgaris</i>	115
5.1.14. Lösungen für Immunfluoreszenz an Gewebekultur	115
5.1.15. Antikörper	116
5.1.15.1. Erstantikörper	116
5.1.15.2. Zweitantikörper	116
5.1.16. Enzyme und Puffer	117
5.1.17. Geräte	117
5.1.18. Kits	117
5.1.19. Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>)	118
5.1.20. Hefestämme	118
5.1.21. DNA- und Proteingrößenstandards	118
5.1.22. Vektoren	118
5.1.23. Primer	119
5.1.24. Sonstige Materialien	121
5.2. Molekularbiologische Standardmethoden	122
5.2.1. Agarosegel	122
5.2.2. DNA- Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung	122
5.2.3. Kultivierung von <i>E.coli</i>	122
5.2.4. Herstellung elektrokompetenter Bakterien	122
5.2.5. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	123
5.2.6. Transformation von Bakterien mittels Elektroporation	123
5.2.7. Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock	123
5.2.8. Präparation von Plasmid- DNA (Minipräparation)	123
5.2.9. Präparation von Plasmid- DNA (Maxi- und Midipräparation)	124
5.2.10. Standard PCR	124
5.2.11. Mutagenese PCR	124
5.2.12. Amplifikation von cDNA Enden mittels <i>RACE</i>	125
5.2.13. Klonierung mit TOPO Kit	126
5.2.14. Restriktionsenzymatische Spaltung	126
5.2.15. Gelextraktion	126
5.2.16. Dephosphorylierung und Ligation	126
5.2.17. Verwendete Plasmide	126
5.2.18. Protein SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese	128
5.2.19. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)	128
5.2.20. Coomassie Färbung	129
5.2.21. Bakterielle Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	129
5.2.22. Herstellung von bakteriellem Zell-Lysat und Reinigung His- gekoppelter Proteine	129

5.2.23. Sonifizieren von Bakterienproben	130
5.3. Standardmethoden für <i>Hydra vulgaris</i>	130
5.3.1. Kultivierung von <i>Hydra vulgaris</i>	130
5.3.2. Immunfluoreszenzfärbung ganzer Hydren (<i>whole mounts</i>)	130
5.3.3. Färbung mit <i>MitoTracker Green</i>	130
5.3.4. Transformation von Hydren mit der Goldkanone	130
5.3.5. Herstellung von Hydraextrakt durch Zerspritzen, Einfrieren, und Sonifizieren	131
5.3.6. Subzelluläre Fraktionierung von Hydren	131
5.3.7. Carbonataufschluss von Mitochondrien	132
5.4. Methoden für <i>S.cerevisiae</i>	132
5.4.1. Kultivierung von <i>S.cerevisiae</i>	132
5.4.2. Anlegen eines Glycerolstocks für <i>S.cerevisiae</i>	132
5.4.3. Transformation von <i>S.cerevisiae</i>	132
5.4.4. <i>Yeast-Two-Hybrid</i> Interaktionsversuch	133
5.4.5. Elimination von falsch positiven Klonen im <i>Yeast-Two-Hybrid</i>	133
5.4.6. Nachweis in Western Blot Analysen	133
5.5. Zellkultur	134
5.5.1. Splitten der Zellen	134
5.5.2. Transfektion von HEK 293T- Zellen mit PEI	134
5.5.3. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebekulturzellen	134
5.5.4. Induktion von Apoptose durch Camptothecin	135
5.6. Konfokale <i>Laser Scanning</i> Mikroskopie	135
5.7. <i>Software</i>	136
6. Literatur	137
7. Abkürzungen	149
8. Anhang	152
Publikationen	161
Danksagung	162
Lebenslauf	163

1. Einleitung

1.1. Apoptose

Der Begriff Apoptose wurde im Jahr 1972 von Kerr, Wyllie und Currie (Kerr et al., 1972) eingeführt, um eine Art des programmierten Zelltodes zu beschreiben, die im Gegensatz zum Zelltod durch Nekrose steht. Während der Nekrose kommt es zu einem Anschwellen und Platzen der Zellen, der Inhalt wird freigesetzt und kann schwere Entzündungsreaktionen auslösen. Dabei werden auch Nachbarzellen geschädigt. Bei der Apoptose kommt es nicht zu einem Freisetzen des Zellinhaltes. Statt dessen weisen apoptotische Zellen einige charakteristische morphologische Änderungen auf: das Chromatin kondensiert, das Zytosol schrumpft und es entstehen kleine, membranumhüllte Körperchen, die so genannten *apoptotic bodies*, die dann von anderen Zellen durch Phagozytose aufgenommen werden. Endonukleasen schneiden die DNA in Fragmente mit einem Größenunterschied von je 200bp, der darauf zurückzuführen ist, dass die Schnitte zwischen den Nukleosomen stattfinden. Auch die Zellorganellen Golgi-Apparat, endoplasmatisches Retikulum und die Mitochondrien fragmentieren während der Apoptose und werden in die apoptotischen Körperchen verpackt. Apoptose ist ein sehr wichtiger Prozess im Organismus, der für die Entfernung von infizierten, kranken oder ungewollten Zellen gebraucht wird. Wird der programmierte Zelltod gestört, so können Krebs, Autoimmunität oder degenerative Krankheiten die Folge sein (Lodish, 2001 und Taylor et al. 2008).

Um die Mechanismen der Apoptose zu untersuchen eignen sich neben der Gewebekultur von Säugetierzellen auch die Modellorganismen *D.melanogaster* oder *C.elegans* sehr gut. Im Folgenden sollen die Unterschiede und Gemeinsamkeiten im apoptotischen Prozess aufgezeigt werden.

1.2. Apoptose in *C.elegans*

Der Nematode *C.elegans* ist ein besonders intensiv untersuchter Modellorganismus für Apoptose. Besonders interessant ist hier, dass während seiner Entwicklung 131 der 1090 gebildeten somatischen Zellen sterben (Sulston und Horvitz, 1977). Zunächst wurden zwei Gene identifiziert, die für das Sterben dieser Zellen verantwortlich sind: Ced-3 und Ced-4 (Ellis and Horvitz, 1986). Inzwischen ist bekannt, dass Apoptose in *C.elegans* durch die Gene Ced-3, Ced-4, Ced-9 und Egl-1 reguliert wird. Das Protein Ced-3 ist ein Homologes der Caspase 1 aus Säugetierzellen, Ced-4 ist ein dem apoptotischen Protease aktivierenden Faktor APAF-1 homologes Protein und Ced-9 stellt ein Ortholog des antiapoptotischen Bcl-2 dar.

Mittels *gain-of-function* und *loss-of-function* Versuchen konnte festgestellt werden, wie diese Komponenten untereinander wechselwirken. In gesunden Zellen ist Ced-9 mit Ced-4 assoziiert und an den Mitochondrien lokalisiert. Wenn Egl-1 durch Transkription in den zur Apoptose bestimmten Zellen hochreguliert wird, bindet es an Ced-9. Dadurch wird das Adapterprotein Ced-4 freigesetzt, welches dann an Ced-3 bindet. Durch Aktivierung von Ced-3 kommt es zur Apoptose (Willis et al., 2003; Igaki et al., 2004; Oberst et al., 2008). Im Gegensatz zu anderen Organismen spielt die Freisetzung von Cytochrom_c in den Nematoden keine Rolle. Dies steht im Einklang mit der Struktur von Ced-4, welche keine WD-40 Domänen aufweist. In anderen Organismen bindet Cytochrom_c an genau diese Domänen. In Abbildung 1 sind die apoptotischen Prozesse in *C.elegans* dargestellt.

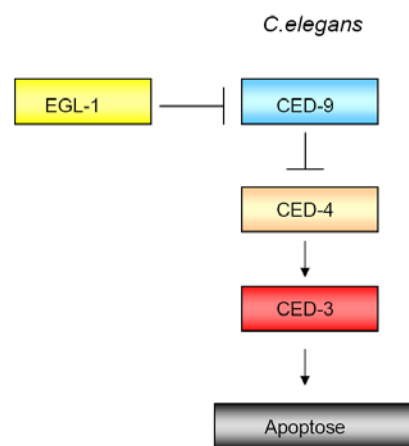


Abb. 1: Apoptose in *C.elegans*

1.3. Apoptose in *D.melanogaster*

Drosophila besitzt eine wesentlich kompliziertere Apoptosemaschinerie als *C.elegans*. Die Caspase-Familie enthält 7 Mitglieder, welche in Initiator- und Effektorcaspasen unterteilt werden kann. Weiterhin gibt es ein APAF-1 ähnliches Protein, DARK, welches WD40 Domänen enthält. Zwei Mitglieder der Bcl-2 Familie sind ebenfalls bekannt: Buffy und Debcl. Buffy ist ein antiapoptotisches Protein, obwohl es keine offensichtliche BH4 Domäne hat (Quinn et al., 2003). Das an den Mitochondrien lokalisierte Debcl hingegen ist proapoptotisch (Colussi et al., 2000; Igaki und Miura, 2004). Das apoptotische Programm in *Drosophila* wird durch DIAP1 kontrolliert, einem Homologen des *Inhibitor of Apoptosis* (IAP) Proteins aus Säugern. Binden die Proteine HID, Reaper und Grim an DIAP1, so lösen sie dessen Auto-Ubiquitinylierung aus und das Protein wird über das Proteasom abgebaut. Dadurch kann DIAP1 die Caspase DRONC nicht mehr inhibieren. In Abbildung 2 sind diese

Prozesse bildlich dargestellt. Da es ausreicht, in Zellen DIAP1 auszuschalten, um Apoptose zu induzieren, ist es noch fraglich, ob die Bindung von Cytochrom_c an DARK eine wesentliche Rolle spielt. Ebenso wird noch diskutiert, wie wichtig die Bcl-2 Homologen für diesen Prozess sind, da Fliegen mit *loss-of-function* Mutationen für Buffy oder Debel sich normal entwickeln und auch Apoptose durchführen können (Sevrioukov et al., 2007 und Oberst et al., 2008).

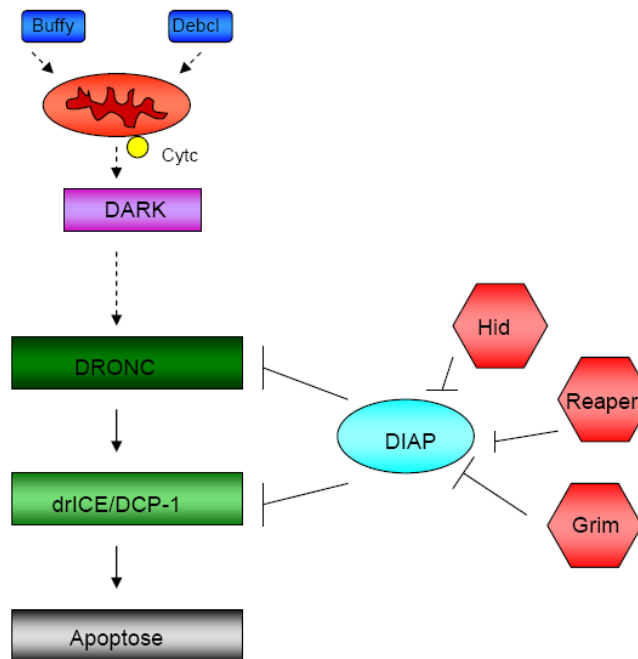


Abb. 2: Apoptose in *D.melanogaster*. Prozesse, die nach aktuellem Stand der Forschung für die Apoptose nicht zwingend nötig sind, sind mit gestrichelten Linien dargestellt.

Zusätzlich zu dem intrinsischen Apoptoseweg ist in *Drosophila* auch ein extrinsischer Weg vorhanden. Eiger ist ein Homologes des Tumornekrosisfaktors TNF, der den JNK Signalweg anschaltet. Er bindet an Wengen, das ein TNF Rezeptorhomolog ist und die Signalkaskade weiterleitet (Igaki et al., 2002; Moreno et al., 2002; Kauppila et al., 2003).

1.4. Apoptose in Mammalia

In tierischen Zellen gibt es zwei Möglichkeiten, um programmierten Zelltod einzuleiten. So kann entweder ein intrinsischer Schaden, wie Schädigung der DNA, zum Zelltod führen oder es kann ein externes Signal auf die Zelle einwirken, das eine Signalkaskade auslöst, die Apoptose nach sich zieht. In beiden Fällen sind Caspasen von wichtiger Bedeutung.

1.4.1. Caspasen

Caspasen schneiden ihr Substrat nach einem Aspartat, wovon sich der Name, **C**ystein-abhängige **a**spartatspezifische Protease, ableitet. Alle haben ein Cystein in ihrem aktiven Zentrum. Es sind bereits 15 verschiedene Säugetiercaspasen bekannt (Chowdhury et al., 2008).

Man unterteilt Caspasen in zwei Gruppen, in Initiatorcaspasen, welche sich auto-aktivieren und die proteolytische Prozessierung von anderen Caspasen initiieren können, und in Effektorcaspasen, welche durch andere Caspasen aktiviert werden. Alle Caspasen haben eine ähnliche Domänenstruktur, die aus einer N-terminalen Prodomäne besteht, auf die eine große und eine kleine Untereinheit folgen. In Effektorcaspasen kann man zwei verschiedene Prodomänen finden, die *CARD-Domain (caspase-recruitment domain)* und die *DED-Domain (death effector domain)*. Diese Domänen sorgen für Interaktion mit anderen Proteinen (Ramage et al., 1995; Earnshaw et al., 1999; Shi, 2002).

Caspasen werden als Zymogene synthetisiert, also als inaktive Vorläufer-Enzyme. Ihre Aktivierung wird durch die proteolytische Spaltung zwischen der großen und kleinen Untereinheit initiiert. So bildet sich ein Heterodimer. Durch diese Prozessierung wird das aktive Zentrum der Caspasen in die aktive Konformation gebracht. Für die Ausbildung des aktiven Zentrums sind zwei konservierte Motive wichtig, die man in der großen Untereinheit von Caspasen findet: LSHG und QACRG. Hiervon gehören das Cystein und das Histidin zum aktiven Zentrum und sorgen so für die proteolytische Aktivität der Caspasen. Auch in der kleinen Untereinheit von Caspasen kann man ein konserviertes Motiv finden: GSWFI. Dieses ist an der Substratbindung beteiligt (Nicholson und Thornberry, 1997). Zwei Caspase-Heterodimere dimerisieren zu Heterotetrameren. In der Pro-Caspase 9 sind die große und kleine Untereinheit durch einen Linker voneinander getrennt (Chowdhury et al., 2008).

Die Caspaseaktivierung in einer Zelle kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden. Eine inhibitorische Gruppe von Molekülen stellen die IAPs (*Inhibitors of Apoptosis*) dar, welche in Baculovirus entdeckt wurden. Sie können Apoptose inhibieren, indem sie entweder an aktivierte Caspase 3 und 7 binden oder die Aktivierung von Pro-Caspase 9 verhindern (Lovering et al., 1992 und Birnbaum et al., 1994). Alle IAPs enthalten 1-3 BIR (*Baculoviral IAP repeat*) Domänen. Im sogenannten *BIR-fold* sitzt ein Zink-Ion, das durch ein Histidin und drei Cysteine koordiniert wird. Außerdem enthalten IAPs eine RING-Domäne, welche E2 Ubiquitin-Ligasen binden kann. Dies führt zur Ubiquitinierung des Substrates und zum Abbau durch das Proteasom (Vaux and Silke, 2005).

Außer durch die Inhibierung durch IAPs können Caspasen auch noch auf transkriptioneller Ebene oder durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden (Tamura et al., 1996 und Earnshaw et al., 1999). Von Bedeutung ist, dass nicht alle Caspasen an der Apoptose beteiligt sind. Einige spielen stattdessen eine Rolle bei der Prozessierung von Zytokinen (Chowdhury et al., 2008).

1.4.2. Der intrinsische, durch Mitochondrien vermittelte Apoptoseweg

Dieser Apoptoseweg wird durch die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran verursacht. Wirken intrinsische apoptotische Stimuli wie DNA-Schäden, Hitzeschock oder ER-Stress auf die Zelle ein, diffundieren Proteine aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol. Diese Permeabilisierung der Mitochondrien wird durch Proteine der Bcl-2 Familie reguliert, welche in 1.5. noch detaillierter besprochen werden. Nach einem apoptotischen Stimulus findet in Proteinen der proapoptotischen Subfamilie eine Konformationsänderung statt, was zur Ausbildung von Oligomeren führt. In dieser Konformation können sie in der äußeren Mitochondrienmembran große Poren ausbilden. Beteiligt an der Ausbildung von Poren sind die proapoptotischen Moleküle Bax und Bak. Sie werden durch proapoptotische Moleküle der BH3-*only* Subfamilie aktiviert. Eben diese verursachen gleichzeitig eine Inaktivierung von antiapoptotischen Proteinen (zusammengefasst in Oberst et al., 2008 und Chipuk und Green, 2008).

Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren wie Cytochrom_c aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Dieses bindet an die WD40-Domänen des zytosolischen Proteins APAF-1. Zusätzlich bindet dATP. Dies verursacht eine Konformationsänderung von APAF-1 und führt zur Ausbildung einer heptameren Struktur, dem Apoptosom. Nun wird die CARD Domäne von APAF-1 exponiert, welche Pro-Caspase 9 rekrutiert, die ebenfalls eine CARD Domäne hat (Acehan et al., 2002). Durch die räumliche Nähe kommt es zur autokatalytischen Spaltung der Caspase und es entsteht eine reife Initiatorcaspase, die die Effektorcaspasen aktivieren kann (Boatright et al., 2003). Im Gegensatz zu *C.elegans*, bei dem Ced-9 und Ced-4 miteinander interagieren, ist dies bei den Säugetierhomologen Bcl-2 und APAF-1 nicht der Fall (Conus et al., 2000).

Es treten außer Cytochrom_c noch weitere Faktoren aus den Mitochondrien aus. Smac/DIABLO und Omi/HtrA2 binden an die Inhibitoren der Apoptose (IAPs) und inhibieren sie dadurch. Im aktiven Zustand binden und inhibieren diese Proteine Caspasen (Vaux und Silke, 2005). Der Apoptose induzierende Faktor AIF (Susin et al., 1999) und

Endonuklease G (van Loo et al., 2001) tragen zur Fragmentierung der DNA bei, was deren Kondensation zur Folge hat.

Obwohl das Modell der Porenbildung durch Bcl-2 Proteine am meisten zur Erklärung herangezogen wird, ist der Mechanismus der Permeabilisierung der Mitochondrienmembran noch nicht vollständig aufgeklärt und es werden noch weitere Modelle, wie etwa die Interaktion mit bereits bestehenden Kanälen, diskutiert (Chipuk und Green, 2008 und Antignani und Youle, 2006).

1.4.3. Der extrinsische, rezeptorvermittelte Signalweg

Bei dem extrinsischen apoptoseinduzierenden Signalweg wirken Signale (Liganden) von außen auf die Zelle ein und binden an die so genannten Todesrezeptoren (Mitglieder der Tumor-Nekrosis-Faktor Familie, wie Fas und TNFR1). Liganden können zum Beispiel die Zytokine TNF α oder Fas sein. Nach der Ligandenbindung kommt es zu einer Konformationsänderung in der intrazellulären Domäne des Rezeptors und die *Death Domain* wird exponiert. Diese erlaubt nun die Rekrutierung von verschiedenen apoptotischen Molekülen an den Rezeptor. Man nennt diesen Proteinkomplex den *Death Inducing Signalling Complex (DISC)*. Zu diesem DISC wird Pro-Caspase 8 rekrutiert. Aufgrund der erhöhten lokalen Konzentration an Pro-Caspase 8 (*induced proximity model*; Muzio et al., 1998) kommt es zu einer Autoprozessierung und somit Aktivierung der Caspase 8. Ein beispielhafter Ligand für den extrinsischen Apoptoseweg ist das Zytokin TNF α , welches von T-Zellen und aktivierten Makrophagen als Antwort auf eine Infektion gebildet wird. Wenn dieser Ligand an den TNF Rezeptor einer Zelle bindet, kommt es zur Trimerisierung von Rezeptoren, wodurch deren *Death Domains* in räumliche Nähe kommen. Durch Interaktion mit eben diesen Domänen kommt das Adaptermolekül TRADD (*TNF associated death domain*) hinzu. TRADD assoziiert mit FADD (*Fas-associated death domain*), das an Pro-Caspase 8 bindet (Ashkenazi und Dixit, 1998; Thorburn, 2004).

Der extrinsische und intrinsische Signalweg sind miteinander verbunden. Aktivierte Caspase 8 schneidet das proapoptotische BH3-*only* Protein Bid. Das geschnittene Bid, tBid, wandert an die Mitochondrien um den intrinsischen Signalweg zu aktivieren (Luo et al., 1998).

Abschließend sind in Abbildung 3 die apoptotischen Prozesse in Säugetierzellen schematisch dargestellt.

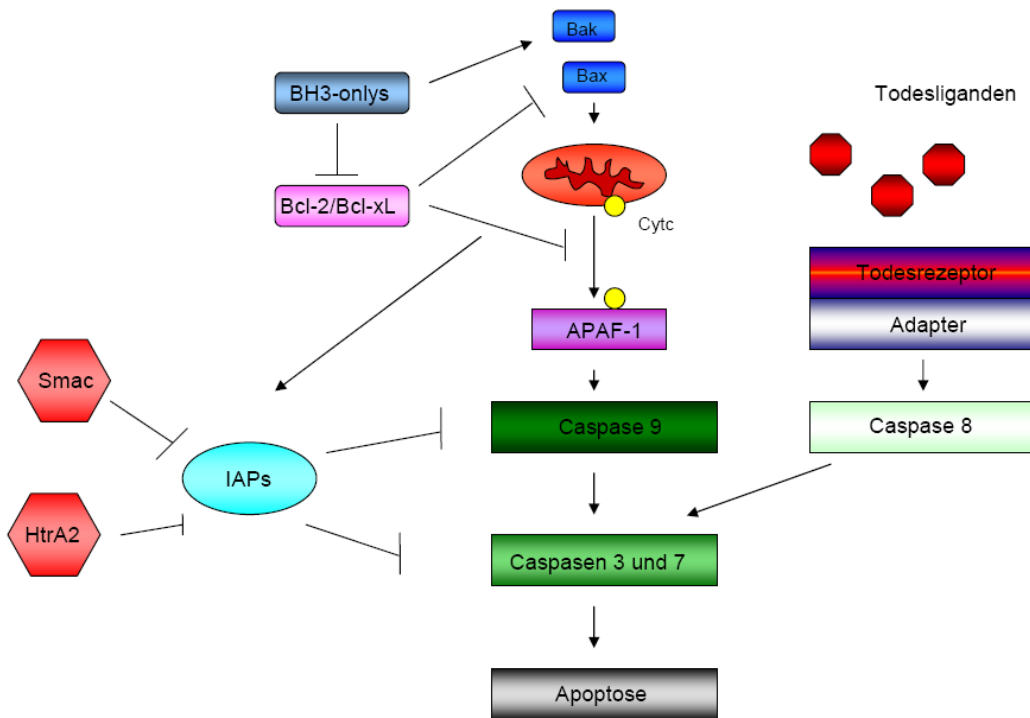


Abb. 3: Apoptose in Mammalia

1.5. Die Bcl-2 Familie

1.5.1. Die Bcl-2 Familie im Allgemeinen

Das zuerst entdeckte Protein, das Namensgeber der Familie wurde, ist Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*). In Lymphomen gerät es durch eine Chromosomentranslokation unter die Kontrolle eines Immunglobulinenpromotors und wird extrem stark exprimiert (Bakhshi et al., 1985). Diese Zellen können nicht mehr in die Apoptose eintreten. Inzwischen sind über 20 Proteine der Bcl-2 Familie bekannt. Ihnen kommt eine besonders wichtige Rolle zu, denn sie kontrollieren die Apoptose durch die Regulation der Freisetzung von Cytochrom_c aus den Mitochondrien. Bcl-2 ähnliche Proteine kann man je nach Anzahl der Bcl-2 Homologie-Domänen (BH1, BH2, BH3 und BH4) in drei Subfamilien unterteilen. Proteine der antiapoptotischen Subfamilie enthalten alle 4 BH Domänen. Die proapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, nämlich in die der Bax-ähnlichen Proteine, welche nur die Bcl-2 Homologie Domänen 1, 2 und 3 haben und in die der BH3-only Proteine, welche nur eine BH3 Domäne aufweisen. Fast alle Proteine dieser Familie enthalten zudem eine Transmembrandomäne, die sie an Membranen lokalisiert. Für die Funktion von Bcl-2 Proteinen ist die Ausbildung von Homo- und Heterodimeren essentiell. Einige konservierte Aminosäuren in den BH1 und BH2 Domänen von antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-x_L sind für die Interaktion mit proapoptotischen Proteinen notwendig. Für proapoptotische Moleküle ist besonders die BH3 Domäne von Bedeutung und

erlaubt die Ausbildung von Heterodimeren (Sato et al., 1994 und Kelekar und Thompson, 1998).

Die Vertreter der einzelnen Subfamilien sind in Abbildung 4 dargestellt und sollen im Anschluss noch genauer diskutiert werden.

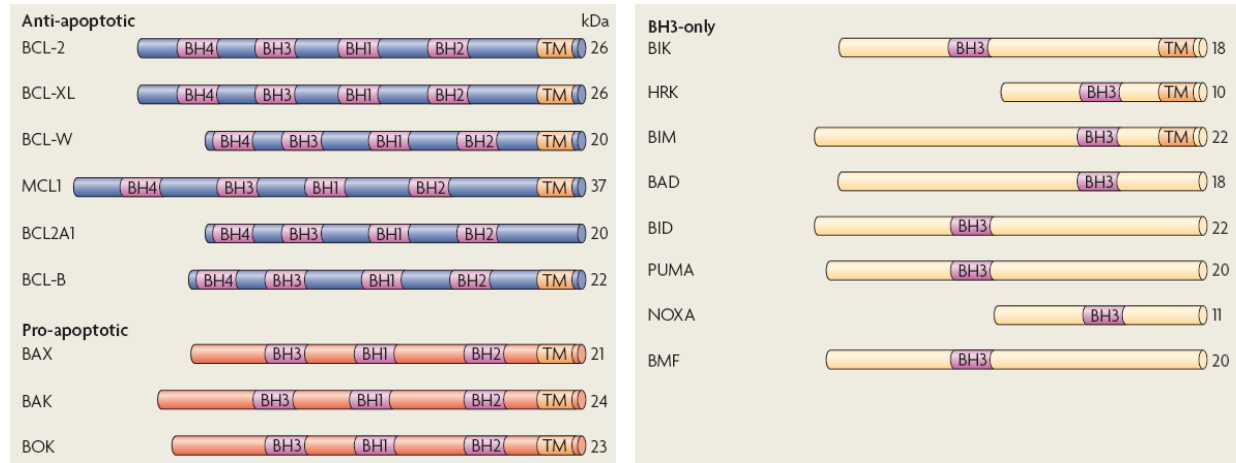


Abb. 4: Die Bcl-2 Proteinfamilie. Die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Subfamilie, die proapoptotischen Mitglieder der Bax-ähnlichen Subfamilie und die proapoptotischen Proteine der BH3-only Subfamilie sind gezeigt. Antiapoptotische Proteine besitzen zusätzlich zu BH1, 2 und 3 auch die BH4 Domäne, BH3-only Proteine nur die BH3 Domäne. Gekennzeichnet sind auch die Transmembrandomänen (TM) (Abbildung aus Taylor et al., 2008).

1.5.2. Die antiapoptotische Subfamilie

Zu dieser Subfamilie gehören zum Beispiel die Proteine Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w. Sie besitzen in ihrer Sequenz einen hydrophoben C-Terminus. Dieser erlaubt die Bindung an drei verschiedene intrazelluläre Membranen: an die äußere Membran der Mitochondrien, an die Kernhülle und an das endoplasmatische Retikulum. Nicht alle Proteine sind jedoch in allen Zellkompartimenten zu finden. Während man Bcl-x_L nur an den Mitochondrien findet, ist Bcl-2 auch am ER und an der Kernhülle lokalisiert (Akao et al., 1994). Die Lokalisation bedingt sich durch die die Transmembrandomäne flankierenden Aminosäuren. Die Transmembrandomäne von Bcl-x_L ist von deutlich mehr basischen Aminosäuren flankiert als die von Bcl-2. Dies ist ein Signal für eine ausschließliche Mitochondrienlokalisation (Kaufmann et al., 2003). Bcl-2 ist im gesunden Zustand einer Zelle mit der Transmembrandomäne in die Mitochondrien inseriert. Nach einem apoptotischen Stimulus, findet in dem Protein eine Konformationsänderung statt und es inserieren zusätzlich Helices 5 und 6 (siehe Abbildung 5). Der Vorteil dieser Konformationsänderung wurde noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch verstärkt dieser Mechanismus möglicherweise die Bindung an proapoptotische Proteine wie Bak (Kim et al., 2004).

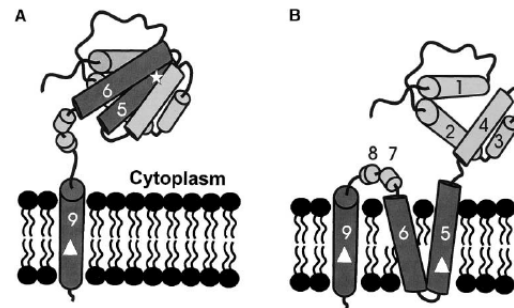


Abb. 5: Membrantopologie von humanem Bcl-2. Dargestellt ist die Topologie für membrangebundenes Bcl-2 in gesunden (A) und apoptotischen (B) Zellen (Abbildung aus Kim et al., 2004).

Die dreidimensionale Struktur der antiapoptotischen Proteine ist bereits bekannt. Sie besteht aus fünf amphipatischen α -Helices, welche zwei zentrale hydrophobe α -Helices umgeben. Bcl-2 Proteine können durch eine hydrophobe Tasche, die durch die Domänen BH1, BH2 und BH3 gebildet wird, an BH3-only Proteine binden (Cory und Adams, 2002 und Willis et al., 1998). Dies ist dargestellt in Abbildung 6.

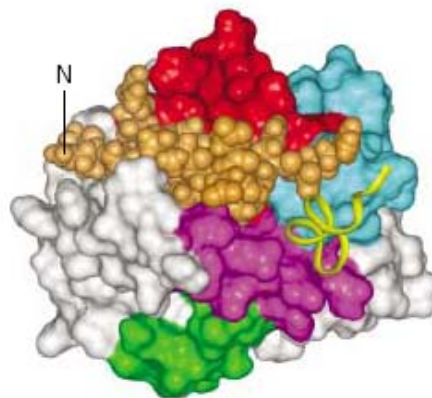


Abb. 6: Struktur von humanem Bcl-x_L an welches das BH3-Peptid von Bak gebunden ist. Dieses ist in braun dargestellt. Die BH1 Domäne von Bcl-x_L ist in rot dargestellt, die BH2 Domäne in blau, die BH3 Domäne in lila und die BH4 Domäne ist grün hervorgehoben (Abbildung aus Cory und Adams, 2002).

1.5.3. Die proapoptotische Subfamilie der Bax-ähnlichen Proteine

Zu dieser Gruppe gehören unter anderem die Proteine Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) und Bax (*Bcl-2 associated x protein*). In nicht apoptotischen Zellen ist Bax im Zytosol lokalisiert und liegt als Monomer vor. Hierbei verschließt die C-terminale Helix die durch BH1, 2 und 3 gebildete hydrophobe Tasche (dargestellt in Abbildung 7).

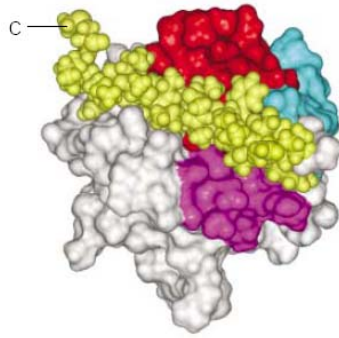


Abb. 7: Die dreidimensionale Struktur von Bax. Der C-terminale Bereich (in gelb) ist in die hydrophobe Tasche (gebildet durch BH1 (rot), BH2 (blau) und BH3 (lila)) eingeklappt, daher liegt ein inaktives Molekül vor (Abbildung aus Cory und Adams, 2002).

Kommt es zur Apoptose, so findet durch die Bindung eines BH3-*only* Moleküls wie tBid eine Konformationsänderung statt, der C-Terminus klappt aus und kann in die äußere Mitochondrienmembran inserieren. Ähnlich wie bei Bcl-2 wird auch hier nicht nur die C-terminale hydrophobe Domäne inseriert, sondern zusätzlich noch Helices 5 und 6 (Lalier et al., 2007). Wird die C-terminale hydrophobe Domäne von Bax entfernt, so wird die Umverteilung während der Apoptose verhindert und die apoptoseinduzierende Wirkung von Bax gehemmt (Wolter et al., 1997 und Nechushtan et al., 1999). In dem Protein Bak findet solch eine Konformationsänderung nicht statt, es ist stets ein integrales Membranprotein. Dimere werden jedoch auch hier erst nach Einleiten des apoptotischen Prozesses gebildet. Durch Ausbildung eines Heterodimers mit Bax wird eine Pore gebildet, durch welche unter anderem Cytochrom_c austreten kann. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass Bcl-2 Proteine Kanäle in Lipiddoppelschichten ausbilden können. Außerdem ähnelt die Struktur von Bcl-x_L der von bakteriellen Toxinen, die in die Membran inserieren können (Willis et al., 1998). Ein anderes Modell geht davon aus, dass Bax und Bak mit einer bereits existierenden *permeability transition pore* interagieren könnten (Cory und Adams, 2002).

1.5.4. Die BH3-*only* Subfamilie

Die Mitglieder dieser Gruppe besitzen nur eine BH3 Domäne. Diese Domäne ist sehr gut konserviert, jedoch sind außerhalb dieser Sequenz keine konservierten Bereiche zu finden. Im Moment kennt man im Säugetier acht BH3-*only* Proteine: Bid, Bad, Bim, Bmf, Bik, Puma, Noxa und Hrk (Taylor et al., 2008). In *C.elegans* gehört Egl-1 zu diesen Proteinen (Conradt und Horvitz, 1998). In *Drosophila* konnten solche Proteine noch nicht gefunden werden. BH3-*only* Proteine werden auf sehr vielfältige Weise reguliert. Puma und Noxa werden auf transkriptioneller Ebene als Folge von DNA Schäden durch p53 reguliert. Bid wird durch Caspase 8 vermittelte Proteolyse aktiviert. Bad ist im inaktiven Zustand phosphoryliert und

an das Protein 14-3-3 gebunden. Auch das Zytoskelett spielt eine entscheidende Rolle. Über die leichten Ketten von Dynein ist Bim an Mikrotubuli gebunden und Bmf an Aktinfilamente. Wird das Zytoskelett degradiert, was während der Apoptose der Fall ist, so werden diese Proteine in das Zytosol freigesetzt (Cory und Adams, 2002 und Taylor et al., 2008).

Die BH3-*only* Proteine Bim, Bad und Bmf liegen in Abwesenheit von Interaktionspartnern als unstrukturierte Moleküle vor. Wenn Bindung an ein antiapoptotisches Molekül eintritt, ordnet sich die BH3 Domäne zu einer α -Helix an. Ein Vorteil davon liegt in der besseren Zugänglichkeit von unstrukturierten Proteinen für den Abbau durch das Proteasom, über den viele BH3-*only* Proteine reguliert werden (Hinds et al., 2007 und Prakash et al., 2004).

1.5.5. BNip Proteine

BNip Proteine sind eine erst seit relativ kurzer Zeit bekannte proapoptotische Subfamilie der Bcl-2 Proteine. Es wurden bereits vier Homologe im Menschen, zwei in der Maus und eines in *C.elegans* identifiziert. Gefunden wurden sie in einem *Yeast-Two-Hybrid* System der Proteine identifizieren sollte, die mit Bcl-2 interagieren (BNip = *Bcl-2 Nineteen kilodalton interacting protein*). Die Proteine zeichnen sich durch eine konservierte BH3 Domäne und eine Transmembrandomäne am C-Terminus aus. Der proapoptotische Mechanismus wird durch Interaktionen mit proapoptotischen Bcl-2 Proteinen und Integration in die äußere Mitochondrienmembran initiiert (Zhang et al., 2003).

1.6. Regulation der Mitochondrienmorphologie

Mitochondrien sind die Orte der Energiegewinnung einer Zelle. Sie bestehen aus vier Subkompartimenten, nämlich der äußeren und inneren Membran, dem Intermembranraum und der Matrix. Nach der Endosymbiontentheorie kann man den evolutionären Ursprung von Mitochondrien auf ein aerobes α -Proteobakterium zurückführen. Mitochondrien besitzen zwar ein ringförmiges Chromosom, jedoch wurden im Laufe der Evolution die meisten Gene in den Zellkern transferiert, so dass nur noch 1% mitochondrialer Gene auf dem mitochondrialen Chromosom kodiert sind (Gray et al., 1999). Wie seit einiger Zeit bekannt ist, sind Mitochondrien keine starren, sich nicht verändernden Organellen, sondern können sich bewegen, fusionieren und sich auch teilen. Da Mitochondrien nicht *de novo* gebildet werden können, stellt die Zelle bei einer Zellteilung so sicher, dass beide Tochterzellen genügend Mitochondrien erhalten (Reichert und Neupert, 2002 und Yoon et al., 2001). In den frühen 1990er Jahren konnten in genetischen Untersuchungen an *S.cerevisiae* die ersten

Proteine gefunden werden, die für die Regulation der Mitochondrienmorphologie verantwortlich sind (McConnell et al., 1990). Ist das Gleichgewicht von Fusion und Teilung gestört, kann es zu schweren Krankheiten kommen. Beispiele hierfür sind die autosomal dominant optische Atrophie, welche durch Mutationen des Gens OPA1 entstehen kann (Alexander et al., 2000) oder Charcot–Marie–Tooth Type 2A, eine Erkrankung bei welcher die sensorischen und motorischen Nervenfasern degenerieren (Amiott et al., 2008). Dies geht auf den Verlust der Funktion von Mitofusin 2 zurück. Inzwischen ist bekannt, dass Proteine für die Fusions- und Teilungsmaschinerie auch in Fliegen, Nematoden, Säugetieren und Pflanzen konserviert sind.

1.6.1. Die Mitochondrienmorphologie regulierende Proteine

Die Proteine, die die Mitochondrienmorphologie regulieren, kann man grob in zwei verschiedene Klassen einteilen: diejenigen, die für Fusionsprozesse zuständig sind und die, die Teilung vermitteln. Auf beiden Seiten spielen sehr große GTP-bindende Proteine eine wichtige Rolle. Drp1 ist eigentlich ein zytosolisches Protein (Smirnova et al., 1998) sammelt sich aber an der äußeren Mitochondrienmembran an, um zusammen mit Fis1 die mitochondriale Teilung zu initiieren, während Mitofusin 1 und 2 sich zwar ebenfalls dort befinden, jedoch für Fusion zuständig sind. Mitofusin ist durch zwei Transmembrandomänen in der äußeren Mitochondrienmembran verankert, so dass sowohl die GTPase Domäne, als auch ein C-terminales *coiled coil* in das Zytoplasma weisen (Eura et al., 2003 und Okamoto, 2005). Um die Mitochondrien in räumliche Nähe zu bringen, interagieren Mitofusin-Oligomere an den Mitochondrien, die fusioniert werden sollen, miteinander. Die Fusion findet unter GTP-Verbrauch statt. Der Prozess, der anschließend die inneren Membranen miteinander verbindet, wird durch das Protein OPA1 vermittelt und benötigt ebenfalls GTP (Hoppins, 2007).

1.6.2. Einfluss der Bcl-2 Familie auf die Mitochondrienmorphologie

Einige Studien haben interessante morphologische Änderungen der Mitochondrien während der Apoptose aufgedeckt. Nach Einwirken eines apoptoseinduzierenden Stimulus kollabiert das filamentöse Mitochondriennetzwerk und bildet punktförmige Fragmente aus (Youle und Karbowski, 2005). Da viele Bcl-2 Proteine stets an den Mitochondrien residieren, stellte sich die Frage, ob sie an diesem Prozess beteiligt sind. Für einige Proteine konnten bereits

Antworten gefunden werden. Während der Apoptose wandern Bax und Bak an den Mitochondrien entlang zu den Stellen, an denen Teilung stattfindet und ko-lokalisieren mit Mfn2 und Drp1 (Karbowski et al., 2002). Humanes Bak ist in der Lage mit Mitofusin 1 und 2 zu interagieren. In embryonalen Maus-Fibroblastenzellen wurden *knock-out* Versuche durchgeführt, welche zeigten, dass in Bak defizienten Zellen die Fragmentierung stark eingeschränkt war. Im Gegensatz dazu hatte der *knock-out* von Bax keinen Effekt darauf (Brooks et al., 2007). Doppel-*knock-outs* von Bax und Bak in embryonalen Maus-Fibroblasten führten zu fragmentierten Mitochondrien (Karbowski et al., 2006). Neueste Arbeiten zeigen, dass das antiapoptotische Protein Bcl-x_L sowohl einen Einfluss auf den Fusions- als auch auf den Teilungsprozess hat und sogar in die Kontrolle der Biomasse von Mitochondrien in neuronalen Zellen involviert ist (Berman et al., 2009).

Auch in *C.elegans* wurde dieser Mechanismus bereits untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Fragmentierung während der in der Entwicklung stattfindenden Apoptose durch Mutationen des Bcl-2 orthologen Ced-9 beeinflusst wurde. Außerdem kann Ced-9 in Säugetierzellen der mitochondrialen Fragmentierung entgegenwirken (Jagasia et al., 2005 und Delivani et al., 2006).

1.7. Der Modellorganismus *Hydra vulgaris*

Den Stamm der Cnidaria (Nesseltiere) kann man in drei Klassen unterteilen: Hydrozoa, zu denen *Hydra vulgaris* gehört, Scyphozoa, die Schirmquallen und Anthozoa, die Korallentiere. Cnidaria sind sehr früh in der Evolution entstandene Eumetazoen deren Körperwand aus einer ektodermalen Epidermis und einer endodermalen Gastrodermis besteht. Diese beiden Epithelien sind über eine azelluläre Stützmatrix, Mesogloea genannt, miteinander verbunden. Ein Mesoderm ist nicht vorhanden. Die Mundöffnung der Cnidaria führt in den Gastralraum und dient gleichzeitig auch als After. Der Aufbau von *Hydra vulgaris* ist dargestellt in Abbildung 8.

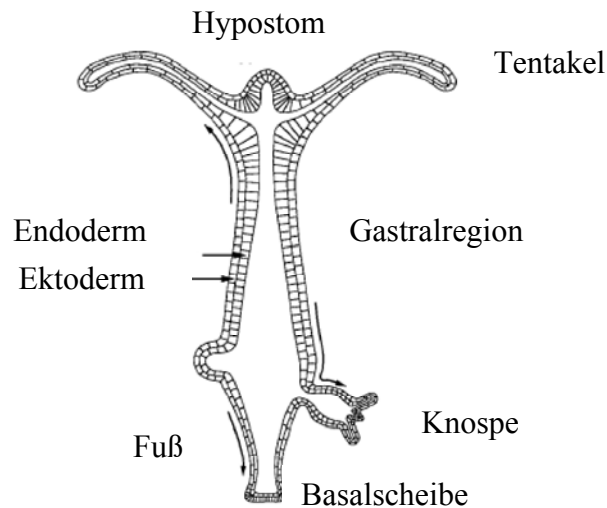


Abb. 8: Schematischer Aufbau von *Hydra vulgaris* (modifiziert aus: Grens et al., 1996)

Cnidaria kommen in Süß- und Salzwasser vor und können als Medusen und in der Polypenform existieren. *Hydra vulgaris* lebt nur in der Polypenform und besiedelt das Süßwasser. Hydren haften sich mit ihrer Fußscheibe am Substrat fest und benutzen ihre Tentakel zum Beutefang. Die Tentakel enthalten Nematocyten (Nesselzellen), welche vier verschiedene Typen von Nematocysten (Nesselkapseln) ausbilden. Kommt ein Beutetier mit den Tentakeln in Kontakt, wird der Nesselschlauch ausgeschleudert und Gift in die Beute injiziert (Campbell, 2000).

Cnidaria besitzen außer ekto- und endodermalen Epithelzellen auch einen undifferenzierten Zelltyp, die interstitiellen Zellen. Diese können zu Nervenzellen, Nematocyten, Drüsenzellen und Gameten differenzieren (Wehner, Gering, 1995). Hydren vermehren sich normalerweise asexuell durch Bildung einer Knospe, Hydren vom Stamm AEP können sich durch die Ausbildung von männlichen oder weiblichen Gameten auch sexuell vermehren.

Hydra vulgaris eignet sich aufgrund der einfachen Zuchtbedingungen sehr gut als Modellorganismus. Hinzu kommt, dass die meisten Signalwege höherer Eukaryoten bereits in Hydra vorhanden sind. *Hydra vulgaris* wurde in den letzten Jahren außerdem immer besser für genetische Studien zugänglich. Biolistische Transformation macht es möglich, GFP- oder RFP-Fusionsproteine transient in Hydra zu exprimieren und so Proteinlokalisationen zu untersuchen (Böttger et al., 2002). Außerdem ist es nun möglich, transgene Hydren zu generieren, indem ein Plasmid direkt in Embryonen, die sich im zwei- bis acht-Zell-Stadium befinden, injiziert wird. In einigen Fällen integriert das Konstrukt im Genom und man erhält stabile Linien von Fusionsprotein exprimierenden Hydren (Wittlieb et al., 2006).

Gab es bis vor kurzem nur eine *EST*-Datenbank von Hydra, so ist es nun durch die Sequenzierung des Genoms von *Hydra magnipapillata* wesentlich einfacher geworden, ein Gen von Interesse zu finden. Es gibt in dieser Datenbank Genmodelle (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>), in denen man ganz gezielt nach konservierten Motiven oder Genen suchen kann (Chapman et al., eingereichtes Manuskript). Dadurch wird es möglich, Gene zu finden, die in der *EST*-Datenbank nicht erfasst werden konnten. Außerdem kann man Promotoranalysen durchführen und sich mit den Exon-Intron Grenzen eines Genes beschäftigen.

1.8. Apoptose in Hydra

Apoptose in Hydra wurde durch ein BrdU Experiment entdeckt. BrdU (Bromdesoxyuridin) ist ein Analogon von Thymidin, welches in der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Somit eignet es sich sehr gut als Marker für proliferierende Zellen. Durch Markierung von Hydrazellen mit BrdU konnte herausgefunden werden, dass diese sowohl in gefütterten als auch in ungefütterten Hydren proliferieren. Da man jedoch in den hungernden Hydren keine Zunahme der Zellzahl beobachten konnte, kam man zu dem Ergebnis, dass die Zellzahl in Hydra nicht über Proliferation, sondern über Apoptose reguliert wird (Bosch und David, 1984).

Durch den PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin kann in Hydra massiv Apoptose induziert werden. Da die PI3-Kinase eine wichtige Komponente einer durch Wachstumsfaktoren ausgelösten Signalkaskade ist, nimmt man an, dass in Hydra ein über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gesteuerter Signalweg Apoptose regulieren kann (David et al., 2005).

Apoptose in Hydra ist ein sehr konservierter Prozess und es wurden bereits einige für die Apoptose wichtige Proteinfamilien identifiziert. Die Hydracaspasen kann man aufgrund der Homologie zu anderen Vertebraten- und Invertebratencaspasen in verschiedene Untergruppen einteilen. Es gibt eine Ced-3-ähnliche (Hy-Ced-3-like), eine Caspase 3-ähnliche (HyCasp-3-like), eine Caspase 8-ähnliche (HyCasp-8-like), sechs Caspase 9-ähnliche (HyCasp-9-like) und eine Meta-Caspase-ähnliche (HyMetacasp-like) Caspasen (Cikala et al., 1999; Dissertation Schmidt, 2003; Diplomarbeit Knapp, 2004; Diplomarbeit Lasi, 2005 und A. Böttger, persönliche Mitteilung). Einige der Caspasen haben Prodomänen, die DD und DED Domänen enthalten (siehe Abbildung 9). Bei einer Caspase wurde eine hydraspezifische Prodomäne gefunden, die die Autoprozessierung der Caspase erlaubt (Dissertation Schmidt, 2003). Besonders auffällig ist, dass es in Hydra keine Caspase mit einer CARD Domäne gibt.

Die Frage, welche Hydracaspase an der Ausbildung des Apoptosoms beteiligt sein könnte, ist daher besonders interessant.

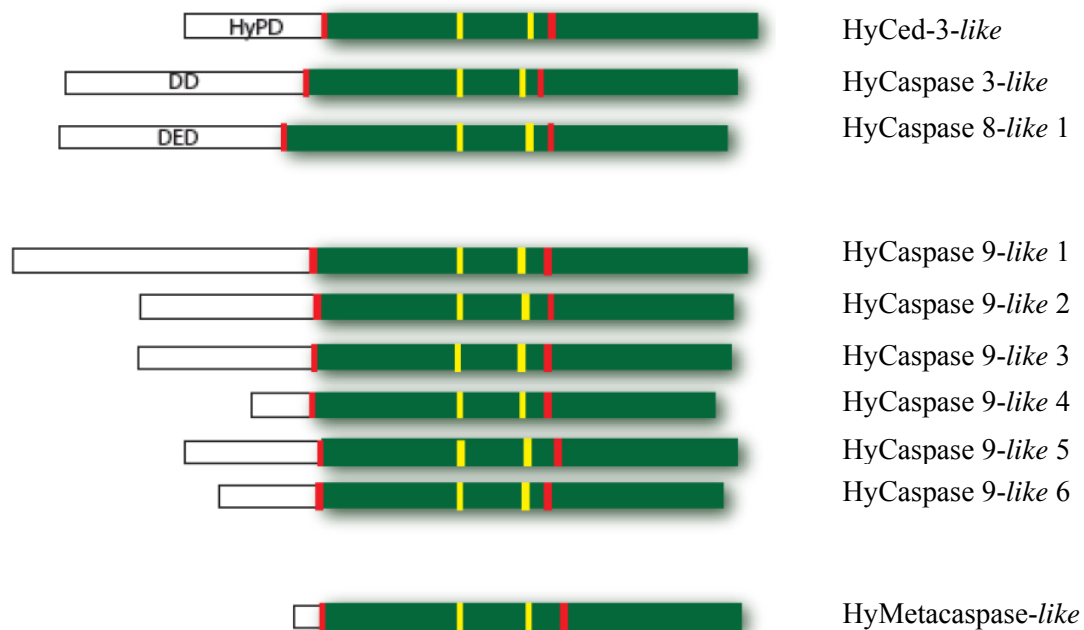


Abb. 9: Caspasen in Hydra. Darstellung aller bekannten Caspasen aus *Hydra vulgaris* mit Prodomäne (weiß), großer und kleiner Untereinheit (grün). Die Prozessierungsstellen (Aspartat) sind rot markiert. Das Histidin (N-terminal) und das Cystein (C-terminal) des aktiven Zentrums sind gelb markiert (unveröffentlichte Daten, A.Böttger).

Zwei Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie in *Hydra* wurden 2004 entdeckt (Diplomarbeit Popp, 2004). Diese beiden Proteine wurden 2005 genauer analysiert und ein drittes Protein identifiziert. Alle drei Proteine können mit ihrer C-terminalen Transmembrandomäne in die äußere Mitochondrienmembran inserieren (Diplomarbeit Lasi, 2005).

1.9. Der Insulin-Signalweg

Insulin ist ein den Blutzucker regulierendes, metabolisches Peptidhormon. Es wird in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas gebildet und als Antwort auf erhöhten Blutzuckerspiegel ausgeschüttet. Dadurch führt es zur Aufnahme von Glukose in der Leber und in den Muskeln sowie zur Aufnahme von Glukose und Fettsäuren in das Fettgewebe. Außerdem werden in Leber und Muskel verstärkt Aminosäuren aufgenommen, was die Proteinsynthese anregt. Der Blutzuckerspiegel wird auf einem konstanten Level gehalten, was für die korrekte Aktivität des zentralen Nervensystems sehr wichtig ist (Cheatham und

Kahn, 1995). Bei der Krankheit Diabetes mellitus ist dieser Mechanismus gestört. Je nach Typ Diabetes wird entweder zu wenig Insulin gebildet, oder es findet ein altersbedingter Sensitivitätsverlust für das Hormon statt.

1.9.1. Struktur und Prozessierung von Insulin

Insulin wird zunächst zu einem Präproinsulin translatiert (Patzelt et al., 1987). Dieses besteht aus einer Signalsequenz, einer β -Kette, einem C-Peptid und einer α -Kette. Durch das Signalpeptid gelangt das Präproinsulin in das endoplasmatische Retikulum wo das Signalpeptid abgespalten wird und Proinsulin entsteht. Dieses enthält bereits Disulfidbrücken und gelangt zum Golgi-Apparat, wo damit begonnen wird, das C-Peptid zu entfernen. Diese Spaltung geschieht durch so genannte prohormonkonvertierende Enzyme, PC1/PC3 und PC2, die an zwei basischen Aminosäureresten N- und C-terminal von dem C-Peptid schneiden (Docherty et al., 1982 und Schwartz, 1990). Im fertigen Insulin bestehen zwei Disulfidbrücken zwischen α -Kette und β -Kette, zusätzlich liegt noch eine Disulfidbrücke innerhalb der α -Kette vor. Die Speicherung des Insulins erfolgt als hexamer, durch zwei Zink-Ionen koordiniertes, Insulin in Speichergranula des Golgi (Pittman, Philipson und Steiner, 2004 und Orci et al., 1984). Bei Bedarf wird Insulin durch Fusion der Membran mit den Speichergranula freigesetzt und gespalten, da es nur als Monomer aktiv ist.

Abbildung 10 zeigt die Reifung von Insulin.

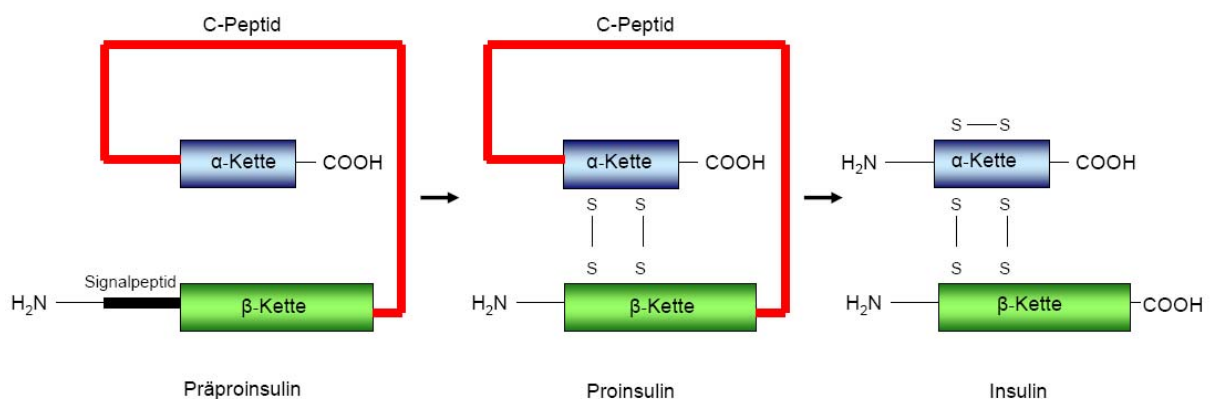


Abb. 10: Reifung von Präproinsulin zu Insulin

1.9.2. Der Insulin Signalweg in Vertebraten

Der Insulinrezeptor besteht aus zwei extrazellulären α - und zwei membranständigen β -Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. In Vertebraten kann das durch den Insulinrezeptor erhaltene Signal durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweg (PI3-K) oder durch den MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase Signalweg weitergeleitet werden. Beide Wege sind in Abbildung 11 dargestellt. Bindet Insulin an den Rezeptor, so kommt es zunächst zur Autophosphorylierung der β -Untereinheiten an Tyrosinresten (Van Obberghen et al., 2001). Im MAP-Kinase Signalweg werden die phosphorylierten Reste durch die Phosphotyrosin-Bindedomänen des Insulin-Rezeptor-Substrates (IRS) erkannt und es kommt hier ebenfalls zu einer Phosphorylierung. Das IRS kann dann die SH2 (*Src-Homology 2*) Domäne des Adapterproteins Shc phosphorylieren, außerdem wird das Adaptermolekül Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*) über die SH3 Domäne aktiviert. Aktiviertes Grb2 rekrutiert Sos1 (*Son of Sevenless*), welches den Ras Signalweg aktivieren kann. Ras löst eine Serinkinasekaskade aus, die nacheinander Raf, MEK und ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) aktiviert. Aktiviertes ERK transloziert in den Zellkern, wo es die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren bedingt, die Zellproliferation und -wachstum regulieren. Im PI3-Kinase Signalweg bindet die PI3-Kinase über die SH2 Domäne an phosphorylierte Tyrosine des IRS. Dadurch wird PIP₂ (Phosphatidylinositol 4,5 diphosphat) phosphoryliert und es entsteht PIP₃ (Phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphat). Dieses aktiviert die PDK-1 (Phosphatidylinositolphosphat-abhängige Kinase-1), die wiederum Akt/PKB (Proteinkinase B) aktiviert. Akt/PKB phosphoryliert metabolische Enzyme wie GSK-3 (*glycogen synthase kinase 3*), was eine Aktivierung der Glykogen-Synthase zur Folge hat. Das finale Ereignis dieses Signalweges ist dann die Translokation des Glukosetransporters GLUT4 von den Vesikeln zur Zellmembran. Diese Glukosetransporter sind nun in der Lage, Glukose in die Zelle zu transportieren (Saltiel und Kahn, 2001). Um das Insulin-Signalling zu beenden, ist die Wirkung von Phosphatasen nötig. PTEN baut PIP₃ zu PIP₂ ab. Alternativ kann der Insulin-Insulinrezeptorkomplex in Endosomen internalisiert werden, oder Insulin wird durch das Insulin abbauende Enzym IDE abgebaut (Bevan, 2001).

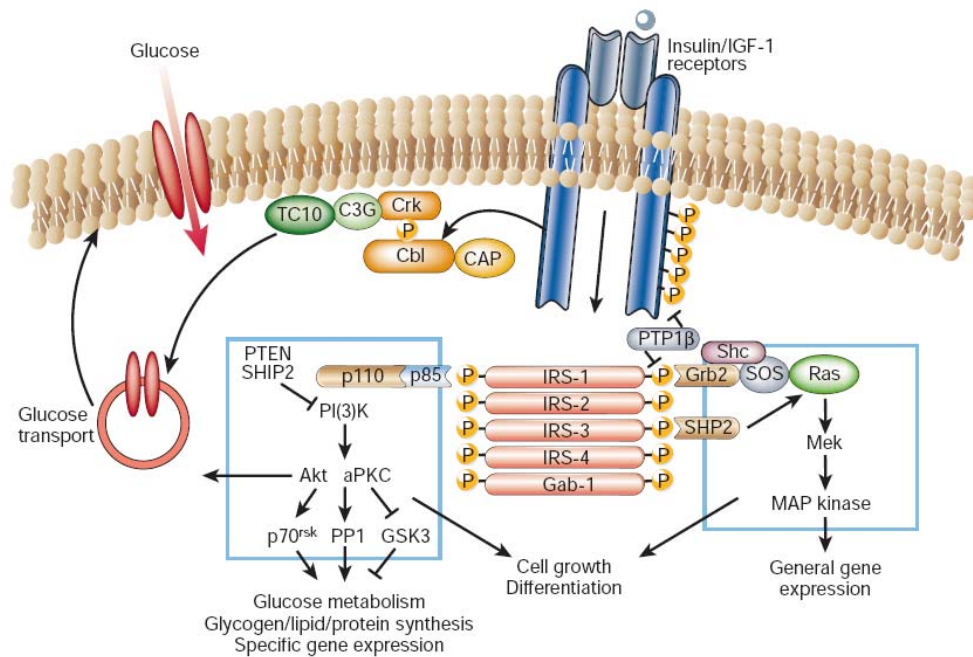


Abb. 11: Insulinsignalweg in Vertebraten (aus Saltiel und Kahn, 2001)

1.9.3. Der Insulin Signalweg in Invertebraten

In *C.elegans* konnte ein Insulinrezeptor, DAF-2, identifiziert werden. Dieser stellt eine membranständige Tyrosinkinase dar (Kimura et al., 1997). Für diesen Rezeptor wurden bislang schon 38 Insulin-ähnliche Liganden gefunden (Pierce et al., 1997 und Nelson und Padgett, 2003), die man in die drei Klassen α , β und γ einteilt, wovon letztere dem Vertebraten-Insulin am ähnlichsten ist. Die Insulin-ähnlichen Peptide sind oft in genomischen Clustern von drei bis sieben Genen organisiert und gehen daher wahrscheinlich auf Duplikationsereignisse zurück. Nur die Insulin-ähnlichen Peptide 1 und 18 besitzen auch ein putatives C-Peptid (Nelson und Padgett, 2003). Diese Vielfalt an potentiellen Liganden für den Insulinrezeptor war überraschend. Die einzelnen Gene zeigen spezifische und verschiedene Expressionsmuster. Die Insulin-ähnlichen Peptide 1 und 8 werden zum Beispiel in Neuronen exprimiert. Andere Gene sind jedoch funktionell redundant (Leevers, 2001).

In *C.elegans* wird der Insulinsignalweg dazu benötigt, das Dauerstadium zu regulieren. Nach Stimulation von DAF-2 findet eine Autophosphorylierung der Kinasedomäne statt und das PI3-K Homologe AGE-1 wird aktiviert. Dies produziert den *second messenger* PIP₃, der für die Aktivierung von PDK-1, AKT-1 und AKT-2 nötig ist. Durch diese Prozesse wird die Kernlokalisierung von DAF-16 und somit das Dauerstadium verhindert (Nelson und Padgett, 2003). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Insulin-ähnlichen Peptide 1 und 18 bei Überexpression das Dauerstadium einleiten können, das heißt, hier findet ein

antagonistischer Prozess statt. Man nimmt an, dass einige der Insulin-ähnlichen Peptide als Agonisten und andere als Antagonisten von DAF-2 wirken. Je nach Umweltbedingungen wird dann das Überleben durch Inhibition des DAF-2 Signalweges und somit Eintritt in das Dauerstadium gefördert, oder durch Aktivierung des DAF-2 Signalweges werden Wachstum und Reproduktion gefördert (Pierce et al., 2001).

In *D.melanogaster* reguliert der Insulin Signalweg das Wachstum und die Größe der Imaginalscheiben im Larvenstadium und somit auch die Größe des adulten Tieres. Ist der Insulin Signalweg eingeschränkt, sinkt in den Imaginalscheiben die Zellgröße und die Zellzahl. Wird das Signal durch Überexpression massiv verstärkt kommt es trotz gleich bleibender Zellzahl zu vergrößerten Zellen (Coelho und Leever, 2000 und Leever, 2001).

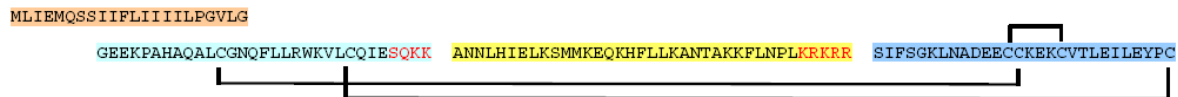
Ein Insulinrezeptor wurde ebenfalls in *Drosophila melanogaster* identifiziert (DInr (*Drosophila Insulin receptor*)). Dieser ist für eine normale Entwicklung nötig und wird außerdem während der Embryonalentwicklung für die Bildung der Epidermis und des Nervensystems benötigt (Fernandez et al., 1995). Wird dieser Rezeptor überexprimiert, so kommt es zu einem Anstieg der Zellgröße und der Zellzahl was ein größeres adultes Tier zur Folge hat (Brogiolo et al., 2001). Für den DInr konnten sieben mögliche Liganden, DILPs (*Drosophila Insulin-like Peptides*) genannt, gefunden werden. Von diesen ist DILP-2 dem humanen Insulin am ähnlichsten. *In situ* Hybridisierungen zeigten, dass die DILPs in verschiedenen Geweben exprimiert werden. So werden *dilp 1,2,3* und *5* in Gehirn exprimiert, *dilp 4,5* und *6* in Mitteldarm, *dilp 2* in Imaginalscheiben, *dilp 7* im Bauchmark und *dilp2* in Speicheldrüsen. Durch Überexpression von DILP-2 konnte festgestellt werden, dass es die Größe des adulten Tieres reguliert, in dem es Einfluss auf die Zellzahl und die Zellgröße verschiedener Organe nimmt. Ändert man also entweder das Expressionslevel des Insulinrezeptors, oder das der Insulin-ähnlichen Peptide, so hat dies eine Auswirkung auf die Zellzahl und die Zellgröße, wodurch die Größe des gesamten Organismus reguliert wird. Alle für den Insulinsignalweg benötigten Komponenten wie IRS, PI3K, PTEN und Akt/PKB sind ebenfalls bereits in *Drosophila* identifiziert worden.

Den Invertebraten *C.elegans* und *D.melanogaster* ist also gemeinsam, dass der Insulinsignalweg über die Komponenten PI3K, PTEN und PKB/Akt durch die Nahrungsaufnahme reguliert wird. Es gibt für jeweils nur einen Insulinrezeptor eine Vielfalt an potentiellen Liganden.

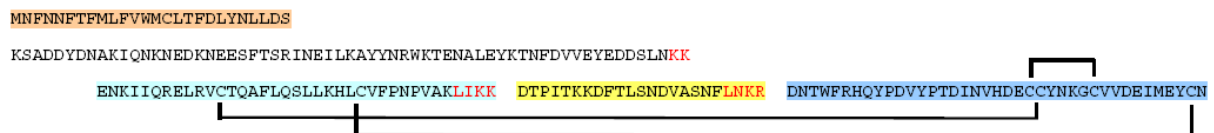
1.9.4. Komponenten des Insulin Signalweges in Hydra

In Hydra war bereits seit längerer Zeit das Insulinrezeptorhomolog HTK7 bekannt (Steele et al., 1996). Nun konnten auch drei mögliche Liganden für diesen Rezeptor identifiziert werden, Hydra Insulin 1, 2 und 3 (Rob Steele, unveröffentlichte Daten). Ähnlich wie humanes Insulin besitzen sie eine Signalsequenz gefolgt von der β -Kette, einem C-Peptid und der α -Kette. In Abbildung 12 ist dieser Aufbau dargestellt.

Hydra Präproinsulin 1:



Hydra Präproinsulin 2:



Hydra Präproinsulin 3:

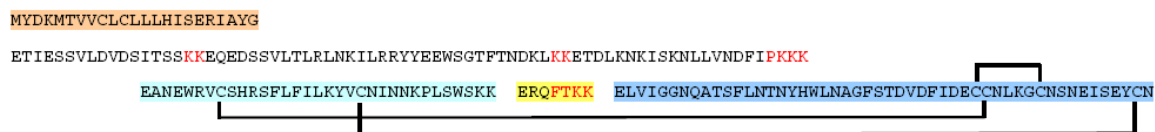


Abb. 12: Schematische Darstellung der Hydra Präproinsuline 1, 2 und 3. Die Signalpeptide sind orange schattiert, β -Ketten in türkis, die α -Ketten in blau und die C-Peptide in gelb. Die putativen Prozessierungsstellen sind mit roten Buchstaben gekennzeichnet. Ebenso sind die möglichen Disulfidbrücken mit schwarzen Verbindungslinien eingezeichnet (erstellt nach Daten von R. Steele).

Anders als bei humanem Insulin ist in HyPräproinsulin 2 und 3 zwischen Signalpeptid und β -Kette noch ein längeres Stück Sequenz von unbekannter Funktion eingebaut. Auch hier werden die Prozessierungsstellen zwischen den einzelnen Ketten aus zwei basischen Aminosäuren gebildet, jedoch sind für HyPräproinsulin 2 und 3 mehrere Stellen der Prozessierung möglich.

Weitere am Insulinsignalweg beteiligte, bereits in Hydra identifizierte Komponenten sind die Proteinkinase B (Herold et al., 2002), die Antagonisten der PI3-Kinase PTP und PTEN (Diplomarbeit Erlacher, 2004), sowie die PI3-Kinase, mTOR und das Insulinrezeptorsubstrat IRS (Recherchen von R. Steele).

1.10. Forkhead-Box Transkriptionsfaktoren

1.10.1. FOXO

FOX (*Forkhead box*) Transkriptionsfaktoren sind in vielfältige Signalwege involviert und spielen eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen. Proteine dieser Familie besitzen alle eine hochkonservierte, etwa 100 Aminosäuren lange DNA-Bindedomäne im N-terminalen Bereich des Proteins, welche ein *winged-helix* DNA – Bindemotiv ausbildet (Clark et al., 1993). Basierend auf der Homologie in dieser Domäne, kann man die Forkhead Gene in 19 Subklassen (FOXA-FOXS) unterteilen (Kaestner et al., 2000). Die Transaktivierungsdomäne ist im C-terminalen Bereich lokalisiert.

FOXO Transkriptionsfaktoren (O für *other*) lassen sich von anderen FOX Proteinen durch eine fünf Aminosäuren lange Insertion kurz vor Helix 3 unterscheiden, die direkt an der sequenzspezifischen Interaktion mit DNA-Bindestellen beteiligt ist (Kaestner et al., 2000). Im Säuger wurden bereits vier FOXO Gene gefunden (FOXO 1, 3, 4 und 6) (Fu und Tindall, 2008). In *C.elegans* und *D.melanogaster* gibt es jeweils nur ein Homologes (*C.elegans* daf-16 (Lin et al., 1996) und *D.melanogaster* dFOXO (Kramer et al., 2003)).

FOXO Transkriptionsfaktoren besitzen sowohl eine Kernexportsequenz als auch ein Kernlokalisierungssignal, wodurch sie vom Zytoplasma zum Kern und umgekehrt transloziert werden können (Biggs et al., 1999; Brownawell et al., 2001). Sie binden als Monomere an das FOXO Erkennungselement (FRE: *FOXO recognition element*) ihrer DNA-Zielsequenzen, (Furuyama et al., 2000). Die Zielgene von FOXO sind an der Regulation des Zellzyklus (GADD45: *growth arrest and DNA damage-inducible protein 45*), am Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (Katalase), an der Reparatur der DNA (DDB1: *damage-specific DNA-binding protein 1*), an der Regulation des Glukosemetabolismus (Glukose-6-Phosphatase) und am Auslösen der Apoptose (Bim, FasL) beteiligt (Greer und Brunet, 2005).

FOXO wird durch den PI3-K-Akt Signalweg kontrolliert. Bindet Insulin oder ein anderer Wachstumsfaktor an den zugehörigen Rezeptor, wird PKB aktiviert. Es kommt zur Produktion von Phosphatidyl-Inositol 3,4,5-triphosphat, wodurch sich eine Bindestelle für die Serin-Threonin Kinase Akt ausbildet. Akt transloziert daraufhin zur Plasmamembran und wird durch Phosphorylierung durch die 3'-Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 aktiviert (Datta et al., 1999; Vivanco und Sawyers, 2002). Aktivierte PKB/Akt phosphoryliert FOXO an drei verschiedenen Serin bzw. Threonin Stellen (Alessi et al., 1996; Brunet et al., 2004). Phosphoryliertes FOXO bindet an 14-3-3 Bindeproteine, dieser Komplex wird aus dem Zellkern exportiert, was eine Inhibierung der Transkription der Zielgene nach sich zieht (Burgering und Kops, 2002). Wirken nun auf eine Zelle keine Wachstumsfaktoren mehr ein,

so wird der PI3K-Akt Signalweg inaktiviert, FOXO dephosphoryliert und in den Zellkern importiert, um die Transkription der Zielgene zu initiieren (Brunet et al., 2004). Dieser Signalweg ist in Abbildung 13 dargestellt.

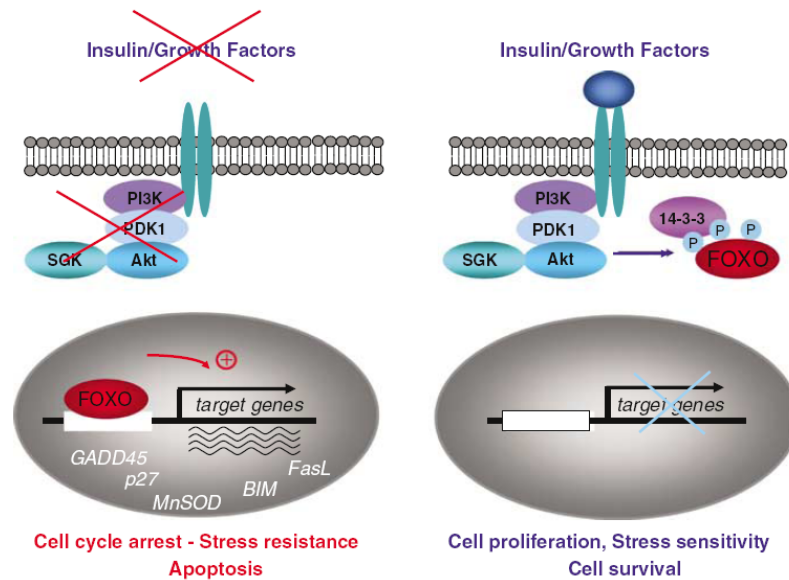


Abb. 13: Regulation von FOXO durch Insulin und Wachstumsfaktoren (Abbildung aus Greer und Brunet, 2005). Ohne Insulin oder Wachstumsfaktoren sind FOXO Transkriptionsfaktoren im Zellkern lokalisiert und sorgen durch die Hochregulation von Genen wie Bim oder FasL für Zellzyklusarrest und Apoptose. Sind jedoch Insulin oder Wachstumsfaktoren vorhanden, so wird der PI3-K-Akt Signalweg aktiviert. Akt phosphoryliert FOXO, diese bindet an 14-3-3 Proteine und wird aus dem Zellkern exportiert. SGK (*serum and glucocorticoid inducible kinase*) wird ebenfalls über die PI3-K aktiviert. Dies führt zum Überleben der Zelle und zur Zellproliferation.

Die Menge an FOXO Protein in einer Zelle wird zwar auch durch die Regulation der Genexpression kontrolliert, hauptsächlich aber durch Abbau durch das Proteasom reguliert. Phosphorylierung durch Akt an Serin 256 führt zur Ausbildung einer Bindestelle für Skp2, der substratbindenden Komponente des *Skp2/culin/F-box* E3 Ubiquitinligase-Komplexes (Matsuzaki et al., 2003).

1.10.2. Beteiligung von FOXO an der Regulation von Apoptose

Besonders von Bedeutung sind FOXO Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Apoptose und somit auch bei der Entstehung von Krebs. Einige der Zielgene sind die an der Apoptose beteiligten Proteine Fas Ligand, das *Insulin-like growth factor* Bindeprotein 1, oder das BH3-only Protein Bim (Accili und Arden, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Bim in Zellen, welche ohne Wachstumsfaktoren wuchsen, durch FOXO hochreguliert wird (Dijkers et al., 2000). Ebenso wird das proapoptotische Protein BNip 3 hochreguliert (Tran et al., 2002). Das humane FOXO4 inhibiert indirekt das antiapoptotische Bcl-x_L durch die

Regulation dessen transkriptionalen Repressors Bcl-6 (Tang et al., 2002). Wird der Fas Ligand hochreguliert, so kann dieses verstärkt an Fas Rezeptoren binden, was letztendlich zur Aktivierung der Pro-Caspase 8 führt. FOXO reguliert also Apoptose über die Transkription von Apoptosegenen des intrinsischen und auch des extrinsischen Apoptosewegs (Fu und Tindall, 2008).

1.10.3. FOXO in den Invertebraten *C.elegans* und *D.melanogaster*

C.elegans hat die Möglichkeit, eine Entwicklungspause einzulegen, wenn ein Mangel an Nährstoffen oder eine hohe Populationsdichte vorliegt. Die Nematoden treten dann in ein andauerndes Larvenstadium ein. Eines der Gene, das den Eintritt in dieses Larvenstadium reguliert, ist das dem humanen FOXO orthologe *daf-16* (Ogg et al., 1997). Die Regulation findet über den Insulinrezeptor DAF-2 und Homologe von PKB/AKT statt (Paradis und Ruvkun, 1998). Bindet ein Ligand an DAF-2, so wird der Insulinsignalweg aktiviert und es findet eine Inaktivierung von DAF-16 statt, welches dann, analog dem humanen FOXO, aus dem Zellkern exportiert wird (Apfeld et al., 1998).

Das FOXO Homologe in *Drosophila* ist dFOXO. Überexpression von dFOXO führt zu kleineren Tieren, was durch Abnahme der Zellgröße und der Zellzahl bedingt wird. Da dieser Phänotyp dem ähnelt, der durch Hungern ausgelöst wird, ist es wahrscheinlich, dass dFOXO eine Aufgabe bei der Erkennung des Nahrungsangebotes hat (Kramer et al., 2003). Es konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass dFOXO eine Wirkung auf den Insulinrezeptor hat. In gehungerten Fliegen wird dieser hochreguliert (Puig und Tijan, 2005).

1.11. Ziel dieser Arbeit

Während man bei Einzellern auch Formen des programmierten Zelltodes findet, beschränkt sich Apoptose im oben beschriebenen Sinne auf tierische Organismen.

Die wesentlichen Mechanismen der Apoptose sind von *C.elegans* bis zum Menschen konserviert, dennoch scheint das komplette Netzwerk apoptotischer Vorgänge in Vertebraten um einiges komplexer zu sein. Hydra steht ganz am Anfang der Metazoenevolution. Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe genomischer und *EST*- Datenbanken ein komplettes Bild über das Arsenal apoptotischer Proteine in Hydra zu erhalten. Die molekulare Funktion der Komponenten der Hydra- Apoptosemaschinerie sollte experimentell untersucht werden.

2. Ergebnisse

2.1. Die Hydra Bcl-2 Familie

2.1.1. Identifikation von neuen Mitgliedern der Hydra Bcl-2 Proteinfamilie

Zu Anfang dieser Arbeit waren drei dem humanen Bcl-2 homologe Hydra-Proteine bekannt. Durch Analyse der *EST*- (*Expressed sequence tag*)- und genomischen Sequenzen (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) wurden sechs weitere kodierende Sequenzen für Bcl-2 homologe Proteine hinzugefügt. Aufgrund der Homologien wurden die Hydra Bcl-2 Familienmitglieder HyBcl-2-*like* 1 bis 7 und HyBak-*like* 1 und 2 genannt.

Die Proteine HyBcl-2-*like* 1 und HyBcl-2-*like* 3 sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 84% identisch. Da die beiden sie kodierenden Gene jedoch auf verschiedenen genomischen *Contigs* liegen und von unterschiedlichen Genen flankiert sind, kann man davon ausgehen, dass es sich tatsächlich um zwei verschiedene Gene und nicht um zwei Allele handelt. Die beiden Bak-ähnlichen Proteine unterscheiden sich recht stark, die sie kodierenden Gene liegen jedoch auf dem gleichen *Contig* direkt hintereinander. Wahrscheinlich fand einst ein Duplikationsereignis statt und seitdem evolviert mindestens eine der beiden Sequenzen.

Zwei Genvorhersagen waren unvollständig: HyBcl-2-*like* 6 und HyBcl-2-*like* 7, wobei ersteres durch Sequenzen aus der *EST*-Datenbank (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) vervollständigt werden konnte. Um die vollständige Sequenz von HyBcl-2-*like* 7 zu erhalten, wurde eine *RACE* (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) Reaktion durchgeführt. Dazu wurde eine spezielle cDNA hergestellt. Hydra mRNA wurde mit einem Primer revers transkribiert, der durch Bindung an die poly-A-Sequenz dem Transkript eine *Linker*-Sequenz anfügte, an welche bei der PCR-Reaktion ein Primer binden konnte. Die anschließende PCR wurde mit einem genspezifischen 5' Primer und einem 3' Primer, der an eben diesen *Linker* band, durchgeführt. Die *RACE* Reaktion amplifizierte das gesamte C-terminale Ende von Hydra Bcl-2-*like* 7, einschließlich der poly-A-Sequenz und des Stop-Codons.

2.1.2. Analyse der Hydra Bcl-2-like Proteinsequenzen

Die kodierenden Sequenzen der HyBcl-2-like Proteine wurden anschließend aus cDNA amplifiziert. Abbildung 14 zeigt für je einen Vertreter der HyBcl-2-like und der HyBak-like Proteine einen Sequenzvergleich mit den humanen Homologen. Außerdem wurden die Sekundärstrukturen der Proteine mit dem Programm *Predict Protein* (<http://www.predictprotein.org/>) berechnet und mit den bekannten Kristall- und Röntgenstrukturen von Bcl-Proteinen verglichen (Aritomi et al., 1997 und Moldoveanu et al., 2006).

Es sind einige konservierte Bereiche vorhanden. Die stärkste Konservierung findet man in den BH-Domänen. Die Strukturvorhersagen für die Helices von HyBcl-2-like 4 und HyBak-like 1 stimmen mit denen im humanen Bcl-2 bzw. Bak sehr gut überein. Die einzige Ausnahme bildet der C-Terminus von HyBak-like 1. Hier findet man eine β -Strang Struktur weniger als im humanen Protein, stattdessen wird hier noch eine zusätzliche Helix vorhergesagt.

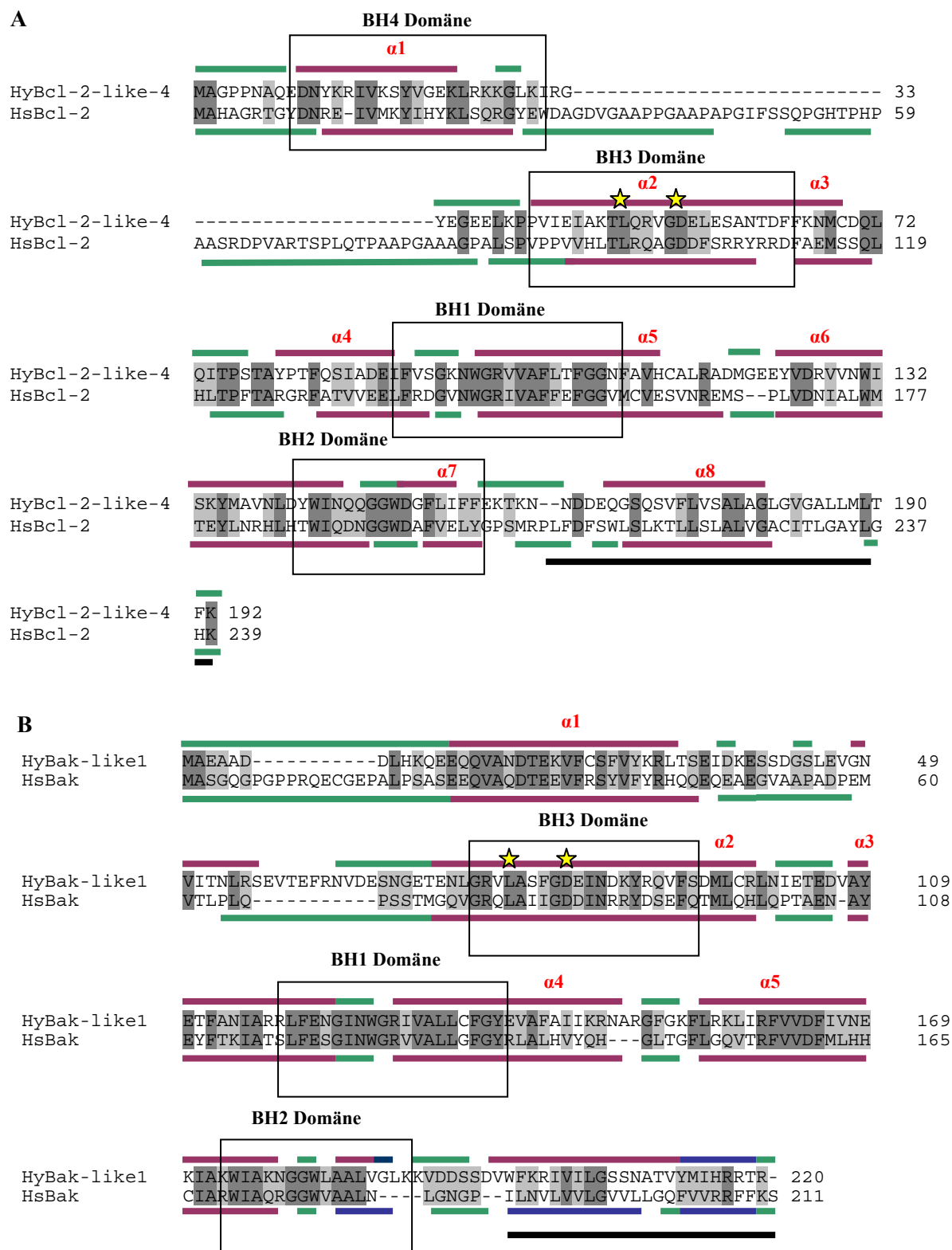


Abb. 14: Sequenzvergleich von Hydra Bcl-2-like 4 mit Homo sapiens Bcl-2 (Zugangsnummer NP_000624) (A) und Hydra Bak-like 1 mit Homo sapiens Bak (Zugangsnummer NP_001179) (B). Dunkelgrau hinterlegt sind gleiche Aminosäuren, hellgrau ähnliche Aminosäuren. Rahmen zeigen die BH Domänen. Die vorhergesagten Helix- (lila), Loop (grün)- und β -Strang-Strukturen (blau) sind mit Balken markiert, ebenso die Transmembrandomäne (schwarz). Mit gelben Sternen gekennzeichnet ist das konservierte Kernstück der BH3-Domäne LXXXGD.

Die BH-Domänen der einzelnen Hydra Proteine sind nicht alle gleich gut konserviert. Dies zeigt ein Sequenzvergleich aller relevanten Hydra Bcl-2-Homologie-Domänen mit humanen BH-Domänen in Abbildung 15.

<u>BH1 Domäne</u>		<u>BH2 Domäne</u>	
HsBcl2	VVEELFRDG-VNWGRIVAFFEFGGV	HsBcl2	TWTQDNG-GWDAFVEL
HsBax	VAADMFSQGNFNWGRVVALFYFASK	HsBax	GTIQDQG-GWDGLLSY
HyBcl-2-like1	VSQKVLTDNLNWGRVVSLLTFGGK	HyBcl-2-like1	-WIKQKG-GWDDFNRT
HyBcl-2-like2	IAEEIFSDG-INWGRIVLYAFAGK	HyBcl-2-like2	-WIRDSGRGWNGFIEN
HyBcl-2-like3	VSQEVFLADDNLNWGRVVSLLTFGGK	HyBcl-2-like3	-WIIEKKG-GWDDFNRT
HyBcl-2-like4	IADEIFVSG-KNWGRVVAFLTFGGN	HyBcl-2-like4	YWINQKG-GWDGFLIF
HyBcl-2-like5	VLRNVLKDS-INFGRITTSILAVCMI	HyBcl-2-like5	-WFEANG-AWDGLMKY
HyBcl-2-like6	VAKETFADGTKNWGRVLAITYTLAGC	HyBcl-2-like6	DWIEQKG-GWDDLPPK
HyBcl-2-like7	NFSEAMFEKCSWPLIVSFLIFSAN	HyBcl-2-like7	GWIIENG-GWEGLASF
HyBak-like1	IARRLFENG-INWGRIVALLCFGYE	HyBak-like1	KWIAKNG-GWLAALVG
HyBak-like2	VAKKLFENDNIAWSHIVSLICFQVE	HyBak-like2	QWIAQHG-GWIKMIDF
<u>BH3 Domäne</u>		<u>BH4 Domäne</u>	
HsBcl-2	VVHLTLRQAGDDFSRRYRRD----	HsBcl-2	-DNREIVMKYIHYKLR-GYEW
HsBax	KLSECLKRIGDEL-DSNMELQ---	HyBcl-2-like1	GFIRKLANDHIHYKLF--G---
HyBcl-2-like1	TTVVTLRRVSSELEDMHIDF----	HyBcl-2-like2	--PEAKIAKEVAYQLIQKTKG
HyBcl-2-like2	RKETELMMRLVE---EIEIKHELF	HyBcl-2-like3	GFIRKLANDHIHYKLF--G---
HyBcl-2-like3	TTAVTLRRVSSELEDMHIDF----	HyBcl-2-like4	NYKRI-VKSYVGEKLRKGL--
HyBcl-2-like4	EIAKTLQRVGDELESANTDF----	HyBcl-2-like5	--LNNEIKLSKIYIDSLLVATY
HyBcl-2-like5	EKVFELCL---ELVSKHETF--	HyBcl-2-like6	SIINTAFAIAMYIIPFHLRSSV
HyBcl-2-like6	TTVAKLCSNM-ELDNAFF-----	HyBcl-2-like7	TQAILEQLVDHEMK-----
HyBcl-2-like7	IIIAILQLKNSLLKLSPLYN---		
HyBak-like1	NLGRVLAASFGEINDKYRQVF---		
HyBak-like2	KAVQILEEQGGIAIQKYHHAF---		

Abb. 15: Sequenzvergleich der BH-Domänen von Hydra mit denen von humanem Bcl-2 (Zugangsnummer NP_000624) bzw. Bax (Zugangsnummer NP_620116). Der Sequenzvergleich wurde angefertigt mit dem Programm Clustal X. Ähnlichen Aminosäuren, die zum konservierten Motiv beitragen, wurde der gleiche Farbton zugeordnet.

Man erkennt, dass die BH1 und BH2 Domänen sehr gut konserviert sind. Die BH3 und BH4 Domänen dagegen sind nicht besonders gut konserviert.

Für alle Hydra Proteine wurde mit dem Programm *TMHMM* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) eine C-terminale Transmembrandomäne gefunden. Im Anhang ist unter Abbildung 62 ein Sequenzvergleich aller *HyBcl-2-like* Proteine dargestellt, der die vorhergesagten Sekundärstrukturen, die Bereiche der BH-Domänen und die Transmembrandomänen aufzeigt.

Zum Vergleich wurde nach *Bcl-2-like* Genen in den genomischen Sequenzen (<http://genome.jgi-psf.org/Nemve1/Nemve1.home.html>) der Seeanemone *Nematostella*

vectensis gesucht. Es fanden sich acht auf *EST* und Genmodelle gestützte Sequenzen für Bcl-2 ähnliche Proteine. Auch sie zeigen gute Konservierung der BH-Domänen und der Sekundärstruktur. Allerdings konnte hier kein Bak-ähnliches Protein gefunden werden. Ein Sequenzvergleich dieser Proteine mit den wichtigen Domänen und Helices ist im Anhang unter Abbildung 63 zu finden.

2.1.3. Analyse der Exon-Intron Struktur der HyBcl-2-like Proteine

Sind in einem Gen mehrere Exons und Introns vorhanden, so ermöglichen sie alternatives Spleißen. Hierbei können mehrere, auch funktional unterschiedliche, Varianten eines Gens entstehen. Dies ist zum Beispiel bei humanem Bax, welches von 6 Exons kodiert wird, der Fall. Wird Exon 3 ausgelassen, so werden Exons 2 und 4 miteinander verbunden, was zu einer verkürzten Version von Bax α , Bax δ genannt, führt (Apte et al., 1995). Die Genstruktur der HyBcl-2-like Familie ist in Abbildung 16 im Vergleich mit der von humanem Bcl-2, Bax, Bak und *C.elegans* Ced-9 abgebildet (Daten über Bcl-2, Bax, Bak und Ced-9 entnommen aus Herberg et al., 1998).

Das humane Bcl-2 Gen besitzt nur ein Intron, humanes Bax sechs, Bak vier und Ced-9 drei. Die Hydra-Gene besitzen alle ein konserviertes Intron. Es liegt in der BH2 Domäne und teilt die letzten beiden Exons voneinander. Das Intron liegt immer an der gleichen Stelle, nämlich nach der kodierenden Sequenz für das konservierte Motiv GGW. Es ist daher wahrscheinlich, dass das ursprüngliche Gen nur ein Intron besessen hat (Herberg et al., 1998). Dieses ist auch in *Nematostella vectensis* konserviert (Anhang Abbildung 64). HyBcl-2-like 7 hat drei zusätzliche Introns, dieses Gen nimmt in der Hydra Proteinfamilie auch aufgrund seiner Größe und seiner besonders schlecht konservierten BH3 und BH4 Domänen eine Sonderstellung ein.

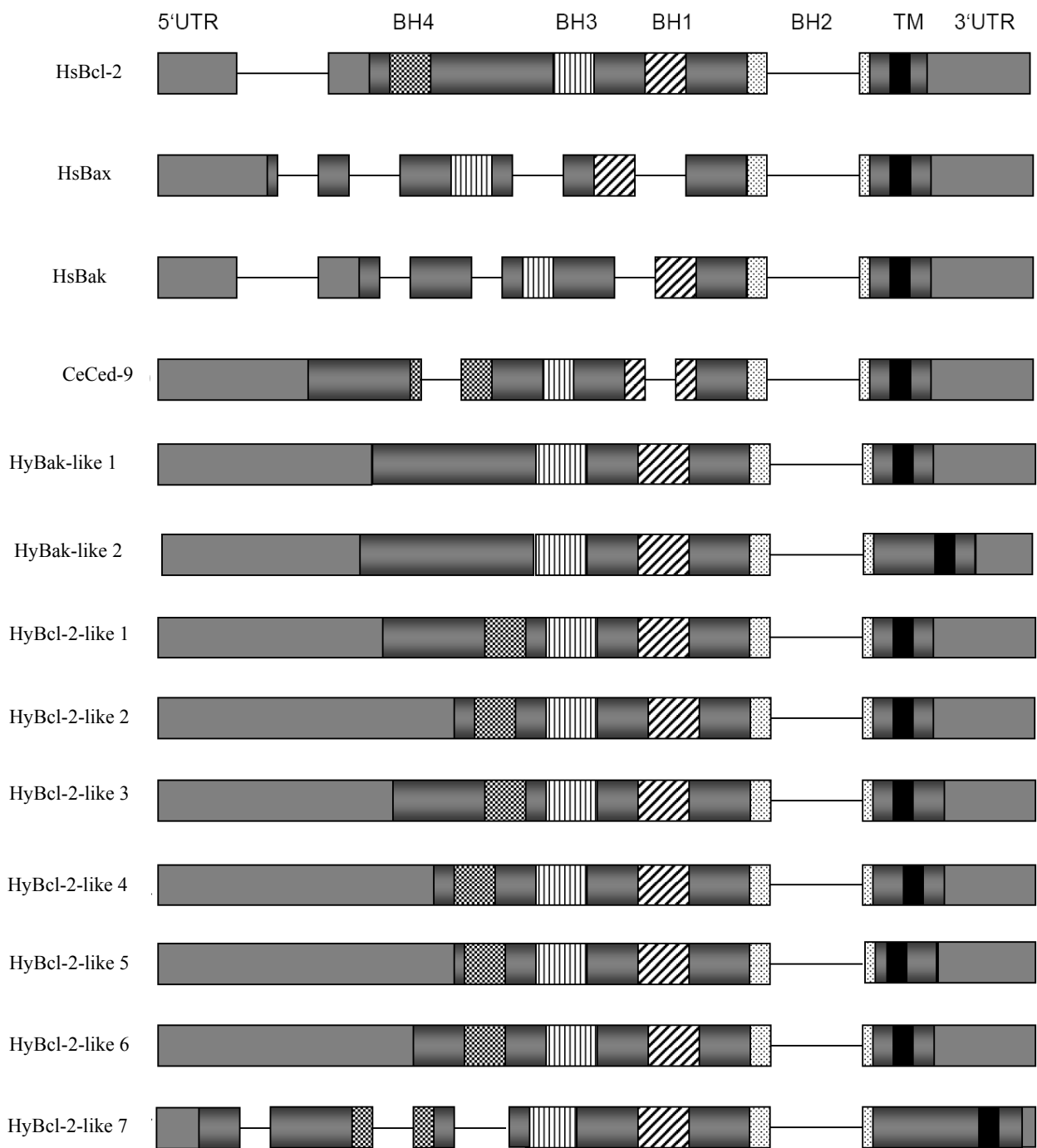






Abb. 16: Vergleich von Bcl-2 Genstrukturen aus verschiedenen Organismen. Dargestellt sind Exons (Kästchen) und Introns (Linien) sowie die Bcl-2-Homologie-Domänen mit strukturierten Kästchen (BH1 , BH2 , BH3  und BH4 ) und die Transmembrandomäne (schwarz; TM). Grau schattiert sind die 5' und 3' untranslatierten Bereiche (UTR) dargestellt.

2.1.4. Untersuchung der Lokalisation der Hydra Bcl-2 Proteine

Zuerst wurde die subzelluläre Lokalisation der HyBcl-2-*like* Proteine untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Gene in den Vektor hoT G kloniert, einem Vektor speziell für die Expression von Proteinen in Hydra. Von diesem Vektor werden GFP-Fusionsproteine unter der Kontrolle des Hydra Aktinpromotors stark exprimiert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem *PDS-1000/He Particle Delivery System* in Hydren transfiziert (Böttger et al., 2002). Um die Struktur der C-terminalen Transmembrandomäne nicht zu verändern, wurde ein N-terminal mit GFP fusioniertes Protein exprimiert. Die Expression der Proteine war bereits nach einem Tag sichtbar, Tiere mit transfizierten Zellen wurden fixiert und mit einem mitochondrialen Marker, dem Antikörper gegen die alpha-Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase, nachgefärbt. Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abbildung 17 dargestellt (alternative Zellen im Anhang unter Abbildung 65). HyBak-*like* 1 konnte nur exprimiert werden, wenn HyBcl-2-*like* 1, dem die C-terminale Transmembrandomäne fehlte, ko-exprimiert wurde. Möglicherweise hält dieses verkürzte HyBcl-2-*like* 1 das Protein HyBak-*like* 1 in einem inaktiven Zustand. Trotzdem waren nur sehr wenige transfizierte Zellen zu finden, was auf eine stark proapoptotische Wirkung von HyBak-*like* 1 schließen ließ.

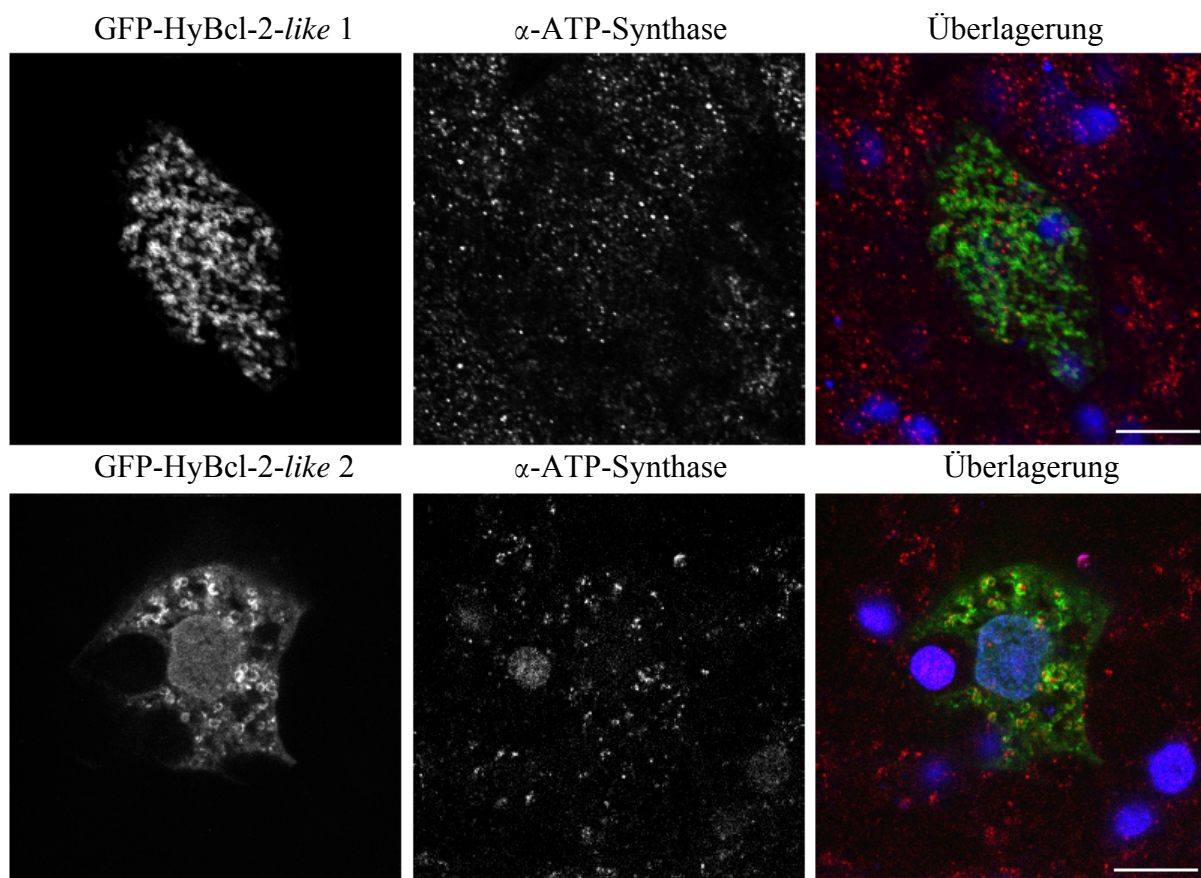


Abb. 17: Expression von HyBcl-2-*like* und HyBak-*like* Proteinen in Hydra (fortgesetzt auf der nächsten Seite).

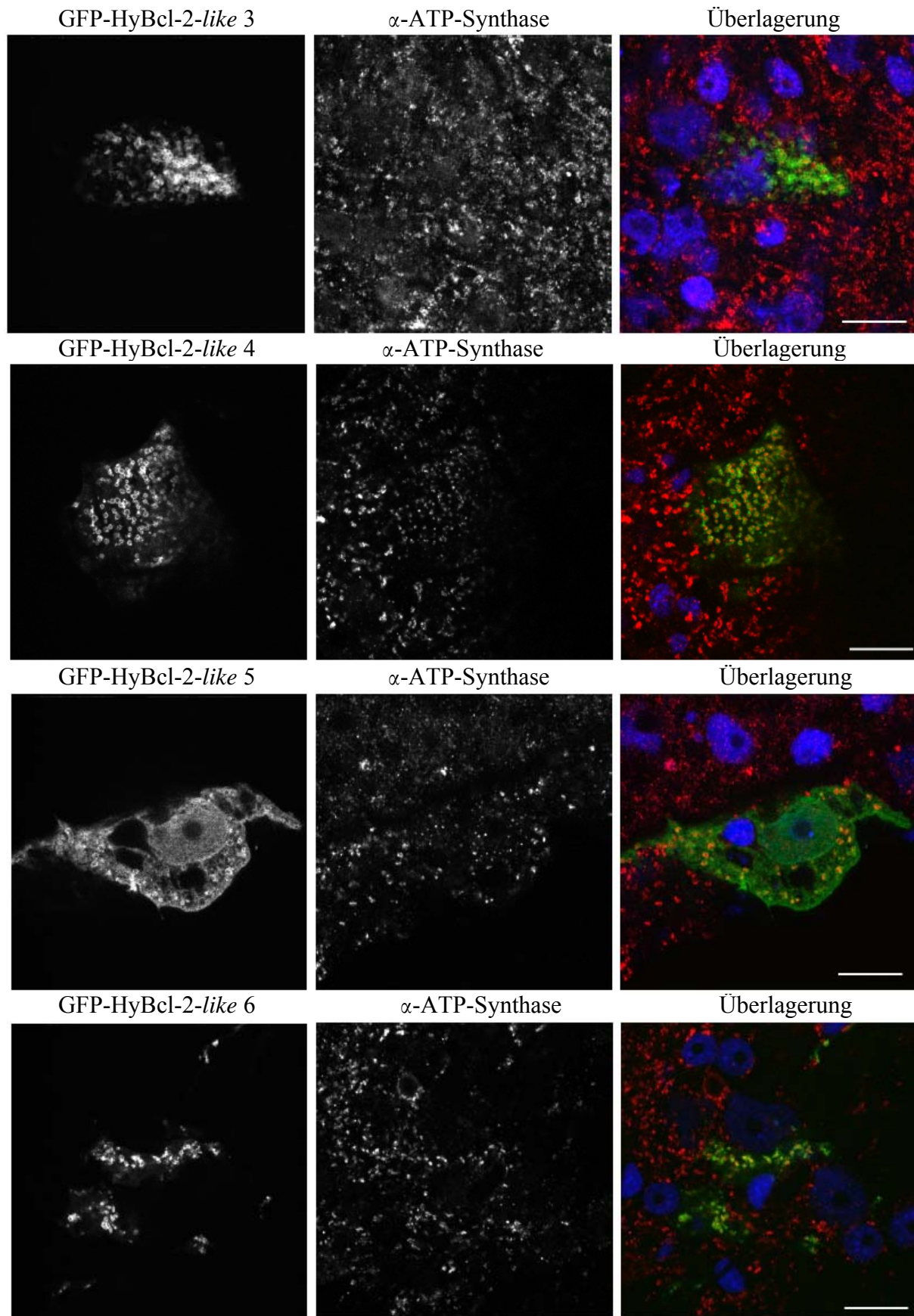


Abb. 17: Expression von HyBcl-2-like und HyBak-like Proteinen in Hydra (fortgesetzt auf der nächsten Seite).

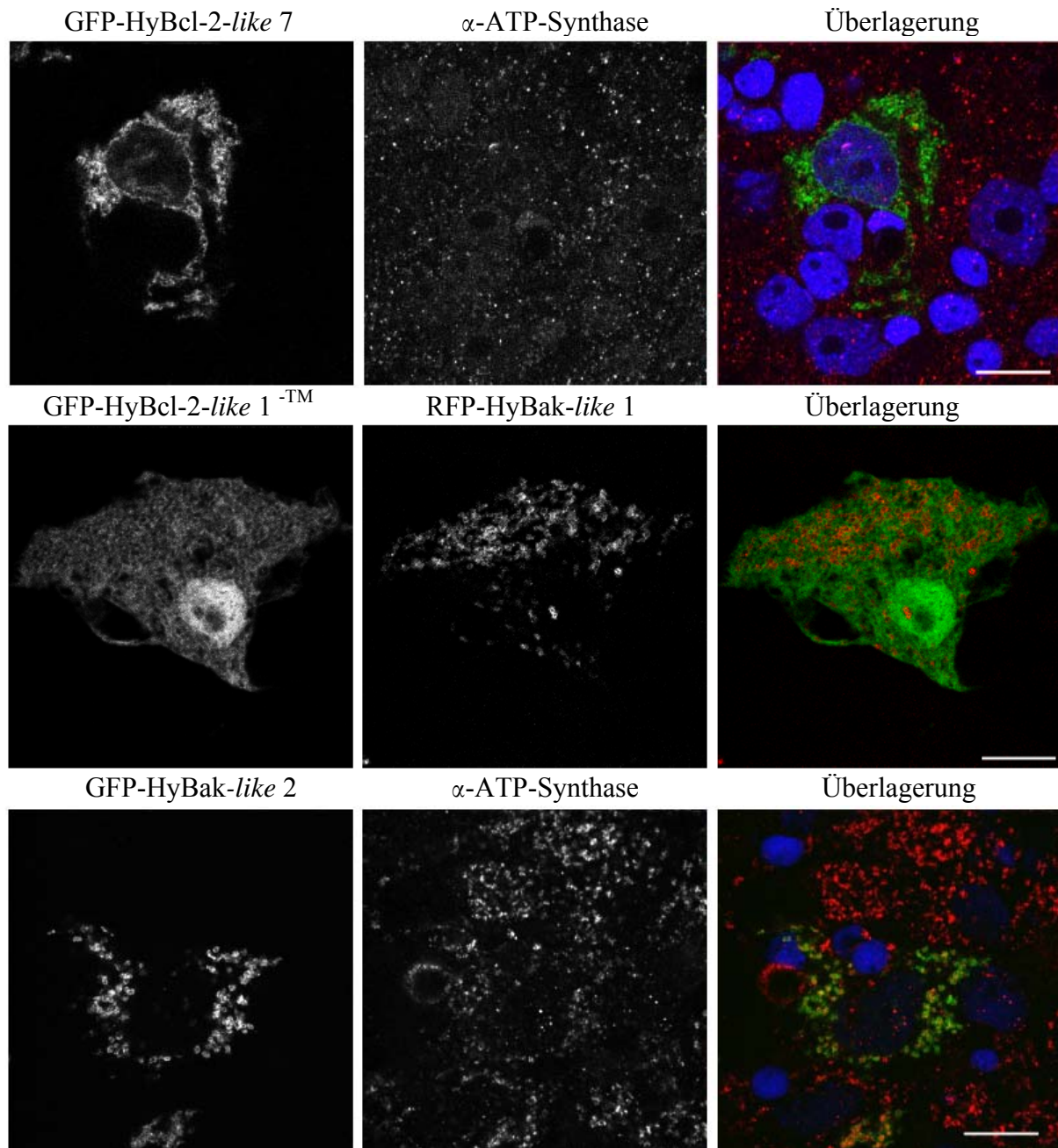


Abb. 17: Expression von HyBcl-2-like und HyBak-like Proteinen in Hydra. Dargestellt ist jeweils ein optischer Schnitt mit einer Dicke von $0,3\mu\text{m}$ durch eine ektodermale Epithelzelle von Hydra, welche das GFP-HyBcl-2-like Fusionsprotein exprimiert (links). Als mitochondrialer Marker diente der α -ATP-Synthase Antikörper (Mitte). Rechts ist in der Überlagerung zusätzlich die Kernfärbung (mit TO-PRO-3) in blau gezeigt, das GFP-Signal ist hier in grün und das α -ATP-Synthase Signal (bzw. RFP-Signal) in rot dargestellt. HyBak-like 1 ist als RFP-Fusionsprotein dargestellt und wurde mit GFP-HyBcl-2-like 1 ohne TM ko-exprimiert. Der Größenmaßstab beträgt $10\mu\text{m}$.

Außer HyBcl-2-like 7 zeigten alle Proteine eine punktförmige Verteilung in der Zelle, die mit dem mitochondrialen Marker korrelierte, jedoch keine vollständige Überlagerung zeigte. Es hat den Anschein, als wäre das GFP-Signal ringförmig um das Signal der ATP-Synthase herum lokalisiert. Zusätzlich zeigten HyBcl-2-like 2 und HyBcl-2-like 5 eine Lokalisation im

Zytoplasma und an der Kernmembran. Um dies deutlicher darzustellen, sind in Abbildung 18 noch höhere Vergrößerungen gezeigt.

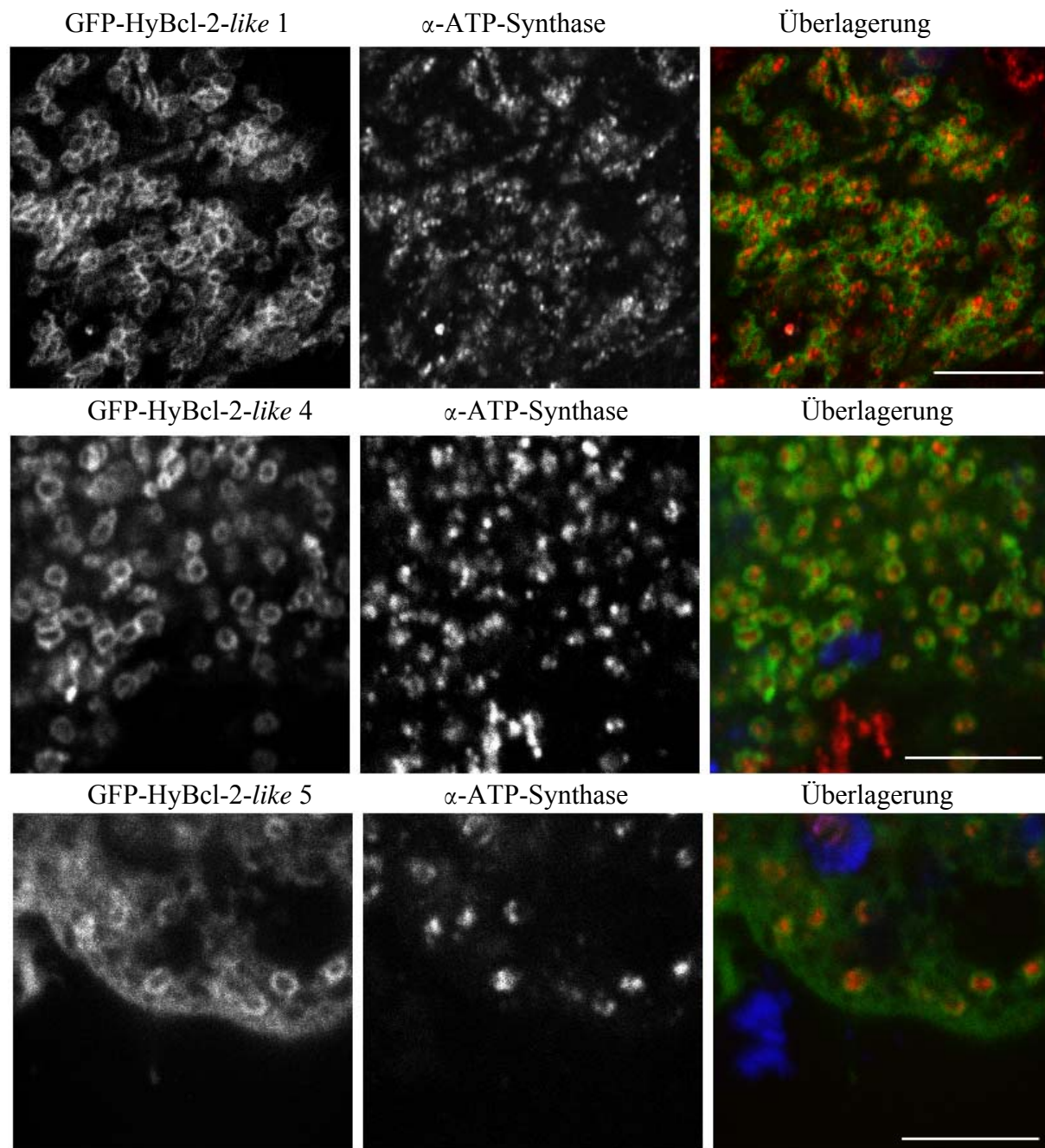


Abb. 18: Expression von HyBcl-2-like und HyBak-like Proteinen in Hydra (fortgesetzt auf der nächsten Seite).

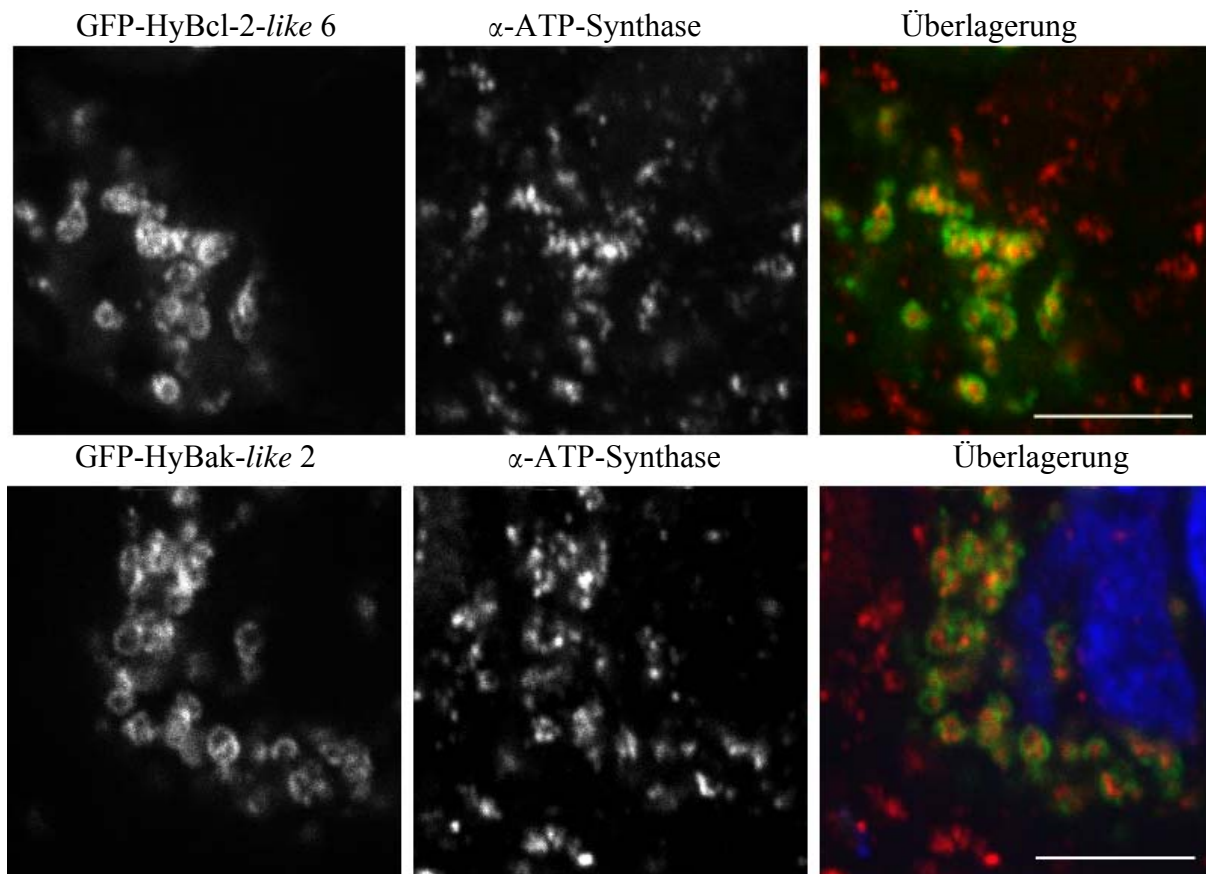


Abb. 18: Expression von HyBcl-2-like und HyBak-like Proteinen in Hydra. Dargestellt ist jeweils ein optischer Schnitt mit einer Dicke von 0,3 μ m durch eine ektodermale Epithelzelle von Hydra, welche das GFP-HyBcl-2-like Fusionsprotein exprimiert (links). Als mitochondrialer Marker diente der α -ATP-Synthase Antikörper (Mitte). Rechts ist in der Überlagerung die Kernfärbung mit TO-PRO-3 blau gezeigt, das GFP-Signal in grün und das α -ATP-Synthase Signal rot dargestellt. Der Größenmaßstab beträgt 10 μ m.

Das Protein HyBcl-2-like 7 zeigte keine Ko-Lokalisation mit dem mitochondrialen Marker, stattdessen sah es eher so aus, als wäre das Protein im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde HyBcl-2-like 7 mit dem ER-Marker HyBax-Inhibitor-1 in Hydra ko-exprimiert. Dies ist ein antiapoptotisches Protein, welches mit seinen sechs Transmembrandomänen in das ER inseriert (Diplomarbeit Wagner, 2009). Zusätzlich wurde HyBcl-2-like 7 in HEK 293T-Zellen exprimiert und mit einem anti-Calnexin Antikörper gefärbt. Beide Experimente bestätigten eine Lokalisation von HyBcl-2-like 7 im endoplasmatischen Retikulum (Abbildung 19).

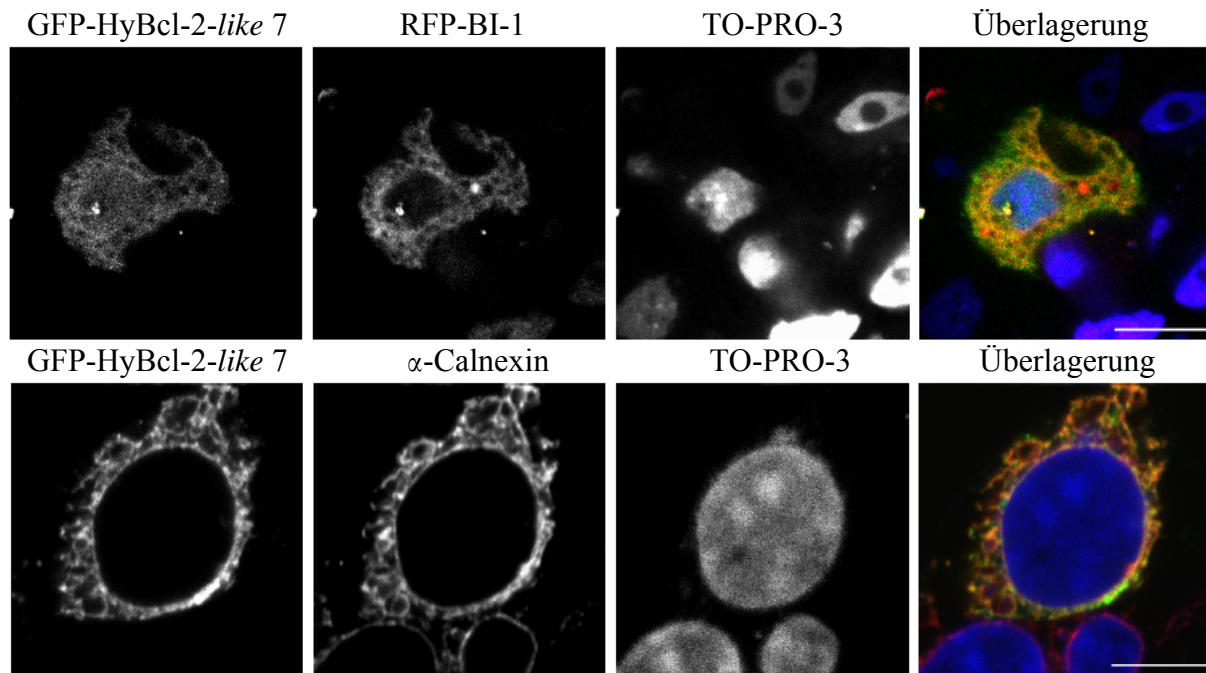


Abb. 19: Subzelluläre Lokalisation von HyBcl-2-like 7. In der oberen Reihe ist eine ektodermale Epithelzelle von Hydra dargestellt, welche GFP-HyBcl-2-like 7 exprimiert, als ER-Marker diente RFP-HyBI-1 (Diplomarbeit Wagner, 2009). In der unteren Reihe ist eine HEK 293T-Zelle, die GFP-HyBcl-2-like 7 exprimiert, dargestellt. Hier diente ein Calnexin Antikörper als ER-Marker. In den Überlagerungen sind die GFP-Signale in grün dargestellt, das RFP-Signal, bzw. das anti-Calnexin Signal in rot und die Kernfärbung mit TO-PRO-3 in blau. Dargestellt sind jeweils optische Schnitte mit einer Dicke von 0,3 μ m. Der Größenstandard beträgt 10 μ m.

2.1.5. Die mitochondriale Lokalisation ist abhängig von der C-terminalen Transmembrandomäne

Für viele Proteine mit C-terminaler Transmembrandomäne wurde bereits herausgefunden, dass sie nicht durch ein mitochondriales Sortierungssignal an die Mitochondrien dirigiert werden, sondern dass sie mit den Transmembrandomänen spontan und sogar vermutlich ohne Rezeptoren in die äußere Membran inserieren (Setoguchi et al., 2006). Um die Wichtigkeit dieses hydrophoben Bereichs auch in Hydra zu demonstrieren, wurde eine Mutante kloniert, der dieser Bereich fehlte. In Abbildung 20 ist das Ergebnis dieses Versuches dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass sich GFP-HyBcl-2-like 6 Δ TM in der ganzen Zelle und sogar sehr stark im Zellkern befand. Es fand keine Lokalisation an den Mitochondrien statt.

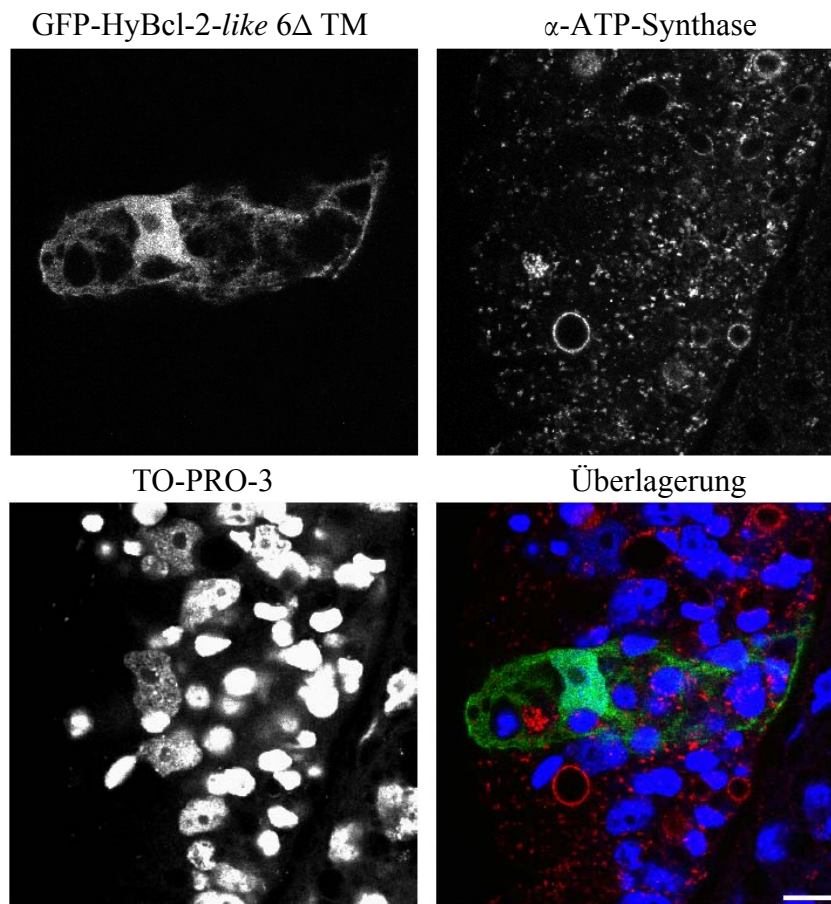


Abb. 20: Optische Schnitte einer ektodermalen Epithelzelle von Hydra, welche GFP-HyBcl-2-like 6 Δ TM exprimiert. Die Gegenfärbung der Mitochondrien erfolgte mit dem α -ATP-Synthase-Antikörper, der in diesem Fall auch unspezifische Färbung der Nematocytenkapseln zeigte (als Ringe zu erkennen). Die Färbung des Zellkernes erfolgte mit TO-PRO-3. In der RGB-Überlagerung ist eine zytoplasmatische Verteilung des Fusionsproteins (in grün gezeigt) und Ko-Lokalisation mit dem Zellkern (in blau gezeigt) nicht jedoch mit den Mitochondrien (in rot gezeigt) zu beobachten. Der Größenmaßstab beträgt 10 μ m, die Dicke der optischen Schnitte 0,3 μ m.

Die Proteine HyBcl-2-like und HyBak-like lokalisieren also mit der C-terminalen Transmembrandomäne an die Mitochondrien. HyBcl-2-like 2 und HyBcl-2-like 5 sind auch im Zytoplasma und an der Kernmembran zu finden. HyBcl-2-like 7 ist am ER lokalisiert. Solche Unterschiede in der Lokalisation der Bcl-2 Proteine findet man auch in Säugerzellen. Sie werden bedingt durch die Anzahl und Position der die Transmembrandomäne flankierenden Aminosäuren (Kaufmann et al., 2003). Wird die Transmembrandomäne je von zwei oder mehr basischen Aminosäuren C- und N-terminal flankiert, so lokalisiert ein Protein an die Mitochondrien, findet man je nur eine basische Aminosäure, so lokalisiert das Protein zusätzlich an das ER, findet man auf einer Seite der Transmembrandomäne gar keine basische Aminosäure, so findet nur eine Lokalisation an das ER statt. Eine Analyse dieser Aminosäuren in den Hydra Proteinsequenzen zeigt zwischen den verschiedenen Proteinen deutliche Unterschiede auf, die in Abbildung 21 gezeigt sind.

A

```

HsBcl-2      DAFVELYGPMSRPLFDFSWSLSLKTLLSLALVG---ACITLGLAYLGHK--
HyBcl-2-like1 DDFNRTFTKPAQNTWWTSLWVGLSASLA-----AAFVMSLR--
Hybcl-2-like2 NGFIENFDVTKQDSWVQGLFAATLGLGTIA-----AALYIKS--
HyBcl-2-like3 -NFNRTFTKPVQSTWWTSLWVGLSASLV-----AALAMKFLRRLR--
HyBcl-2-like4 -GFLIFFEKTNNNDDEQGSQSVFLVSALAGLGV-GALLMLTFK--
HyBcl-2-like5 -GLMKYFFNPTDYFWKGFVVTTVGLGAMA-----GLLYAKS--
HyBcl-2-like6 -DLPKKLSNDSNNQSSWSKVIAVGGVVAAT-----AGLFLESTGMR--
HyBcl-2-like7 YVILDIGNFFNHPLSIKTLSVLIWIPILILFFAWLVNSQVKNKYFKSIFKQTENKDFQNFVSNEL-
HyBak-like1  -GWLAALVGLKKVDDSSDVWFKRIVILGSIIA-----TVYMIHRITR--
HyBak-like2  DFFDDPNCQFETNHILAAMAISELTNIEVWLQRFFVASLVSGIIVIAWRKWHQP--

```

B

Protein	Lokalisation
HyBcl-2-like 1	äußere Mitochondrienmembran
HyBcl-2-like 2	äußere Mitochondrienmembran und ER
HyBcl-2-like 3	äußere Mitochondrienmembran
HyBcl-2-like 4	äußere Mitochondrienmembran
HyBcl-2-like 5	äußere Mitochondrienmembran und ER
HyBcl-2-like 6	äußere Mitochondrienmembran und ER
HyBcl-2-like 7	ER
HyBak-like 1	äußere Mitochondrienmembran
HyBak-like 2	äußere Mitochondrienmembran

Abb. 21: Analyse der Sequenzen der Transmembrandomänen der Hydra Bcl-2 Familie.

(A) Dargestellt sind die Sequenzen der C-Termini der Hydra Proteine und von humanem Bcl-2 (Zugangsnummer NP_000624). Die Transmembrandomäne ist blau gekennzeichnet, die basischen Aminosäuren sind rot gekennzeichnet. Die Tabelle (B) gibt einen Überblick über Lokalisationsvorhersagen, die durch die Analyse in (A) getroffen werden konnten.

Die auf dieser Grundlage gemachten Vorhersagen zur Lokalisation der HyBcl-*like* und HyBak-*like* Proteine stimmen mit den Beobachtungen (siehe Abbildung 17) weitestgehend überein. Die Proteine HyBcl-2-*like* 1, 3 und 4 sowie HyBak-*like* 1 und 2 sind nur an den Mitochondrien lokalisiert. Die Transmembrandomänen von HyBcl-2-*like* 2, 5 und 6 werden je nur von einer basischen Aminosäure flankiert, sie sollten wie humanes Bcl-2 (Akao et al., 1994) an Mitochondrien und ER lokalisieren können. Dies konnte für HyBcl-2-*like* 2 und 5, allerdings nicht für HyBcl-2-*like* 6 beobachtet werden. Die Transmembrandomäne von HyBcl-2-*like* 7 ist nur C-terminal von basischen Aminosäuren umgeben, es lokalisiert an das ER.

2.1.6. Antikörper gegen HyBcl-2-*like* 1 und HyBak-*like* 1

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen HyBcl-2-*like* 1 und HyBak-*like* 1 wurden die Gene ohne den Bereich, der für die Transmembrandomäne kodiert, in den Vektor

pRSET A kloniert, die Proteine in Bakterien in großem Maßstab überexprimiert und denaturierend aufgereinigt. Das Protein wurde zur Immunisierung von Hühnchen verwendet (Firma Davids). Die Antikörper wurden zuerst in einer Western Blot Analyse getestet. Sie erkannten bis zu 500 pg (anti-HyBak-*like*1) bzw. 80 ng (anti-HyBcl-2-*like* 1) an rekombinantem Protein. Außerdem waren sie in der Lage, in HEK 293T- Zellen überexprimiertes Protein zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Um endogenes HyBcl-2-*like* 1 bzw. HyBak-*like* 1 Protein zu detektieren, wurden Mitochondrien von 250 Hydren mittels Carbonatextraktion aufgeschlossen. Bei dieser Methode werden die Proteine der inneren und äußeren Mitochondrienmembran von denen des Intermembranraums und der Matrix getrennt und dadurch angereichert. Es wurden verschiedene Mengen an Protein aufgetragen, durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und dort mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt.

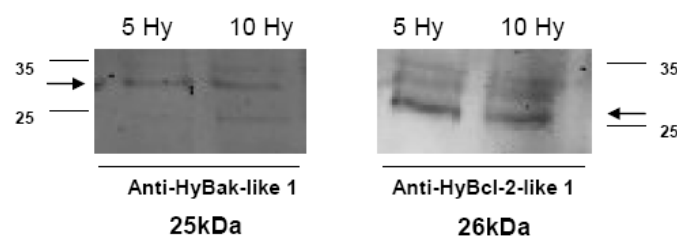


Abb. 22: Western Blot zur Analyse von endogenem HyBak-*like* 1 bzw. HyBcl-2-*like* 1. Eine durch subzelluläre Fraktionierung ganzer Hydren gewonnene Mitochondrienfraktion wurde durch Carbonatextraktion in lösliche und membranständige Proteine aufgetrennt, die Membranproteine wurden durch Zentrifugation angereichert, in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit den jeweiligen Antikörpern gefärbt. Aufgetragen sind die Mitochondrien von je 5 und 10 Hydren. Pfeile markieren die stärksten Banden.

Der Anti-HyBak-*like* 1 Antikörper erkennt eine Bande bei ca. 30 kDa. Das berechnete Molekulargewicht liegt bei 25 kDa. Anti-HyBcl-2-*like* 1 erkennt eine Bande bei 26 kDa, was der berechneten Größe entspricht. Damit wurde bestätigt, dass sowohl HyBak-*like* 1 als auch HyBcl-2-*like* 1 in den Mitochondrien von Hydra exprimiert sind.

Anschließend wurde mit den Antikörpern eine Immunfluoreszenzanalyse an ganzen Hydren durchgeführt. Daraus konnte geschlossen werden, dass sowohl endogenes HyBcl-2-*like* 1 als auch endogenes HyBak-*like* 1 in allen Zellen exprimiert und an den Mitochondrien lokalisiert sind. Dies ist aus Abbildung 23 zu erkennen.

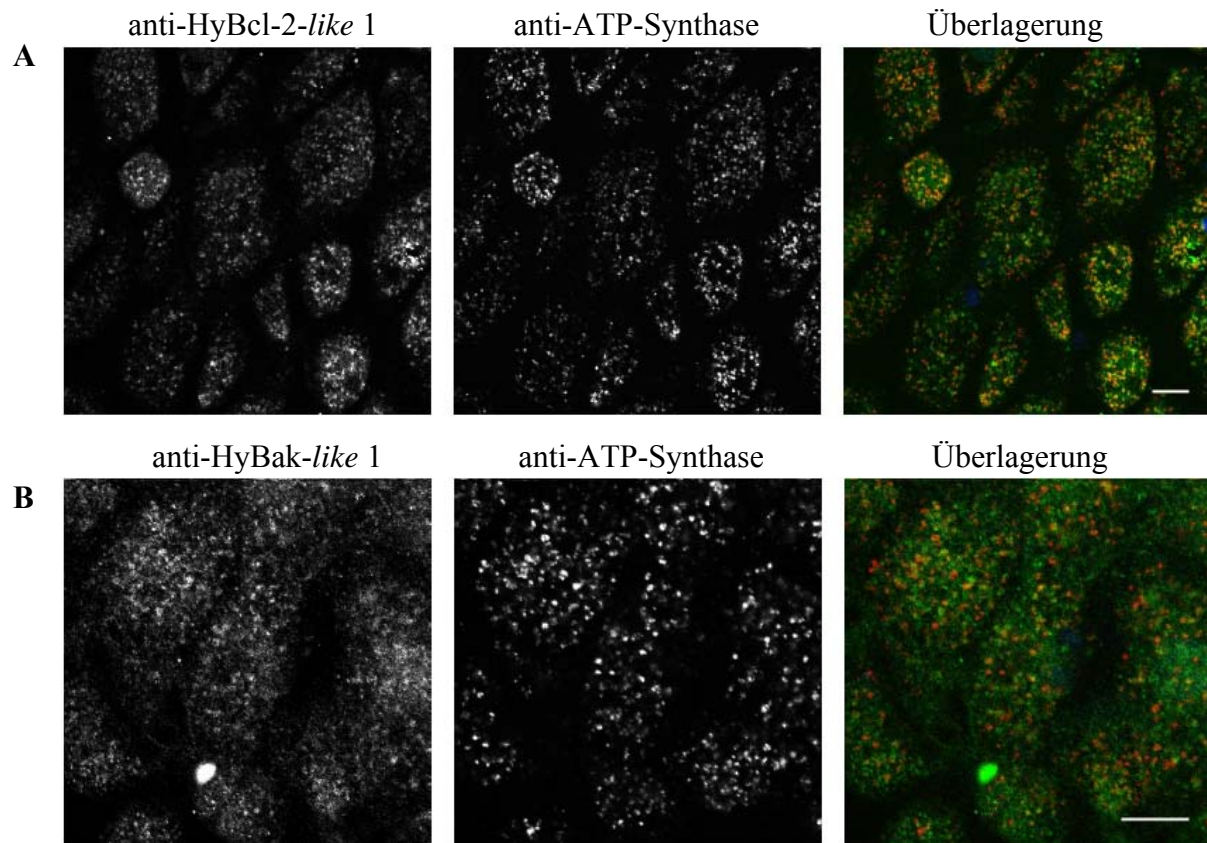


Abb. 23: Immunfluoreszenzanalyse an ganzen Hydren mit anti-HyBcl-2-like 1 und anti-Hy-Bak-like 1 Antikörper. Gezeigt sind Ausschnitte aus der Körpersäule von ganzen Hydren, die mit dem anti-HyBcl-2-like 1 (A) bzw. dem anti-HyBak-like 1 (B) Antikörper gefärbt wurden. Als Zweitantikörper wurde ein FITC-markierter Antikörper verwendet, das Signal ist in der Überlagerung grün gezeigt. Als Mitochondrienmarker diente der ATP-Synthase Antikörper, welcher mit dem anti-Maus-Cy₃ Antikörper sichtbar gemacht wurde. Dieses Signal ist in der Überlagerung in rot gezeigt. Man kann in der Überlagerung eine deutliche Ko-Lokalisation erkennen (gelbe Farbe). Es sind optische Schnitte mit einer Dicke von 0,3µm gezeigt, der Größenstandard beträgt 10µm.

2.1.7. Untersuchung der Funktion der HyBcl-2-like Proteine

Im Folgenden wurde untersucht, welche Rolle die HyBcl-2-like Proteine bei der Apoptose spielen. Lösen sie bei Überexpression Apoptose aus oder können sie diese gar verhindern? Da die Anzahl der transformierten Zellen in einem Hydra Transformations-Experiment meist recht niedrig ist und sich so ein hoher Standardfehler ergibt, wurde für Untersuchungen der pro- und antiapoptotischen Aktivität der Hydra Proteine auf ein Säugetierzellsystem ausgewichen. Alle folgenden Versuche wurden an HEK 293T-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Gene der Hydra Bcl-2 Familie in den Vektor pEGFP kloniert, wiederum am 3' Ende der GFP-Sequenz. HEK 293T-Zellen wurden mit der jeweiligen Plasmid-DNA transfiziert. Die Fusionsproteine wurden bereits nach einem Tag stark exprimiert.

Apoptotische Zellen wurden anhand der typischen Veränderungen der DNA-Verteilung im Zellkern erkannt (siehe Abbildung 24 A). Es wurden dann grün fluoreszierende Zellen gezählt

und der Anteil an apoptotischen Zellkernen bestimmt. In Abbildung 24 B sind mikroskopische Bilder der beiden Extremfälle gezeigt. HyBcl-2-like 6 exprimierende Zellen zeigen keine Apoptose. In HyBak-like exprimierenden Zellen dagegen sind bis zu 90% apoptotisch. Abbildung 24 C zeigt den Anteil von apoptotischen Zellen bei Expression aller HyBcl-2-like und HyBak-like Proteine. Zum Vergleich wurde der Anteil von apoptotischen Zellen bei Expression von humaner Caspase 8 bestimmt.

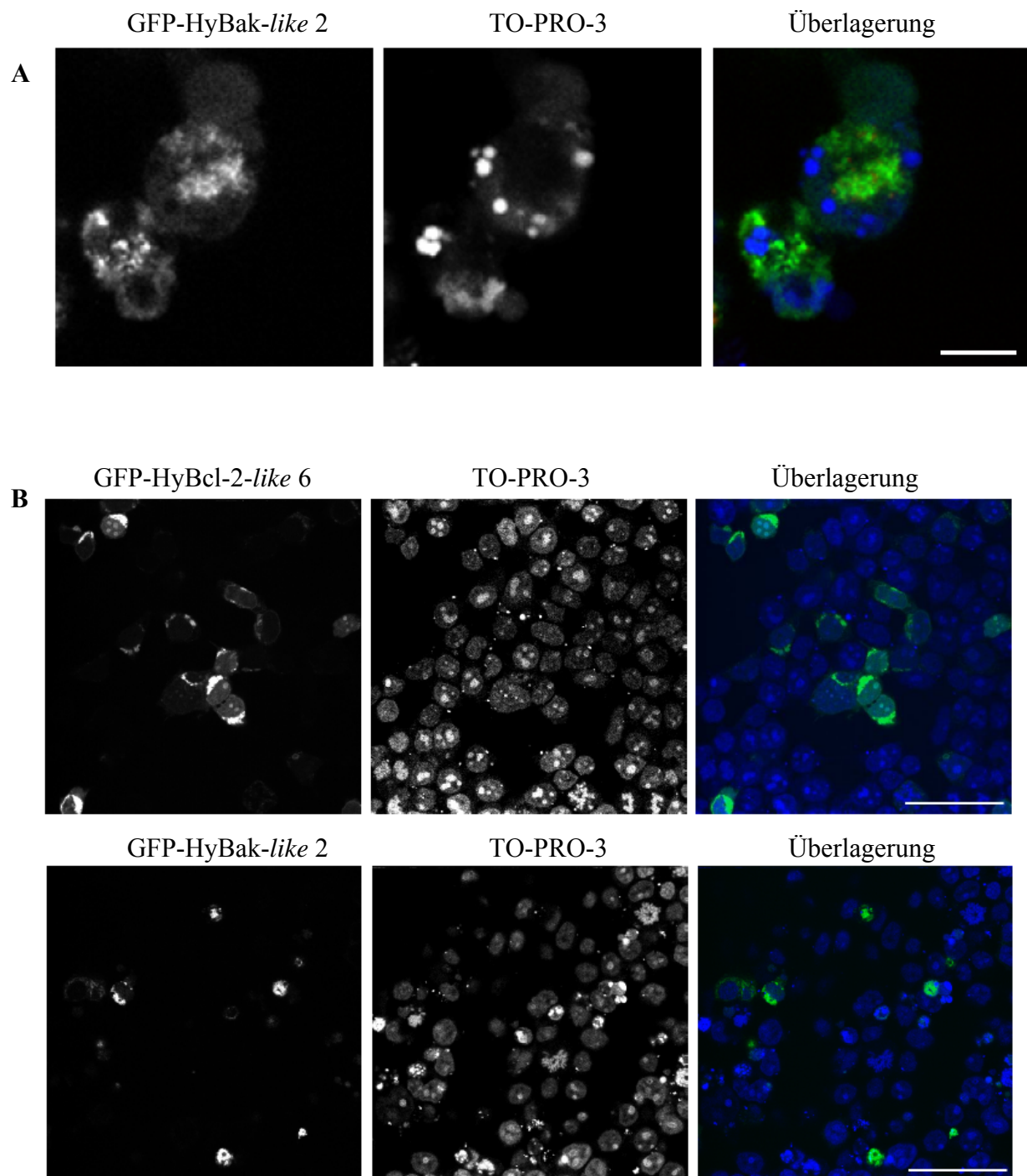


Abb. 24: Expression der HyBcl-like und HyBak-like Proteine in HEK 293T-Zellen (fortgesetzt auf der nächsten Seite).

C

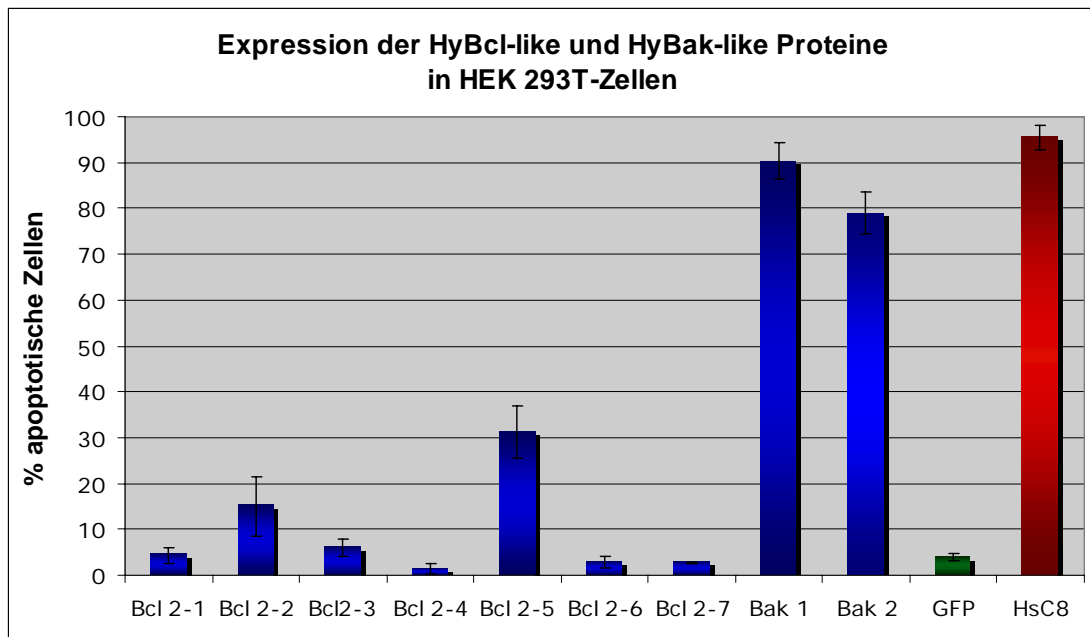


Abb. 24: Expression der HyBcl-like und HyBak-like Proteine in HEK 293T-Zellen. (A) Expression von GFP-HyBak-like 2 in HEK 293T-Zellen. Eine Färbung der DNA mit TO-PRO-3 zeigt einen apoptotischen Zellkern. In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün, das TO-PRO-3-Signal in blau dargestellt. Die Abbildung zeigt optische Schnitte mit einer Dicke von 0,5 μm , der Größenmaßstab beträgt 10 μm . In (B) sind Überblicksbilder dargestellt, die das morphologische Bild der transfizierten Zellen zeigen, die ein antiapoptotisches (HyBcl-2-like 6) oder proapoptotisches (HyBak-like 2) Protein exprimieren. In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün, das TO-PRO-3-Signal in blau dargestellt. Die Abbildung zeigt optische Schnitte mit einer Dicke von 0,5 μm , der Größenmaßstab beträgt 50 μm . (C) zeigt den prozentualen Anteil von apoptotischen Zellen bei Überexpression der Hydra-Proteine in HEK 293T-Zellen. Als Kontrollen dienten die Expression von GFP und humaner Caspase 8. Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Proteine HyBak-like 1 und 2 in diesem Versuch stark proapoptotisch wirkten. Sie lösten beinahe ebensoviel Apoptose aus wie humane Caspase 8. Auch das Protein HyBcl-2-like 5 löste in gewissem Maße Apoptose aus. Alle anderen Proteine waren in diesem System nicht proapoptotisch. Das Ergebnis zeigt, dass die Hydra Proteine offensichtlich mit den humanen Bcl-2 Proteinen in diesen Zellen interagieren. Diese Interaktion sollte über die BH3 Domäne vermittelt werden. Die wichtigste Aminosäure ist dabei ein Leucin an Position 1 der Kernsequenz (siehe Abbildung 15), welche in allen bekannten Bcl-Proteinen vorhanden ist. In humanen Proteinen führt die Deletion des Leucins zu einer funktionslosen BH3 Domäne (Wang et al., 1998). Dieses Leucin ist auch in den HyBcl-2-like Proteinen konserviert (siehe Abbildung 25).


```

HsBcl-2      -VPPVVHLTLRQAGDDFSRRYRRD----
HsBax        -STKKLSECLKRIIGDEL-DSNMELQ---
HyBcl-2-like 1  ---TTTVVTLRRVSSELEDMHIDF----
HyBcl-2-like 2  RKETELMMRLVE---EIEIKHELFD---
HyBcl-2-like 3  ---TTTAVTLRRVSSELEDMHIDF----
HyBcl-2-like 4  ---IEIAKTLQRVGDELESANTDF----
HyBcl-2-like 5  -KIGEKVFE LCL---ELVSKHETF----
HyBcl-2-like 6  SHLFTTVAKLCSNM-ELDNAFF-----
HyBcl-2-like 7  -PVDIIIAILQLKNSLLKLSPLGLYN---
HyBak-like1   -ETENLGRV LASFGEINDKYRQVF---
HyBak-like2   --IHKAVQILLEEQGGIAIQKYHHAF---

```

Abb. 25: Sequenzvergleich der BH3 Domäne von humanem Bcl-2 (Zugangsnummer NP_000624) bzw. Bax (Zugangsnummer NP_620116) im Vergleich mit den Hydra Proteinen. Konservierte Aminosäuren die zur Konsensus-Sequenz beitragen sind blau hinterlegt. Das Leucin (rot) an Position 1 der Kernsequenz ist stets konserviert.

Um die Spezifität der proapoptotischen Effekte von HyBak-*like* 1 zu testen, wurde dieses Leucin gegen Glutaminsäure ausgetauscht. Die Punktmutation hob die proapoptotische Wirkung von HyBak-*like* 1 fast vollständig auf, wie Abbildung 26 zeigt.

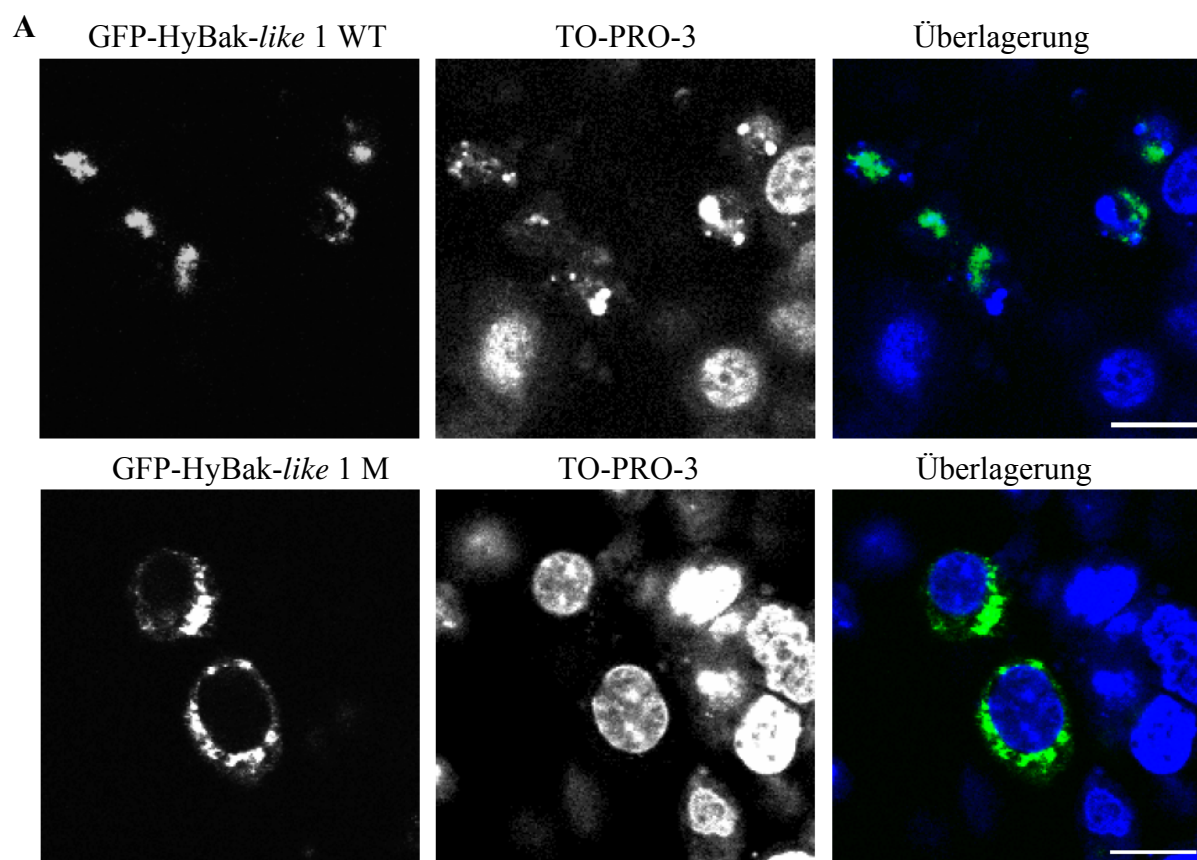


Abb. 26: Expression von HyBak-*like* 1 Wildtyp und HyBak-*like* 1 BH3 Mutante in HEK 293T-Zellen (fortgesetzt auf der nächsten Seite)

B

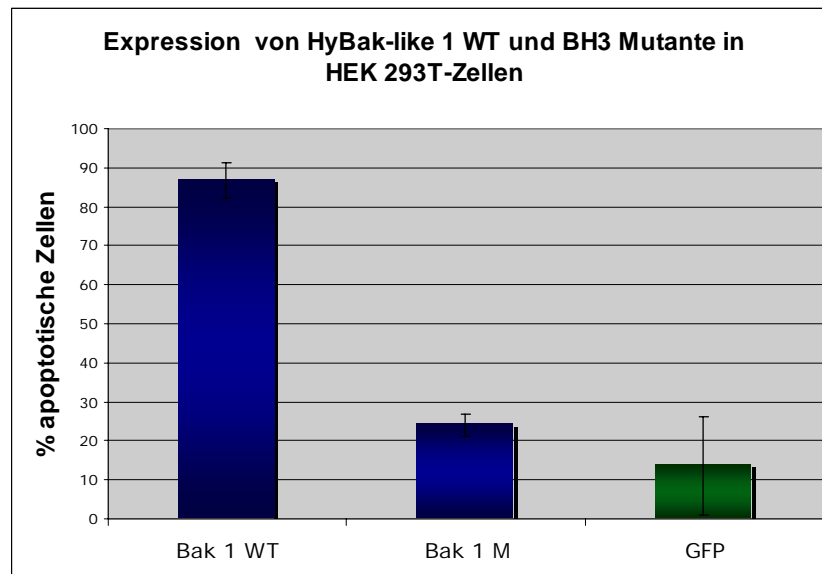


Abb. 26: Expression von HyBak-like 1 Wildtyp und HyBak-like 1 BH3 Mutante in HEK 293T-Zellen. (A) zeigt transfizierte Zellen die HyBak-like 1 Wildtyp oder HyBak-like 1 BH3 Mutante exprimieren. In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün, das TO-PRO-3-Signal in blau dargestellt. Der Größenmaßstab beträgt $10\mu\text{m}$, es sind optische Schnitte mit einer Dicke von $0,5\ \mu\text{m}$ gezeigt. (B) zeigt den prozentualen Anteil von apoptotischen Zellen bei Überexpression von HyBak-like 1 Wildtyp oder BH3 Mutante in HEK 293T-Zellen. Als Kontrolle diente die Expression von GFP. Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

2.1.8. Untersuchung antiapoptotischer Eigenschaften

Im Folgenden wurde untersucht, ob Hydra Bcl-2-like Proteine antiapoptotische Eigenschaften haben. Dazu wurde in HEK 293T-Zellen mit dem Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin Apoptose induziert (Wang et al., 2006; El-Assaad et al., 1998). Nach 24 h in $10\mu\text{M}$ Camptothecin wurden die Zellen fixiert und der Anteil an apoptotischen Zellen bestimmt. In Abbildung 27 ist ersichtlich, dass diese Behandlung bei 75% der GFP exprimierenden Zellen zur Apoptose führte (Kontrolle, roter Balken in Abbildung 27). Die Expression der Hydra Bcl-2-like Proteine unterdrückte die durch Camptothecin induzierte Apoptose in verschiedenem Maße. HyBcl-2-like 5, welches in vorangegangenen Versuch Apoptose auslösend war, hatte keinen antiapoptotischen Effekt.

Besonders das gut konservierte HyBcl-2-like 4 senkte die Apoptose von 75% (Kontrolle) auf nur 10%. HyBcl-2-like 1, 2 und 3 unterdrückten zwar auch Apoptose, aber der Effekt war nicht so stark. Diese Proteine haben auch eher schlecht konservierte Bcl-2-Homologie-Domänen (vergleiche Abbildung 15). Auch das am ER lokalisierte HyBcl-2-like 7 unterdrückte Apoptose.

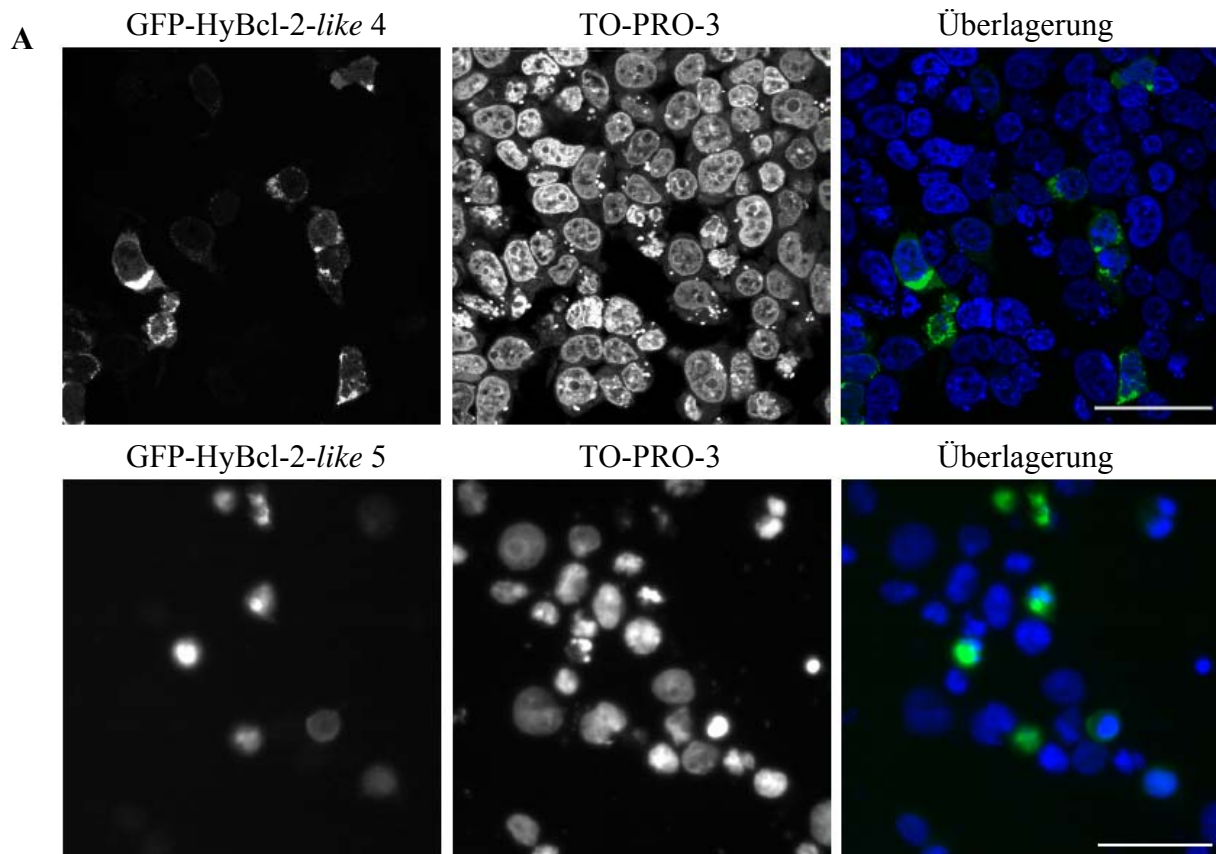
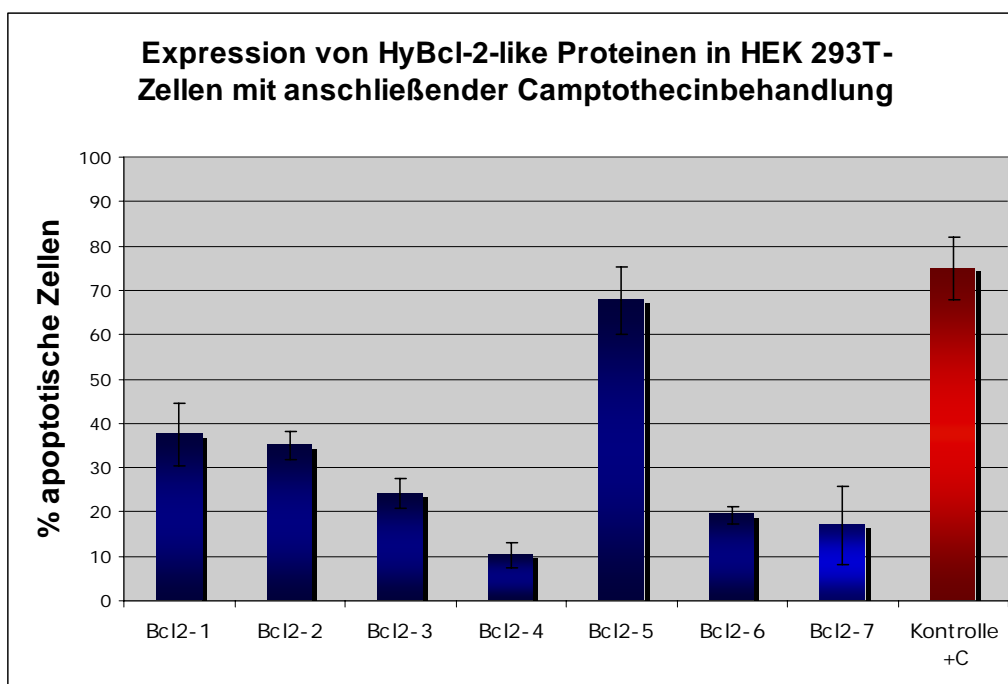
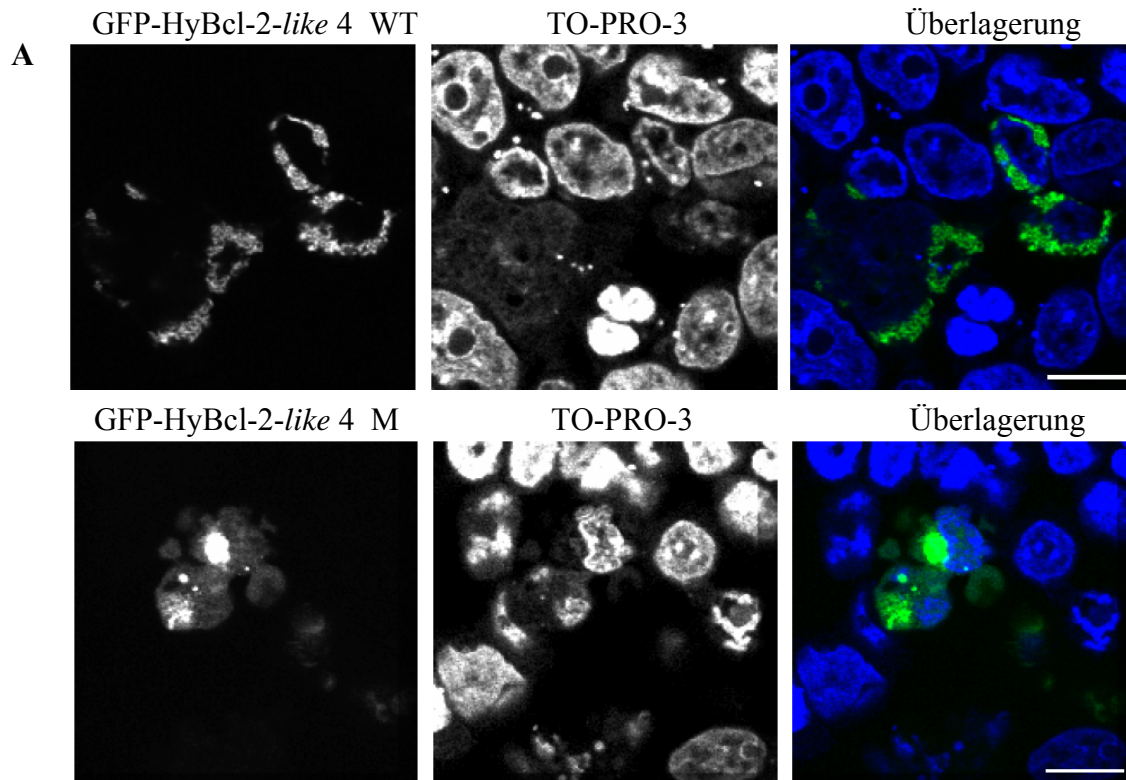
**B**

Abb. 27: Expression der HyBcl-like Proteine in HEK 293T-Zellen mit anschließender Camptothecinbehandlung. In (A) sind transfizierte Zellen gezeigt, die ein antiapoptotisches (HyBcl-2-like 4) Protein oder ein Protein ohne antiapoptotische Wirkung (HyBcl-2-like 5) exprimieren. In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün, das TO-PRO-3-Signal in blau dargestellt. Dargestellt sind optische Schnitte einer Dicke von 0,5 μm , der Größenstandard beträgt 50 μm . (B) zeigt die graphische Darstellung des Anteils von apoptotischen Zellen bei Überexpression der Hydraproteine in HEK 293T-Zellen mit anschließender Camptothecinbehandlung. Als Kontrollen dienten die Expression von GFP. Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Analog dem vorangegangenen Mutageneseversuch (Abschnitt 2.1.7) wurde das konservierte Leucin der BH3 Domäne von HyBcl-2-like 4 gegen Glutaminsäure ausgetauscht. Diese Punktmutante verlor die antiapoptotische Wirkung (Abbildung 28).



B

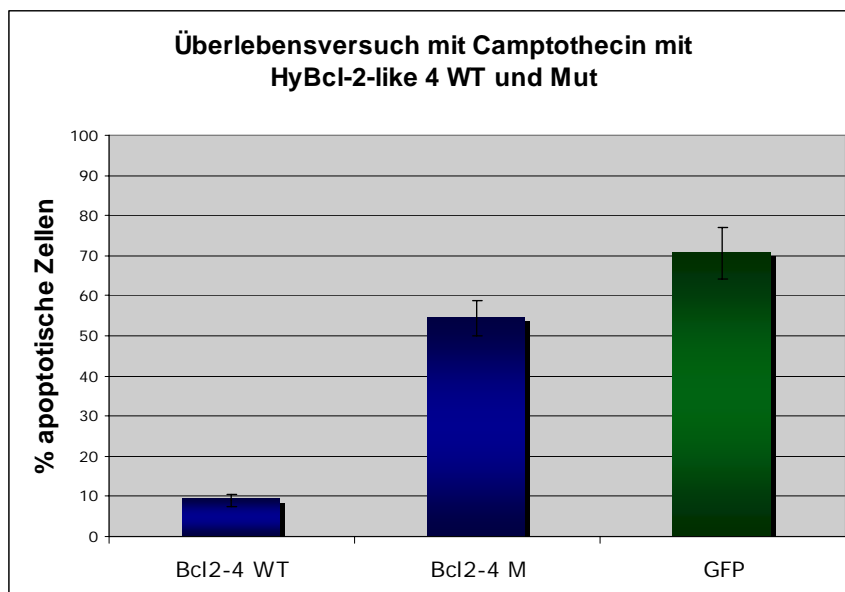


Abb. 28: Expression von HyBcl-2-like 4 Wildtyp und BH3 Mutante in mit Camptothecin behandelten HEK 293T-Zellen. (A) zeigt das morphologische Bild der transfizierten Zellen die HyBcl-2-like 4 Wildtyp oder BH3 Mutante exprimieren. In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün, das TO-PRO-3-Signal in blau dargestellt. Es sind optische Schnitte mit einer Dicke von 0,5µm gezeigt, der Größenstandard beträgt 10µm. (B) zeigt den prozentualen Anteil von apoptotischen Zellen bei Überexpression von HyBcl-2-like 4 Wildtyp oder BH3 Mutante in HEK 293T-Zellen. Als Kontrolle diente die Expression von GFP. Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

2.1.9. Interaktionen im *Yeast-Two-Hybrid* Versuch

Bcl-2 Proteine können Homo- und Heterodimere ausbilden (Oltvai et al., 1993). Die Interaktion geschieht dabei in den meisten Fällen über die BH3-Domäne. Diese ist in den Hydra Proteinen unterschiedlich gut konserviert (siehe Abbildung 15). Auch das Potenzial der HyBcl-2-like Proteine, in HEK 293T-Zellen Apoptose zu induzieren bzw. zu hemmen, war unterschiedlich. Im Folgenden wurden die Interaktionen der HyBcl-2-like Proteine in einem *Yeast-Two-Hybrid* Versuch untersucht. Es wurde das *Grow'n'Glow* System der Firma MoBiTec verwendet. Dieses System ist eine auf LexA basierende Version des originalen *Yeast-Two-Hybrid* Systems (Fields and Song 1989). Es nutzt die Tatsache, dass viele eukaryotische Transkriptionsaktivatoren aus zwei voneinander trennbaren Teilen bestehen: der DNA Bindedomäne und der transkriptionsaktivierenden Domäne. Das *bait* Protein wird dazu von dem Vektor pEG202 exprimiert, um ein Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne von LexA zu erhalten, das *prey* Protein wird exprimiert vom Vektor pJG4-5, wodurch man ein Fusionsprotein mit der transkriptionsaktivierenden Domäne B42 erhält. Binden *bait* und *prey* Protein aneinander, so bindet der Komplex an den LexA Operator, was die Transkription des Reportergens erlaubt. Als Reportergen dienen zum einen der metabolische Reporter LEU2, zum anderen GFP, das über ein drittes Plasmid, pNG1, exprimiert wird. Die Hefen können so direkt nach Wachstum auf dem leucinfreien Medium unter Fluoreszenzlicht auf die Expression von GFP hin untersucht werden (Handbuch *Grow'n'Glow* Kit der Firma MoBiTec, 2004).

Alle Gene der Hydra Bcl-2 Familie wurden jeweils sowohl in den *bait*- als auch in den *prey*-Vektor kloniert (HyBcl-2-like 3 wurde hierbei aufgrund seiner hohen Homologie zu HyBcl-2-like 1 ausgespart). Dies erlaubte sowohl die Untersuchung der Ausbildung von Homo- als auch von Heterodimeren. Außerdem konnten die Interaktionsversuche in beide Richtungen durchgeführt werden. Alle Proteine wurden ohne die C-terminale Transmembrandomäne exprimiert, um zu verhindern, dass ein Fusionsprotein an die Mitochondrienmembran lokalisierte (Sato et al., 1994 und Borgese et al., 2007). Zuerst wurde die Expression der *bait* und *prey* Proteine auf einem Western blot überprüft. Der Nachweis erfolgte mit einem anti-LexA Antikörper für das *bait* Protein und mit einem anti-HA Antikörper für das *prey* Protein. Alle Proteine zeigten eine ausreichende Expression (Abbildung 29).

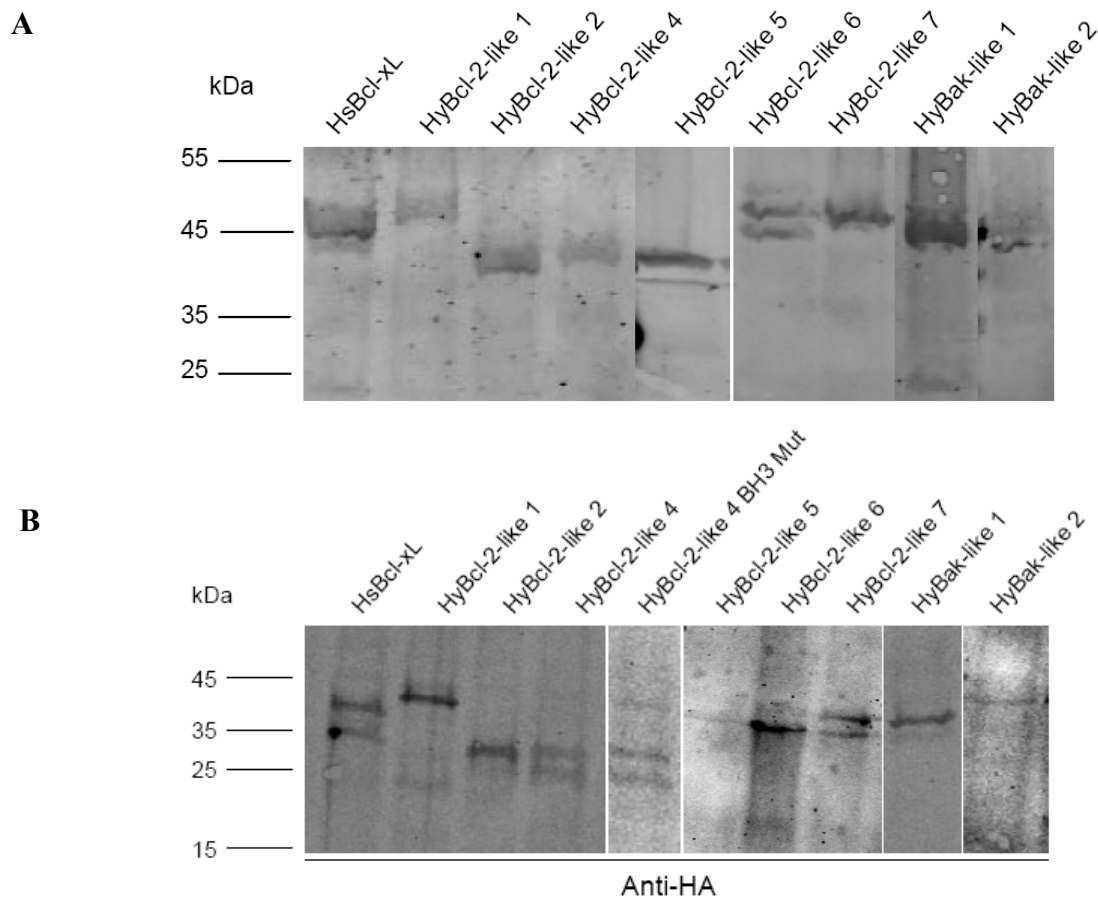


Abb. 29: Western Blot Analyse der Expression von HyBcl-like und HyBak-like Proteinen in Hefe. (A) Expression der *bait*-Proteine (B) Expression der *prey*-Proteine. Der Nachweis erfolgte mit einem LexA bzw. HA Antikörper. Die Hydra Bcl-Proteine sind ohne Transmembrandomäne etwa 20kDa groß, durch die Markierung mit LexA werden 25kDa zugefügt, die HA-Markierung vergrößert das Protein um 12kDa. Alle Proteine befinden sich in Positionen, die diesen Größen entsprechen.

Für alle Fusionsproteine wurde außerdem getestet, ob sie allein die Aktivierung des Leucin- und des GFP-Reportergens verursachten. Dies war nicht der Fall. Als Positivkontrolle diente die Interaktion von humanem p53 mit dem *Large-T-Antigen* (LTA). Zusätzlich wurde die Interaktion aller Hydraproteine mit humanem Bcl-x_L getestet.

Abbildung 30 zeigt das Wachstum von Hefeklonen, die interagierende Klone exprimieren (p53/LTA; HsBcl-x_L/ HsBcl-x_L; HsBcl-x_L/ HyBcl-2-like 4; HyBcl-2-like 4/ HyBcl-2-like 4; HyBak-like1/ HyBcl-2-like 4) auf Galaktose/Raffinose- Platten. Diese Klone exprimieren auch GFP. Eine Punktmutation der BH3 Domäne von HyBcl-2-like 4 (siehe Abschnitt 2.1.7) störte die Interaktion mit HsBcl-x_L, HyBcl-2-like 4 und HyBak-like 1, die Klone konnten nicht wachsen und exprimierten demnach auch kein GFP. Keiner der Klone wuchs auf Platten mit Glukose-Medium. Dies war eine weitere Kontrolle. Die B42-Fusionsproteine werden vom *Gall,10* Promotor gesteuert, der durch Galaktose induziert wird, auf Glukose aber inaktiv ist. Das Wachstum der Hefeklone ist dargestellt in Abbildung 30.

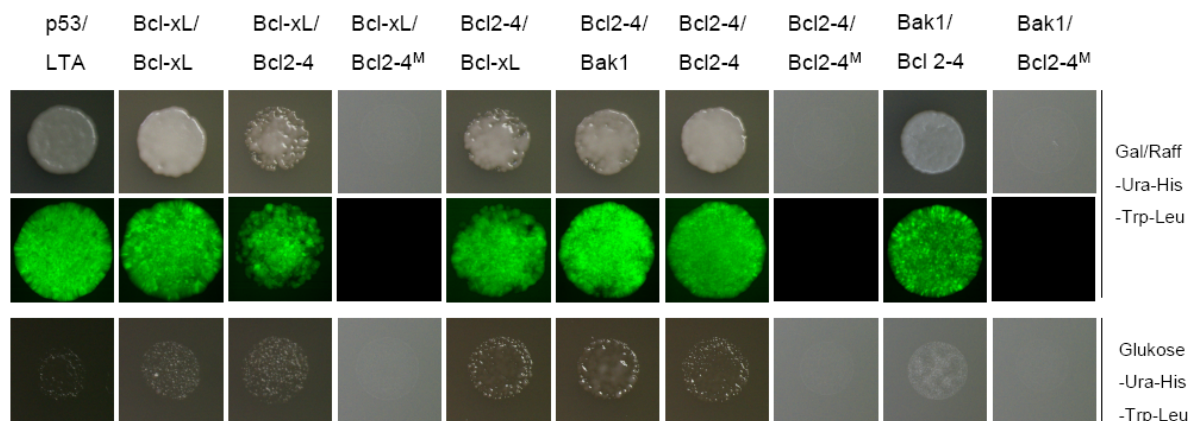


Abb. 30: Interaktionen im *Yeast-Two-Hybrid* Versuch. Hefen in der oberen Reihe wachsen oder wachsen nicht auf galaktose-/raffinosehaltigem Medium. In wachsenden Hefen interagieren die beiden Fusionsproteine. In der mittleren Reihe dargestellt ist der GFP-Reporter. Die Hefen wachsen nicht auf glukosehaltigem Medium (untere Reihe), die Interaktion ist also spezifisch.

In Tabelle 1 sind alle Ergebnisse dargestellt, + steht dabei für stattfindende, - für ausbleibende Interaktion. HyBcl-2-like 4 konnte Homodimere ausbilden und mit humanem Bcl-x_L interagieren. Dies erklärt sein Potential, in HEK 293T-Zellen durch Camptothecin ausgelöste Apoptose zu verhindern. Es fand ebenfalls eine Interaktion von HyBcl-2-like 4 mit HyBak-like 1 statt. Die Punktmutation in der BH3 Domäne von HyBcl-2-like 4 verhinderte diese Interaktionen (siehe Abschnitt 2.1.7). HyBak-like 1 konnte in diesem System nicht mit sich selbst interagieren. Auch fand keine Interaktion mit humanem Bcl-x_L statt. HyBak-like 2 war in diesem System zu keinerlei Interaktion fähig, obwohl es in HEK 293T-Zellen stark proapoptotisch wirkte (siehe Abbildung 24).

prey/bait	Hs Bcl-xL	HyBcl2-1	HyBcl2-2	HyBcl2-4	HyBcl2-5	HyBcl2-6	HyBcl2-7	HyBak 1	HyBak 2	LTA
Hs Bcl-xL	+	-	-	+	-	-	-	-	-	
HyBcl2-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HyBcl2-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HyBcl2-4	+	-	-	+	-	-	-	+	-	
HyBcl2-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HyBcl2-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HyBcl2-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HyBak 1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
HyBak 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
p53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Tabelle 1: Ergebnis des *Yeast-Two-Hybrid* Versuches. Die festgestellten Interaktionen sind mit + markiert und grau hinterlegt.

2.1.10. Suche nach BH3-only Proteinen

BH3-only Proteine sind ein essentieller Baustein der Apoptosemaschinerie. Da sie jedoch außerhalb der BH3 Domäne keinerlei Sequenzhomologie aufweisen, sind sie mit einem *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) des Genoms kaum auffindbar. Im *BLAST* wurde nur ein BNip Protein aufgrund seiner hohen Homologie zu humanem BNip identifiziert. BNip Proteine sind eine Untergruppe der BH3-only Proteine, die erst seit relativ kurzer Zeit bekannt sind (Zhang et al., 2003). Es wurde daher versucht, BH3-only Gene über bioinformatische Homologiesuche mittels eines sequenzspezifischen Profils zu finden (Dr. Johannes Söding, Genzentrum LMU). Als Vorlage dienten BH3-only Struktur- und Sequenzmotive aus anderen Organismen. Es wurde für alle vorhergesagten *Open-Reading-Frames* aus Hydra und für ein BH3-Domänen-Alignment ein *Hidden Markov Model* (HMM) erstellt (Biegert und Söding, 2009). Das BH3-Domänen HMM wurde mit den Hydra-Genvorhersagen-HMMs mit der Software *HHsearch* verglichen. Als Ergebnis erhielt man 14 potentielle Kandidaten für BH3-only Proteine in Hydra. Diese wurden dann weiterhin untersucht. Acht Proteine waren die bereits bekannten Mitglieder der Bcl-2 Familie, die wegen ihrer BH3-Domäne in dieser Suche auch gefunden wurden. Die restlichen 6 Proteine stellten gute Kandidaten für BH3-only Proteine dar. Abbildung 31 zeigt ein Alignment der BH3-Domänen der gefundenen Proteine im Vergleich mit bekannten BH3-only Proteinen.

ce EGL-1	EIGSKLAAMCDDFDAQMM
hsBik	ALALRLACIGDEMDVSLR
hsBad	RYGRELRRMSDEFVDSFK
hsBid	NIARHLAQVGDSDRSIP
hsDP5/Hrk	LTAARLKAI GDELHQRTM
mm Blk	QVALRLACIGDEMDLCLR
hsBimL/Bod	WIAQELRRIGDEFNAYYA
hs Noxa	ECATQLRRFGDKLNFRQK
Hma2.230679	EVATKLACVGDEIQE---
Hma2.221399	-IGACLRAIGDDIQ----
Hma2.204719	-----LAMLGEQFMV---
Hma2.218794	-----LQSFGDDFDDQFK
Hma2.229779	-LYDVVKNMGLILEMKY-
Hma2.224514	-----TIVMGDELNMRV-
konsensus	.IA..LRRIGDEFD....

Abb. 31: Sequenzvergleich von BH3 Domänen. Verglichen wurden die BH3 Domänen von potentiellen Hydra BH3-only Proteinen (Hma 2.) mit *C.elegans* EGL-1, *H.sapiens* Bik, Bad, Bid, Hrk, Bod und NOXA und Maus Blk. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm Clustal X berechnet, Aminosäuren vom gleichen Typ wurde die gleiche Farbe zugewiesen. Das Motiv LXXXGDE bildet das Kernstück der BH3 Domäne, die Konservierung ist hier besonders stark.

Diese sechs Proteine und das BNip1 Homologe wurden weiterhin bioinformatisch untersucht. Von allen Genen, bis auf BNip1, sind *Expressed Sequence Tag* (EST) Sequenzen in der Hydradatenbank (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) vorhanden, das heißt, es findet sicher Genexpression statt. In den Sequenzen von Hma2.229779, Hma2.224514 und in BNip1 kann man eine Transmembrandomäne finden. C-terminale Transmembrandomänen sind nicht in allen BH3-*only* Proteinen zu finden. So tragen Bik und Bim eine in sich, jedoch nicht Puma und Noxa. Eine hohe Homologie zu BH1, BH2 und BH4 Domänen konnte in Hma2.229779 gefunden werden, daher ist anzunehmen, dass es sich hier um ein weiteres Mitglied der Bcl-2 Multidomänenfamilie handelt. Hma2.204719 hat hohe Sequenzhomologie zu eIF4E-1 (eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E), möglicherweise ist hier die BH3-Sequenzhomologie Zufall. Die restlichen Genmodelle zeigen außer der gut konservierten BH3 Domäne keine Homologie zu bisher bekannten Genen. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst dargestellt.

	EST	TM	Homologe	Bewertung
Hma2.230679	ja	nein	keine	BH3- <i>only</i>
Hma2.221399	ja	nein	keine	BH3- <i>only</i>
Hma2.204719	ja	nein	eIF4E-1	eIF4E-1
Hma2.218794	ja	nein	keine	BH3- <i>only</i>
Hma2.229779	ja	ja	Bcl-2; Bok	Bcl-2 Multidomain
Hma2.224514	ja	ja	keine	BH3- <i>only</i>
BNip1	nein	ja	BNip1	BH3- <i>only</i> BNip1

Tabelle 2: Zusammenfassung der bioinformatischen Analysen der möglichen BH3-*only* Gene.
EST = *Expressed Sequence Tag*, TM= Transmembrandomäne

Als viel versprechende Kandidaten für BH3-*only* Proteine bleiben Hma2.230679, Hma2.221399, Hma2.218794, Hma2.224514 übrig. Deren Sequenzen sind in Abbildung 32 gezeigt.

Hma2.230679: 296 Aminosäuren lang, keine Transmembrandomäne vorhanden
 MVKFFSFQLFFFFRKDSLASTLEVLHSTVDGLEDHKKDRVGTVP EIKRVGI IPEIKRVGIV
 AEMKRVGTVP EIKRVVTIPEIKREGTVAEIKRVGTVP EIKRVGTVP EKKGF MKDYSKI IN
 IVVHYVPRNSQLQRDAGRTLKSGNMSEIAGMTPILSRSSGAYDENYLVGSLIKSDDFDHR
 SDVGDQRL LKPC LMPYEIVEYQPSVPTQEGPTQE QIK **EVATKLACVGDEIQEEYVKNKE**
 FLKVQSLALYSLIYINNLPDILTSKVALSADNTT IYSYHDMNPALSDCLEGAFELE-

Hma2.221399: 97 Aminosäuren lang, keine Transmembrandomäne vorhanden
 MVFKIFK KKSNESSNTPNVDITEVSARPNRPSLRRI SNESMRRLRA **IGACLRAIGDDIQSR**
 SEKSEDAANHSDEEEQKNLYKNKENMLAESNGRSK-

Hma2.218794: 231 Aminosäuren lang, keine Transmembrandomäne vorhanden
 MDSDDDFDSRPVRRGIKLNND SLHKS IATEGNND SLTVKPRENSN STTATLNTNTAKKS
 FEVYNNELNGVVKDFSKLTVKSKENS DTNNFQADSYTIDNNFDFNFQETIKENSMPFKKSI
 DKNDCLINIPIKASAVVPKEEALCNKVTLIDVASNETLEESAPKPRIKGVKFDLDFVQMS
 NSSDLTIDDSGVASHNTRV PQNF DNSPYSFGV **LQSF GDDFDDQFK** YTNPG-

Hma2.224514: 83 Aminosäuren lang, Transmembrandomäne vorhanden
 MFLMVSHAACHSM PRANLKS RNNHVAVDNANLNEVVYQNI VDT **IIVMGDELNMRV** RREKL **IS**
TVKIALVVGASVFFVWRI TKT-

Abb. 32: Aminosäuresequenzen potentieller Hydra BH3-only Proteine. Die BH3 Domäne ist in gelb gekennzeichnet, zusätzlich der wichtige Kernbereich mit roten Buchstaben markiert. Die Transmembrandomäne in Hma 2.224514 ist in türkis gekennzeichnet.

2.1.11. Hydra APAF-1

Im Folgenden wurde nach einem Homologen des *Apoptotic protease-activating factor-1* (APAF-1) Proteins gesucht. Ausgehend von *EST*-Sequenzen und einem Genmodell wurde die vollständige Sequenz von HyAPAF-1 über ein 5' und 3' *RACE* Experiment bestimmt (Diplomarbeit Wagner, 2009). Es konnte ein sehr gut konserviertes APAF-1 erhalten werden, dessen Aufbau in einem Sequenzvergleich mit humanem APAF-1 in Abbildung 33 dargestellt ist.

Man erkennt eine gut konservierte CARD Domäne (Abbildung 33 rosa gekennzeichnet) und eine NB-ARC-Domäne (Abbildung 33, türkis gekennzeichnet). Außerdem hat HyAPAF-1 sieben WD40 Domänen (Abbildung 33, grün gekennzeichnet). Bei humanem APAF-1 findet man 13 WD40 Domänen.

		CARD Domäne	
HyAPAF-1		MNENQRHILISNRKNISQDLMVEDVLSYLQSKPAINIDDVDAIKLQLTREKVEKLISIL	60
HsAPAF-1		MDAKARNCLLQHREALEKDIKTSYIMDHMISDGFLLTISEEEKVRNEPTQQQRAAMLKMI	60
HyAPAF-1		LLRQSNYFGVFPYSALKYAEYDHLAELLVNSLTSVIDHHDGGDEE--LASYDVILKNGGVE	118
HsAPAF-1		LKKDNDSYVSPYNALLHEGYKDLAALLHLSIPVSSSSSGKDSVSGITSYVVRTVLCGGGVE	120
		NB-ARC Domäne	
HyAPAF-1		SLPQVVFQRNDCIQKVNNAICNLKSE-GWVVLHGMAGCGRTVLAISALNNERMHSFCPG	177
HsAPAF-1		QRFVVFVTRKKLVAIQQKLSKLGEPGWVTIHGMAGCGKSVLAEEAVRDHSLLEGCPFG	180
HyAPAF-1		GVPWINLGGINETRLMLKMNLCLLLDLVHNS-QRVPQNLEEARDRLRILFSSHQPRSLI	236
HsAPAF-1		GVHWVSVGKQDKSGLLMKLNLCRLDQDESFSQRLPLNIEEAKDRLRILMLRKHPRSLI	240
HyAPAF-1		VIDDLWSSSHAKYFNIVHRTLVTRYSAVADQLLEDIYKVPVMEQLHLGQSRQILSKWVN	296
HsAPAF-1		IIDDVWDSWVLKAPDSQCQILLTTRDKSVTDSVMGPKYVVPVLESSLGEKGLEILSLFVN	300
HyAPAF-1		ISIFDLPKEADLIEECKGSPIALSMIGALLKIHKNRWNYLTQLREQKTSKVRSKVAVE	356
HsAPAF-1		MKADLPEQAHSIIECKGSPVVSLIGALLRDFPNRWEYKQLQNKQFKRIRKSSSYD	360
HyAPAF-1		YPSLYDAIAVSNFNDLEEVIKKHYESMVPEENSLIPSKTLETYWELEDEVETEDIMHELIE	416
HsAPAF-1		YEALDEAMSISVEMLREDIKDYITDLSILQKDVKVPKVLKILWDMETEEVEDILQEFVN	420
HyAPAF-1		HSLATKTMNGDNFVSLHGLNSGFLKER-AKDLHLYHSTIVNKYESPFQNDPFLIKEDKY	475
HsAPAF-1		KSLIFCDRNGKSPRYLHDLQVDFLTERKNSQLQDLHKKIITQFORVHQPHTLSPDQEDC	480
HyAPAF-1		ICWY--FVYHLIHAAGNYRKAVELLQDPSWLTFFNLIKVGPAHLIQDYFVFLKEAQSEEDKK	533
HsAPAF-1		MYWYNFLAYHMASAKMHKELCALMPSLDWIKAKTELVGPAHLIHEFVEYRHILD-EKCA	539
HyAPAF-1		NLTDMVRFPSVQSDILSVFQLEIDLIALCRPTSEFVYNLAKTSAQKIINSSDRIFYEW	593
HsAPAF-1		VSENFQEPFLSLNGHLLGRQPPFN-IVQGLCEPETSEVYQQAQKLAQKQEVNDNG-MLYLEW	597
		WD40 Domänen	
HyAPAF-1		INHPQDITDTVLLTSKLGDAVNYCSLSHNTTLAVSCSRDGMVKVWDYLTGAEKISFSGH	653
HsAPAF-1		INR-KNITNLSRLVVRPHTDAVYHACFSEDGQRIASCADKTLQVFKAETGEKLEIKAH	656
HyAPAF-1		DNEVKWCEPSPDDENIISCSDTKIKVWMMRSEEEICLRGHTDEVLCCRY--KNNKWI	711
HsAPAF-1		EDEVLCAPSTDDRFIATCSVDKVKIWNMSMTGELVHTYDEHSEQVNCCHFTNSSHLLL	716
HyAPAF-1		ASTSMDKSLKIWEGISGKLYISFNDHTVNVCCSPSNCNSLVVSCSNDCTTRVWNIKEKS	771
HsAPAF-1		ATGSSDCFLKLDLWLNQKECRNTMFGHTNSVNHCRFSPDDKLLASCADGTLKLDWATSAN	776
HyAPAF-1		MTLVCSSGDFCT-----SCIFSLDDQFIFTSQRFVLKCSKDGDLLEKIE	817
HsAPAF-1		ERKSINVKQFPLNLEDPQEDMEVIVKCSWSADGARIMVAANKIPLFDIHTSGLLGEIH	836
HyAPAF-1		T--ASDILSMALSYNGKHMGLSHQNMCAVMDLSKSEVNNYGHSSWVNSINFSRDGSR	875
HsAPAF-1		TGHHSTIQYCDFSPQNH LAVVALSQYVELWNTDSRSKVADCRGHLSEVHGVMSFDGSS	896
HyAPAF-1		IITASADGACKVWSVKDNMD-VEEKLI PVFVSPESGFYIVVGTNQKR-IKVINECN---	930
HsAPAF-1		FLTSSDDQITIRLWETKKVKNSAVMLKQEVDDVPEQENEVMVLAVDHIRRLQLINGRTGQI	956
HyAPAF-1		-----YAHSSASLQEQFSDLPWGH-----	950
HsAPAF-1		DYLTEAQVSCCLSPHLQYIAPGDENGAIEILELVNNRIFQSRFQHKKTVWHIQFTADEK	1016
HyAPAF-1		-----	
HsAPAF-1		TLISSDDAEIQVWNWQLDKCIFLRGHQETVKDFRLLKNSRLLSWSFDGTVKWNIIITGN	1076
HyAPAF-1		-----	
HsAPAF-1		KEKDFVCHQGTVLSCDISHDATKFSSTADKTAKIWSFDLLLPLHELGRHNGVRCSAFS	1136
HyAPAF-1		-----	
HsAPAF-1		VDSTLLATGDDNGEIRIWNVSNGELLHLCAPLSEEGAATHGGWVTDLCFSPDGKMLISAG	1196
HyAPAF-1		-----	
HsAPAF-1		GYIKWVNVVTGESSQTFYTNGTNLLKIHVSPDPKTYVTVDNLGILYILQTL	1248

Abb. 33: Vergleich der Aminosäuresequenzen und Proteindomänen von HyAPAF-1 und humanem APAF-1

Abbildung 34 zeigt einen Vergleich der Domänenstruktur von APAF-1 Homologen aus Mensch, Hydra, *D.melanogaster* und *C.elegans* (analysiert mit dem Programm SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)).

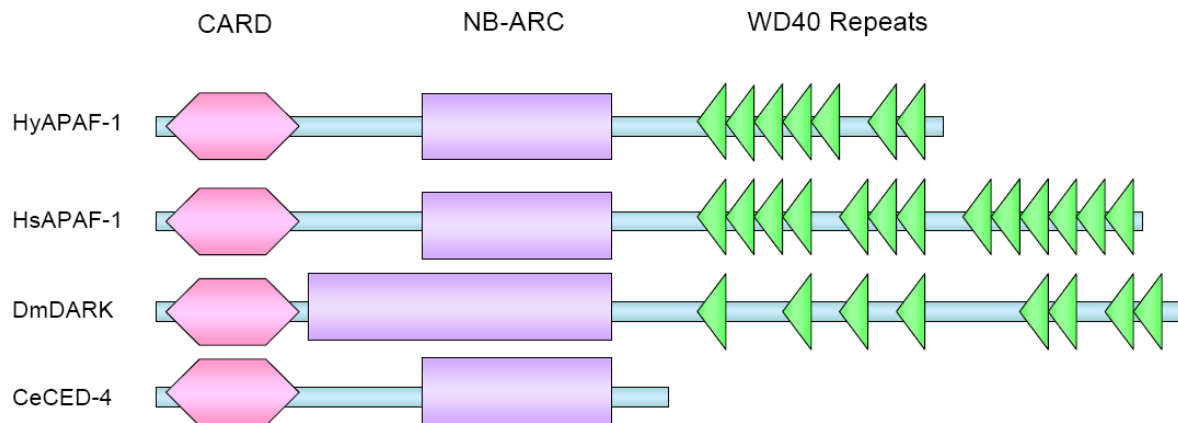


Abb. 34: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen von APAF-1 aus *Hydra vulgaris* (HyAPAF-1), *Homo sapiens* (HsAPAF-1), *D.melanogaster* (DARK) und *C.elegans* (CED-4).

Alle APAF-1 Proteine haben eine konservierte CARD-Domäne am N-Terminus, welche für die Rekrutierung von Caspasen nötig ist. Weiterhin findet man eine NB-ARC Domäne, die ATP binden kann. Große Abweichungen in der Anzahl kann man bei den WD40 Domänen beobachten. Während das Protein aus *C.elegans* Ced-4 gar keine WD40-Domänen hat, kann man bei *D.melanogaster* 8, beim Mensch 13 und bei Hydra 7 finden (Diplomarbeit Wagner, 2009).

Humanes APAF-1 ist im Zytoplasma lokalisiert, während Ced-4 im inaktiven Zustand an den Mitochondrien lokalisiert ist und bei Aktivierung an die Kernmembran transloziert (Hausmann et al., 2000 und Chen et al., 2000). Die Lokalisation von HyAPAF-1 wurde durch die Expression von GFP-Fusionsproteinen untersucht. Dabei wurde sowohl ein N-terminal als auch ein C-terminal GFP-markiertes Protein in Hydraxellen exprimiert. Die Zellen wurden am konfokalen Mikroskop analysiert (Diplomarbeit Wagner, 2009).

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 35 dargestellt.

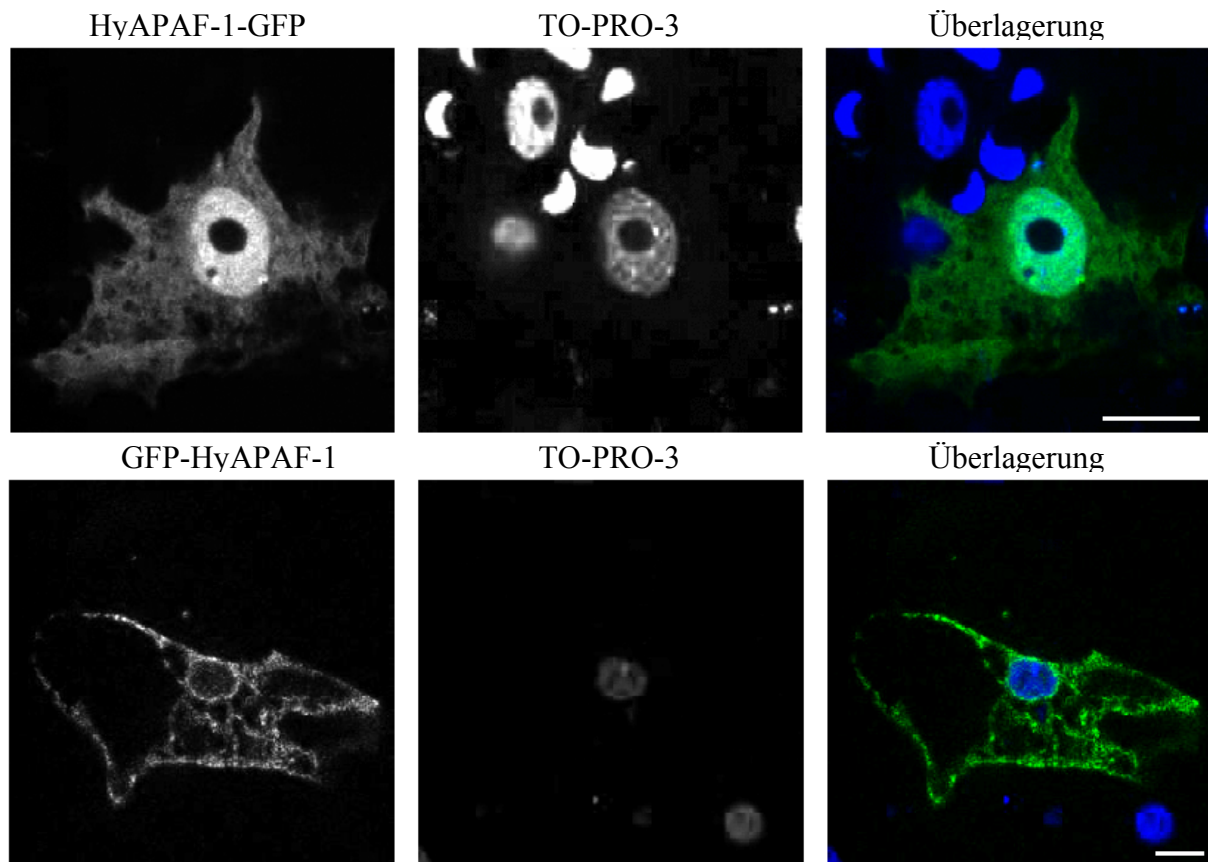


Abb. 35: Expression von HyAPAFAF-1-GFP und GFP-HyAPAFAF-1 in Hydra. Dargestellt sind ektodermale Epithelzellen von *Hydra vulgaris*, die HyAPAFAF-1-GFP (oben) oder GFP-HyAPAFAF-1 (unten) exprimieren. In der Überlagerung ist das GFP-Signal grün und die TO-PRO-3 Färbung blau dargestellt. Bei Expression von GFP-HyAPAFAF-1 ist deutlich die Kernmembran gefärbt, was auf eine ER-Lokalisation schließen lässt. Dargestellt sind optische Schnitte mit einer Dicke von 0,5 μm , der Größenmaßstab beträgt 10 μm (Modifiziert aus Diplomarbeit Wagner, 2009).

Es zeigt sich, dass die Orientierung des GFP die Lokalisation von HyAPAFAF-1 beeinflusst. HyAPAFAF-1-GFP wird im Zytoplasma und im Zellkern exprimiert. Das Expressionsmuster von GFP-HyAPAFAF-1 ähnelt den Strukturen des endoplasmatischen Retikulums. Dies wird bestätigt beim Vergleich der Lokalisation von GFP-HyAPAFAF-1 und dem ER-Marker RFP-HyBI-1 (Abbildung 36).

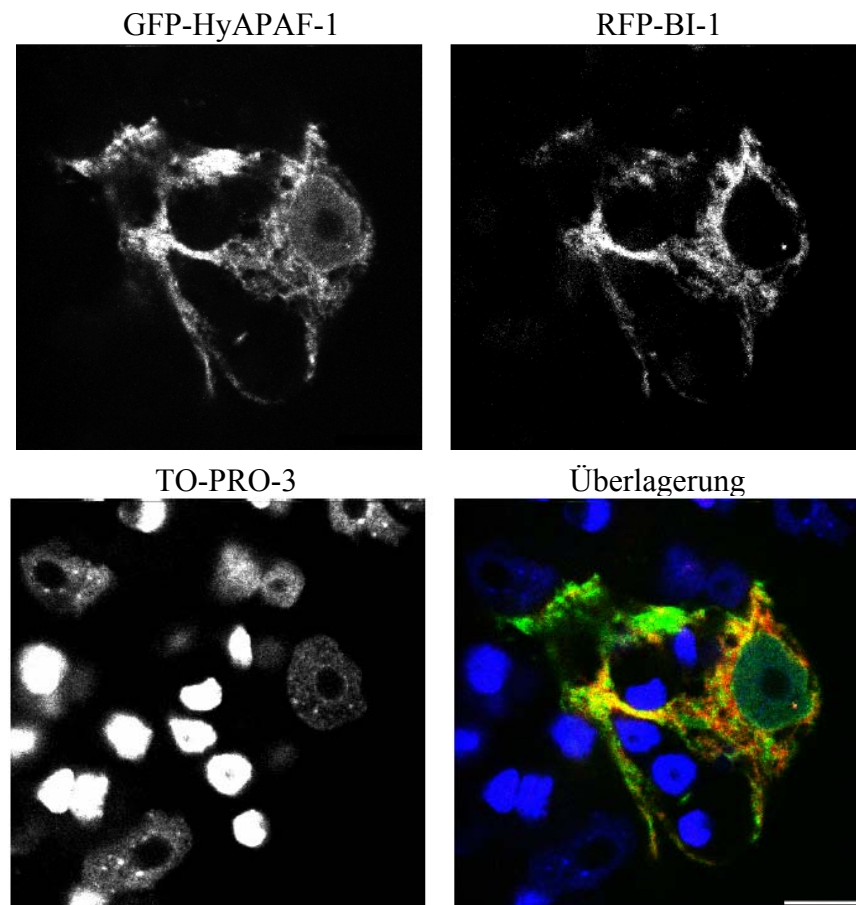


Abb. 36: Ko-Expression von GFP-HyAPAF-1 und RFP-HyBI-1 in einer ektodermalen Epithelzelle von Hydra. In der RGB-Überlagerung wurde GFP-HyAPAF-1 die Farbe grün zugeordnet, RFP-HyBI-1 ist rot dargestellt, die Kernfärbung mit TO-PRO-3 blau. Gelbe Farbe in der RGB Überlagerung zeigt Überlappung der GFP- und RFP-Signale. Dargestellt sind optische Schnitte mit einer Dicke von 0,5 μm , der Größenstandard beträgt 10 μm .

Es ist eine partielle Überlagerung des GFP-HyAPAF-1 mit dem ER festzustellen. In der Literatur war jedoch bislang eine Lokalisation des APAF-1 im ER unbekannt. Möglicherweise spielt der C-terminale Bereich des Proteins eine Rolle bei der Assoziation mit dem ER.

2.1.12. Lokalisation von APAF-1 in Hydra

Zur Herstellung eines anti-HyAPAF-1 Antikörpers wurden Kaninchen mit dem Peptid YAHASSLQEQFSDLPWGHP, das die letzten 20 Aminosäuren des C-Terminus von Hydra APAF-1 repräsentiert, immunisiert. Das Antiserum wurde affinitätsgereinigt. Es erkannte bakteriell hergestelltes HyAPAF-1 im Western Blot (Diplomarbeit Wagner, 2009). Zum Nachweis von endogenem HyAPAF-1 wurden Hydren in isotonischem Puffer Dounce-homogenisiert. Durch differentielle Zentrifugation wurde das Homogenisat in Kern-, Mitochondrien-, Zytoplasma- und Vesikelfractionen getrennt. Die Proteine der

Zellkompartimente sowie ein Lysat aus ganzen Tieren wurden durch SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Western Blot wurde mit dem anti-HyAPAF-1 Antikörper gefärbt. Er zeigte sich eine starke Anreicherung des 108.6 kDa großen HyAPAF-1 in der Mikrosomenfraktion.

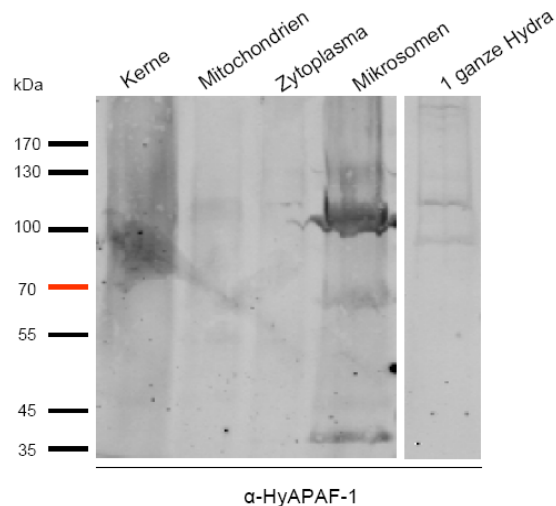


Abb. 37: Analyse von subzellulären Fraktionen von Hydra in einer Western Blot Analyse. Der polyklonale anti-HyAPAF-1 Antikörper aus Kaninchen erkennt endogenes HyAPAF-1 im Western Blot. Analysiert wurden die Kernfraktion von 25 Hydren, die Mitochondrienfraktion von 35 Hydren, die Zytoplasmafraktion von 2.5 Hydren und die Vesikelfraktion von 125 Hydren. Zusätzlich wurde das Lysat einer ganzen unfraktionierten Hydra analysiert.

Anschließend wurde der anti-HyAPAF-1 Antikörper für eine Immunfluoreszenzanalyse an ganzen Hydren verwendet. Es wurden Strukturen gefärbt, die stark an Nervenzellen erinnern (Diplomarbeit Wagner, 2009), was in Abb. 38 zu sehen ist.

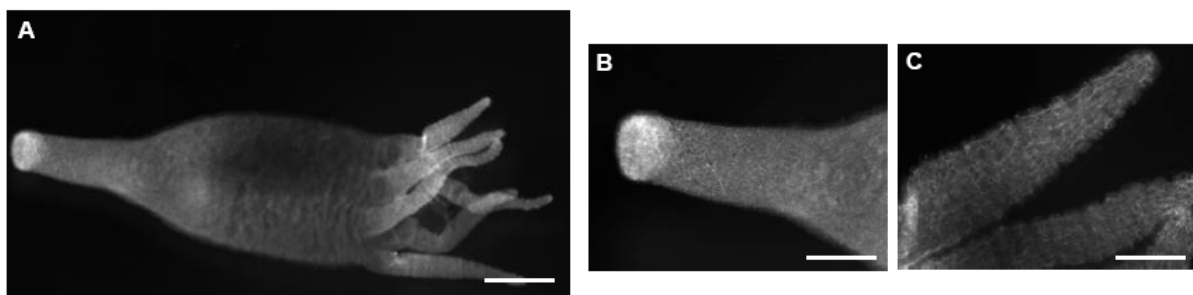


Abb. 38: Immunfluoreszenzfärbung an ganzen Hydren mit dem anti-HyAPAF-1 Antikörper. Der ganze Körper ist gefärbt (A) jedoch besonders stark im Fußbereich (B) und in den Tentakeln (C) (Modifiziert aus Diplomarbeit Wagner, 2009). Maßstab 250 μ m in (A), 125 μ m in (B) und (C).

Eine Gegenfärbung mit dem Nervenzellmarker *Nerve-1* Antikörper bestätigte das (Abb.39)

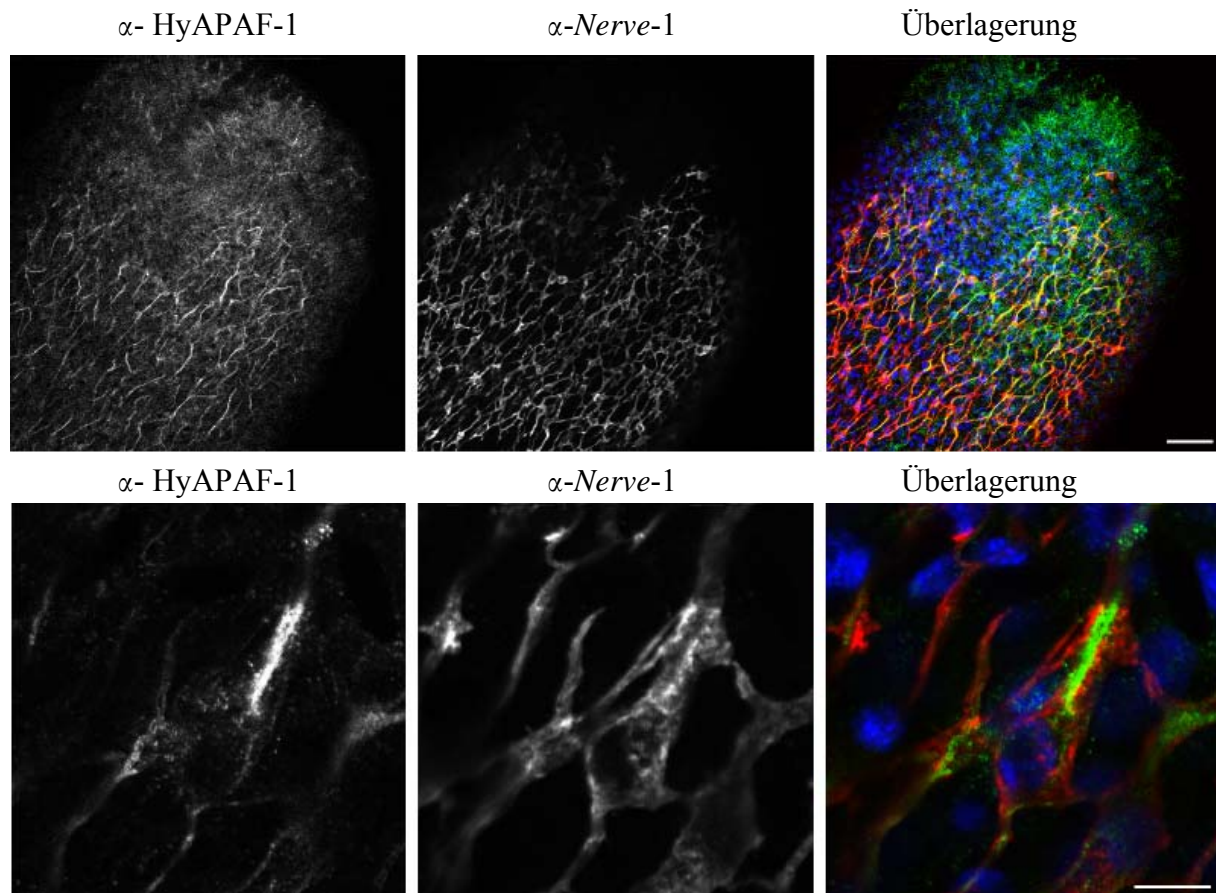


Abb. 39: Immunfluoreszenzfärbung an ganzen Hydren mit dem anti-HyAPAF-1 und dem anti-Nerve-1 Antikörper. In der oberen Reihe ist der Fußbereich, in der unteren Reihe eine Vergrößerung aus dem Fußbereich von Hydra dargestellt. Die Antikörperfärbungen erfolgten mit dem α -HyAPAF-1 Antikörper als ersten und einem anti-Kaninchen Alexa488 Antikörper als zweiten Antikörper bzw. mit dem anti-Nerve-1 Antikörper als ersten und dem anti-Maus Cy3 Antikörper als zweiten Antikörper. In der Überlagerung sieht man eine Lokalisation von HyAPAF-1 (grün) in den Nervenzellen, nicht jedoch eine Ko-Lokalisation mit Nerve-1 (rot). Außerdem sind die mit TO-PRO-3 gefärbten Kerne in blau dargestellt. Dargestellt sind jeweils optische Schnitte mit einer Dicke von 0,5 μm , der Größenmaßstab beträgt in der oberen Reihe 50 μm , in der unteren Reihe 10 μm .

2.1.13. Cytochrom_c in Hydra

Humanes APAF-1 benötigt zur Ausbildung des aktiven Apoptosoms die Bindung von Cytochrom_c. Im Normalfall ist Cytochrom_c im Intermembranraum der Mitochondrien als Komponente der Atmungskette lokalisiert. Es verlässt die Mitochondrien, wenn Apoptose induziert wird. In *C.elegans* ist das nicht der Fall (Yan et al., 2005 und Tan et al, 2007). Über die Beteiligung von Cytochrom_c an der Apoptose in Hydra war bislang nichts bekannt. Um das zu untersuchen, wurde Hydra Cytochrom_c zunächst mit einem anti-Cytochrom_c Antikörper gefärbt. In Abbildung 40 kann man erkennen, dass das Hydra Cytochrom_c mit dem Mitochondrienmarker ko-lokalisiert.

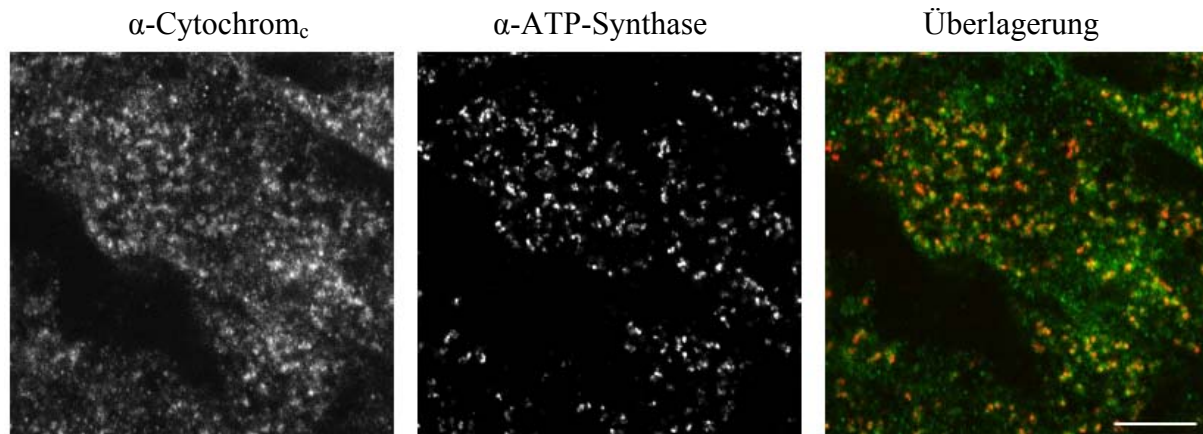


Abb. 40: Ko-Färbung von Cytochrom_c und ATP-Synthase in Hydra. Dargestellt sind optische Schnitte aus der Körpersäule von Hydra mit einer Dicke von 0,3 μm . Die Färbung mit dem Cytochrom_c Antikörper ist in der Überlagerung grün und die Färbung mit dem ATP-Synthase Antikörper rot gefärbt. Die Überlagerung zeigt eine deutliche Überlappung der beiden Signale (gelbe Farbe). Der Größenmaßstab beträgt 10 μm .

Der anti-Cytochrom_c Antikörper zeigte ein starkes Hintergrundsignal. Damit war er nicht geeignet, um die Freisetzung von HyCytochrom_c während der Apoptose zu betrachten. Es stand also kein Antikörper zur Verfügung, der Hydra Cytochrom_c in Immunfluoreszenzanalysen erkennen konnte. Daher wurde ein Versuch unternommen, HyCytochrom_c – GFP in Hydren zu exprimieren und sein Verhalten während der Apoptose zu untersuchen.

Das Gen für Hydra Cytochrom_c konnte als vollständige Genvorhersage im Hydragenom (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) identifiziert werden. Es wurde aus cDNA amplifiziert und kloniert. HyCytochrom_c ist sehr gut konserviert, wie ein Sequenzvergleich mit humanem Cytochrom_c zeigt (Abbildung 41).

HyCyt _c	MGAEKIPTGDATKGAKVFKQRCQAQCHVIDQSGKHKHTGPNLYGLIGRKTGQAPGFSYTOAN	60
HsCyt _c	-----MGDVEKGGKKIFIMKCSQCHTVEKGGKHKHTGPNLHGLFGRKTGQAPGYSYTAAN	53

HyCyt _c	QNKGITWNKDTLWVYLENPSKYIPGTKMVFAGIKKGQERADLIAYLEEECKK	112
HsCyt _c	KNKGIIWGEDTLMEYLENPKKYIPGTKMIFVGIKKKEERADLIAYLKATNE	105

Abb. 41: Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem und Hydra Cytochrom_c. Konservierte Aminosäuren sind in dunkelgrau und ähnliche Aminosäuren in hellgrau hinterlegt. Das Häm-Bindemotiv CXXCH ist mit einem Kästchen gekennzeichnet.

Trotz mehrmaliger Transformationsversuche konnten nur zwei das Fusionsprotein exprimierende Zellen gefunden werden. Auffällig war, dass diese beiden Zellen das Fusionsprotein sehr schwach exprimierten (Abbildung 42).

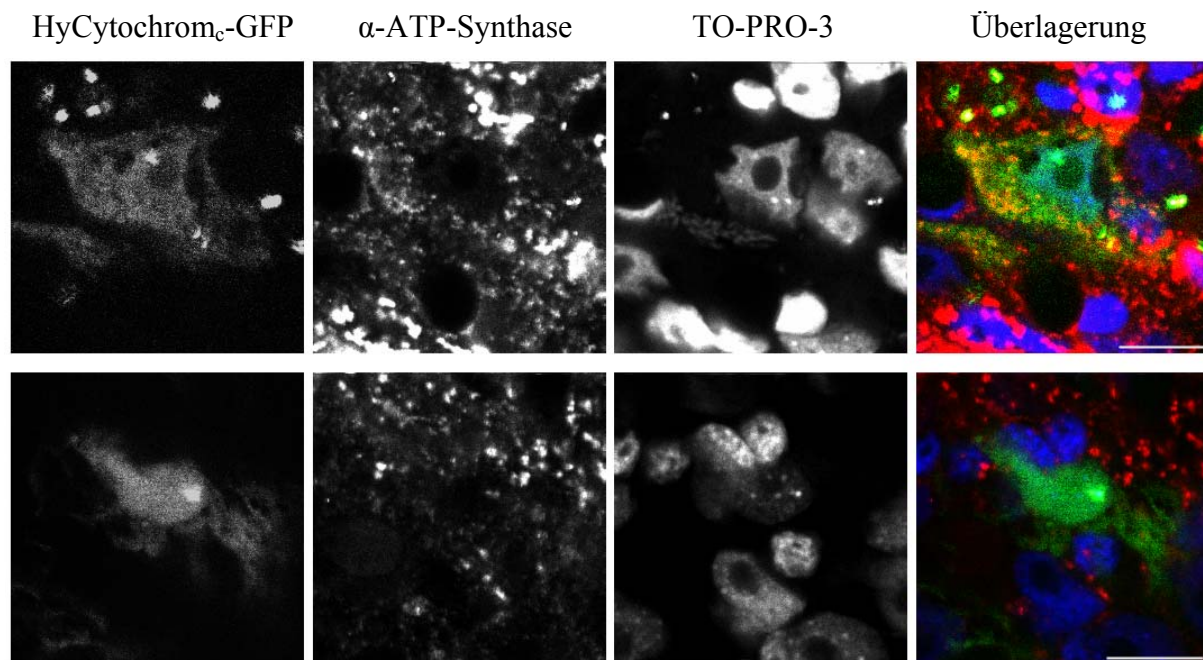


Abb. 42: Expression von HyCytochrom_c-GFP in Epithelzellen von Hydra. Als mitochondrialer Marker diente der anti-ATP-Synthase Antikörper. In den Überlagerungen sind die GFP-Signale in grün, das Signal der ATP-Synthase in rot und die TO-PRO-3 Kernfärbung blau dargestellt. In der oberen Reihe ist eine gesunde Zelle zu sehen, hier zeigt sich in der Überlagerung eine Ko-Lokalisation mit der ATP-Synthase (gelbe Farbe). In der unteren Reihe ist eine Zelle zu erkennen, bei welcher das Zytoplasma bereits kondensiert, der apoptotische Prozess wurde eingeleitet. Der Größenmaßstab beträgt 10 μ m, dargestellt sind optische Schnitte mit einer Dicke von 0,3 μ m.

Die in Abbildung 42 in der oberen Reihe dargestellte Zelle sieht intakt aus, die Zelle in der unteren Reihe aber scheint bereits mit dem apoptotischen Prozess zu beginnen. Während es in der gesunden Zelle noch Überlagerung des Fusionsproteins mit dem mitochondrialen Marker gibt, ist die Verteilung von HyCytochrom_c-GFP in der apoptotischen Zelle sehr diffus. Um eine eindeutige Aussage über die Bedeutung von Hydra Cytochrom_c während der Apoptose treffen zu können, sind in jedem Fall weitere Experimente notwendig.

2.2. Untersuchung der Mitochondrienmorphologie

In den meisten Organismen haben Mitochondrien keine kugelförmige sondern eine tubuläre Gestalt und können auch verzweigte Netzwerke ausbilden. Mitochondrienfusion und auch Mitochondrienteilung sind für eine Zelle von großer Bedeutung. Wird dieser Prozess gestört, so kann die Zelle schweren Schaden nehmen. Für die Regulation der Mitochondrienmorphologie sind viele Proteine bekannt, die meisten davon wurden in *S.cerevisiae* gefunden. Inzwischen wurden viele dieser Proteine auch in den wichtigen Modellorganismen *C.elegans* und *D.melanogaster* entdeckt, sowie in Säugetieren. Da die

Proteine für Fusion und Teilung der Mitochondrien auch mit Proteinen der Bcl-2 Familie interagieren (siehe Abschnitt 1.6.2), wurden diese Proteine in Hydra untersucht. Mit Hilfe des Hydra-Genombrowsers (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) wurde zunächst nach homologen Genen gesucht. Für Mitofusin, Opa-1, PARL, Drp-1 und Fis1 konnten Genvorhersagen gefunden werden. Für diese Gene gibt es auch Homologe in *C.elegans* und in *Drosophila*. Die Gene für Ugo-1, Mdv1, Mdm33 und Caf4 wurden bislang nur in Hefe gefunden und auch in Hydra konnten keine Homologen gefunden werden (siehe Tabelle 3).

<i>H.sapiens</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.elegans</i>	<i>D.melanogaster</i>	<i>H.vulgaris</i>	Eigenschaften
Mitofusin 1/2	Fzo1	Fzo-1	Fzo/dMTFN	unvollständige Genmodelle, aber vollständig kloniert	GTPase in der äußeren Mitochondrienmembran
OPA1	Mgm1	Eat-3	OPA1 (zwei Splicevarianten)	unvollständiges Genmodell	GTPase im mitochondrialen Intermembranraum
PARL	Pcp1	ROM5	Rhomboid 7	vollständiges Genmodell	Für Prozessierung von OPA1 benötigt, in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert
Unbekannt	Ugo1	Unbekannt	Unbekannt	kein Genmodell	In der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, für Fusion benötigt
Drp1/DLP1	Dnm1	Drp1	DLP1	unvollständiges Genmodell	GTPase, die mitochondriale Teilung vermittelt
hFis1	Fis1	Fis1	Fis1	Vollständiges Genmodell, vollständig kloniert	Protein für Mitochondrienteilung in der äußeren Mitochondrienmembran
Unbekannt	Mdv1	Unbekannt	Unbekannt	kein Genmodell	Unterstützt Mitochondrienteilung
Unbekannt	Mdm33	Unbekannt	Unbekannt	kein Genmodell	Unterstützt Mitochondrienteilung
Unbekannt	Caf4	Unbekannt	Unbekannt	kein Genmodell	Unterstützt Mitochondrienteilung

Tabelle 3: Vergleich von Genen aus verschiedenen Organismen, die Mitochondrienteilung oder Mitochondrienfusion vermitteln.

Da die Proteine Mitofusin und Fis 1 einen nachgewiesenen Effekt auf die Mitochondrienmorphologie zeigen (Huang et al., 2007 und Stojanovski et al., 2004) wurden diese beiden Proteine als Repräsentanten für je ein Protein das die Fusionsreaktion bzw. die Teilungsreaktion steuert für die weiteren Versuche ausgewählt.

2.2.1. Klonierung von HyFis1

Die Sequenz von HyFis1 wurde vollständig im Hydragenom gefunden. Das Gen wurde durch PCR aus cDNA amplifiziert, in den TOPO-Vektor kloniert und sequenziert. Das Gen ist 450 bp lang und codiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 16,9 kDa. Abbildung 43 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen von HydraFis1 mit humanem Fis1. Außerdem ist die C-terminale Transmembrandomäne gezeigt, mit welcher Fis1 in die äußere Mitochondrienmembran inseriert.

```

HyFis1  MADFHTHDYIREEDFSRFQNSYNAELRSGKVSPETQFQYGWCLIKSQYKDDIRKGIK LLE 60
HsFis1  -MEAVLNELVSVEDLLKFEKKFQSEKAAGSVSKSTQFEYAWCLVRSKYND DIRKGI V LLE 59

HyFis1  ALCATN--MDSRDFLYFIALGYKLYSEYDKALRFVKRL LNIEPNNAQAKELEKSTESKMK 118
HsFis1  ELLPKGSKEEQRDYVFYLA VGN YRLKEYEKALKYVRGLLQTEPQNNQAKELERLIDKAMK 119

HyFis1  SDGVMGIAMVGGAAIAAVG-GIVLGILLAKRRK 150
HsFis1  KDGLVGM AIVGGMALGVAGLAGLIGLAVSKSKS 152

```

Abb. 43: Sequenzvergleich von Hydra Fis 1 mit humanem Fis 1. In dunkelgrau dargestellt identische Aminosäuren, in hellgrau ähnliche Aminosäuren. Die C-terminale Transmembrandomäne ist mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet.

In dem Sequenzvergleich kann man erkennen, dass das Protein sehr gut konserviert ist. Auch die Transmembrandomäne ist in ihrer Länge und Aminosäuresequenz der humanen sehr ähnlich (Analysiert mit dem Programm *TMHMM* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)).

2.2.2. Lokalisation von HyFis1 in Hydrazellen

Um die Lokalisation und Wirkung von HyFis1 zu untersuchen, wurde GFP-HyFis1 in Hydrazellen exprimiert. Hydren mit GFP-positiven Zellen wurden fixiert und anschließend mit einem Antikörper gegen die α -Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase nachgefärbt.

Abbildung 44 zeigt eine GFP-HyFis1 exprimierende ektodermale Epithelzelle von *Hydra vulgaris*.

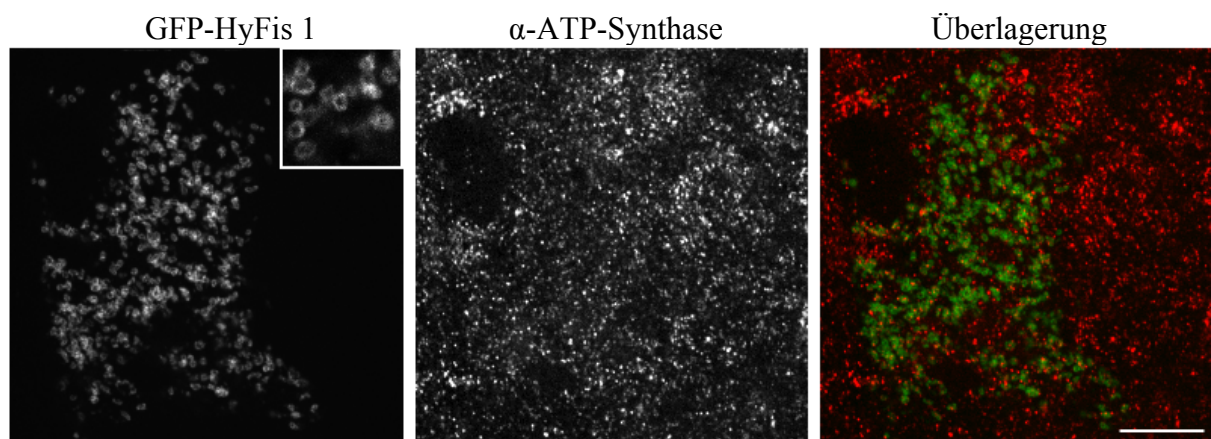


Abb. 44: Expression von GFP-HyFis1 in einer ektodermalen Epithelzelle von *Hydra vulgaris*. Dargestellt sind optische Schnitte einer ektodermalen Epithelzelle von Hydra, die das Fusionsprotein GFP-HyFis1 exprimiert. In der Vergrößerung (Kästchen) sieht man ein ringförmiges Signal. Die Gegenfärbung erfolgte mit dem anti-ATP-Synthase Antikörper. In der Überlagerung ist das GFP-Signal grün und das Signal der ATP-Synthase rot dargestellt. Der Größenmaßstab beträgt 10 μm , die Dicke der optischen Schnitte beträgt 0,3 μm .

GFP-HyFis1 zeigt eine Lokalisation an den Mitochondrien. Man kann erkennen, dass es keine Ko-Lokalisation mit der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten ATP-Synthase gibt. Stattdessen liegt das Signal wie ein Ring um das ATP-Synthase Signal. Dies zeigt, dass HyFis 1 in der äußeren Mitochondrienmembran inseriert ist, wie es auch schon bei den HyBcl-2-like Proteinen beobachtet werden konnte. Eine durch die Überexpression von HyFis1 bedingte Verkürzung oder Fragmentierung der Mitochondrien konnte nicht beobachtet werden. Die Größe der Mitochondrien betrug 500 nm bis 1 μm .

2.2.3. Klonierung von HyMitofusin

Während es von dem Protein Mitofusin in Hefe und im Nematoden jeweils nur eine Form gibt, wurden in Mammalia zwei gefunden, Mitofusin 1 und 2. Beide sind essentiell und erfüllen unterschiedliche Aufgaben (Eura et al., 2003). Im Hydragenombrowser (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) ist kein vollständiges Genmodell vorhanden. Auf dem *Contig* 38049 liegen direkt hintereinander drei Genmodelle (Hma1.115647/46/45), die jeweils einen Abschnitt von HyMitofusin verkörpern. Durch die Identifikation von konservierten Domänen in diesen drei Genmodellen konnte ein vollständiges Modell vorhergesagt werden. Eine Amplifikation des Gens durch RT-PCR bestätigte diese Vorhersage. Das Gen für HyMitofusin ist 2416 bp lang und kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 89,6 kDa. Abbildung 46 zeigt einen Sequenzvergleich von HyMitofusin mit humanem Mitofusin. Aus diesem ist ersichtlich, dass das Protein Hydra Mitofusin sehr gut konserviert ist. Es zeigt *coiled coils*, welche für die Interaktion von Mitofusinen untereinander wichtig sind, eine GTPase Domäne und zwei Transmembrandomänen. Da das Protein so gut konserviert ist, ist anzunehmen, dass die Membrantopologie der für humanes Mitofusin, bzw. Hefe Fzo, gleicht. Hierbei durchlaufen die hydrophoben Transmembranbereiche die äußere Mitochondrienmembran zwei Mal, sowohl der N-Terminus als auch der C-Terminus sind dem Zytosol zugewandt (Abbildung 45).

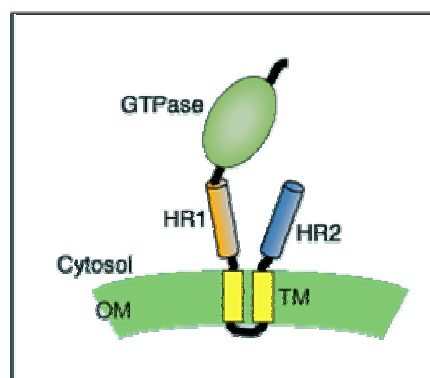


Abbildung 45: Membrantopologie von humanem Mitofusin (David Chan Forschungsgruppe)

HyMFN	MPPGKPFKKTNSIQSDKSMLNNAVVDGPIINSPLQRFVRAKRRVVKIFDDIFTYLKEGRAFL	60
HsMFN	-----MAEPV-SPLKHFVLAKKAITAIFDQLLEFVTEGSHFV	36
HyMFN	LDCDILNQTD-NGVQKSVQQVDGYLSQVVCINEVLLRDHMKVAFFGRTSNGKSTVVNAML	119
HsMFN	EATYKNPELDRIATEDDLVEMQGYKDKLSIIGEVLSRRHMKVAFFGRTSSGKSSVINAML	96
GTPase Domäne		
HyMFN	SDKILPAGIGHTTNCVFVSVIGADGSDAYMEDSITKDRKSVEESLQQLAHALHNNK-LDISS	178
HsMFN	WDKVLPSGIGHITNCFLSVEGTDGDKAYLMTEGSDKESVKTVMNQLAHALHMDKDLKAGC	156
HyMFN	LLNVYWPKSECPLLKDDVVFVDSPIIDVTPDLDCWIDKHCLDADVFLVNVSESTLNQTE	238
HsMFN	LVRVFWPKAKCALLRDDLVLVDSPIIDVTELDLSDWIDKFCLDADVFLVANSESTLMNTE	216
HyMFN	KSFFHKVNTRLSKPNIFILNNRWDASADGEPKIKLVRRQOHLDRITTEFLVDELKCVSRVE	298
HsMFN	KHFFHKVNERLSKPNIFILNNRWDASAS-EPEYMEDVRRQOHLDRITTEFLVDELKCVSRVE	275
HyMFN	AADRIFFVSALEMLRYRISHKNARYTESPLIEEENADTDFKLGKIARRQEFEDFETKFKKE	358
HsMFN	AQNRIFFVSAKEVLSARK-QKAQGMPE-----GVALAEGFHARLQEFQNFQIFEE	326
HyMFN	CISKSAIITKIFYSHATTGITISKEMINHLEQVLAKASSQRAYLQAEREVEVQDSLEYMSSQ	418
HsMFN	CISQSAVKTKFEQHTIRAKQILATVKNIMDSVNLAAEDKRHYSVEEREDQIDRLDFIRNQ	386
coiled coil		
HyMFN	LALVTEQIKLKIKNISEEIGLQVSKAMSEIEIRRLGHLVGDYDFPHPHSGFLKNYKQELH	478
HsMFN	MNLLTLDVKKIKEVTEEVANKVSCAMTDEICRLSVLVDEFCESEFHPNPDVLKIYKSELN	446
HyMFN	THIEKGLGKNLKARCSAPLLESTIEEYKSAMKDKIFSLIPASACSSSTIPATPKTNFVSYSY	538
HsMFN	KHIEDGMGRNLADRCTDEVNALVLQTOQEIENLKPILLPAGIQDKLHTLIPCKKFDLSYN	506
HyMFN	LDVPNLCSDFQEDISFQFSLGWSNLSKYVAPRNPRLAFMLGATFKPHMINLPPDPLAVT	598
HsMFN	LNYHKLCSDFQEDIVFRFSLGWSNLSVHRFLGPRNAQRVLLG---LSEPIFQLER-SLAST	562
HyMFN	PHKNPSDQAASKNDRVISIRQNLDPDLLNFDDDELTMAVIQGLSSLSSTAMAFVAVVSL	658
HsMFN	PT-APTTPATPDN-----ASQEELMITLVTGLASVTSRRTSMGIIIVGGV	605
Transmembrandomänen		
HyMFN	VWKAVGWKLVVALGVSSYVTIYLYERAMWTNAAKEKTFKKQFVEYATERLRLIVSFTSKGC	718
HsMFN	IWKTIIGWKLVSLSLTYGALYLYERLSWTTHAKERAFKQFVNYATEKLRMIVSSTSAAC	665
coiled coil		
HyMFN	SHQIEQELSHTFAQLASQADVAKIKIEERIQELNEEIQRLLEETESKAKLLRNKATFIEND	778
HsMFN	SHQVKQIATTFARLCQVDITQKQLEEEIARLPKEIDQLEKIQNNSKLLRNKAVQLENE	725
HyMFN	LTSFVKDFNLSVSKIF	794
HsMFN	LENFTKQFLSSNEES	741

Abb. 46: Sequenzvergleich von humanem und Hydra Mitofusin. Konservierte Aminosäuren sind in dunkelgrau hinterlegt, ähnliche Aminosäuren in hellgrau. Eingezeichnet sind die GTPase Domäne (grün), die *coiled coil* Regionen (lila) und die beiden Transmembrandomänen (blau). Analyse wurde durchgeführt mit den Programmen *SMART*, *COILS*, *NCBI conserved domain search* und *TMHMM* (Angaben über das humane Protein (Zugangsnummer NP_284941) stammen aus Honda et al., 2005).

2.2.4. Lokalisation von HyMitofusin in Hydrazellen

Hydra Mitofusin wurde in Hydrazellen exprimiert. Es wurde ein unmarkiertes HyMitofusin exprimiert, da Mitofusin N- und C-terminal wichtige Domänen hat, die durch eine Markierung mit z.B. GFP gestört werden würden. Das Gen für HyMitofusin wurde in den Vektor hoT G kloniert, nachdem hier die GFP-kodierende Sequenz eliminiert wurde. Die Hydrazellen, die Hydra Mitofusin exprimierten, wurden durch Ko-Expression von mito-GFP sichtbar gemacht (Müller-Taubenberger et al., 2006).

Abbildung 47 zeigt eine HyMitofusin überexprimierende ektodermale Epithelzelle von *Hydra vulgaris*.

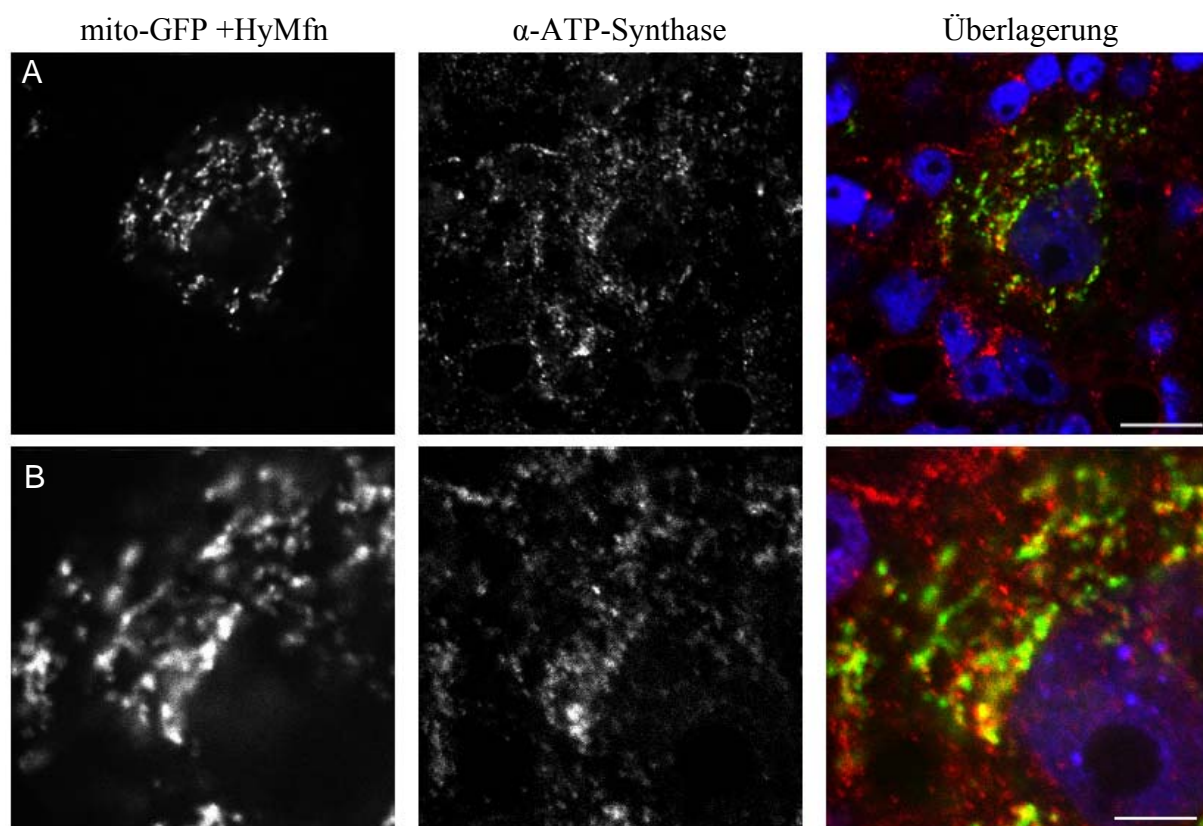


Abb. 47: Ko-Expression von mitochondrialem-GFP und Hydra Mitofusin in Hydra. Es sind optische Schnitte einer ektodermalen Epithelzelle von Hydra gezeigt, die mitochondriales GFP und unmarkiertes HyMitofusin ko-exprimiert. Zusätzlich wurden die Mitochondrien mit dem anti-ATP-Synthase Antikörper gegengefärbt. (B) ist ein vergrößerter Ausschnitt der Zelle aus (A). In der Vergrößerung sind die verlängerten Mitochondrien besonders gut zu erkennen. In der Überlagerung ist das mito-GFP-Signal in grün, das Signal der ATP-Synthase rot und die TO-PRO-3 Kernfärbung blau gefärbt. Der Größenmaßstab in (A) beträgt 10µm, in (B) 5µm, es sind jeweils optische Schnitte mit einer Dicke von 0,3 µm gezeigt.

Man kann deutlich die verlängerten Mitochondrien erkennen. Die Mitochondrien sind bis zu 5µm lang. Diese Wirkung kann man dem Mitofusin zusprechen. Abbildung 48 zeigt den direkten Vergleich zwischen Expression von mito-GFP und mito-GFP in Ko-Expression mit HyMitofusin.

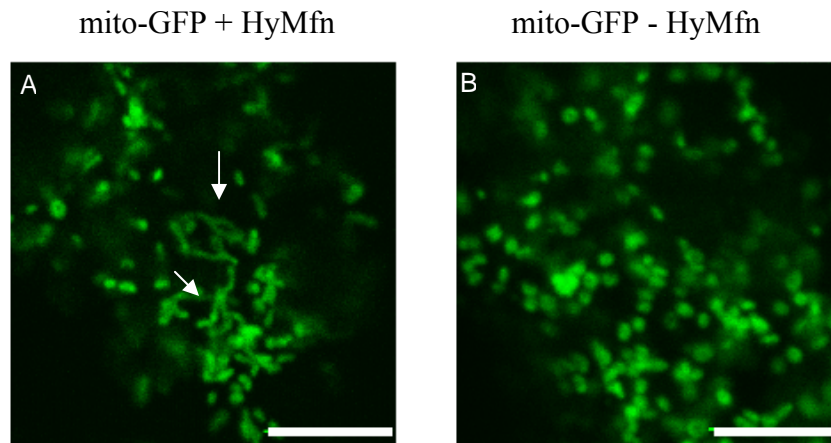


Abb. 48: Expression von mito-GFP in Hydras, mit (A) oder ohne (B) Ko-Expression von HyMitofusin. Besonders verlängerte Mitochondrien sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Der Größenmaßstab beträgt 5µm, dargestellt sind optische Schnitte (Dicke 0,3µm) stark vergrößerter transformierter Hydras.

Dies bedeutet, dass es auch in Hydra Mitochondrienfusion und -teilung gibt. Allerdings weisen Hydras diese Veränderung nur nach Überexpression von HyMitofusin auf.

2.2.5. MitoTracker-Färbung von Hydra Einzelzellen

Es stellte sich die Frage, weshalb Hydra-Mitochondrien im Normalzustand einer Zelle kugelförmig und nicht, wie in anderen Organismen, tubulär sind. Bislang wurden jedoch immer nur ganze Tiere betrachtet. Es wurde nach einer Möglichkeit gesucht, lebende Einzelzellen von Hydra zu untersuchen. Für diesen Versuch wurden Hydras in Einzelzellen dissoziiert (David, 1973) und anschließend mit dem Farbstoff *MitoTracker Green FM* gefärbt. Die Einzelzellen wurden danach sofort im lebenden Zustand am Mikroskop betrachtet. Hierbei konnte ein interessantes Phänomen beobachtet werden, welches in Abbildung 49 dargestellt ist. Die Mitochondrien bildeten tubuläre Strukturen und Netzwerke aus. Diese stehen in starkem Kontrast zur Mitochondrienmorphologie in Abbildung 48 B. Möglicherweise geschah diese Veränderung als Antwort auf den Stress der Dissoziation. Dies bestätigt, dass Mitochondrienfusion auch in Hydra stattfinden kann.

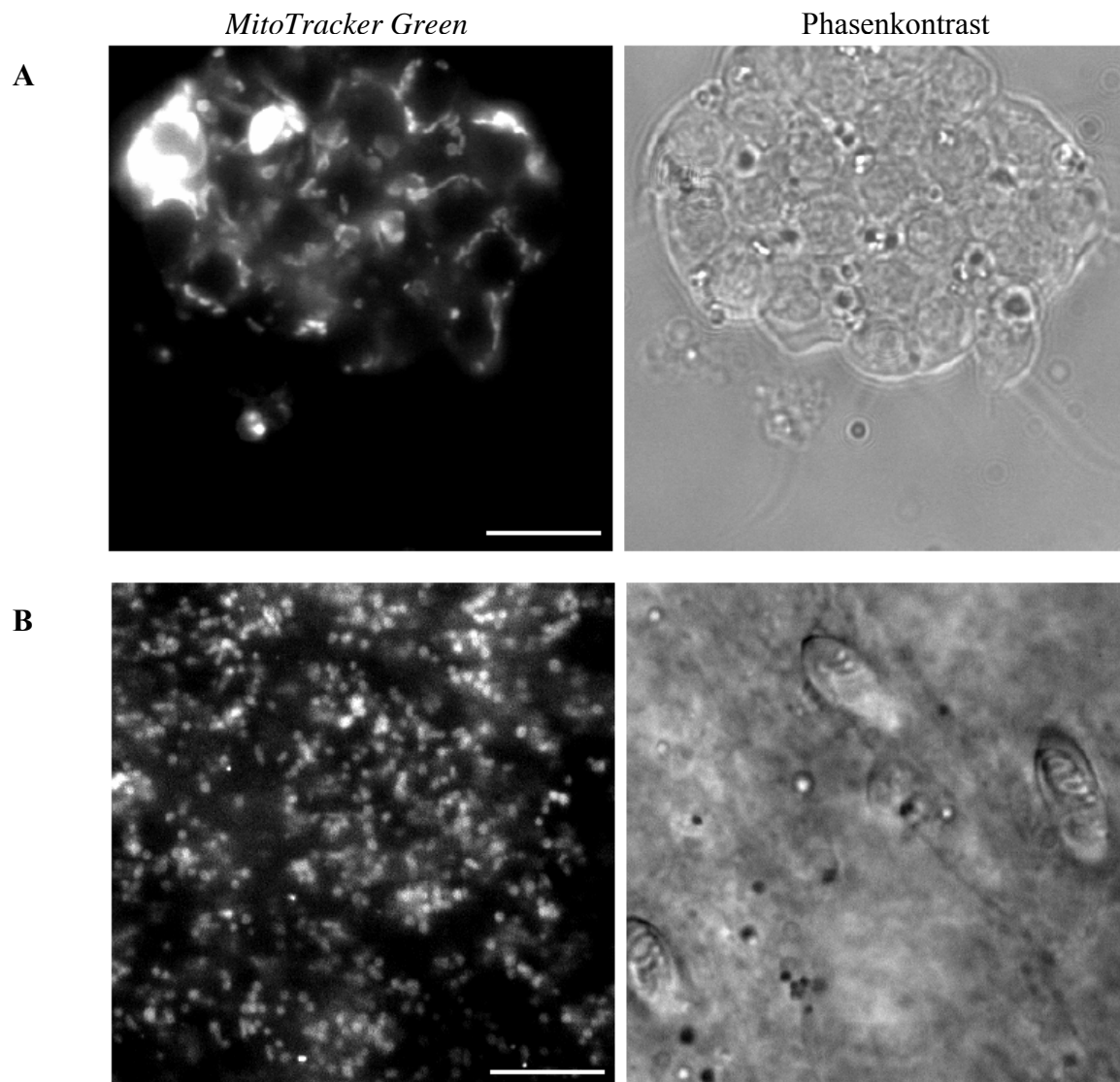


Abb. 49: MitoTracker Green FM Färbung von Hydra-Einzelnzellen und ganzen Hydren. In (A) sind dissoziierte Einzelzellen von *Hydra vulgaris* zu sehen. Es handelt sich um einen Zellhaufen (zu erkennen im Phasenkontrast). (B) zeigt einen Ausschnitt aus der Körpersäule von Hydra. Die Mitochondrien wurden hier ebenfalls mit *MitoTracker Green FM* gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten nach Färbung mit *MitoTracker Green FM* am Fluoreszenzmikroskop. Maßstabsbalken repräsentieren 10 μ m.

2.2.6. Ko-Expression von HyMfn und HyBcl-like Proteinen

Viele Bcl-2 Proteine erfüllen neben den Aufgaben am apoptotischen Vorgang noch weitere Funktionen. Es ist bekannt, dass sie mit Proteinen interagieren, die Mitochondrienfusion und -teilung kontrollieren. Ein Beispiel ist das humane Protein Bcl-x_L, welches über eine Interaktion mit Mitofusin 2 die Mitochondrienfusion anregt (Delivani et al., 2006). Auch im Nematoden *C.elegans* ist eine Interaktion von Ced-9, dem Bcl-2 Homologen, mit Fzo-1 (das Mitofusin Homolog) und Eat-3 (das Opa1 Homolog) bekannt. Diese Interaktionen geschehen oftmals über BH1 und 2 Domänen (Delivani et al., 2006 und Estaquier 2006). Im folgenden Versuch sollte eine mögliche Regulation von Hydra Mitofusin durch die Proteine der Hydra Bcl-2 Familie untersucht werden. Die Zellen wurden mit je drei Plasmiden transfiziert. In jedem Ansatz wurden Mitofusin, ein GFP-markiertes HyBcl-like und der mitochondriale Marker mito-RFP in den Zellen exprimiert (HyBcl-2-like 3 wurde hierbei aufgrund seiner hohen Homologie zu HyBcl-2-like 1 ausgespart). HyBak-like 1 wurde in diesen Versuch nicht einbezogen, da aufgrund dessen stark proapoptischer Eigenschaften nicht genügend Zellen zur Auswertung vorlagen. Das Ergebnis dieser Transfektionen ist in Abbildung 50 A bis G dargestellt (weitere Zellen im Anhang Abbildung 66).

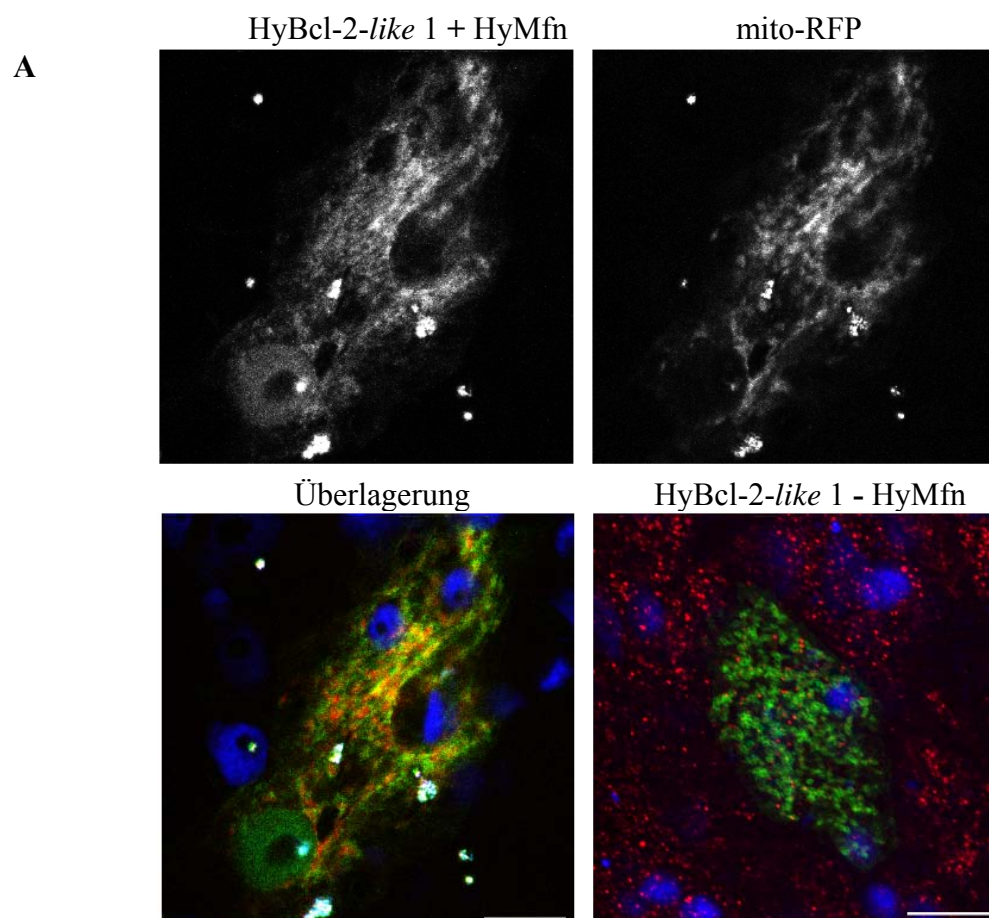


Abb. 50: Analyse der Mitochondrienmorphologie in Hydra bei Ko-Expression von HyBcl-2-like/ HyBak-like Proteinen mit HyMfn (fortgesetzt auf der nächsten Seite).

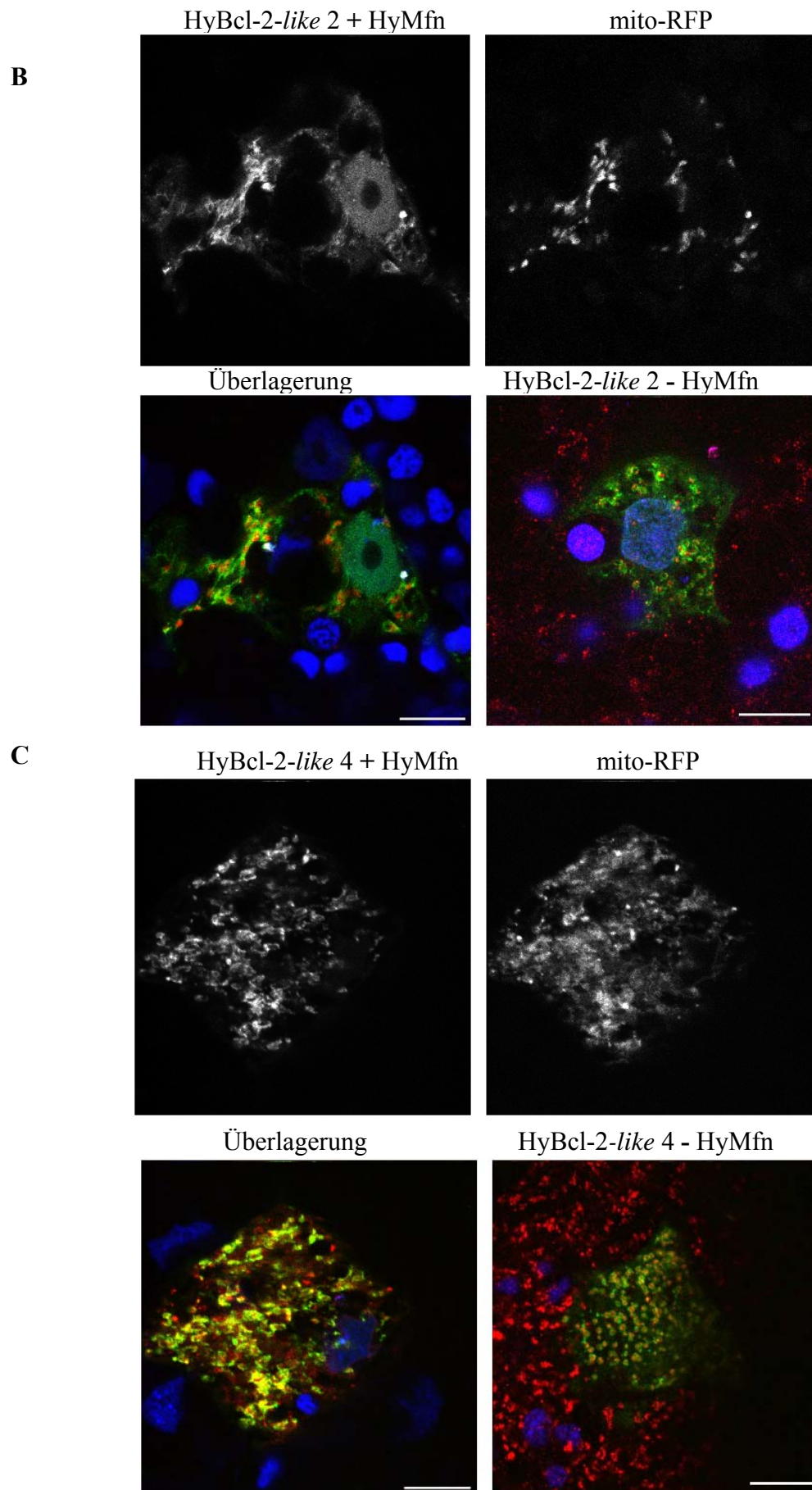


Abb. 50: Analyse der Mitochondrienmorphologie in Hydra bei Ko-Expression von HyBcl-2-like/ HyBak-like Proteinen mit HyMfn (fortgesetzt auf der nächsten Seite).

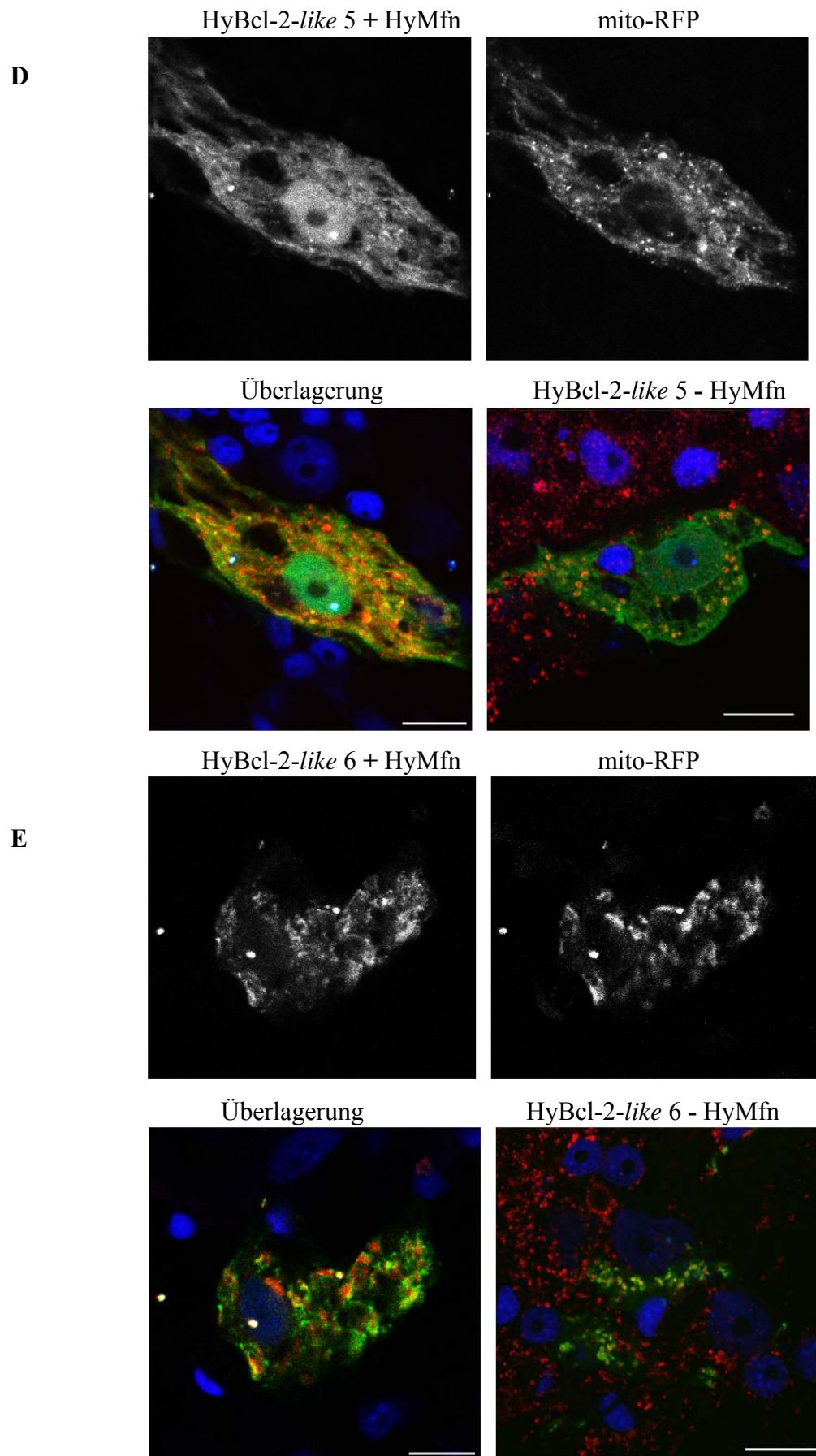


Abb. 50: Analyse der Mitochondrienmorphologie in Hydra bei Ko-Expression von HyBcl-2-like/HyBak-like Proteinen mit HyMfn (fortgesetzt auf der nächsten Seite).

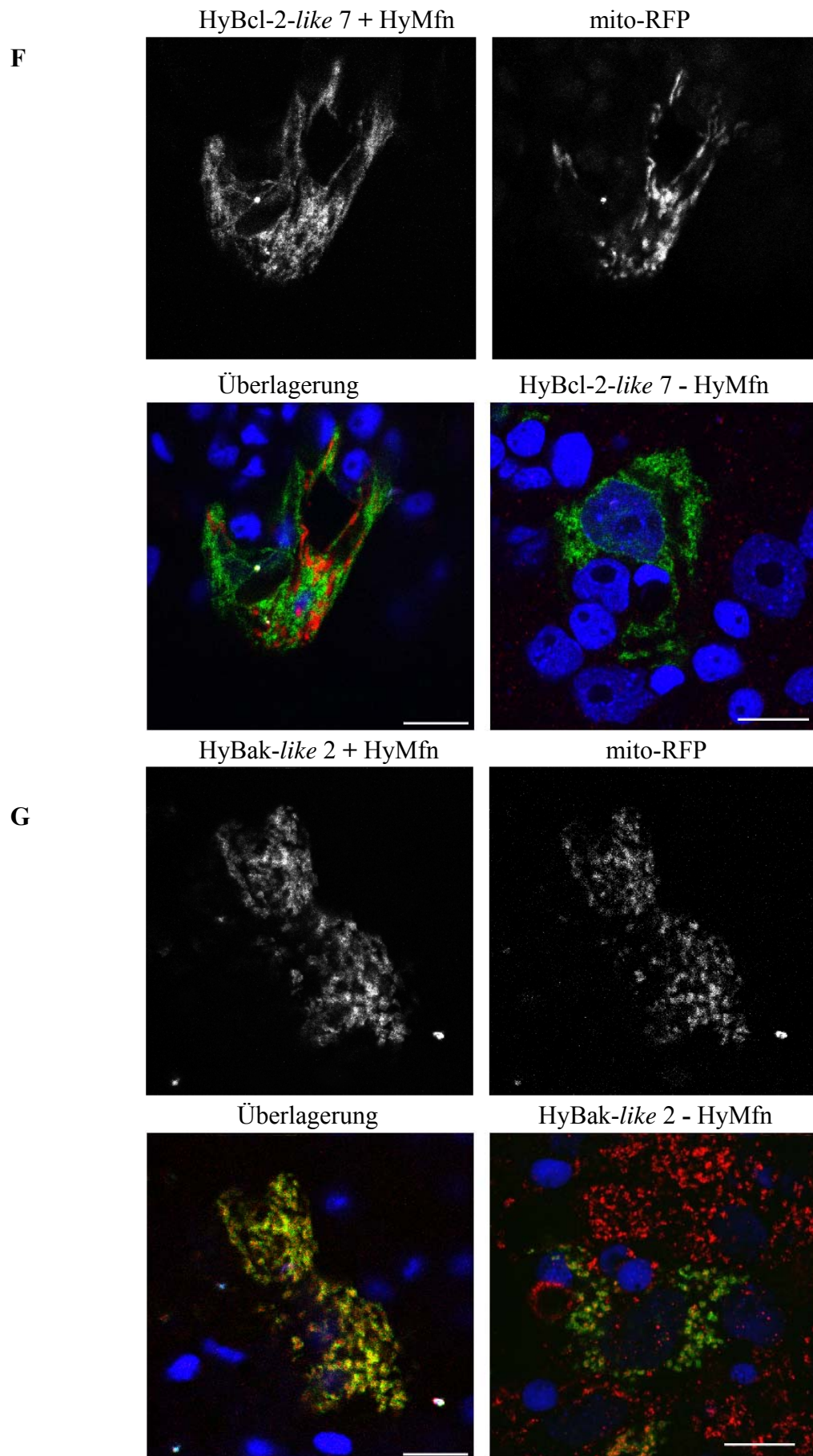


Abb. 50: Analyse der Mitochondrienmorphologie in Hydra bei Ko-Expression von HyBcl-2-*like*/HyBak-*like* Proteinen mit HyMfn (Legende auf der nächsten Seite).

Abb. 50: Analyse der Mitochondrienmorphologie in Hydra bei Ko-Expression von HyBcl-2-like/HyBak-like Proteinen mit HyMfn. Hydraxellen wurden jeweils mit einem GFP-markiertem HyBcl-like Protein, unmarkiertem HyMfn und dem Marker mito-RFP transfiziert. Die Überlagerung der Signale ist ebenfalls dargestellt, hierbei ist das GFP-Signal grün, das RFP-Signal rot und das TO-PRO-3 Kernsignal blau dargestellt. Zusätzlich ist gezeigt, wie sich die HyBcl-like Proteine ohne die Ko-Expression von Mitofusin verhalten hatten (siehe Abschnitt 2.1.4). Maßstab 10µm, dargestellt sind optische Schnitte mit einer Dicke von 0,3 µm.

Abbildung 50 zeigt, dass die Ko-Expression von Hydra Bcl-2 Proteinen eine Auswirkung auf die Wirkung von HyMitofusin hatte. Es sind jedoch Unterschiede zu erkennen. HyBcl-2-like 1 und 2 störten die durch HyMitofusin induzierte Mitochondrienfusion nicht. Teilweise ist eine eigenartige Verteilung der HyBcl-like Proteine auf dem Mitochondrienetzwerk zu erkennen. Das GFP-HyBcl-2-like 1- bzw. 2- Signal scheint sich mit dem Mitochondriensignal abzuwechseln. Die Ko-Expression von HyBcl-2-like 4 und 6 mit HyMfn verhinderte eine Fusion der Mitochondrien zum größten Teil. Es sind aber immer noch fusionierte Mitochondrien zu sehen, was sich in vergrößerten Ringen zeigt. Bei Expression von HyBcl-2-like 5 scheinen die Mitochondrien komplett zerstört worden zu sein. Das gesamte Zytosol zeigt sowohl GFP- als auch RFP-Signal. HyBcl-2-like 7 veränderte die Wirkung von HyMfn nicht. Da es an das ER lokalisiert, war das zu erwarten. Die Expression von HyBak-like 2 verhindert die Fusion von Mitochondrien komplett.

2.3. Untersuchungen am Insulin Signalweg

Im Hydragenom wurden drei Gene gefunden, die für Proinsulin kodieren (R.Steele, unveröffentlichte Daten, siehe Abbildung 12). Diese könnten über die Aktivierung des Hydra-Insulinrezeptors HTK7 (Steele et al., 1996) als Überlebenssignale in Frage kommen. Im Folgenden wurde diese Hypothese getestet.

2.3.1. Herstellung von Antikörpern gegen Hydra Insulin 1, 2 und 3

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen die drei Hydra Insulin-ähnlichen Proteine wurden Peptide synthetisiert und Kaninchen damit immunisiert (Firma Davids). Für den anti-HyInsulin1 Antikörper wurde das Peptid EEKPAHAQALCGNQFLLRWK der β -Kette gewählt, für anti-HyInsulin 2 das Peptid RELRVCTQAFLLQSLKHLC der β -Kette und für anti-HyInsulin 3 das Peptid YHWNAGFSTDVDFIDECCNLK der α -Kette (siehe Abbildung 12). Um die Antikörper in Western Blot Analysen testen zu können, wurden alle drei HyInsulingene in den Vektor pRSET kloniert. Dieser erlaubt die Überexpression von mit dem *xpress* Epitop markierten Proteinen in *E.coli*. Alle Proteine wurden in großem Maßstab exprimiert und denaturierend aufgereinigt.

In Western Blot Analysen zeigten die Antikörper eine Sensitivität von bis zu 200 ng von rekombinantem Protein für anti-HyIns1 und bis zu 500 ng für anti-HyIns2 und anti-HyIns3 (Daten nicht gezeigt), jedoch kein Signal in einem Western Blot, auf welchem subzelluläre Fraktionen von Hydren analysiert wurden. In Immunfluoreszenzanalysen zeigten anti-HyIns1 und -2 Färbung von Kapseln, anti-HyIns3 zeigte kein Signal (Daten nicht gezeigt). Um zu testen, ob die Antikörper überexprimiertes HyProinsulin in einer Immunfluoreszenzanalyse generell erkennen können, wurden HA-markiertes HyProinsulin 1, 2 und 3 in HEK 293T-Zellen überexprimiert und mit dem jeweiligen Antikörper gefärbt. Als Kontrolle diente eine Gegenfärbung mit einem anti-HA Antikörper. Alle drei Antikörper waren in der Lage, das Proinsulin sehr gut (anti-HyInsulin1 und -2 Antikörper) bis mäßig gut (anti-HyIns3) zu erkennen, wobei die anti-HyIns2 und -3 Antikörper ein unspezifisches Hintergrundsignal zeigten (siehe Abbildung 51). Dieser Versuch zeigt, dass die Antikörper prinzipiell in der Lage sind, HyProinsulin 1, 2 und 3 zu erkennen, die Menge an endogenem HyProinsulin jedoch offenbar nicht ausreicht, um es für den Antikörper in Immunfluoreszenzanalysen an ganzen Hydren detektierbar zu machen.

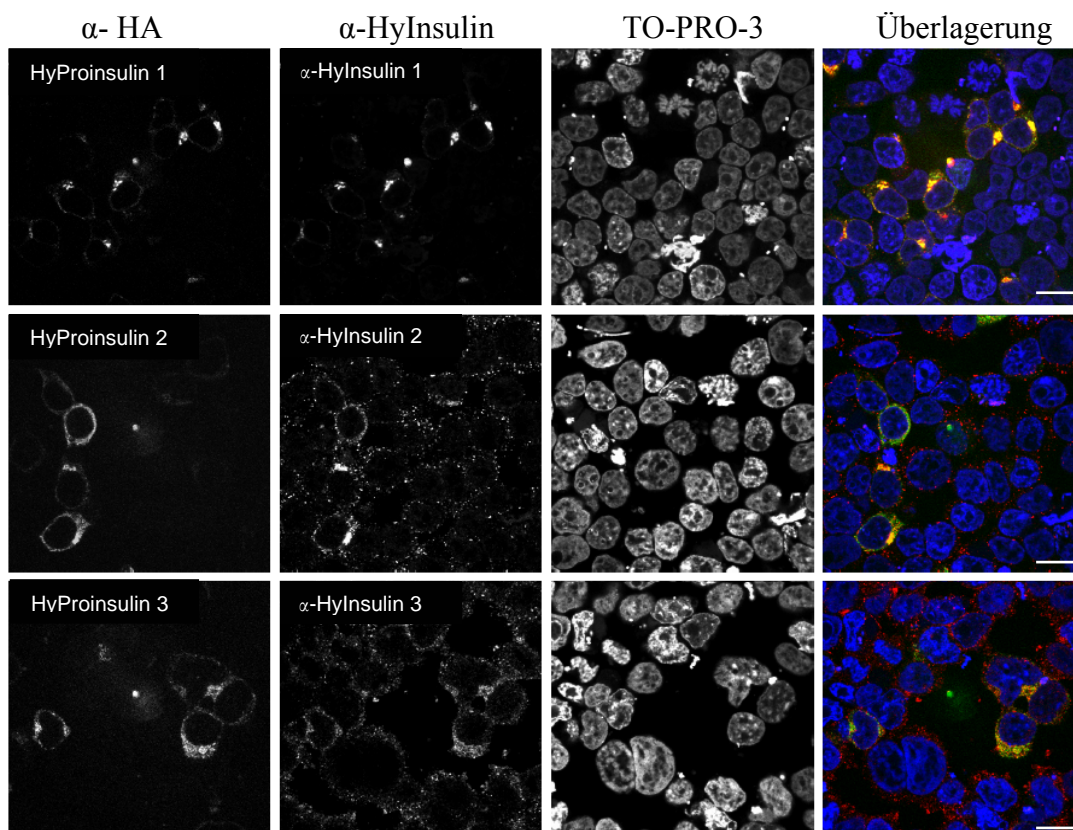


Abb. 51: Expression von HA-markiertem HyProinsulin 1, 2 und 3 in HEK 293T-Zellen. Gezeigt ist eine Immunfluoreszenzanalyse mit dem anti-HA-Antikörper, den anti-HyInsulin Antikörpern und die Gegenfärbung der DNA mit dem Farbstoff TO-PRO-3. In der Überlagerung ist die Färbung mit dem anti-HA Antikörper in grün dargestellt, die Färbung mit dem jeweiligen anti-HyInsulin Antikörper in rot und die Kernfärbung mit TO-PRO-3 in blau. Dargestellt sind optische Schnitte einer Dicke von 0,5 μm , der Größenstandard entspricht 10 μm .

2.3.2. Überexpression der HyInsulin Gene in Hydra

Zur Untersuchung der Lokalisation von Hydra Proinsulin 1, 2 und 3 in Hydrazellen wurde ein HA-markiertes Fusionsprotein verwendet. GFP wurde ko-exprimiert, um transformierte Zellen erkennbar zu machen. Die Hydren wurden nach der Fixierung sowohl mit dem jeweiligen anti-HyInsulin Antikörper als auch mit dem anti-HA Antikörper gefärbt. In den Abbildungen 52, 53 und 54 ist das Ergebnis dieses Versuches dargestellt.

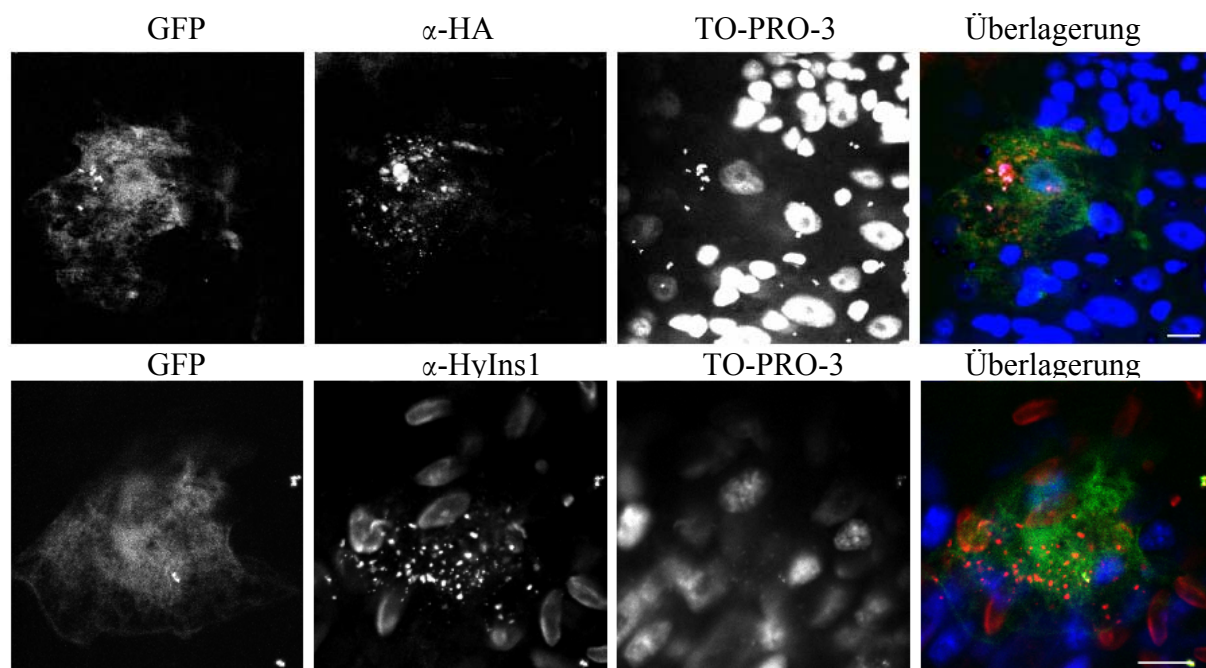


Abb. 52: Expression von HA-markiertem Hydra Proinsulin 1 in ectodermalen Epithelzellen von Hydra. Dargestellt ist jeweils eine ectodermale Epithelzelle von Hydra, welche GFP und HyProins1-HA ko-exprimiert. In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün dargestellt, die Färbung mit dem anti-HA Antikörper (oben) bzw. mit dem anti-HyInsulin1 Antikörper (unten) in rot und die Kernfärbung mit TO-PRO-3 in blau. Der anti-HyIns1 Antikörper erkennt zusätzlich unspezifisch Kapseln. Dargestellt sind optische Schnitte mit einer Dicke von 0,5 μm , der Größenstandard entspricht 10 μm .

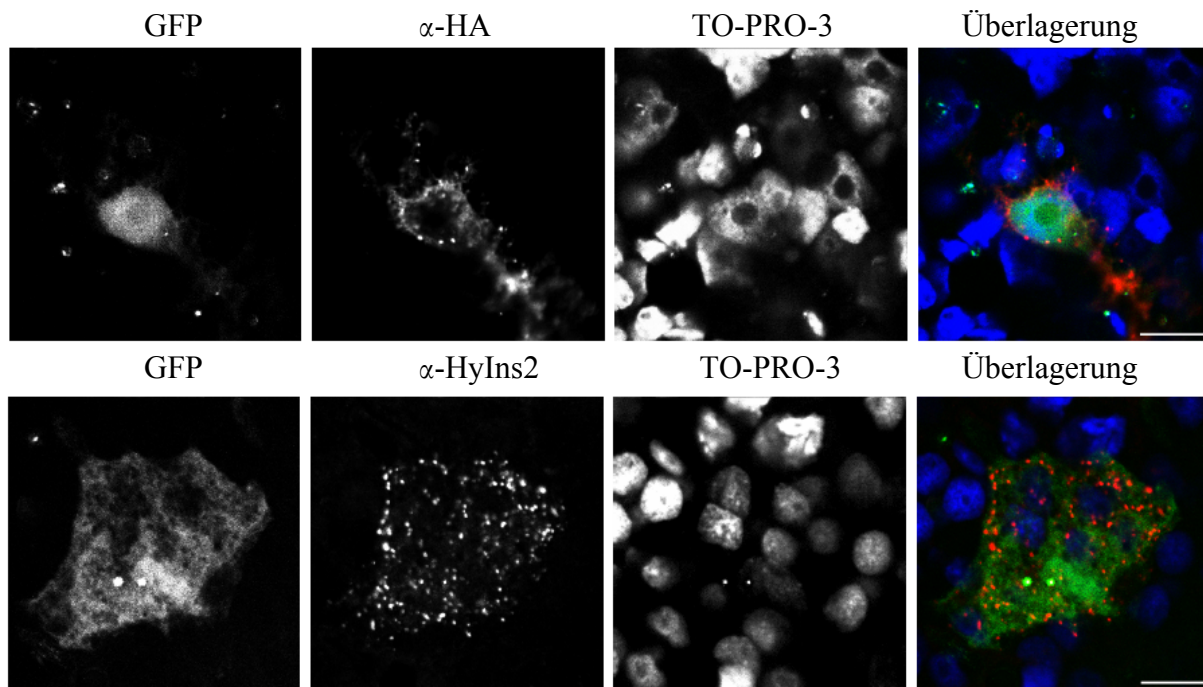


Abb. 53: Expression von HA-markiertem Hydra Proinsulin 2 in ectodermalen Epithelzellen von Hydra. Dargestellt ist jeweils eine ectodermale Epithelzelle von Hydra, welche GFP und HyProins2-HA ko-exprimiert. In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün dargestellt, die Färbung mit dem anti-HA Antikörper (oben) bzw. mit dem anti-HyInsulin2 Antikörper (unten) in rot und die Kernfärbung mit TO-PRO-3 in blau. Dargestellt sind optische Schnitte einer Dicke von 0,5 μm , der Größenstandard entspricht 10 μm .

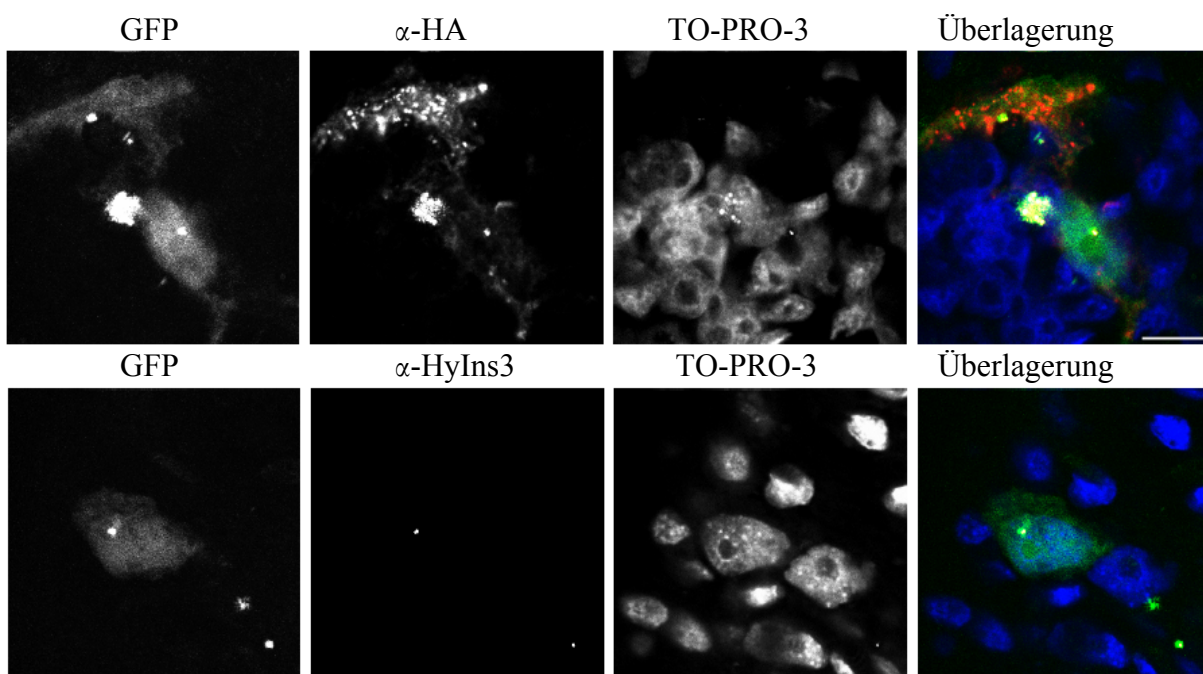


Abb. 54: Expression von HA-markiertem Hydra Proinsulin 3 in ectodermalen Epithelzellen von Hydra. Dargestellt ist jeweils eine ectodermale Epithelzelle von Hydra, welche GFP und HyProins3-HA ko-exprimiert. In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün dargestellt, die Färbung mit dem anti-HA Antikörper (oben) bzw. mit dem anti-HyInsulin3 Antikörper (unten) in rot und die Kernfärbung mit TO-PRO-3 in blau. Dargestellt sind optische Schnitte einer Dicke von 0,3 μm , der Größenstandard entspricht 10 μm .

Die Antikörper anti-HyIns1 und -2 erkannten in diesem Versuch Hydran das jeweilige überexprimierte Protein, anti-HyIns3 jedoch nicht. Alle HyInsulinproteine sind in Vesikeln lokalisiert. Die Färbung von HyProinsulin 2 unterscheidet sich, je nachdem mit welchem Antikörper gefärbt wurde. Wird mit dem anti-HyIns2 Antikörper aus Kaninchen gefärbt, so färben sich vesikuläre Strukturen an der Zellperipherie, bei Färbung mit dem anti-HA Antikörper sind Strukturen besonders rund um den Zellkern gefärbt und nur vereinzelte Vesikel im Rest der Zelle. Der anti-HA Antikörper erkennt das HA-Epitop an HyProinsulin2, das im Golgi-Apparat lokalisiert sein könnte. Da für Hydra zurzeit noch kein Marker für den Golgi vorliegt, wurde die Sequenz von HyIns2 in einen Säugetiervektor kloniert, der Expression von HA-markierten Fusionproteinen erlaubte. Hier wurde anschließend mit dem Golgi-Antikörper anti-GM130 gegengefärbt. Das Ergebnis ist in Abbildung 55 dargestellt. Der anti-HyIns2 Antikörper erkennt diese Strukturen des Golgi nicht. Die Färbung der Vesikel legt den Schluss nahe, dass er nur prozessiertes HyIns2 erkennt. Das impliziert, dass epitheliale Hydranzellen die Möglichkeit haben, überexprimiertes HyProinsulin korrekt zu prozessieren.

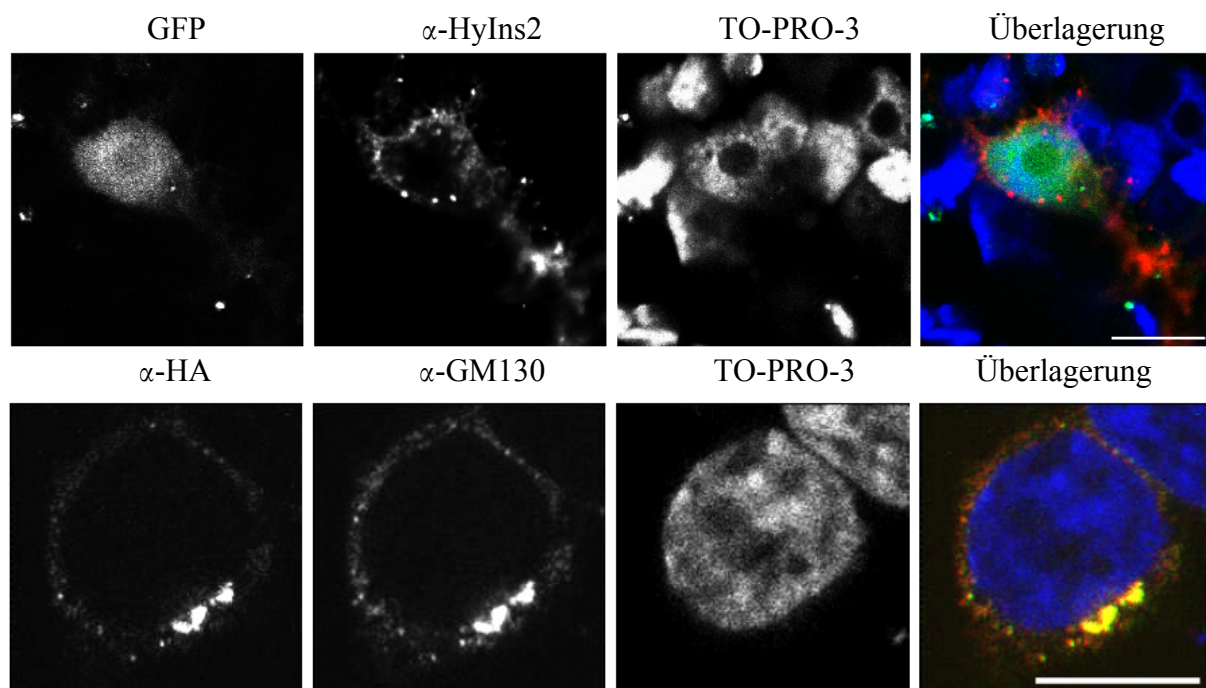


Abb. 55: Expression von Hydra Proinsulin 2 in ektodermalen Epithelzellen von Hydra (oben) und in HEK 293T-Zellen (unten). In der oberen Reihe ist eine ektodermale Epithelzelle von Hydra dargestellt, welche GFP und HyIns2-HA ko-exprimiert. In der Überlagerung ist das GFP-Signal in grün dargestellt, die Färbung mit dem anti-HyIns2 Antikörper in rot und die Kernfärbung mit TO-PRO-3 in blau. Die untere Reihe zeigt eine HEK 293T-Zelle, welche Hydra Proinsulin 2 exprimiert. In der Überlagerung ist die Färbung mit dem anti-HA-Antikörper in grün, die Färbung mit dem anti-GM130 Antikörper in rot und die Kernfärbung mit TO-PRO-3 in blau gezeigt. Dargestellt sind optische Schnitte einer Dicke von 0,5 μ m, der Größenstandard entspricht 10 μ m.

Abbildung 55 zeigt, dass HyProinsulin2-HA in HEK 293T-Zellen im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Dies legt den Schluss nahe, dass dies auch in Hydra der Fall ist.

2.3.3. HyFOXO

FOXO (*Forkhead box subgroup O*), ein Zielgen des Insulin-Signalweges, konnte vollständig im Hydragenom identifiziert werden. Es wurde durch RT-PCR aus mRNA amplifiziert (Diplomarbeit Gradingner, 2008). Abbildung 56 zeigt einen Sequenzvergleich mit humanem FOXO.

		14-3-3 Bindestelle ↓		
		T1		
HyFoxo	MDVDVELIYDSSPTIQREDRPRSRTWPLIIPSPPIETIHENDYN-----ADIGSSLRPA		52	
HsFoxo1	-MAEAPQVVEIDPDFEPLRPRSCTWPLIIPRPEFSQSNSATSSPAPSGSAAANPDAAAGLP		59	
HyFoxo	IIEEKEVEEDVSDNLKKNQ-----		73	
HsFoxo1	SASAAVSAADFMSNLSLLEESDFPQAPGSVAAAVAAAAAATGGLCGDFQGPEAGCLH		119	
HyFoxo	-----PRKIS--RKNAGNLSYADLTCQAIQASPDQ		102	
HsFoxo1	PAPPQPPPPGPLSQHPPVPPAAAGPLAGQPRKSSSRNAGNLSYADLITKAISSAEK		179	
	Forkhead box			
HyFoxo	RLTLSQIYDWMVRNISYFKDKDSTSSAGVKNSIRHNLSSLHSRFRMVQNDTNGKSSYWVI		162	
HsFoxo1	RLTLSQIYEWVKSVPYFKDKDSSNSAGVKNSIRHNLSSLHSKFRVQNEGTGKSSWML		239	
		S1		
HyFoxo	NPD-AKAGKSSRRRAGSVDGQPKKKNKRVRTKKHHQSIDDITSL-----PANT		210	
HsFoxo1	NPEGGKSGKSSRRRAASMDNISKFAKSRRAAKKASLQSGQEGAGDSPGSQFQSKWPASP		299	
HyFoxo	PLKQNHSEYENLLS/SSPCSSTDSISNVEEISSERVCSPPNYASSDINSPTYGDSFARPRS-		269	
HsFoxo1	GSHSNDDFDNWSTFR-PRTSNASSTISGRLLPIMTEQDDLGEQDVHSMVYPPSAAKMAST		358	
HyFoxo	-TSTVSVQSNINPSELEDDLKRIIDQQSVISFRVDD-----ESSDQFSLSSINLDDSMKK		322	
HsFoxo1	LPSLSEISNPFENMENLLDNLNLLSSPTSLTVSTQSSPGTMMQOTPCYSFAPPNTSLNPS		418	
HyFoxo	ITEKKLSKSEETNFLLSNRQSTDSFTSNDSGYDGSVYFSPHSNFRRCQNLPMISSPNSI		382	
HsFoxo1	PNYQKYTYGQSSMSPLP-QMPIQTLQDNKSSYGGMSQYNCAPGLLKEKLLTSDSPPHNDIM		477	
HyFoxo	TPFQQTAYNPGFPMQVVRDINQNSYFMHQQFDTTFNQDNFVRSRSLKHYDANKSYNT---		439	
HsFoxo1	TPVDPGVAQPNRSRVLGQNVMMGPNVSMSTYGSQASHNKMMNPSSHHPGHAQQTSAVNGR		537	
HyFoxo	-LINNISENCSSSQSYISKQRVNLDCCFYQNTLPSHNVDMLDTIPSDLDHVKLYSFE		498	
HsFoxo1	PLPHTVSTMPHTSGMNRILTQVKTPVQVPLPHPMQMSALGGYSSVSSCNGYGRMGLLHQEK		597	
HyFoxo	DP-----HQLAIDLNQIIEIDLKGSSTNLKSLCEPIVNNNTSSTSNDFIYQNWVR-		548	
HsFoxo1	LPSDLLGMFIERLDCDMESIIRNDLMDGDT-LDFNFDNVLPNQSFPHSVKTTTHSWVSG		655	

Abb. 56: Sequenzvergleich von Hydra und humanem FOXO, gezeigt sind folgende Domänen: T1 (Thr²⁴), S1 (S²⁵⁶) und S2 (S³¹⁹) sind die Akt Zielsequenzen (in gelb); *Forkhead box* DNA-Bindedomäne (rot eingerahmt); Phosphorylierungsstelle von DYRK1A (grüner Pfeil); Cdk1-Phosphorylierungsstelle (Ser²⁴⁹) (hellblauer Pfeil); Region des Kernexportsignals (graue Box); Eine Insertion von fünf charakteristischen Aminosäuren (SNSSA) zwischen α -Helices 2 und 3 der *forkhead domain* (violette Box); mit einem rosa Balken gekennzeichnet ist das NLS von FOXO; ebenso ist die 14-3-3 Bindestelle gekennzeichnet. (Zugangsnummer humanes FOXO: NP_002006)

Man kann die typische *Forkhead*-Domäne, welche die DNA Bindedomäne darstellt, auch in HyFOXO finden (Abbildung 56, rot gekennzeichnet). Die Insertion von fünf Aminosäuren (STSSA bei Hydra und SNSSA bei Mensch) innerhalb der *forkhead box* unterscheidet FOXO von anderen Mitgliedern der *Forkhead*-Familie (Abbildung 56, lila Kästchen) (Puig et al. 2003). Es konnten eine Threonin- und zwei Serin-Phosphorylierungsstellen (Abbildung 56, gelbe Kästchen) identifiziert werden (Kramer et al., 2003). In dem Bereich dieser Phosphorylierungsstellen findet man die Zielsequenzen für PKB/Akt. Auch für die Proteinkinase DYRK1A (Kramer et al., 2003) und für Cdk1 (Yuan et al., 2008) wurden potentielle Phosphorylierungsstellen gefunden (Abbildung 56, hellgrüner bzw. hellblauer Pfeil). Cdk1 phosphoryliert FOXO an Serin²⁴⁹, dadurch wird die Bindung von FOXO an 14-3-3 Proteine unterbunden. Dies vermittelt die Akkumulation von FOXO im Kern, was zur Transkription von proapoptischen Genen anregt (Yuan et al., 2008). Ein unkonventionelles Kernlokalisierungssignal (Abbildung 56 rosa gekennzeichnet) (Kramer et al., 2003) wurde ebenfalls entdeckt, genauso wie eine Kernexportsequenz (Abbildung 56, graue Box) (Arden et al., 2002).

Der Transkriptionsfaktor FOXO ist normalerweise im Zytoplasma lokalisiert. Seine Lokalisation sollte in Hydra untersucht werden. Ein HyFOXO-GFP Fusionsprotein verteilte sich in Hydrazellen in Kern und Zytoplasma (Abbildung 57). GFP allein tut dies allerdings in der Regel auch. Interessanterweise gelangt RFP nicht in den Zellkern (Müller-Taubenberger et al., 2006). Dies traf auch für das HyFOXO-RFP Fusionsprotein zu. Eine vergleichende Expression von HyFOXO-GFP und HyFOXO-RFP in der gleichen Zelle ist in Abbildung 57 dargestellt.

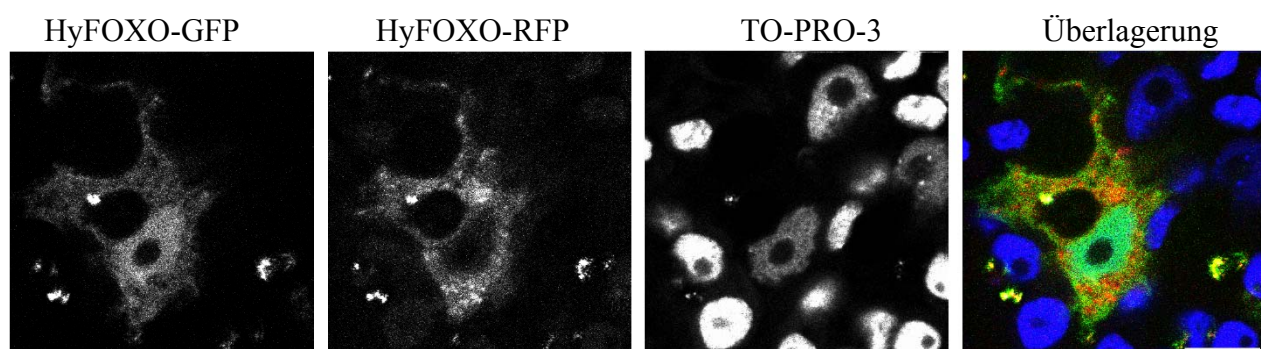


Abb. 57: Ko-Expression von HyFOXO-GFP und HyFOXO-RFP in einer ektodermalen Epithelzelle von *Hydra vulgaris*. In der Überlagerung ist das HyFOXO-GFP Signal in grün, das HyFOXO-RFP Signal in rot und das TO-PRO-3 Signal in blau dargestellt. Dargestellt sind optische Schnitte mit einer Dicke von 0,5 µm, der Größenstandard beträgt 10µm.

Das folgende Experiment wurde deshalb mit dem RFP-Fusionsprotein durchgeführt. FOXO reagiert auf Insulin-Signale. Sind diese abwesend, transloziert es in den Zellkern und induziert die Expression von Zielgenen wie Bim (Greer und Brunet, 2005). Insulin wird in anderen Invertebraten (*C.elegans*, *D.melanogaster*) in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme reguliert. Die Frage war, ob HyFOXO bei Nahrungsmangel ebenfalls in den Zellkern gelangt. Dazu wurden Hydren vor der Transfektion mit dem Plasmid für HyFOXO-RFP eine Woche gehungert. Das Resultat ist in Abbildung 58 dargestellt.

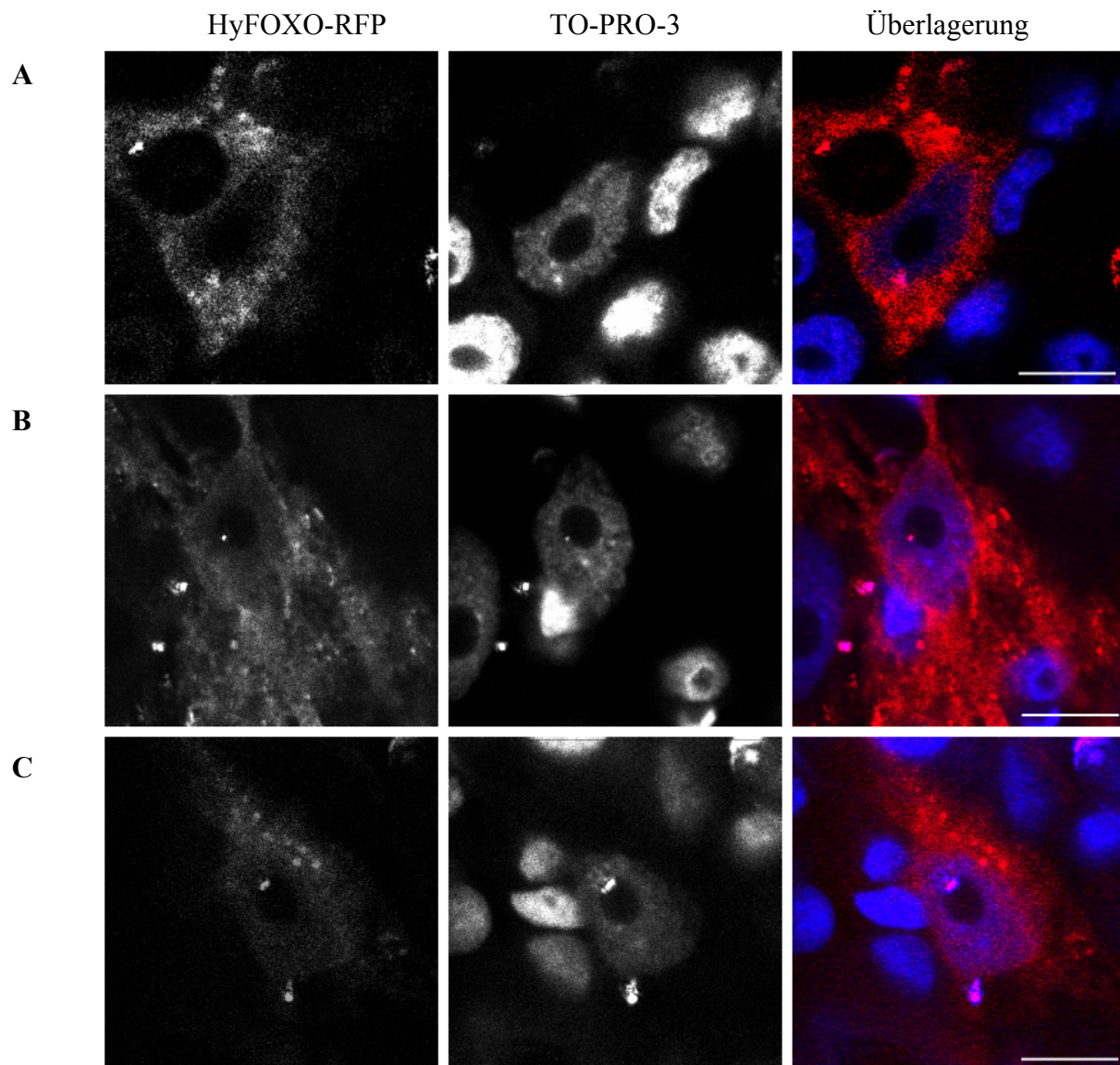


Abb. 58: Expression von HyFOXO-RFP in ektodermalen Epithelzellen von satten (A) oder gehungerten (B/C) Hydren. Das RFP-Signal ist in rot, das TO-PRO-3 Signal in blau dargestellt. Dargestellt sind jeweils optische Schnitte mit einer Dicke von 0,5 μm , der Größenmaßstab beträgt 10 μm .

Abbildung 58 zeigt, dass im Vergleich mit gefütterten Tieren mehr HyFOXO-RFP im Zellkern lokalisiert ist, auch wenn der größte Teil weiterhin im Zytoplasma lokalisiert ist.

2.3.4. HyIns1 hemmt HyFOXO und Wortmannin induzierte Apoptose

Die Überexpression von HyFOXO-GFP führte zu einer erhöhten Apoptoserate der transformierten Zellen (siehe Abbildung 59). Die durch das GFP-Fusionsprotein vermittelte Kernlokalisierung von HyFOXO-GFP könnte dafür die Ursache sein. Es stellte sich die Frage, ob Hydra Insulin einen Einfluss auf durch HyFOXO induzierte Apoptose hat. Ko-Expression von HyInsulin 1 senkte den Anteil apoptotischer Zellen von 25% auf 10%. Um die überlebensfördernde Wirkung von HyInsulin 1 noch genauer untersuchen zu können, wurde in mit HyFOXO-GFP transfizierten Zellen zusätzlich Apoptose durch den PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin ausgelöst. Hier wurde die Wirkung von HyInsulin 1 noch deutlicher. Durch die Expression von HyFOXO-GFP in mit Wortmannin behandelten Zellen wurde der Anteil von apoptotischen Zellen auf 65% erhöht, durch die Ko-Expression von HyIns1 auf etwa 20% gesenkt (dargestellt in Abbildung 59). Für diesen Versuch wurden 247 transformierte Hydrazellen ausgewertet, davon 161 Zellen, die HyFOXO und HyInsulin 1 ko-exprimierten und 86 Zellen, die HyFOXO und RFP (Kontrolle) ko-exprimierten. Es wurde ein unmarkiertes HyIns1 exprimiert, um eine korrekte Prozessierung und Faltung des Proteins zu ermöglichen. Der Nachweis der Expression von HyIns1 erfolgte mit dem anti-HyIns1 Antikörper aus Kaninchen. Abbildung 59 A zeigt Beispiele für Hydrazellen, die in diesem Versuch ausgewertet wurden.

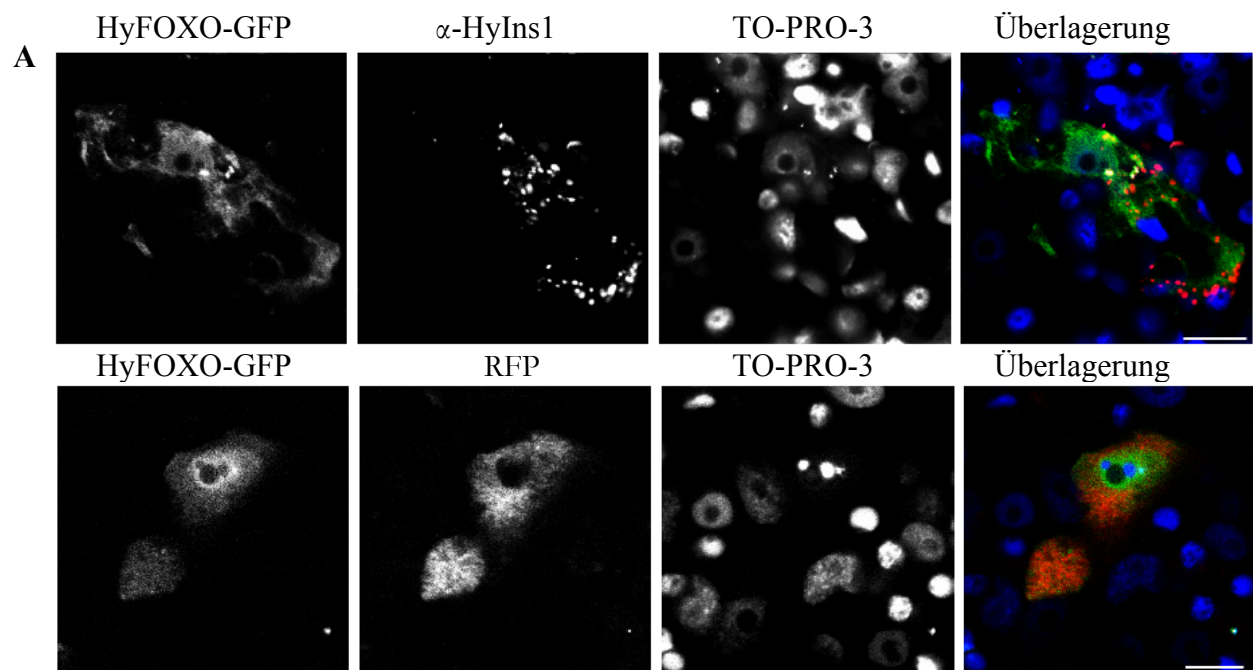


Abb. 59: HyIns1 hemmt HyFOXO und Wortmannin induzierte Apoptose (fortgesetzt auf der nächsten Seite)

B

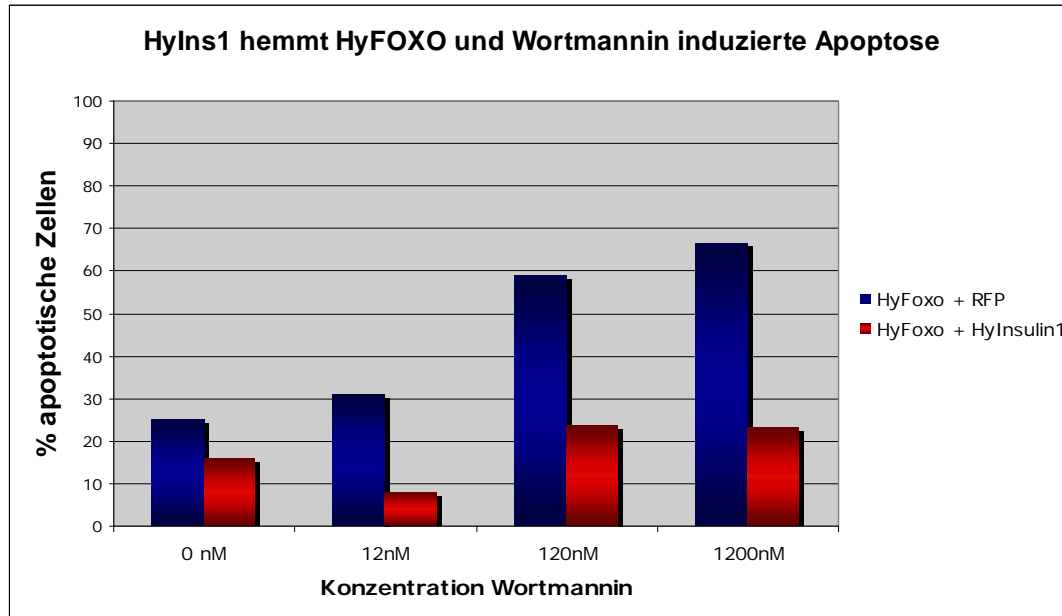


Abb.59: HyIns1 hemmt HyFOXO und Wortmannin induzierte Apoptose (A) Beispiele für Hydrazellen, welche bei diesem Versuch ausgewertet wurden. Die obere Reihe zeigt eine gesunde ektodermale Epithelzelle welche HyFOXO-GFP und HyInsulin 1 ko-exprimiert. In der RGB-Überlagerung ist das GFP-Signal in grün, die Färbung mit anti-HyIns1 in rot und die Kernfärbung mit TO-PRO-3 in blau dargestellt. In der unteren Reihe ist eine apoptotische Zelle gezeigt, die HyFOXO-GFP und RFP ko-exprimiert. Diese Zelle besitzt einen apoptotischen Kern und hat bereits mit der Bildung von apoptotischen Körperchen begonnen. In der RGB-Überlagerung ist das GFP-Signal in grün, das RFP-Signal in rot und die Kernfärbung mit TO-PRO-3 in blau dargestellt. Der Größenmaßstab beträgt $10\mu\text{m}$, dargestellt sind jeweils $0,5\mu\text{m}$ dicke optische Schnitte. (B) zeigt den prozentualen Anteil von apoptotischen Hydrazellen, welche mit verschiedenen Konzentrationen von Wortmannin behandelt wurden und die entweder HyFOXO-GFP und RFP ko-exprimierten oder HyFOXO-GFP und HyInsulin 1 ko-exprimierten.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Apoptose in Hydra auch über HyInsulin, PI3-Kinase und PKB gesteuert werden kann und dass dies durch den Transkriptionsfaktor HyFOXO reguliert wird.

3. Diskussion

3.1. Die Hydra Bcl-2 Familie enthält neun Mitglieder

Die Bcl-2 Familie von Proteinen ist eine wichtige regulatorische Komponente der Apoptose. Sie lässt sich in pro- und antiapoptotische Mitglieder unterteilen. Alle Proteine zeichnen sich durch so genannte Bcl-2-Homologie-Domänen aus, wobei antiapoptotische Proteine die BH Domänen 1, 2, 3 und 4 aufweisen und proapoptotische Proteine nur die Domänen BH1, 2 und 3 oder gar nur die BH3 Domäne. Die meisten Mitglieder der Bcl-2 Familie haben zusätzlich eine stark hydrophobe C-terminale Transmembrandomäne, welche eine Lokalisation an verschiedene Membranen ermöglicht. In dieser Arbeit wurde die Bcl-2 Familie in Hydra untersucht.

Bereits bekannt waren drei Mitglieder der Hydra Bcl-2 Familie, zusätzlich konnten ein weiteres Bak-ähnliches und fünf weitere Bcl-2 ähnliche Mitglieder identifiziert und deren Gene kloniert werden. Die frühere Nomenklatur (Böttger und Alexandrova, 2007) wurde abgeändert und die Gene wurden *HyBcl-2-like* 1 bis 7 und *HyBak-like* 1 und 2 genannt. Die Hydra Proteine der Bcl-2 Familie unterscheiden sich untereinander sehr stark in der Konservierung der Bcl-2-Homologie-Domänen. Während die BH1 und BH2 Domänen in allen Proteinen sehr gut konserviert sind, zeigen die BH3 und BH4 Domänen starke Abweichungen von der Konsensus-Sequenz. Das konservierte Motiv LXXXGDE der BH3 Domäne ist nur in *HyBcl-2-like* 4 und in *HyBak-like* 1 zu finden (siehe Abbildung 15). *HyBcl-2-like* 4 ist in den BH3 und BH4 Domänen am besten konserviert und zeigt auch in der Abfolge von Helices und Loops große Übereinstimmungen mit der Struktur von humanen Proteinen (siehe Abbildung 14). Alle Hydraproteine haben eine C-terminale hydrophobe Transmembrandomäne, die eine Lokalisation an Membranen bedingen kann. Die Genstruktur der Hydra *Bcl-2-like* Gene ähnelt dem „Ur-Gen“ der Bcl-2 Familie (Herberg et al., 1998), Bcl-2 (siehe Abbildung 16). Dieses weist nur ein Intron auf, welches nach der kodierenden Sequenz für das konservierte Motiv GGW der BH2 Domäne inseriert ist. Alternatives Spleißen ist ein bei humanen Proteinen der Bcl-2 Familie oft vorkommendes Ereignis. Humanes Bax kommt in verschiedenen Spleißformen vor (Apte et al., 1995). Das kodierende Gen für das Protein Bcl-x kann in vierfacher Weise gespleißt werden. Die verschieden gespleißten Gene können sowohl für die antiapoptotischen Proteine Bcl-x_L und Bcl-x_{ES} als auch für die proapoptotischen Proteine Bcl-x_S und Bcl-x_{AK} kodieren (Hossini und Eberle 2008). Eine solche durch Spleißen bedingte Vielfalt ist bei den Hydragenen nicht möglich. Lediglich *HyBcl-2-like* 7 weist 4 Introns auf. Aufgrund der schlechten Konservierung der

BH-Domänen, dieser Exon-Intron Struktur und seiner Lokalisation hat es sich wahrscheinlich im Laufe der Evolution am meisten verändert.

Die Mechanismen, durch die Bcl-Proteine reguliert werden, sind vielfältig. In der Sequenz des Hydra Proteins HyBcl-2-*like* 1 wurde ein 14-3-3 Bindemotiv identifiziert und die Interaktion mit dem Hydra 14-3-3 Protein HyA bereits bestätigt (Pauly et al., 2007).

3.2. Hydra Bcl-2 Proteine sind an den Mitochondrien und am ER lokalisiert

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Hydra Bcl-2-*like* Proteine wurden GFP-Fusionsproteine exprimiert. Alle Proteine, bis auf HyBcl-2-*like* 7, ko-lokalisierten mit einem mitochondrialen Marker (siehe Abbildung 17). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass diese Lokalisation über die C-terminale hydrophobe Helix stattfindet. In stark vergrößerten Aufnahmen erkennt man, dass sich das Signal der GFP-HyBcl-2-*like*-Fusionsproteine deutlich von dem der ATP-Synthase, welche in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, abgrenzt. Das Ergebnis ist konsistent mit der Lokalisation von humanen Bcl-2 Proteinen, welche ebenfalls in die äußere Mitochondrienmembran inseriert sind (Chen-Levy et al., 1989, Setoguchi et al., 2006 und Heath-Engel und Shore, 2006). Um zu überprüfen, ob Hydra Bcl-2 Proteine endogen exprimiert werden, wurde für je ein pro- und ein antiapoptotisches Protein ein polyklonaler Antikörper in Hühnchen hergestellt. Western Blot Analysen bestätigten die endogene Expression der Proteine und die Lokalisation an den Mitochondrien für HyBcl-2-*like* 1 und HyBak-*like* 1.

Nach neueren Erkenntnissen inserieren die Bcl-2 Proteine nicht nur mit ihrer C-terminalen Helix, welche die Transmembrandomäne repräsentiert, in die Mitochondrien, sondern zusätzlich mit Helices 5 und 6 (Kim et al., 2004 und Lalier et al., 2007). Diese Konformationsänderung erlaubt eine weitere Regulation der Interaktion von pro- und antiapoptotischen Proteinen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Bcl-2 erst nach Induktion der Apoptose und somit nach der Konformationsänderung an das Protein Bak binden kann (Cheng et al., 2003). Analysiert man die Aminosäuresequenzen der Hydra Proteine mit Programmen zur Hydrophobizitätsanalyse (*ProtScale* (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl?1>)), so findet man auch hier stark hydrophobe Bereiche, die als weitere Membranhelices fungieren könnten.

Auffällig ist, dass es in Hydra kein dem humanen Bax ähnliches Protein gibt, das sich im nicht apoptotischen Zustand der Zelle im Zytoplasma befindet und erst nach Einleiten der Apoptose an die Mitochondrien umverteilt wird (Wolter et al., 1997). Diese Umverteilung von Bax wird dadurch bedingt, dass der C-Terminus des Moleküls im nicht apoptotischen

Zustand einer Zelle in die durch BH1, BH2 und BH3 gebildete hydrophobe Tasche eingeklappt ist. Dieses Einklappen wird ermöglicht durch eine Wasserstoffbrücke zwischen Serin 184 und Asparaginsäure 98 (Anhang Abbildung 62). Werden diese in Mutageneseexperimenten deletiert oder durch andere Aminosäuren substituiert, kann das Einklappen des C-Terminus nicht mehr erfolgen und es kommt zu einer stetigen Integration in die Mitochondrien (Suzuki et al., 2000 und Borgese et al., 2003). Eine Analyse der Sequenzen der Hydraproteine hat ergeben, dass die Positionen von Serin 184 und Asparaginsäure 98 in keinem Mitglied der Hydra Bcl-2 Familie konserviert sind.

Durch ein Ko-Transformationsexperiment mit dem ER-Marker BI-1 (Diplomarbeit Wagner, 2009) konnte eine Lokalisation am ER für HyBcl-2-*like* 7 bewiesen werden (siehe Abbildung 19). Diese wird bedingt durch die Anzahl und Position der die Transmembrandomäne flankierenden Aminosäuren (Kaufmann et al., 2003), welche sich von den anderen Hydra Bcl-2-*like* Proteinen dadurch unterscheidet, dass deutlich weniger basische Reste vorhanden sind (siehe Abbildung 21). Bcl-Proteine spielen am ER eine wesentliche Rolle, da der Calciumhaushalt einer Zelle, der durch das ER reguliert wird, eine wichtige Rolle bei der Apoptose hat. Calciumionen, die vom ER zu den Mitochondrien übertragen werden, können als apoptotische Signale wirken. Wie die Bcl-2 Proteine an diesem Signalweg beteiligt sind, konnte noch nicht vollständig geklärt werden (Thomenius und Distelhorst, 2003). Es ist jedoch bekannt, dass das ER über das Protein Mitofusin 2 direkt mit den Mitochondrien verbunden ist und so der Calciumtransfer zwischen den beiden Organellen reguliert werden kann (Martins de Brito und Scorrano 2008). Einige Gruppen spekulieren, dass auch Bcl-2 als Adapterprotein für Bindung zwischen den beiden Organellen fungieren könnte (Voeltz et al., 2006).

Die Proteine HyBcl-2-*like* 2 und HyBcl-2-*like* 5 sind nicht nur an den Mitochondrien, sondern auch im Zytoplasma und an der Kernmembran lokalisiert. Damit ähneln sie in der Verteilung dem humanen Bcl-2, welches ebenfalls sowohl an Mitochondrien, als auch am ER lokalisiert ist (Akao et al., 1994).

3.3. Hydra Bcl-2 Proteine wirken pro- oder antiapoptotisch

Überexpression der Hydra Bcl-2 Proteine in HEK 293T-Zellen zeigte eine stark proapoptotische Wirkung von HyBak-*like* 1 und 2, sowie HyBcl-2-*like* 5 (siehe Abbildung 24). Mutierte man das konservierte Leucin an Position 1 der Kernsequenz der BH3 Domäne von HyBak-*like* 1, so war dieser proapoptotische Mechanismus nahezu aufgehoben. Die Proteine HyBcl-2-*like* 4, 6 und 7 wirkten in mit Camptothecin behandelten HEK 293T-Zellen stark antiapoptotisch (siehe Abbildung 27). Mutierte man das Leucin der BH3 Domäne von HyBcl-2-*like* 4, so wurde dieser Effekt massiv verringert. Dies bedeutet, dass die Hydra Proteine trotz der teilweise schlechten Konservierung der BH3 und BH4 Domänen starke Auswirkung auf Apoptose in HEK 293T- Zellen hatten. Die antiapoptotische Wirkung von Proteinen ohne offensichtliche BH4 Domäne ist bereits aus Drosophila bekannt. Das Protein Buffy ist ein antiapoptotisches Protein, obwohl es keine dem humanen Bcl-2 homologe BH4 Domäne besitzt (Quinn et al., 2003). Zwei weitere humane Proteine, Mcl-2 und Bfl-1/A1, sind ebenfalls dafür bekannt, dass sie trotz Abwesenheit der BH4 Domäne Apoptose unterbinden können (Hossini und Eberle, 2008).

3.4. Hydra Bcl-2 Proteine können miteinander interagieren

Verschiedene Familienmitglieder der Bcl-2 Familie in Vertebraten können über die Bcl-2-Homologie-Domänen miteinander interagieren (Oltvai et al., 1993). Vergleicht man die BH3 Domänen von Mensch und Hydra, so stellt man fest, dass nur HyBcl-2-*like* 4 und HyBak-*like* 1 das konservierte Motiv LXXXGDE aufweisen. In einem *Yeast-Two-Hybrid* Versuch wurde deshalb geklärt, welche Proteine miteinander interagieren können.

HyBcl-2-*like* 4 und HyBak-*like* 1 waren die einzigen beiden Proteine, für die eine Interaktion gefunden werden konnte. Dabei konnten von HyBcl-2-*like* 4 und HyBak-*like* 1 Heterodimere ausgebildet werden und von HyBcl-2-*like* 4 Homodimere. Es stellt sich nun die Frage, ob die anderen Proteine nicht interaktionsfähig sind, oder ob die Interaktion zu schwach war, um sie im *Yeast-Two-Hybrid* zu identifizieren. Einige Vertreter der humanen Bcl-2 Familie können erst nach einer Konformationsänderung miteinander interagieren (Cheng et al., 2003 und Dlugosz et al., 2006). Die Interaktion ist zudem oft sensitiv für zelluläre Gegebenheiten wie pH-Wert (Xie et al., 1998). Da eine Änderung der Bedingungen in einem *Yeast-Two-Hybrid* Versuch nicht induziert werden kann, wäre es sinnvoll noch andere Techniken für Interaktionsstudien anzuwenden.

3.5. Es sind Gene für BH3-*only* Proteine im Genom von Hydra vorhanden

Im Genom von Hydra (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) konnten fünf Gene für potentielle BH3-*only* Proteine identifiziert werden. Diese Proteine besitzen gut konservierte BH3 Domänen.

Humane BH3-*only* Proteine unterscheiden sich untereinander durch ihre Länge und durch das eventuelle Vorhandensein einer Transmembrandomäne. Es sind jeweils sowohl kürzere als auch längere Proteine mit oder ohne Transmembrandomäne vorhanden (Taylor et al., 2008). Auch bei den Hydraproteinen gibt es kürzere (ca. 100 Aminosäuren lang) und längere (ca. 300 Aminosäuren lang) Kandidatenproteine, von denen jedoch nur eines, das von Hma2.224514 kodierte Protein, eine eindeutige Transmembrandomäne aufweist. Damit ähnelt das 83 Aminosäuren lange von Hma2.224514 kodierte Protein in Größe und Struktur am ehestem dem humanen HRK, welches 91 Aminosäuren lang ist und ebenfalls eine C-terminale Transmembrandomäne besitzt (Imaizumi et al., 1997).

Die Hydra BH3-*only* Proteine sollten in HEK 293T-Zellen auf ihre Apoptose induzierende Wirkung hin untersucht werden. Weiterhin sollten sie in einem *Yeast-Two-Hybrid* Versuch auf Interaktion mit den bisher bekannten HyBcl-2-*like* Proteinen sowie untereinander getestet werden. Um noch weitere BH3-*only* Proteine identifizieren zu können, die bislang auf bioinformatischem Wege noch nicht gefunden werden konnten, könnte man auch einen *Yeast-Two-Hybrid* mit einem der HyBcl-2-*like* Proteine als Köder in Erwägung ziehen. Es wurden bereits einige BH3-*only* Proteine, wie Bmf, in solch einem Versuch identifiziert (Puthalakath et al., 2001).

3.6. Hydra besitzt ein APAF-1 Homolog

Durch das Auffinden von mehreren Bcl-2 und Bak ähnlichen Proteinen konnte die Apoptosemaschinerie von Hydra bereits um wichtige Proteine ergänzt werden. Die potentiellen Kandidaten für BH3-*only* Proteine runden das Bild zusätzlich ab. Eine weitere wichtige Komponente der Apoptosemaschinerie ist APAF-1, welches nach Auslösen von Apoptose durch den mitochondrialen Signalweg das Apoptosom ausbildet. Das Hydrachomolog konnte über ein kurzes Stück einer Genvorhersage im Hydragenom (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) gefunden und über 5' und 3' *RACE* komplettiert werden. HyAPAF-1 besitzt im N-Terminus eine *CARD* Domäne, darauf folgt eine *NB-ARC* Domäne, und sieben *WD40 Repeats* (siehe Abbildung 33). Um ein komplettes, aktives Apoptosom auszubilden, ist im Säugetier die Bindung einer Caspase mit *CARD*-Domäne nötig. Da eine solche Caspase in Hydra nicht vorhanden ist (siehe Abbildung 9),

wurden die bislang aus Hydra untersuchten Caspasen (HyCed-3-like Caspase, HyCaspase 9-like 3, HyCaspase 3-like und HyCaspase 8-like) auf eine potentielle Interaktion mit HyAPAF-1 im *Yeast-Two-Hybrid* getestet. In diesem Versuch konnte keine der Hydra Caspasen mit HyAPAF-1 interagieren (Diplomarbeit Wagner, 2009).

Ein polyklonaler anti-HyAPAF-1 Antikörper aus Kaninchen erkennt rekombinantes HyAPAF-1 Protein (Diplomarbeit Wagner, 2009). In Immunfluoreszenzanalysen an ganzen Hydren, die mit diesem Antikörper gefärbt wurden, ist HyAPAF-1 besonders stark in Nervenzellen zu finden. In der Literatur wurde beschrieben, dass APAF-1 im Säuger eine wichtige Rolle bei der neuronalen Entwicklung spielt und unabdingbar für eine korrekte Entwicklung des Gehirns ist (Yoshida et al., 1998).

GFP-HyAPAF-1 und HyAPAF-1-GFP waren in Hydrzellen unterschiedlich lokalisiert (siehe Abbildung 35). Das ist ein Hinweis darauf, dass GFP in mindestens einem Fall die korrekte Lokalisation von HyAPAF-1 verhinderte. Bei den Strukturen, in welchen GFP-HyAPAF-1 lokalisiert war, könnte es sich um das endoplasmatische Retikulum handeln. Ko-Expression von GFP-HyAPAF-1 mit dem ER-Marker RFP-Bax-Inhibitor 1 (Diplomarbeit Wagner, 2009) zeigte eine Überlappung der GFP-HyAPAF-1 und RFP-BI-1 Signale. Eine Lokalisation von APAF-1 am ER ist aus der Literatur nicht bekannt. Humanes APAF-1 ist im Zytoplasma lokalisiert und das *C.elegans* Homolog Ced-4 ist im inaktiven Zustand an den Mitochondrien lokalisiert und transloziert bei Aktivierung an die Kernmembran (Hausmann et al., 2000 und Chen et al., 2000). Möglicherweise ist HyAPAF-1 an ein Protein gebunden, das an oder in der ER-Membran lokalisiert ist.

In einer Western Blot Analyse färbte der anti-HyAPAF-1 Antikörper Banden in der Vesikelfraktion und im Lysat ganzer Hydren. Das Vorkommen des Proteins in der Vesikelfraktion, in welcher sich auch die ER-Membranen befinden, unterstützt die in der Immunfluoreszenzanalyse ermittelten Ergebnisse, dass HyAPAF-1 an das ER lokalisiert. Im Bereich des erwarteten Molekulargewichts findet man im Western Blot zwei Banden, die in ihrer Größe nur geringfügig voneinander abweichen. Möglicherweise kommt HyAPAF-1 in zwei Spleißformen vor. Da das für HyAPAF-1 kodierende Gen 13 Introns aufweist, wären durchaus mehrere Spleißvarianten möglich. Von dem aus 32 Introns bestehenden Gen für humanes APAF-1 (www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/index.html; AceView:Gene: APAF1) ist bekannt, dass es mindestens in den drei Spleißvarianten APAF-1_{XS}, APAF-1_M und APAF-1_L vorkommt (Hahn et al., 1999).

3.7. Fis1 und Mitofusin regulieren die Mitochondrienmorphologie in Hydra

In Hefe sind die Mitochondrien verlängerte, tubuläre Organellen, die besonders während Wachstum, Paarung und Sporulation eine gewisse Dynamik aufweisen und sich ständig teilen und wieder verschmelzen. Im Menschen beschränkt sich die Ausbildung von mitochondrialen Netzwerken auf einige Zelltypen wie zum Beispiel Muskelzellen und kardiale Myocyten. In diesen Zelltypen wird immer viel Energie benötigt und durch die Ausbildung von Netzwerken wird gewährleistet, dass diese zügig von der Zellperipherie zur Zellmitte gelangen kann (Breiter-Hahn et al., 1994; Sesaki und Jensen, 1999 und Bach et al., 2003). In ganzen lebenden oder auch fixierten Hydren konnte bisher keine tubuläre Form der Mitochondrien beobachtet werden, stattdessen waren sie stets als kugelförmige Organellen zu erkennen (Transformationsexperimente und Färbung mit anti-ATP-Synthase Antikörper wie in Abbildung 17 dargestellt). Mitochondrienfusion konnte jedoch an lebenden Einzelzellen von Hydra beobachtet werden. In diesem Experiment wurden Hydren mechanisch in Einzelzellen dissoziiert und anschließend mit dem nur für lebende Zellen geeigneten Mitochondrienfarbstoff *MitoTracker Green* gefärbt. Die Mitochondrien dieser Einzelzellen lagen als stark fusionierte, tubuläre Organellen vor. Die Verlängerung der Mitochondrien einer Zelle ermöglicht es, rasch Energie in der gesamten Zelle zu verteilen. Wahrscheinlich kostete es die Hydrazellen sehr viel Energie, den Dissoziationsprozess unbeschadet zu überleben, die Färbung mit *Mitotracker* und die Betrachtung unter einem luftdichten Deckglas raubten zusätzlich Sauerstoffvorräte. Eine Verlängerung der Mitochondrien unterstützte dann den Sauerstoffmetabolismus. Im Gehirn von Säugetieren wird die Biomasse der Mitochondrien ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen vergrößert (Gutsaeva et al., 2007). Möglicherweise wird in Hydra der Mechanismus der Fusion und Teilung der Mitochondrien nicht stetig angewandt, sondern beschränkt sich auf kurze Zeitspannen wie Zellteilung oder Oogenese. Es wurde daher im Hydragenom (<http://hydrasome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) nach Genen für Proteine, die Komponenten der Mitochondrienfusions- und Teilungsmaschinerie darstellen, gesucht. Es konnten die Gene Mitofusin, Opa-1, PARL, Drp-1 und Fis1 in Hydra identifiziert werden (siehe Tabelle 3). Für weitere Versuche wurden die Proteine HyFis1 und HyMfn ausgewählt. Überexpression von HyFis1 in ektodermalen Epithelzellen von Hydra führte nicht zu einer Änderung der Mitochondrienmorphologie, die Mitochondrien blieben, wie auch im untransfizierten Zustand der Zelle, etwa 500 nm-1µm groß. Möglicherweise reichte in Hydra die alleinige Überexpression von HyFis1 nicht aus, um Effekte auf die Mitochondrienmorphologie zu bewirken und Teilung erfordert in Hydra noch andere Komponenten. In Hefe dient Fis 1 als *Docking* Protein für Dnm1, welches ebenfalls

für die Mitochondrienteilung benötigt wird. Möglicherweise hätte in Hydra erst eine Ko-Expression von Fis 1 und Dnm1 zu einer deutlichen Verkürzung der Mitochondrien geführt. Die Überexpression von HyMfn hingegen zeigte einen starken Effekt auf die Gestalt der Mitochondrien. Es induzierte Mitochondrienfusion, was zu Mitochondrien mit bis zu 5µm Länge führte (siehe Abbildung 47). Auch die humanen Homologen Mfn1 und Mfn2 zeigen bei Überexpression starke Auswirkungen auf die Mitochondrienmorphologie (Santel et al., 2001).

3.8. Hydra Bcl-2 Proteine zeigen Effekte auf die Wirkung von HyMitofusin

Humane Bcl-2 Familienproteine interagieren mit Proteinen der Mitochondrienfusions- bzw. -teilungsmaschinerie (Karbowski et al., 2002 und Karbowski et al., 2006). Ko-Expression von HyBcl-2-like oder HyBak-like Proteinen mit HyMfn veränderte die Mitochondrienmorphologie verglichen mit alleiniger Expression von HyMfn (siehe Abbildung 50). HyBcl-2-like 1 und HyBcl-2-like 2 störten die durch HyMitofusin induzierte Veränderung der Mitochondrienmorphologie nicht. Die Proteine HyBcl-2-like 4 und HyBcl-2-like 6 verhinderten durch HyMfn induzierte Mitochondrienfusion bis zu einem gewissen Grade. HyBak-like 2 verhinderte die Fusion von Mitochondrien komplett. Bei Expression von HyBcl-2-like 5 schienen die Mitochondrien komplett zerstört. Dieser Einfluss der HyBcl-2-like und HyBak-like Proteine auf die Mitochondrienmorphologie stand in keinerlei Korrelation zu den Interaktionsstudien oder zu den pro- oder antiapoptotischen Eigenschaften der Proteine. Möglicherweise konkurrieren die HyBcl-Proteine mit HyMfn um einen Platz in der Mitochondrienmembran.

Um das Rätsel aufzuklären, müsste die direkte Interaktion von HyBcl-2-like Proteinen mit HyMfn untersucht werden. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, Interaktionen von HyMfn und HyBcl-2-like Proteinen im *Yeast-Two-Hybrid* nachzuweisen, was jedoch nicht gelang. Dies könnte durch die Transmembrandomäne von HyMitofusin bedingt worden sein, welche das Fusionsprotein an die Mitochondrien statt in den Zellkern direktioniert haben könnte. Es ist jedoch nicht trivial, ein Mitofusin zu exprimieren, bei dem das verhindert wird. Anders als bei HyBcl-2-like Proteinen liegen in Mitofusin-Proteinen zwei Transmembrandomänen vor, die nicht direkt am C-terminalen Ende des Proteins liegen. Das heißt, eine Verkürzung des Proteins bis zu diesen Domänen würde auch andere wichtige Bereiche von Mitofusin, wie ein konserviertes *coiled coil*, deletieren und so eine Interaktion unter Umständen unmöglich machen. Für weitere Versuche würde sich also eher ein *Yeast-*

Two-Hybrid System empfehlen, das für membranständige Proteine geeignet ist (*Yeast-Two-Hybrid Membrane Protein System* der Firma MoBiTec).

3.9. Hydra Proinsulin 1, 2 und 3 sind in sekretorischen Vesikeln lokalisiert

Der Insulinsignalweg ist im Säugetier unabdingbar für die Regulation des Blutzuckerspiegels. Insulin wird nur in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas gebildet und untergeht während seiner Reifung verschiedene Prozessierungs- und Faltungsschritte. In Invertebraten sind Komponenten des Insulinsignalweges ebenfalls bekannt. Sie unterscheiden sich von den Homologen aus Vertebraten vor allem dadurch, dass für jeweils nur einen Rezeptor bis zu 38 verschiedene potentielle Liganden vorliegen können. Diese Insulin-ähnlichen Peptide werden bevorzugt in Nervenzellen exprimiert und regulieren zum Beispiel das Größenwachstum bei *Drosophila* (Coelho und Leever, 2000 und Leever, 2001).

Die Arbeitsgruppe von Rob Steele fand in der EST-Datenbank 3 verschiedene Insulin-ähnliche Peptide, welche HyInsulin 1, 2, und 3 genannt wurden (unveröffentlicht). Um die Lokalisation dieser Hydra Insuline untersuchen zu können, wurden Antikörper hergestellt. Die Immunisierung erfolgte mit synthetisierten Peptiden. Obwohl einige der Antikörper rekombinantes Protein im Western Blot oder überexprimiertes Protein in HEK 293T- Zellen erkannten, konnte mit keinem Antikörper eine Färbung von endogenem Insulin erreicht werden. Stattdessen fand oftmals eine Färbung der Kapseln statt. Dies könnte an strukturellen Ähnlichkeiten der Hydra Insuline und einiger Kapselproteine liegen, die beide Disulfidbrücken aufweisen. Die Antikörper anti-Insulin 1 und 2 aus Kaninchen waren jedoch in der Lage, in Hydrazellen überexprimiertes, unmarkiertes Protein zu erkennen (siehe Abbildung 52, 53 und 54). Alle HyProinsuline waren in Vesikeln lokalisiert. Dies deutet daraufhin, dass entweder nicht genügend endogenes Insulin vorhanden ist, um von den Antikörpern detektiert werden zu können, oder dass das Insulin als singuläres, sezerniertes Protein mittels Antikörperfärbung nicht detektierbar ist. Daher konnte nicht geklärt werden, in welchen Zelltypen und in welchem Bereich des Tieres die Hydra Insuline exprimiert werden. Ein Vergleich mit anderen Invertebraten-Modellsystemen hätte die Vermutung nahe gelegt, dass die Hydra Insuline besonders in Nervenzellen exprimiert werden. Dies ist in *C.elegans* der Fall, bei welchem Insulin 1 in Neuronen im ganzen Tier exprimiert wird und bei *D.melanogaster*, bei welcher mediale neurosekretorischen Zellen im Gehirn DILP-2 exprimieren und (Leever, 2001 und Cao et al., 2001).

Die Antikörperfärbungen an überexprimiertem Protein ergaben, dass sich Hydra Insulin Proteine in Vesikeln in der Zelle befinden. Auch in Säugetierzellen findet man Insulin vor der Sekretion in Speichergranula (Pittman, Philipson und Steiner, 2004 und Orci et al., 1984). Für Hydra Insulin 2 konnte gefunden werden, dass der HA Antikörper zusätzlich zu den Vesikeln Strukturen färbt, die dem Golgi gleichen. Eine Gegenfärbung mit einem Golgi-Marker in HEK 293T- Zellen bekräftigte diese Vermutung, jedoch sollte die Bestätigung für Hydrazellen nachgeholt werden, sobald ein geeigneter Marker vorhanden ist.

3.10. HyFOXO ist an der Regulation der Apoptose in Hydra beteiligt

Der Transkriptionsfaktor FOXO konnte im Hydragenom (<http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>) identifiziert und die kodierende Sequenz kloniert werden (Diplomarbeit Gradinger, 2008). HyFOXO ist evolutionär sehr konserviert und weist eine DNA-Bindedomäne, eine charakteristische Insertion von 5 Aminosäuren und diverse Phosphorylierungsstellen auf. *C.elegans* FOXO wird in den Zellkern transloziert, wenn die Zelle kein Überlebenssignal erhält. Es konnte gezeigt werden, dass HyFOXO-RFP in gehungerten Hydren auch in gewissem Maße im Kern zu finden war, während gefütterte Tiere dort kein Signal zeigten. Im Säugetiersystem setzt FOXO apoptotische Prozesse in Gang (Birkenkamp et al. 2003; Fu und Tindall, 2008). Es konnte bereits gezeigt werden, dass dies auch in Hydra der Fall ist (Diplomarbeit Gradinger, 2008). Diese apoptotischen Prozesse können durch Ko-Expression mit HyInsulin 1 nahezu aufgehoben werden (Diplomarbeit Gradinger, 2008). Wenn in Hydren, in denen Einzelzellen mit HyFOXO-GFP transformiert waren, mit dem PI3-Kinase Inhibitor Wortmannin zusätzlich Apoptose induziert wurde, fand man bei einer Konzentration von 1200 nM Wortmannin 65% apoptotische Zellen. Durch Ko-Expression von HyInsulin1 wurde das auf nur 20% gesenkt (siehe Abbildung 59). Da die Expression von HyInsulin1 und HyFOXO in jeweils den gleichen Zellen erfolgte, muss es sich um einen autokrinen Effekt handeln.

Dieser Regulationsmechanismus beweist, dass der Insulinsignalweg schon zu Beginn der Evolution, nämlich in *Cnidaria*, an der Regulation des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Apoptose beteiligt war und dass ein wesentlicher Regulator der Transkriptionsfaktor HyFOXO ist. Hydra Insulin 1 kann also den durch HyFOXO ausgelösten Signalweg zur Apoptose inhibierend regulieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von unmarkiertem HyInsulin 1 in ektodermalen Epithelzellen erfolgt. Da das Molekül offensichtlich eine biologische Wirkung hatte, kann man davon ausgehen, dass es in korrekter Weise prozessiert und gefaltet war. Dies

lässt wiederum die Hypothese zu, dass, anders als im Säugetier, für die Prozessierung notwendige Enzyme in allen Zelltypen vorhanden sind.

3.11. Apoptose in Hydra ähnelt den Mechanismen in Vertebraten

Fasst man alle Ergebnisse zusammen, so stellt man fest, dass das apoptoseregulierende Netzwerk in Hydra viel komplexer ist, als bisher angenommen. Damit unterscheidet es sich deutlich von den Mechanismen der Apoptose in *C.elegans* und *D.melanogaster* und ähnelt eher denen der Vertebraten. Es sind sowohl Komponenten des intrinsischen, als auch des extrinsischen Signalweges bekannt. Außerdem kann Apoptose in Hydra, wie auch in *C.elegans*, durch die Ab- oder Anwesenheit von Wachstumsfaktoren wie Insulin reguliert werden. In Abbildung 60 ist ein Vergleich der wichtigsten an der Apoptose beteiligten Proteine aus *Homo sapiens*, *C.elegans*, *D.melanogaster* und *Hydra vulgaris* dargestellt.

	<i>Homo sapiens</i>	<i>C. elegans</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>Hydra vulgaris</i>
Caspasen	Initiatorcaspasen	Caspase 2, 8, 9, 10	Ced-3	HyCed-3-like HyCasp8-like HyCasp3-like
	Effektorcaspasen	Caspase 3, 6, 7	-----	HyCasp9-like 1, 2, 3, 4, 5, 6 HymetaCasp-like
APAF-1	APAF-1	Ced-4	DARK	HyAPAF-1
Bcl-2 Familie	Bcl-2 Subfamilie	Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W Mcl-1, Bcl-B	-----	HyBcl-2-like 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
	Bax/Bak-Subfamilie	Bax, Bak, Bok	Debcl (proapopt.) Buffy (antiapopt.)	HyBak-like 1, 2
	BH3-only Subfamilie	Bid, Bad, Bim, Bik, Bmf, Noxa, Puma, Hrk	Egl-1	(evtl. HyBH3-only like 1-5)
BIR Proteine	IAPs	XIAP, NAIP, c-IAP1, c-IAP2	DIAP1, DIAP2	HyIAP
	Survivin	Survivin	Deterin	HySurvivin
IAP Antagonisten	Bruce	Bruce/Apollon	Bruce	HyBruce
	AIF	Smac/Diablo, HtrA2/Omi	Hid, Reaper, Grim Sickle	unbekannt
mt Faktoren	Cytochrom c	Cytochrom c	Cytochrom c	HyAIF
	p53	p53	p53	Hyp53 (unvollständig)
TNF	Rezeptor	TNF-R	Wengen	HyTNF-like Rezeptor
	Ligand	TNF	Eiger	unbekannt

Abb. 60: Vergleich der Apoptosemaschinerie in *H.sapiens*, *C.elegans*, *D.melanogaster* und *H.vulgaris*.

Da alle wichtigen Komponenten der Apoptosemaschinerie von Hydra bekannt sind, kann man spekulieren, in welchem Zusammenhang die einzelnen Proteine zueinander stehen. Nach einem apoptotischen Stimulus sorgen wahrscheinlich BH3-*only* Proteine für Aktivierung der proapoptotischen Moleküle HyBak-*like* 1 und 2, sowie HyBcl-2-*like* 5. Durch Ausbildung von Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran gelangt HyCytochrom_c in das Zytoplasma und bindet an HyAPAF-1. Für die Ausbildung eines vollständigen Apoptosoms wird an dieser Stelle eine Caspase mit CARD Domäne benötigt. Welche Hydracaspase diesen Platz einnimmt, ist noch nicht geklärt. Nach Aktivierung der Initiator- und Effektorcaspasen kommt es zur Apoptose. Aus dem extrinsischen Signalweg sind ebenfalls einige Komponenten bekannt. So konnte ein TNF-Rezeptor ähnlicher Rezeptor gefunden werden, der 2 TNFR-Domänen aufweist. Das Molekül FADD, das mit diesem Rezeptor wechselwirkt, ist ebenfalls bekannt (A.Böttger, persönliches Gespräch). Höchstwahrscheinlich kommt es zur Aktivierung der Hydra Caspase mit *Death Effector Domain* (siehe Abbildung 9), was das Einleiten der Apoptose nach sich zieht. Die Hydracaspasen können im gesunden Zustand der Zelle durch HyIAP inhibiert werden, welcher 3 BIR-Domänen und eine RING-Domäne aufweist (kloniert von Flosdorff und Lasi). Die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren wirkt sich negativ auf den Zustand einer Zelle aus. Gelangt der Transkriptionsfaktor HyFOXO in den Zellkern, so wird durch die Transkription von spezifischen Genen Apoptose ausgelöst. In Abbildung 61 ist ein hypothetisches Modell für die Regulation der Apoptose in Hydra dargestellt.

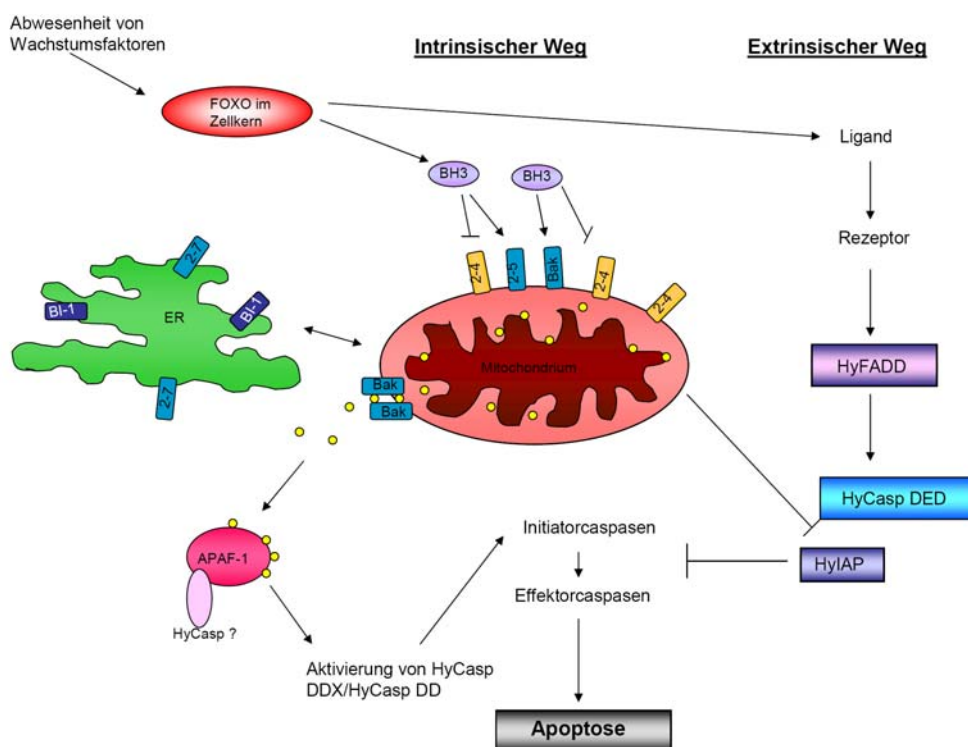


Abb. 61: Schematische Darstellung der Apoptose in Hydra.

4. Zusammenfassung

In den letzten Jahren konnte herausgefunden werden, dass in Hydra sehr viele Komponenten der Apoptosemaschinerie, die auch aus höheren Tieren bekannt sind, konserviert sind. Bislang kannte man Caspasen und Mitglieder der Bcl-2 Familie. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Mitglieder der Bcl-2 Familie sowie das Protein APAF-1 beschrieben und Experimente zum Verständnis ihrer Funktionen durchgeführt. Des Weiteren wurde erstmals die Regulation der Apoptose durch Wachstumsfaktoren untersucht.

4.1. Untersuchung der Bcl-2 Familie

Die Bcl-2 Familie von Proteinen stellt eine wichtige regulatorische Komponente der Apoptose dar, welche sich in pro- und antiapoptotische Mitglieder unterteilen lässt. Die Gemeinsamkeit der Proteine beruht auf Bcl-2-Homologie-Domänen. Die meisten Mitglieder dieser Familie haben zusätzlich eine stark hydrophobe C-terminale Domäne, welche eine Lokalisation an diverse Membranen ermöglicht.

Die Hydra Bcl-2 Familie wurde um fünf Bcl-2 ähnliche Proteine und ein Bak-ähnliches Protein erweitert. Somit sind nun aus Hydra insgesamt neun Mitglieder der Bcl-2 Familie bekannt. Ihre genomische Struktur ähnelt dem „Ur-Gen“ der Bcl-2 Familie, Bcl-2, welches nur ein einziges Intron aufweist. In einem *Yeast-Two-Hybrid* Versuch konnten nur die Proteine HyBcl-2-like 4 und HyBak-like 1 miteinander interagieren, HyBcl-2-like 4 konnte zusätzlich Homodimere ausbilden. Die Interaktion war abhängig von der Funktionalität der BH3 Domäne. Durch die Expression von GFP-Fusionsproteinen wurde gezeigt, dass alle Proteine, außer HyBcl-2-like 7, in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. HyBcl-2-like 7 befindet sich am endoplasmatischen Retikulum. Die Wirkung auf den apoptotischen Prozess wurde durch Überexpression der Proteine in HEK 293T- Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Proteine HyBak-like 1 und 2, sowie in geringerem Maße auch HyBcl-2-like 5 Apoptose induzieren konnten, während HyBcl-2-like 4, 6 und 7 in Zellen, in welchen Apoptose durch Camptothecin ausgelöst worden war, stark antiapoptotisch wirkten. Eine bioinformatische Suche nach Genen für BH3-only Proteine im Hydragenom förderte fünf Gene, die für BH3-only Proteine kodieren könnten, zutage. Auch ein sehr gut konserviertes APAF-1 Homolog wurde gefunden und kloniert (Diplomarbeit Wagner, 2009). Dieses besitzt eine CARD-Domäne, eine NB-ARC-Domäne und sieben

WD40 Repeats. Es ist mit dem ER assoziiert und wird hauptsächlich in Nervenzellen exprimiert.

Die Mechanismen, die Teilung und Fusion von Mitochondrien bewirken, wurden ebenfalls erstmalig in Hydra untersucht. Dabei konnte herausgefunden werden, dass eine Überexpression von Hydra Mitofusin eine Verlängerung der Mitochondrien induziert. Die Effekte der Bcl-2 Proteine auf diesen Prozess sind vielfältig. Durch die Ko-Expression von HyBcl-2-*like* 4 und 6, sowie durch HyBak-*like* 2 wurde die durch HyMitofusin induzierte Fusion der Mitochondrien weitgehend unterbunden. Die Proteine HyBcl-2-*like* 1 und 2 jedoch störten den Fusionsprozess nicht.

Diese Ergebnisse zusammengenommen zeigen, dass die Hydra Bcl-2 Familie ebenso wie ihre Verwandten in höheren Tieren Funktionen in der Regulation der Apoptose wie auch in der Regulation der Mitochondrienmorphologie haben.

4.2. Der Insulinsignalweg in Hydra

Der Insulinsignalweg spielt in Säugetieren eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutzuckerspiegels. Bei Invertebraten wird er dazu benötigt, Wachstum zu kontrollieren. In dieser Arbeit wurde der Insulinsignalweg in Hydra anhand der drei bislang bekannten Hydra Insulin Gene untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die An- oder Abwesenheit des in Vesikeln lokalisierten HyInsulin1 Auswirkungen auf die durch den Transkriptionsfaktor HyFOXO regulierten Apoptosemechanismen hat. Der Beweis für das Zusammenwirken des HyInsulin-HyFOXO-Signalweges über den Regulator HyPKB/Akt war die starke Verminderung der Zahl apoptotischer Zellen bei Ko-Expression von HyInsulin1 und HyFOXO, im Gegensatz zu Ko-Expression von HyFOXO und RFP als Kontrolle, in mit Wortmannin behandelten Tieren.

5. Material und Methoden

5.1. Materialien

5.1.1. Chemikalien und Bezugsquellen

Acrylamid-Bisacrylamid	Biorad
Agarose (PeqGold Universalagarose)	Peqlab
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck
Ampicillin	Roth
Aprotinin	Sigma
APS	Sigma
Bacto Agar	Roth
Bacto Pepton	Difco
Bromphenolblau	Serva
BSA	Roth
Calciumchlorid Dihydrat	Roth
Camptothecin	Biocat
Coomassie-Blau	Roth
DAPI	Sigma
DMSO	Sigma
DTT	Sigma
EDTA	Roth
EGTA	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol p.a.	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Galaktose	Roth
D (+) Glukose	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Difco
HEPES	Sigma
Imidazol	Roth
IPTG	Roth
Isopropanol	Roth

Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kanamycin	Roth
Leupeptin	Sigma
Lithiumacetat	Sigma
Luminol	Roth
Magermilchpulver	Töpfer
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Sigma
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Sigma
2-Mercaptoethanol	Merck
Methanol p.a.	Roth
MitoTrackerGreen FM	Molecular Probes
MOPS	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogenphosphat	Roth
Nukleotidtriphosphate	PeqLab
Paraformaldehyd	Sigma
Para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma
PEG3350	Sigma
Pefabloc	Roche
Pepstatin A	Sigma
Ponceau	Sigma
Raffinose	Roth
D (+) Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
SDS	Roth
Spermidin	Fluka
Temed	Merck
Tetracyclin	Serva
TO-PRO 3	Molecular Probes
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Tween-20	Roth
Urea	Sigma

Urethan	Sigma
Vectashield	Vector Laboratories
Xylene Cyanol	Sigma
Yeast nitrogen base	Difco

5.1.2. Allgemeine Lösungen und Puffer

1000 x Ampicillin Lösung	100 mg/ml in ddH ₂ O; sterilfiltrieren
200 x Kanamycin Lösung	50 mg/ml in ddH ₂ O; sterilfiltrieren
2500 x Tetracyclin-Lösung	12,5 mg/ml in 100% Ethanol; sterilfiltrieren
Zytoplasmapuffer	25 mM Hepes, pH 7,5 5 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 10 mM DTT 1 % (v/v) Inhibitor-Cocktail 1 % (v/v) Pefabloc
100 mM IPTG Lösung	238 mg ad 10 ml mit ddH ₂ O; sterilfiltrieren
Mitochondrienpuffer	5 mM Tris, pH 7,5 1 mM EGTA 250 mM Saccharose 1% C10/Pefabloc
1M Tris Puffer	60,5 g Tris 400 ml ddH ₂ O pH mit HCl einstellen, ad 500 ml mit ddH ₂ O
Tfb I-Lösung	30 mM Kac 0,1 M RbCl 10 mM CaCl ₂ 15% Glycerin 50 mM MnCl ₂ pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren
Tfb II-Lösung	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15% Glycerin pH 6,5 einstellen, sterilfiltrieren

5.1.5. Lösungen für Polyacrylamid-Gelelektrophorese

12% Trenngel (für 2 Gele)	3 ml Acrylamid/Bislösung 29:1 2,5 ml 1,5M Tris pH 8,8 100 µl 10% SDS 500 µl 50% Glycerol 3,9 ml ddH ₂ O 36 µl 10% APS 15 µl Temed (Tetramethylenethyldiamin)
Sammelgel (für 2 Gele)	600 µl Acrylamid/Bislösung 410 µl 1,5M Tris Puffer pH 6,8 100 µl 10% SDS 3,89 ml dd H ₂ O 50 µl 10% APS 5 µl Temed (Tetramethylenethyldiamin)
2x Ladepuffer	0,5 ml 1,5M Trispuffer pH 6,8 3,2 ml 50% Glycerol 3,2 ml 10% SDS 0,8 ml 2-Mercaptoethanol 0,8 ml 1% Bromphenolblau 0,3 ml ddH ₂ O
4x Ladepuffer	1,0 ml 1,5 M Tris-Puffer pH 6,8 3,2 ml 100 % Glycerol-Lösung 2,56 ml 25 % SDS-Lösung 1,6 ml 2-Mercaptoethanol 320 µl 5 % Bromphenolblau-Lösung 120 µl ddH ₂ O
1,5 M Tris Puffer pH 6,8 für Sammelgele	12 g Tris 0,8 g SDS 150 ml ddH ₂ O pH 6,8 einstellen; ad 200 ml mit ddH ₂ O
1,5 M Tris Puffer pH 8,8 für Trenngele	91 g Tris 2 g SDS 400 ml ddH ₂ O pH 8,8 einstellen; ad 500 ml mit ddH ₂ O
10% APS	1g APS; ad 10 ml mit ddH ₂ O
10 x Laufpuffer für PAGE	30 g Tris 144,1 g Glycin 10 g SDS 900 ml ddH ₂ O pH 8,3 einstellen ad 1l mit ddH ₂ O

5.1.6. Lösungen für Coomassie-Färbung

Coomassie Färbelösung 0,5 g Brilliant Blue R250
100 ml Isopropanol
70 ml Eisessig
ad 1l mit ddH₂O

Schnellentfärber 400 ml Isopropanol
100 ml Essigsäure
600 ml ddH₂O

Entfärber 100 ml Isopropanol
70 ml Essigsäure
ad 1l mit ddH₂O

5.1.7. Lösungen für Western Blot Analysen

10x Blotpuffer 30 g Tris
144 g Glycin
ad 1l mit ddH₂O

1x Blotpuffer zur Verwendung 100 ml 10x Blotpuffer
200 ml Methanol
ad 1l mit ddH₂O

0, 1% Ponceau 1 g Ponceau S
50 ml Eisessig
ad 1l mit ddH₂O

5% Magermilchpulver (Blocklösung) 2,5 g Magermilchpulver
ad 50 ml mit TBST

10x TBST 24,2 g Tris
80 g NaCl
10 ml Tween 20
800 ml ddH₂O
pH 7,6 mit Salzsäure einstellen
ad 1l mit ddH₂O

10x TBS 30 g Tris
80 g NaCl
2 g KCl
800 ml ddH₂O
pH 7,4 mit Salzsäure einstellen
ad 1l mit ddH₂O

ECL Lösungen

Lösung A	1 ml 250mM Luminol 440 µl 90mM Coumarinsäure 10 ml 1M Tris/HCl ad 100 ml mit ddH ₂ O
Lösung B	64 µl 30% H ₂ O ₂ 10 ml 1M Tris/HCl ad 100 ml mit ddH ₂ O

5.1.8. Lösungen für Agarosegel-Elektrophorese

3,3% Ethidiumbromid	75 ml Stammlösung 10 mg/ml 15 ml 10xMOPS-Lösung 135 ml ddH ₂ O
50x TAE	242 g Tris 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5M EDTA-Lösung (pH 8,0) ad 1l mit ddH ₂ O
1% Agarosegel	1g Agarose ad 100 ml mit 1x TAE-Puffer
5x Ladepuffer für Agarosegel	3 ml 100% Glycerol 25 mg Bromphenolblau 25 mg Xylenecyanol ad 10 ml mit ddH ₂ O
5.1.9. Proteaseinhibitoren	
Antipain 100x	5 mg Antipain (Sigma) ad 1 ml mit ddH ₂ O
Calpain Inhibitor II 100x	1mg Calpain (Roche) ad 1 ml mit ddH ₂ O
Pefabloc 100x	100 mg Pefabloc SC ad 2 ml mit ddH ₂ O
1M DTT-Lösung	1,54 g DTT ad 10 ml mit ddH ₂ O
Cocktail C10 (100x)	100 µl Pepstatin A (1 mg in 100 µl DMSO) 200 µl Aprotinin (1 mg in 200 µl ddH ₂ O) 200 µl Leupeptin (1 mg in 200 µl ddH ₂ O) 500 µl ddH ₂ O

5.1.10. Medien für Bakterien

LB-Medium	10g NaCl 5g Hefeextrakt 10g Trypton ad 1l mit ddH ₂ O, autoklavieren
LB-Agar	10g NaCl 5g Hefeextrakt 10g Trypton ad 1l mit ddH ₂ O + 15g Agar, autoklavieren
SOB-Medium	0,58g NaCl 5g Hefeextrakt 20g Trypton 10ml 250mM KCl-Lösung 900ml ddH ₂ O, pH 7,0 mit NaOH einstellen ad 980ml mit ddH ₂ O autoklavieren 10ml 1M MgCl ₂ (steril) 10ml 1M MgSO ₄ (steril)
SOC-Medium	50ml SOB Medium 397µl 50% Glukose (20mM)
NZY⁺ - Medium	10g Caseinhydrolysat 5g Hefeextrakt 5g NaCl pH 7.5 mit NaOH einstellen autoklavieren 12,5ml 1M MgCl ₂ zugeben 12,5ml 1M MgSO ₄ zugeben 10ml 2M Glukoselösung zugeben
ϕb Medium	0,6 mM MgSO ₄ ·7H ₂ O 5 g Hefeextrakt 20 g Pepton pH 5,6 einstellen ad 1l mit ddH ₂ O

5.1.11. Medien für die Kultur von *S.cerevisiae*

YPD	20g Pepton 10g Hefeextrakt 20g Glukose pH 6,5 einstellen, ad 1 l mit ddH ₂ O für YPD-Agar 17-20g Agar zugeben
------------	--

DOB-Glukose 1,7g YNB
 5g Ammoniumsulfat
 20g Glukose
 pH5,8; ad 900ml; autoklavieren;
 100ml Dropout-Lösung zugeben
 für DOB-Glukose-Agar 17-20g Agar zugeben

DOB-Galaktose-Raffinose 1,7g YNB
 5g Ammoniumsulfat
 20g Galaktose
 10g Raffinose
 pH5,8; ad 900ml; autoklavieren;
 100ml Dropout-Lösung zugeben
 für DOB-Galaktose-Raffinose-Agar 17-20g
 Agar zugeben

10x Dropout-Lösungen 1l (alle Aminosäuren von Sigma)

	Menge in mg/l		URA/HIS	HIS/LEU	URA/HIS/TRP	URA/HIS/LEU/TRP
	URA	HIS				
L-Isoleucin	300	300	300	300	300	300
L-Valin	1500	1500	1500	1500	1500	1500
L-Adeninhemisulfat	200	200	200	200	200	200
L-Arginin	200	200	200	200	200	200
L-Histidin	200					
L-Leucin	1000	1000	1000		1000	
L-Lysin	300	300	300	300	300	300
L-Methionin	200	200	200	200	200	200
L-Phenylalanin	500	500	500	500	500	500
L-Threonin	2000	2000	2000	2000	2000	2000
L-Tryptophan	200	200	200	200		
L-Tyrosin	300	300	300	300	300	300
L-Uracil		200		200		
L-Glutamat	1000	1000	1000	1000	1000	1000
L-Aspartat	1000	1000	1000	1000	1000	1000
L-Serin	4000	4000	4000	4000	4000	4000

pH 5,8 einstellen und autoklavieren

5.1.12. Lösungen für die Transformation von *S.cerevisiae*

10 X TE 100 mM Tris-HCl (pH 7,5)
 10 mM EDTA

10 X LiOAc 1 M Lithiumacetat

Polyethylene Glycol 50 % (w/v) Polyethylene Glycol-3350

1 X TE/LiOAc (frisch herstellen) 1 ml 10 X TE
 1 ml 10 X LiOAc
 8 ml steriles ddH₂O

1 X TE/LiOAc/PEG (frisch herstellen)	1 ml 10 X TE 1 ml 10 X LiOAc 8 ml 50 % PEG-3350
Carrier DNA (20 mg/ml)	Sonifizierte <i>salmon sperm</i> DNA (Sigma) vor Verwendung 3x5min bei 95°C kochen
5.1.13. Medien für <i>Hydra vulgaris</i>	
Hydramedium	20 ml 1M CaCl ₂ Lösung 40 ml 500x M-Solution ad 20 l mit dH ₂ O
500x M-Solution	29,22 g NaCl 12,32 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 3,73 g KCl 60,55 g Tris pH 7,6 mit Salzsäure einstellen ad 1l mit ddH ₂ O
5.1.14. Lösungen für Immunfluoreszenz an Gewebekultur	
1xPBS	16,35 g NaCl 402 mg KCl 3,6 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 490 mg KH ₂ PO ₄ ad 1800 ml mit ddH ₂ O pH 7,4 ad 2l mit ddH ₂ O, autoklavieren
4% Paraformaldehyd in PBS	4% (w/v) PFA in 1x PBS
Permeabilisierungslösung	1% Triton in PBS
Blockierungslösung	10% FKS (fetales Kälberserum) 0,2% Tween-20 in PBS
Waschlösung	1% BSA 0,2% Tween-20 in PBS

5.1.15. Antikörper**5.1.15.1. Erstantikörper**

Bezeichnung	Spezies	WB	IF	Firma
Anti-Myc	Maus	1:5000	--	Invitrogen
Anti-Xpress	Maus	1:5000	--	Invitrogen
Anti-LexA	Kaninchen	1:200	--	Upstate
Anti-HA	Ratte	1:200-1:500	1:200-1:500	Roche
Anti-HyBcl2-1	Hühnchen	1:100	1:100-1:500	Davids Biotechnologies
Anti-HyBak1	Hühnchen	1:100	1:100-1:500	Davids Biotechnologies
Anti-GM130	Schaf	--	1:100	Barr-Labor (Liverpool)
Anti-Calnexin	Maus	--	1:100	Chemicon
Anti-ATP- Synthase	Maus	1:500	1:100	Invitrogen
Anti Insulin1,2,3 Peptidantikörper	Kaninchen	1:50-1:200	1:50-1:200	Davids Biotechnologies
Anti-Cytochromc	Kaninchen	--	1:100	AG W.Neupert
Anti-Nv1	Maus	--	1:2	Selbst hergestelltes Antiserum

5.1.15.2. Zweitantikörper

Bezeichnung	WB	IF	Firma
α - Maus HRP	1:3000	--	GE Healthcare
α - Ratte HRP	1:3000	--	Jackson Immuno Research
α -Huhn HRP	1:15.000	--	Jackson Immuno Research
α -Maus IRDye 800	1:10.000	--	Licor
α -Ratte IRDye 800	1:10.000	--	Licor
α -Huhn IRDye 800	1:10.000	--	Biomol
α -Kaninchen IRDye 800CW und 680CW	1:10.000	--	Licor
α -Maus Fluorescein	--	1:500	Polyscience
α -Maus Cy3	--	1:500	Dianova
α -Ratte FITC	--	1:200	Dianova
α -Kaninchen Alexa 488	--	1:400	Molecular Probes
α -Ratte Cy3	--	1:200	E.Kremmer, GSF
α -Huhn FITC	--	1:160	Sigma
α -Schaf Cy3	--	1:100	Jackson Immuno Research
α -Kaninchen-cy3	--	1:500	GE Healthcare

5.1.16. Enzyme und Puffer

Alle Restriktionsenzyme und die zugehörigen Puffer samt BSA wurden von New England Biolabs (NEB) bezogen

T4-DNA Ligase	NEB
T4-DNA Ligase Puffer	NEB
RNase I	Qiagen
<i>Shrimp</i> alkalische Phosphatase mit Puffer	USB
Antarktische Phosphatase mit Puffer	NEB
Taq-DNA Polymerase mit Puffer	Peqlab
Phusion DNA Polymerase	NEB

5.1.17. Geräte

Primus advanced 25	Peqlab
Robocycler gradient 96	Stratagene
PDS-1000/He Particle Delivery System	Biorad
Gene Quant RNA/DNA Calculator	Pharmacia
Leica TCS SP konfokales Laser Scanning Mikroskop	Leica Microsystems
Leica MZ 12 (Fluoreszenz-Stereomikroskop)	Leica Microsystems
Leica M205 FA (Fluoreszenz-Stereomikroskop)	Leica Microsystems
Fluoreszenzmikroskop	Nikon
Odyssey Infrared Imager	Licor
Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine CP1000	AGFA

5.1.18. Kits

Plasmid Maxiprep Kit	Macherey-Nagel
First-Strand-cDNA Synthesis Kit	Amersham
QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
QuickPrep Micro mRNA Purification Kit	Amersham
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab
TOPO TA-cloning kit pCR®2.1.-TOPO	Invitrogen
TOPO TA-cloning Kit for sequencing	Invitrogen
TOPO TA-zero blunt cloning Kit	Invitrogen
GeneRacer Kit	Invitrogen
Grow'n'Glow Yeast two Hybrid Kit	MoBiTec

5.1.19. Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

- XL1-Blue MRF⁺ $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F}' \text{ proAB lacI}^q\text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^r\text{) Su}^- \text{ (nonsuppressing) } \lambda^R \text{ (lambda resistant)}$ (dieser Stamm wurde für Klonierungen und bakterielle Expression von Proteinen verwendet)
- Top 10 (Invitrogen) für Klonierung mit TOPO-TA cloning Kits
- BL21(DE3)-RIL *E.coli* B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA Hte [argU ileY leuW Cam^r] für bakterielle Expression von Proteinen*

5.1.20. Hefestämme

Für den *Yeast-Two-Hybrid* Interaktionsversuch wurden folgende Hefestämme verwendet:

Hohe Sensitivität	leu2::6	EGY48
Mittlere Sensitivität	leu2::4	EGY194
Niedrige Sensitivität	leu2::2	EGY188

Die Hefestämme haben den Genotyp: MAT α , *trp* 1, *his* 3, *ura* 3, *leu2::2/4/6* LECAop-LEU2. Die verschiedenen Stämme unterscheiden sich durch das im Genom integrierte LEU2 Reportergen welches zwei bis sechs Kopien des LexA Operators enthält. Die Anzahl dieser Kopien korreliert direkt mit der Sensitivität des Stammes.

5.1.21. DNA- und Proteingrößenstandards

Gene Ruler DNA ladder mix	Fermentas
PeqGold Proteinmarker IV	Peqlab

5.1.22. Vektoren

für Expression in Bakterien

pTRC His2C	Invitrogen
pRSETA	Invitrogen
pCR2.1-TOPO	Invitrogen
pCR Blunt II TOPO	Invitrogen

für Expression in Zellkultur

pEGFP C1/N1	Clontech
pHA	Abwandlung des pcDNA3 (MPI)
pcDNA 3	Invitrogen

für Expression in Hydra

hoT G	AG Böttger (Böttger et al., 2002)
hoT Red	hoTG mit RFP

für Expression in Hefe (alle von MoBiTec)

	Hefemarker	<i>E.coli</i> -Marker	Bemerkungen
pGNG1	Uracil	Ampicillin	GFP-Reporter
pEG202	Histidin	Ampicillin	Bait Plasmid
pJG4-5	Tryptophan	Ampicillin	Prey Plasmid
pEG202-p53	Histidin	Ampicillin	Bait Kontroll Plasmid
pJG4-5-LTA	Tryptophan	Ampicillin	Prey Kontroll Plasmid
pEG202-Gal4	Histidin	Ampicillin	Positivkontrolle

5.1.23. Primer

alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen

Primer für Klonierungen der HyBcl-2 Familie in hoT G/ hoT Red:

5'bcl2-3	GGA ATT CAT GGC GAG ATA TGT AAA TAG
3'bcl2-3	GGA ATT CTC ACC TCA GAA ATT TCA TAG C
5'Bcl-2-4ECO	GGA ATT CAT GGC TGG ACC TCC TAA TGC
3'Bcl-2-4ECO	GGA ATT CTT ATT TAA ACG TTA ACA TAA GTA ATG C
5'EcoBcl2-5	GGA ATT CAT GAC AAC GAA TTC TTT TTC
3'EcoBcl2-5	GGA ATT CTT ATG ATT TTG CAT ACA ATA GAC C
5'EcoBcl2-6	GGA ATT CAT GAC TAC AGT AAC ATT ATC G
3'EcoBcl2-6	GGA ATT CTC ACC TCA TAC CAG TTG
5'EcoBcl2-7	GGA ATT CAT GGA CTC AAA GAT TAT AAG AAA G
3'EcoBcl2-7	GGA ATT CAA TGT CTA ATA TTA CAT ATT TCC T
5'EcoBak2	GGA ATT CAT GGC TGA ACA TGA ATG C
3'EcoBak2	GGA ATT CTT AGG GTT GAT GCC ATT TTC

Primer für 3'RACE von HyBcl-2-like 7:

Bcl2-7 race	ATG CAA GGT GCT TTA GGC AGT AAC TTT
Bcl27 ger	GGA ATT CTC AGA GTT CAT TAC TCA CAA AAT TTT G

Primer für Klonierungen der HyBcl-2 Familie in pEGFP:

5'Bcl-2 pEGFP Xh	CCG CTC GAG CTA TGT CAG ATA CAC CAA TTA ATT TC
5'Bax pEGFP Xho	CCG CTC GAG CTA TGA AAG ATC CTA TGA TGG
5'Bak pEGFP Xho	CCG CTC GAG CTA TGG CAG AAG CAG CTG
XhoBcl2-3pEGFP	CCG CTC GAG CTA TGG CGA GAT ATG TAA ATA G
5'XhopEGFPBcl2-4	CCG CTC GAG CTA TGG CTG GAC CTC CTA ATG C
5'XhoBcl2-5	CCG CTC GAG CTA TGA CAA CGA ACT CTT TTT C
5'XhoBcl2-6	CCG CTC GAG CTA TGA CTA CAG TAA CAT TAT CG
5'XhoBcl2-7	CCG CTC GAG CTA TGG ACT CAA AGA TTA TAA GAA
5'XhoBak2	CCG CTC GAG CTA TGG CTG AAC ATG AAT GC

Als 3' Primer wurden die 3'EcoRI Primer der hoT G Klonierungen verwendet

Primer für Klonierungen der Zielgene in pEG202/pJG 4-5:

5 EcoHuBcl-XL	GGA ATT CAT GTC TCA GAG CAA CCG G
3 XhoHuBcl-XL	CCG CTC GAG TTA GCG GTT GAA GCG TTC C
3 XhoHyBak	CCG CTC GAG TTA TTT CTT TAA ACC AAC AAG AGC
3 XhoBcl2-4	CCG CTC GAG TTA TTT CGT CTT TTC AAA GAA AAT T
5 EcoBcl2-2	GGA ATT CAT GTC AGA TAC ACC AAT TAA
3 XhoBcl2-2	CCG CTC GAG TTA CTT GAC ATC AAA GTT TTC
3 XhoBcl2-1	CCG CTC GAG TTA TTT CCA CCA TGT GTT TTG TGC
Bcl2-5	CCG CTC GAG TTA CCA AAA GTA GTC TGT AGG
Bcl2-6	CCG CTC GAG TTA GCT CCA TGA TGA TTG ATT ATT TG
Bcl2-7	CCG CTC GAG TTA CCT TTT AGG TTT TTT GCG ATC C
Bak2	CCG CTC GAG TTA TTG AAG CCA TAC TTC AAT ATT AG
5'MTFeco	GGA ATT CAT GCC ACC AGG AAA ACC
3'MTFeco	GGA ATT CTC AAA TCT TAC TCA CGC TTA AG

Als 5'Primer wurden teilweise die 5' EcoRI Primer der hoT G Klonierungen verwendet

Primer für Klonierungen der HyBcl-2 Familie in bakterielle Expressionsvektoren:

5'Xho_Bax_PrSET	CCG CTC GAG ATG AAA GAT CCT ATG ATG G
5'Xho_Bak_Prset	CCG CTC GAG ATG GCA GAA GCA GCT G
3'Eco_Bak_Prset	GGA ATT CTT AGT TTT TGG CAA TCC ACT TTG C
3'Eco_Bak_Prset	GGA ATT CTT ATT CAA TGT TCA AGC GAC ATA AC

Primer für Mutagenese der BH3 Domäne:

5 Bak_mut	CTT GGT AGA GTC GAA GCT TCA TTT GGT GAT G
3 Bak_mut	CAT CAC CAA ATG AAG CTT CGA CTC TAC CAA G
5_mut2_4	CAT TGA AAT AGC AAA AAC AGA ACA AAG AGT TGG AG
3_mut2_4	CTC CAA CTC TTT GTT CTG TTT TTG CTA TTT CAA TG

Primer für Klonierungen der HyInsuline in pHA:

5'Eco_ins1HA	GGA ATT CAT GCT TAT TGA AAT GCA AAG CTC
3'Not_ins1HA	ATA GTT TAG CGG CCG CCA CAT GGA TAC TCC AAT ATT TCT AG
5'Eco_ins2HA	GGA ATT CAT GAA TTT TAA CAA TTT CAC TTT TAT G
3'Not_ins2HA	ATA GTT TAG CGG CCG CCA TTA CAG TAT TCC ATA ATT TCG TC
5'Eco_ins3HA	GGA ATT CAT GTA CGA TAA AAT GAC GGT TG
3'Not_ins3HA	ATA GTT TAG CGG CCG CCG TTA CAG TAT TCA GAT ATC TC

Primer für Klonierungen der HyInsuline in pRSET:

5'Xho_Ins1_pRSET	CCG CTC GAG GGT GAG GAA AAA CCT GCT CAC
3'Eco_Ins1_pRSET	GGA ATT CCT CAA CAT GGA TAC TCC AAT ATT TC
5'Xho_Ins2_pRSET	CCG CTC GAG AAA TCT GCG GAT GAT TAC GAC
3'Eco_Ins2_pRSET	GGA ATT CCT TAA TTA CAG TAT TCC ATA ATT TC
5'Xho_Ins3_pRSET	CCG CTC GAG GAA ACG ATA GAA TCA TCC G
3'Eco_Ins3_pRSET	GGA ATT CCT TAG TTA CAG TAT TCA GAT ATC TC

Primer für Klonierung von HyInsulin1/2/3-HA in hoT G (ohne GFP)

5'NheInsulin1	CTA GCT AGC ATG CTT ATT GAA ATG CAA AGC TC
5'NheInsulin2	CTAGCTAGCATGAATTTTAACAATTTCACTTTTATG
5'NheInsulin3	CTA GCT AGC ATG TAC GAT AAA ATG ACG GTT G
3'Insulin1HA (universell auch für Ins2 und3)	GGAATTCTTAAGCGTAGTCTGGGACGTCG

Primer für Klonierungen der Mitochondrienfusions-/teilungsgene:

5'Fis1_EcoRI	GGA ATT CAT GGC TGA CTT TCA CAC TC
3'Fis1_EcoRI	GGA ATT CTC AAC GAC GTT TTG CCA GC
5'MTFkurz	TCC CCC GGG ATG TTG AAT AAT GTA GTT GAT GGG
5'MTFlang	TCC CCC GGG ATG CCA CCA GGA AAA CCT TTC
5'MTF_Sma_ganz	TCC CCC GGG ATG GGC CCT AAA TTT GAT CCC
5'Mitofusin_neu	CCC CCC GGG GTT GAT GGG TAT TTA AGT CAA G
5'Sma_Mitofusin	TCC CCC GGG ATG AGC AGC CAG TTA GCA C
3'Sma_Mitofusin	TCC CCC GGG TCA AAT CTT ACT CAC GCT TAA G
5'MTFeco	GGA ATT CAT GCC ACC AGG AAA ACC
3'MTFeco	GGA ATT CTC AAA TCT TAC TCA CGC TTA AG
3'MTFsmaneu	TCC CCC GGG AAT CTT ACT CAC GCT TAA G
Mtfseq	GCA GCA GAT CGT ATT TTT TTT GTA TC
MTFseq2	CCT CCA GAC CCT CTG GC

Primer für die Klonierung von Hydra Cytochrom c:

5'NheCytC	CTA GCT AGC ATG GGA GCT GAA AAA ATT CC
3'SmaCytC	TCC CCC GGG TTT TTT ACA CTC TTC TTC CAA GTA G

Sequenzierprimer:

RFPseq3	CAA TTA CCA GGT GCT TAT AAA ACA G
GFPi SeqPr 3'	GACCACATGGTCCTTCTTG
Aktin-2-seq3'	GCGCTCAAGCGATTCACC
GFPi SeqPr 5'	CACCATCTAATTCAACAAGAATTG
bait	CGT CAG CAG AGC TTC ACC
prey	CTG AGT GGA GAT GCC TCC

5.1.24. Sonstige Materialien

ECL Röntgenfilme	Super RX 100NIF Fujifilm
ECL-Lösungen	Amersham oder selbst hergestellt
Goldkugeln 1,0µm	Biorad
Nitrozellulosemembran (HyBond)	Amersham
Whatmanpapier	Schleicher&Schuell

5.2. Molekularbiologische Standardmethoden

5.2.1. Agarosegel

Um DNA der Größe nach elektrophoretisch aufzutrennen, wurde ein 1% iges Agarosegel gegossen. Dafür wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer aufgeköcht. Nach abkühlen auf 50°C wurden 7µl Ethidiumbromid pro 70 ml Gel zugegeben und das Gel gegossen. Die Probe wurde mit 5x Ladepuffer versetzt. Zusätzlich wurden 5µl eines Größenmarkers aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80V in 1x TAE. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

5.2.2. DNA- Konzentrationsbestimmung und Sequenzierung

Die Konzentration der DNA wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm in dem DNA *Calculator* der Firma Pharmacia bestimmt. Die DNA Konzentration berechnete sich wie folgt: $Ab_{S_{260nm}} \times \text{Verdünnung} \times 50 = \text{DNA Gehalt in ng/}\mu\text{l}$. Für eine Sequenzierung bei MWG-Biotech AG wurden 1-2µg DNA auf dem Heizblock getrocknet und versendet.

5.2.3. Kultivierung von *E.coli*

E.coli Zellen wurden bei 37°C auf LB-Agarplatten mit Antibiotika kultiviert oder, ebenfalls bei 37°C, als Flüssigkulturen bei 170 bis 220 rpm in LB Medium mit Antibiotika geschüttelt.

5.2.4. Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für die Herstellung von elektrokompetenten Bakterien wurden 10 ml LB/ Tetracyclin-Medium (enthält 5 mg/ml Tetracyclin) mit XL1 Blue MRF' (Glycerolstock von Bakterien oder LB-Tetracyclin-Platte mit Bakterien) angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 250 ml LB-Medium mit 2 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis OD (optische Dichte) $_{600} = 0,6$ geschüttelt. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (30 min bei 4000rpm, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskaltem, sterilen ddH₂O resuspendiert, in ein 50 ml-Zentrifugationsgefäß überführt und mit eiskaltem ddH₂O auf 50 ml aufgefüllt. Dieser Schritt wurde 4-mal wiederholt. Beim vierten Schritt wurde das Bakterienpellet in wenig ddH₂O resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 10000rpm und 2°C. Das bakterielle Pellet wurde anschließend im gleichen Volumen 10 % Glycerol resuspendiert, zu 50 µl aliquotiert und auf Trockeneis oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

5.2.5. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien wurden am Vortag 10 ml ψ b Medium mit Bakterien aus einem Glycerolstock angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 100 ml ψ b Medium mit der Vorkultur angeimpft und bis zu einer $OD_{600}=0,5$ kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min auf Eis inkubiert, danach für 5 min bei 5000g und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde dann in 40 ml eiskalter Tfb I-Lösung resuspendiert und wieder für 5 min auf Eis gekühlt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Bakterienpellet in 4 ml Tfb II-Lösung resuspendiert. Dann wurden die Bakterien für 15 min auf Eis gekühlt und schließlich in Aliquots zu je 50 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.6. Transformation von Bakterien mittels Elektroporation

Für die Elektroporation wurde ein Aliquot elektrokompetente Zellen auf Eis aufgetaut, die DNA wurde zugegeben (10-100 ng oder 5 μ l eines Ligationsansatzes/ad 100 μ l mit ddH₂O) und 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Ω , 25 μ F und 2,5 kV in 0,2 cm Küvetten. Nach der Transformation wurde 1 ml SOC Medium zugegeben und die Zellen wurden 1 h bei 37°C horizontal geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterienzellen auf LB-Platten mit Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.7. Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock

Für die Transformation durch Hitzeschock wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, die DNA wurde zugegeben (10-100 ng oder 5 μ l eines Ligationsansatzes) und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 45 Sekunden, danach folgte eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Nach der Transformation wurde 1 ml SOC Medium zugegeben und die Zellen wurden 1 h bei 37°C horizontal geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterienzellen auf LB-Platten mit Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.8. Präparation von Plasmid- DNA (Minipräparation)

Je eine Bakterienkolonie wurde in 4 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 *rpm* geschüttelt. Nach Zentrifugation der Bakterienzellen wurde das Pellet in 100 μ l eiskalter Lösung I (50 mM Glukose, 25 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) resuspendiert. Danach wurden 200 μ l frische Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % SDS) zugeben und durch fünfmaliges Invertieren gemischt. Nach der

Zugabe von 150 μl eiskalte Lösung III (60 ml 5M KAc, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml ddH₂O) wurde die Suspension kurz gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte danach eine Zentrifugation bei 12000g für 10 min. Der Überstand mit Plasmid-DNA wurde mit 2 Volumen 100 % Ethanol 2 min bei RT präzipitiert und anschließend gemischt, wieder abzentrifugiert und das DNA-Pellet wurde dann mit 500 μl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 50 μl ddH₂O mit 20 $\mu\text{g/ml}$ RNase aufgenommen.

5.2.9. Präparation von Plasmid- DNA (Maxi- und Midipräparation)

Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden mit dem Plasmid Maxiprep Kit der Firma Machery-Nagel nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt, danach wurde die DNA Konzentration bestimmt. Midi-Präparationen wurden mit dem PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.2.10. Standard PCR

Der Reaktionsansatz einer Standard-PCR setzte sich wie folgt zusammen:

1-2 μl Template DNA
5 μl 5'Primer (5 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)
5 μl 3'Primer (5 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)
1 μl dNTPs (jeweils 10mM)
5 μl Polymerasepuffer (10x)
0,5 μl Taq-Polymerase
ad 50 μl mit sterilem ddH₂O

Es erfolgte eine erste Denaturierung für fünf min bei 95°C, die Denaturierungen der nächsten Zyklen wurden für 30sec bei 95°C durchgeführt. Die Annealingtemperatur wurde mit dem Programm *Gene Jockey* ausgehend von der Schmelztemperatur berechnet (einmal mit und einmal ohne die anzufügende Restriktionsschnittstellen). Von dieser Temperatur wurden dann 5°C abgezogen. Es wurden zuerst 5 Zyklen mit der niedrigeren Temperatur gefahren, danach 25-30 Zyklen mit der höheren Temperatur. Die Elongation wurde für 1 min bei 72°C durchgeführt. Die letzte Elongation wurde für 7 min bei 72°C durchgeführt.

5.2.11. Mutagenese PCR

Die Mutagenese-Reaktion wurde mit dem QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene durchgeführt.

Reaktionsansatz:

5µl 10x Reaktionspuffer
 x µl (50ng) dsDNA Template
 xµl (125ng) Primer 1
 xµl (125ng) Primer 2
 1µl dNTP Mix
 ad 50µl mit ddH₂O
 dann 1µl *PfuTurbo* DNA Polymerase (2.5U/µl) zugeben

Reaktionsbedingungen:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	5 min
2	12-16	95°C	30sec
		55°C	1min
		68°C	2min/kb Plasmidlänge

Nach erfolgter Reaktion wurde der Ansatz für 2 min auf Eis gekühlt. Dann wurde 1µl *DpnI* (10U/µl) zugegeben (dieses verdaut das *Template*), gemischt und für 1h bei 37°C inkubiert. Für die Transformation wurde ein Aliquot XL1-Blue *supercompetent cells* (im Kit enthalten) auf Eis aufgetaut, 1 µl der DNA wurde zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C für 45 Sekunden, danach folgte eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Nach der Transformation wurden 0,5ml NZY⁺ Medium zugegeben und die Zellen wurden 1 h bei 37°C horizontal geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterienzellen auf LB-Platten mit Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.2.12. Amplifikation von cDNA Enden mittels RACE

Zur Isolierung von mRNA aus Hydra wurde ein Kit von Amersham verwendet. Es wurden 100 Hydren in 400µl Extraktionspuffer zerspritzt. Dann wurden 600 µl Elutionspuffer zugegeben und die Probe wurde zentrifugiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Gewinnung von cDNA wurde 1µg mRNA mit einem Not I-(dT)18 Primer inkubiert. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben. Für eine RACE-PCR wurde die gewonnene mRNA mit dem *GeneRacer* Kit in cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Für eine RACE-PCR wurde dann ein genspezifischer Primer verwendet, der eine bekannte Sequenz des zu klonierenden Gens enthielt und ein mitgelieferter Primer aus dem *GeneRacer* Kit, welcher an die 5' bzw. 3' Enden der cDNA bindet. Die RACE PCR erfolgte nach Protokoll des Herstellers bei einer möglichst hohen Temperatur um größtmögliche Spezifität zu erhalten.

5.2.13. Klonierung mit TOPO Kit

Für Klonierungen mit dem *TOPO TA-cloning* Kit wurden 4µl PCR-Produkt mit 1µl salzhaltiger Lösung (im Kit mitgeliefert) und 1µl Vektor für 30 min bei RT inkubiert und anschließend wurden 4µl davon zu chemisch kompetenten TOPO-Zellen gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Die Transformation erfolgte bei 42°C für 30 Sekunden, es wurden 250µl SOC Medium zugegeben und 1h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterienzellen wurden auf antibiotikahaltige Platten ausplattiert.

5.2.14. Restriktionsenzymatische Spaltung

Für restriktionsenzymatische Spaltung von DNA wurden 1-2 µg DNA eingesetzt und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in 1 x Reaktionspuffer unter der Verwendung von 1xBSA für 2 h bei 37°C oder bei 25°C (SmaI) inkubiert.

5.2.15. Gelextraktion

Die Gelextraktion erfolgte mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit der Firma Peqlab nach Angaben der Hersteller. Die DNA wurde mit 20-40µl ddH₂O eluiert.

5.2.16. Dephosphorylierung und Ligation

Für eine Ligation wurde das Insert in 10-15 fachen molaren Überschuss im Verhältnis zum Vektor verwendet. Der Vektor wurde vor der Ligation mit der mit *shrimp* alkalischen Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Die Ligation mit T4 Ligase fand über Nacht bei 16°C unter Verwendung eines ATP-haltigen Puffers statt. Am nächsten Tag wurde der Ligationsansatz für 10 min bei 65°C inaktiviert und konnte direkt zur Transformation verwendet werden.

5.2.17. Verwendete Plasmide

bereits vorhandene Plasmide

Gen	Vektor	Expression in	Herkunft
HyBcl2-1	hoT G und hoT Red	Hydra	Diplomarbeit Lasi
HyBcl2-2	hoT G und hoT Red	Hydra	Diplomarbeit Lasi
HyBak1	hoT G und hoT Red	Hydra	Diplomarbeit Lasi
HyInsulin 1	hoT G ohne GFP	Hydra	Diplomarbeit Gradinger
HyFoxo	hoT G	Hydra	Diplomarbeit Gradinger

in dieser Arbeit klonierte Plasmide

Gen	Vektor	Expression in
HyBcl2- <i>like</i> 3	hoT G	Hydra
HyBcl2- <i>like</i> 4	hoT G	Hydra
HyBcl2- <i>like</i> 5	hoT G	Hydra
HyBcl2- <i>like</i> 6	hoT G	Hydra
HyBcl2- <i>like</i> 6-TM	hoT G	Hydra
HyBcl2- <i>like</i> 7	hoT G	Hydra
HyBak- <i>like</i> 2	hoT G	Hydra
HyBcl2- <i>like</i> 1	pEGFP	HEK 293T
HyBcl2- <i>like</i> 2	pEGFP	HEK 293T
HyBcl2- <i>like</i> 3	pEGFP	HEK 293T
HyBcl2- <i>like</i> 4	pEGFP	HEK 293T
HyBcl2- <i>like</i> 4 BH3Mut	pEGFP	HEK 293T
HyBcl2- <i>like</i> 5	pEGFP	HEK 293T
HyBcl2- <i>like</i> 6	pEGFP	HEK 293T
HyBcl2- <i>like</i> 7	pEGFP	HEK 293T
HyBak- <i>like</i> 1	pEGFP	HEK 293T
HyBak- <i>like</i> 1 BH3Mut	pEGFP	HEK 293T
HyBak- <i>like</i> 2	pEGFP	HEK 293T
HuBcl-xL	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 1	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 2	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 3	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 4	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 5	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 6	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 7	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HyBak- <i>like</i> 1	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HyBak- <i>like</i> 2	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HuBcl-xL	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 1	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 1 BH3Mut	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 2	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 2 BH3Mut	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 3	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 4	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 4 BH3Mut	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 5	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 6	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 7	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBak- <i>like</i> 1	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBak- <i>like</i> 1 BH3Mut	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBak- <i>like</i> 2	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyBcl2- <i>like</i> 1	pRSET	<i>E.coli</i>
HyBak- <i>like</i> 1	pRSET	<i>E.coli</i>
HyInsulin 1	pHA	HEK 293T
HyInsulin 2	pHA	HEK 293T

HyInsulin 3	pHA	HEK 293T
HyInsulin 1	pRSET	<i>E.coli</i>
HyInsulin 2	pRSET	<i>E.coli</i>
HyInsulin 3	pRSET	<i>E.coli</i>
HyInsulin 1-HA	hoT G ohne GFP	Hydra
HyInsulin 2-HA	hoT G ohne GFP	Hydra
HyInsulin 3-HA	hoT G ohne GFP	Hydra
HyFoxo	hoT Red	Hydra
Mito-GFP	hoT G	Hydra
Mito-RFP	hoT Red	Hydra
HyFis 1	hoT G	Hydra
HyMitofusin	hoT G ohne GFP	Hydra
HyMitofusin	pEG202	<i>S.cerevisiae</i>
HyMitofusin	pJG4-5	<i>S.cerevisiae</i>
HyCytochrom c	hoT G	Hydra

5.2.18. Protein SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese

Durch SDS-PAGE wurden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Zuerst wurde ein 12% iger Trenngel gegossen, welches nach Polymerisation von etwa 20 min mit Sammelgel überschichtet wurde, welches dann 15 min auspolymerisierte. Die Proteinproben für die SDS-PAGE wurden mit 2x oder 4x Auftragspuffer gemischt und 5 min bei 100°C gekocht. Von den Proben wurden bis zu 20 µl pro Spur auf das Gel geladen. Als Größenstandard wurde 5 µl Protein-Marker aufgetragen. Der Lauf des Gels erfolgte in 1xSDS-PAGE-Laufpuffer bei 80V bis die Proben das Trenngel erreicht hatten (ca. 15min), danach erfolgte der Lauf des Gels bei 180V bis die blaue Front des Ladepuffers den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

5.2.19. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

(Western Blot)

Der Western Blot dient dazu, die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran zu übertragen und diese dann durch Antikörper nachzuweisen. Der Transfer der Proteine erfolgte in 1 x Blotting Puffer über Nacht bei 19V oder für 2 Stunden bei 200 mA. Anschließend wurde die Membran 1-2min mit Ponceau gefärbt um zu testen ob der Transfer erfolgreich war. Die Membran wurde dann für 1h bis über Nacht in 5% Milchpulver in TBST geblockt. Das weitere Vorgehen war wie folgt: Inkubation des ersten Antikörpers in 5% Milchpulver in TBST für 1h, danach 3x 10min waschen in 1x TBST. Inkubation des zweiten Antikörpers in 5% Milchpulver in TBST für 1h, wieder 3x 10 min

waschen in 1x TBST danach 1x kurz mit TBS waschen. Anschließend konnte die Membran entwickelt werden.

Entwicklung eines Western Blots mittels ECL-Reaktion

In einem Schälchen wurden je 2 ml ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 gemischt. Darin wurde die Membran für eine Minute geschwenkt, in eine Hülle aus Plastikfolie gelegt und unter Rotlicht ein Film aufgelegt. Die Belichtung erfolgte in einer geschlossenen Kasette für eine halbe Minute bis zu einer Stunde. Die Entwicklung erfolgte in einer Entwicklermaschine der Firma AGFA.

Entwicklung eines Western Blots mit dem Licor Odyssey

Für die Entwicklung einer Membran mit dem Licor Odyssey Gerät wurde diese luftblasenfrei auf das Gerät aufgelegt. Das Einscannen der Membran erfolgte je nach gewähltem Zweitantikörper bei 700 oder 800 nm mit der Licor Odyssey Software.

5.2.20. Coomassie-Färbung

Nach dem Lauf des SDS-Gels wurde das Trenngel für 30 min in Coomassie-Blau-Färbelösung geschüttelt. Anschließend wurde es 10 min in Schnellentfärber geschüttelt und dann über Nacht in Entfärber gewaschen, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt waren.

5.2.21. Bakterielle Expression von Proteinen in *E. coli*

Für die bakterielle Expression von Proteinen in großem Maßstab wurde eine Bakterienkolonie in 125 ml LB mit Antibiotikum angeimpft und über Nacht im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 25 ml Übernachtskultur in 500 ml LB mit Antibiotikum angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 geschüttelt. Dann erfolgte die Induktion mit 1mM IPTG. Die Zellen wurden 4 Stunden nach der Induktion durch Zentrifugation geerntet.

5.2.22. Herstellung von bakteriellem Zell-Lysat und Reinigung His-gekoppelter Proteine

Für die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen wurde das Bakterienpellet aus 2 Liter Kultur verwendet. Das Bakterienpellet wurde in Native Binding Buffer aufgenommen und durch Sonifizieren (5 mal 10 Sekunden mit 10 Sekunden Pause) aufgeschlossen. Die Reinigung erfolgte mit Nickel Sepharose *High Performance Beads* von der Firma Amersham nach Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde im Dialyse-Schlauch bei 4 °C gegen 1x PBS dialysiert.

5.2.23. Sonifizieren von Bakterienproben

Das Pellet von 2ml Bakterien wurde in 5000µl *Osmotic shock buffer* mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte 3x(3x10Sekunden) auf Eis. Danach wurde das Lysat 10 min bei 12000g und 4°C zentrifugiert und in Überstand und Pellet getrennt.

5.3. Standardmethoden für *Hydra vulgaris*

5.3.1. Kultivierung von *Hydra vulgaris*

Hydra vulgaris wurde bei 18°C in Hydramedium kultiviert und fünfmal in der Woche mit *Artemia nauplii* der Firma Sanders Brine Shrimp Company gefüttert. Fünf bis sechs Stunden nach der Fütterung wurden die Hydren gewaschen. Einmal in der Woche wurden die Hydren in neue Schalen umgesetzt.

5.3.2. Immunfluoreszenzfärbung ganzer Hydren (*whole mounts*)

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Hydren wurden diese zunächst in 2% Urethan relaxiert. Anschließend erfolgte die Fixierung für 1 Stunde in 2% PFA oder Lavdovsky. Danach wurde 3 mal 10 min mit PBS gewaschen, 15 min mit Permeabilisierungslösung inkubiert und anschließend 15 min in Blocklösung geblockt. Der erste Antikörper wurde in Blocklösung verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde wieder 3 mal 10 min gewaschen und die Inkubation mit dem zweiten Antikörper in Blocklösung erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunklen. Nach dem sich anschließenden Waschen wurde für 5 min ein Gegenfärbung mit DAPI und To-PRO-3 (1:1000 in 1xPBS) durchgeführt. Die Hydren wurden in Vectashield eingebettet.

5.3.3. Färbung mit *MitoTracker Green*

Für eine Färbung mit dem Farbstoff *MitoTracker Green* wurden die Hydren 15 min mit einer 750nM *MitoTracker Green* Lösung inkubiert, anschließend 3x 10 min mit Hydramedium gewaschen und danach am Fluoreszenzmikroskop angeschaut.

5.3.4. Transformation von Hydren mit der Goldkanone

Zur Vorbereitung der *Microcarrier* wurden 30mg Goldkugeln in 1ml 70% Ethanol 3 bis 5 min kräftig gemischt. Danach setzten sich die Goldkugeln für 15 min ab und wurden kurz zentrifugiert. Folgende Waschschrte wurden anschließend 3 Mal wiederholt:

1ml steriles ddH₂O zugeben, 1 min mischen, 1 min absetzen lassen, kurz zentrifugieren, Überstand verwerfen. Am Ende wurden die Kügelchen in 500µl sterilem 50% Glycerol in

Hydramedium resuspendiert. Um die DNA auf *Microcarrier* zu präzipitieren wurden 40µl der Goldsuspension 5 min gemischt um Goldklümpchen zu lösen. Dann wurden 20µg DNA in einem Volumen von 15µl zugegeben, gemischt und währenddessen 50 µl 2,5M CaCl₂ und 20 µl 0,1M Spermidin zugegeben. Diese Mischung wurde für 3 min gemischt. Es erfolgten zwei Waschstschritte mit 70% und 100% Ethanol und am Ende wurden die *Microcarrier* in 50-75 µl 100% Ethanol aufgenommen und je 25µl auf die *Macrocarrier* aufgetropft und getrocknet.

Die Transformation der Hydren erfolgte mit dem PDS-1000/He Particle Delivery System von BioRad. Pro Transformation wurden 100 Hydren verwendet, die am Tag der Transformation ungefütert waren. Die Heliumflasche wurde aufgedreht und einen Druck von 850-900 psi eingestellt. Die Vakuumpumpe und das *particle delivery system* wurden eingeschaltet. Vor der Transformation wurde ein Probeschuss ohne Hydren, nur mit *rupture disc*, durchgeführt.

Die in Isopropanol getränkte *rupture disc* wurde in die *Disk Retaining Cap* gelegt und der *Macrocarrier* in die *Macrocarrier Launch Assembly* gelegt. Es wurde der mittlere Abstand zwischen *Disk Retaining Cap* und *Macrocarrier Launch Assembly* gewählt. Danach wurde eine Petrischale mit etwa 100 Hydren (diese müssen ohne Medium in der Mitte der Petrischale liegen) auf den *Target Shelf* gestellt. Es wurde dann Vakuum angelegt und der Feuerknopf betätigt, bis die *rupture disc* brach. Die Transformation wurde 2-3-mal mit den gleichen Tieren durchgeführt. Die Hydren wurden bei 18°C und im Dunklen inkubiert, bis grün fluoreszierende Zellen unter einem Fluoreszenzbinokular entdeckt werden konnten.

5.3.5. Herstellung von Hydraextrakt durch Zerspritzen, Einfrieren und Sonifizieren

Zur Herstellung eines Hydraextrakts wurden 50 Hydren in Hydramedium gewaschen, das Hydramedium abgenommen und 200 µl Zytoplasmapuffer zugegeben. Die Hydren wurden mit einer Spritze homogenisiert und bei -80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde mit 6 Impulsen von 10 Sekunden bei hoher Intensität sonifiziert. Die Zellbruchstücke wurden bei 10.000 upm, 4°C für 15 min abzentrifugiert, Pellet verworfen und zum Überstand 20 µg/ml Calpain und 50 µg/ml Antipain zugegeben.

5.3.6. Subzelluläre Fraktionierung von Hydren

500 Tiere wurden in 2 ml Mitochondrienpuffer aufgenommen, für 20 min auf Eis inkubiert und danach mit ca. 35 Stößen Dounce-homogenisiert. Das Lysat wurde 10 min bei 1000g zentrifugiert, um Kerne abzutrennen. Der hierbei gewonnene Überstand wurde anschließend 30 min bei 16.000 g zentrifugiert, um Mitochondrien abzutrennen. Der verbleibende

Überstand wurde für 1 h bei 100.000 g zentrifugiert, bei dem hierbei entstandenen Pellet handelte es sich um die Vesikelfraktion. Die Proben konnten nun mit 2x oder 4x SDS-Ladepuffer versetzt werden und auf einem PAGE Gel analysiert werden.

5.3.7. Carbonataufschluss von Mitochondrien

Um Proteine von Mitochondrien zu separieren wurde ein Carbonataufschluss durchgeführt. Dafür wurden 50µg aus subzellulärer Fraktionierung gewonnene Mitochondrien mit 50µl 20mM HEPES/KOH pH 7,4 für 5 min auf Eis inkubiert, dann wurde 20µl 200mM Na₂CO₃ zugegeben und es wurde 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 45000 rpm in der Ultrazentrifuge. Im Pellet waren dann die Membranen mit Membranproteinen vorhanden.

5.4. Methoden für *S.cerevisiae*

5.4.1. Kultivierung von *S.cerevisiae*

S.cerevisiae Zellen wurden bei 30°C auf YPD-Platten oder DOB-Agarplatten kultiviert, oder, ebenfalls bei 30°C, als Flüssigkulturen bei 160 rpm in entsprechendem Medium geschüttelt.

5.4.2. Anlegen eines Glycerolstocks für *S.cerevisiae*

Hierzu wurde eine Hefekolonie in 4 ml YPD- Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Von dieser Kultur wurden 850µl mit 150µl 100% sterilem Glycerin gemischt. Diese Kulturen wurden dann bei -80°C gelagert.

5.4.3. Transformation von *S.cerevisiae*

Für die Transformation von *S.cerevisiae* wurde am Vorabend Kolonie Hefe in 5ml YPD angeimpft und für 24h geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden die Hefen auf eine OD von 0.1 in 60ml YPD angeimpft und bis zu einer OD von 0.5-0.7 geschüttelt.

Die Hefen wurden dann abzentrifugiert für 5 min bei 1500g. Das Hefepellet wurde in 20ml ddH₂O resuspendiert, wieder zentrifugiert und dann in 5ml 1xTE/LiOAc resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 300µl 1xTE/LiOAc resuspendiert. Als Transformationsansatz wurden 250ng Plasmid DNA zu 25µg carrier DNA (sonifizierte salmon sperm DNA) (Endvolumen 10µl) geben und gemixt. Pro Ansatz wurden 50µl der resuspendierten Zellen zu der DNA geben. Anschließend wurden 340µl der 1xTE/LiOAc/PEG Mischung zugegeben, invertiert, 30 min bei 30°C inkubiert, dann 15 min

bei 42 °C inkubiert und schließlich wurde 600µl ddH₂O zugeben und es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Das Pellet wurde in 100µl ddH₂O resuspendiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

5.4.4. Yeast-Two-Hybrid Interaktionsversuch

Der Interaktionsversuch wurde mit dem *Grow'n'Glow* Kit der Firma MoBiTec nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Hefevektor pEG202 enthielt das *bait*-Gen und der Vektor pJG 4-5 das *prey*-Gen. Als Positivkontrolle wurden in dem Kit die Interaktionspartner p53 und LTA mitgeliefert. Außerdem enthielt das Kit den Reporter pGNG1 mit dem GFP Gen. Das *bait*-Plasmid und der pGNG1 Vektor wurden gleichzeitig in die Hefen eingebracht und auf glukosehaltiges Selektionsmedium ausplattiert. Diese Hefen wurden dann nach Angaben des Herstellers auf die Autoaktivierung des GFP und des Leu Reporters geprüft. Waren diese beiden Kontrollen negativ, so wurde das dritte Plasmid, das *prey* Plasmid, in die Hefen eingebracht und auf galaktose/raffinose-haltige Selektionsmedien ausplattiert. Die gewachsenen Hefekolonien wurden am Fluoreszenzbinokular auf die Expression von GFP examiniert.

5.4.5. Elimination von falsch positiven Klonen im Yeast-Two-Hybrid

Um falsch positive Klone zu eliminieren wurden die Hefen, die auf dem galaktose/raffinose-haltigen Medium gewachsen waren, auf glukosehaltiges Medium umplattiert. Wuchsen die Hefen nur auf dem galaktose-raffinosehaltigen Medium war die Interaktion echt, wuchsen sie hingegen auch auf dem glukosehaltigen Medium so konnte man von einem unspezifischen Wuchs der Hefen ausgehen, da das B42 Fusionsprotein nur exprimiert wird, wenn der Gal1,10 Promotor auf dem Vektor pJG4-5 durch Galaktose induziert wurde.

5.4.6. Nachweis in Western Blot Analysen

Eine Hefekolonie wurde in 4ml entsprechendem Selektionsmedium über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde 1ml Hefen (OD₆₀₀=1) abzentrifugiert, in 50µl 2xLadepuffer aufgenommen, bei -80°C eingefroren, wieder aufgetaut und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert. Zum Nachweis der *bait*-Proteine wurde ein lexA Antikörper verwendet, zum Nachweis der *prey*-Proteine ein HA-Antikörper.

5.5. Zellkultur

Für alle Versuche wurden HEK 293T- Zellen (*Human Embryonic Kidney*) verwendet. Diese wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Als Medium wurde DMEM (*Dulbeccos minimal essential medium*) verwendet, das mit dem Antibiotikum Pen/Strep und 10 % FKS (fetales Kälberserum) versetzt wurde (alles von der Firma Biochrom). Alle Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

5.5.1. Splitten der Zellen

HEK 293T-Zellen sind adhärent wachsende Zellen. Bei diesen wird das Medium erneuert, wenn die Zellen zu 70– 80 % konfluent sind. Um die Zellen abzulösen wird das Kulturmedium entfernt und dann der Zellrasen ein Mal mit PBS gewaschen. Um die Zellen restlos vom Flaschenboden zu lösen, wurden sie kräftig mit PBS abgespült. Die Zellen wurden danach entweder auf 6-Loch Platten mit oder ohne Deckgläschen gegeben oder in kleine Flaschen verteilt.

5.5.2. Transfektion von HEK 293T- Zellen mit PEI

Für die Transfektion sollten die Zellen 50- 60 % konfluent sein. Etwa 2 Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Pro Loch einer 6- Lochplatte wurden dann zu 8µg DNA, die aus einer Maxipräparation stammte, 150 µl DMEM- Medium (ohne Zusätze) gegeben. Dazu wurden 24µl PEI (poly-ethylenimin; A.Gahl, München) pH 7,0 zugegeben, leicht geschüttelt und es wurde bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Diese Mischung wurde dann tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und nach 4-stündiger Inkubation wurde das Medium erneut gewechselt. Die Zellen wurden nach 24h-48h für die Versuche verwendet.

5.5.3. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebekulturzellen

Das Medium der am Vortag transfezierten HEK 293T Zellen wurde abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 1x PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 15 min mit 4 % PFA/PBS fixiert und danach noch zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min mit Permeabilisierungslösung. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 1xPBS wurden die Zellen 1 Stunde in Blocklösung bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte dann die Inkubation mit dem Erstantikörper (verdünnt in Blocklösung) für 1h. Nach drei 10-minütigen Waschschritten mit Waschlösung erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper ebenfalls für 1h bei Raumtemperatur, aber im Dunklen. Anschließend wurden die Zellen wieder gewaschen, die Kerne wurden mit DAPI/TO-PRO-3 gefärbt und

die Deckgläschen wurden in Vectashield eingebettet und mit Nagellack versiegelt.

Um eine bessere Konservierung des endoplasmatischen Retikulums während der Fixierung zu gewährleisten, wurde hier mit eiskaltem 100% Methanol für 5 min bei -20°C fixiert. Ein Permeabilisierungsschritt war danach nicht mehr notwendig.

5.5.4. Induktion von Apoptose durch Camptothecin

Zur Untersuchung antiapoptotischer Eigenschaften der Hydra Bcl-2 Proteine wurde in HEK 293T-Zellen die Induktion von Apoptose durch Behandlung mit Camptothecin, einem Topoisomerase I Inhibitor, durchgeführt. Diese Methode wurde in der Literatur bereits beschrieben (Wang et al., 2006; El-Assaad et al., 1998). Camptothecin aktiviert Apoptose durch Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges (Stefanis et al., 1999). Für den Versuch wurden HEK 293T-Zellen mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert und nach 24 h (wenn das Protein bereits exprimiert wurde) mit 10µM Camptothecin für 24 h behandelt. Die transfizierten Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Als Marker für die Apoptose dienten hierbei Veränderungen der Zellkernmorphologie wie die Kondensierung und Fragmentierung des Chromatins oder das Schrumpfen des Zellkerns.

5.6. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Mit dem LEICA TCS SP Konfokalen Laser Scanning Mikroskop konnten optische Schnitte angefertigt werden. Es wurde ein Ölimmersions Plan-Apochromat 100/1.4 NA Objektiv verwendet. Die Fluorochrome FITC und GFP wurden durch einen Argon Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsfilter von 520-540 nm sichtbar gemacht. Für TO-PRO-3, welches als Kernfarbstoff verwendet wurde, wurde ein Helium-Neon Laser mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm und einem Emissionsfilter von 660-760 nm verwendet. Um Cy₃-Fluorochrome und RFP-Signale zu detektieren wurde ein Krypton-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 568 nm und einem Emissionsfilter von 575-585 nm verwendet. FITC und TO-PRO-3 Signale wurden gleichzeitig gescannt, falls auch RFP Signale eingescannt wurden, so geschah dies sequentiell um eine unspezifische Anregung zu vermeiden. Teilweise wurde auch eine Aufnahme im Phasenkontrast eingescannt. Die Auflösung der Bilder war 512 x 512 pixel. Der Abstand zwischen einzelnen optischen Schnitten betrug 300nm bis 1µm. Jede Ebene wurde automatisch 4-mal eingescannt um Hintergrund zu reduzieren. Die einzelnen 8-bit Bilder je einer Zell-Ebene wurden mit Adobe Photoshop CS zu einem RGB Bild übereinander gelagert, indem jedem Kanal eine Falschfarbe zugeordnet wurde.

5.7. Software

Die Software *ClustalW2* und *Clustal X* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) wurde verwendet um Sequenzvergleiche zu erstellen. Zum translatieren von Sequenzen wurde das *translate tool* verwendet (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). Hydrophobititätsanalysen wurden mit dem Programm *ProtScale* (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl?1>) durchgeführt. Konservierte Domänen konnten mit *SMART* (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) gefunden werden. Transmembrandomänen wurden mit dem Programm *TMHMM* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) vorhergesagt. Um Proteinstrukturen vorherzusagen wurde das Programm *PredictProtein* (<http://www.predictprotein.org/>) verwendet. Zum gleichen Zweck wurde auch das Programm *SOPMA* (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) benutzt. Für diverse Analysen wie *BLAST* oder Suche nach konservierten Domänen wurde die Seite *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) verwendet. Vorhersagen über die Proteinlokalisierung wurden mit *PSORT* gemacht (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>). *Coiled coils* wurden mit dem Programm *COILS* (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) berechnet. Sequenzanalysen wurden mit dem Programm *Gene Jockey* durchgeführt. Für *EST*-Sequenzen und Genmodelle wurde die Seite des Hydragenoms verwendet (<http://hydrasome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>). Das Hydragenom wurde vollständig sequenziert (Chapman et al., eingereichtes Manuskript). Die einzelnen sequenzierten DNA-Sequenzabschnitte wurden danach zu so genannten *Contigs* zusammengefügt. Auf diesen findet man die Genmodelle (*Hma*). Zusätzlich werden auf der Seite des Hydragenoms Exons, Introns und *EST*-Sequenzen angezeigt.

6. Literatur

- Accili, D., Arden, K.C.** (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* **117** 421–426
- Acehan, D., Jiang, X., Morgen, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., Akey, C.W.** (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation *Mol Cell* **9** 423-432
- Adams, J.M., Cory, S.** (1998) The Bcl-2 protein Family: Arbiters of cell Survival *Science* **281**, 1322-1326
- Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y., Tsujimoto, Y.** (1994) Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane and mitochondrial membranes *Cancer Research* **54** 2468-2471
- Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., Cohen, P.** (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* **399** 333–338
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E.A., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodrigues, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bharacharya, S., Wissinger, B.** (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28 *nature genetics* **26** 211-215
- Allen, J.W.A., Barker, P.D., Ferguson, S.J.** (2003) A Cytochrome b562 variant with a c-type Cytochrome CXXCH Heme-binding motif as a probe for the *Escherichia coli* Cytochrome c maturation system *The Journal of Biological Chemistry* **278** 52075-52083
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lippmann, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs *Nucleic Acids Research* **25** (17) 3389-3402
- Amiott, E.A., Lott, P., Soto, J., Kang, P.B., McCaffery, M., DiMauro, S., Abel, D., Flanigan, K.M., Lawson, V.H., Shaw, J.M.** (2008) Mitochondrial fusion and function in Charcot–Marie–Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations *Experimental Neurology* **211** 115–127
- Antignani, A., Youle, R.J.** (2006) How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane ? *Current Opinion in Cell Biology* **18** 685-689
- Apfeld, J., Kenyon, C.** (1998) Cell nonautonomy of *C. elegans* daf-2 function in the regulation of diapause and life span *Cell* **95** 199–210
- Apte, S.S., Mattei, M.G., Olsen, B.R.** (1995) Mapping of the human BAX gene to chromosome 19q13.3-q13.4 and isolation of a novel alternatively spliced transcript, BAX delta. *Genomics*. **26**(3):592-4.
- Arden, K.C., Biggs, W.H.** (2002): Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling *Archives of biochemistry and biophysics* **403** 292–298
- Aritomi, M., Kunishima, N., Inohara, N., Ishibash, Y., Ohta, S., Morikawa, K** (1997) Structure of Rat Bcl-xL *The Journal of biological chemistry* **272** (44) 27886–27892

- Ashkenazi, A., Dixit, V.M.** (1998) Death receptors: signalling and modulation *Science* **5381** 1305-1308
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., Rabasa-Lhoret, R., Wallberg-Henriksson, H., Laville, M., Palacín, M., Vidal, H., Rivera, F., Brand, M., Zorzano, A.** (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity *J Biol Chem* **278** 17190-12197
- Bakhshi, A., Jensen, J.P., Goldman, P., Wright, J.J., McBride, O.W., Epstein, A.L., Korsmeyer, S.J.** (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on Chromosome 14 and near transcription unit on 18 *Cell* **41** 899-906
- Berman, S.B., Chen, Y., Qi, B., McCaffery, M., Rucker, E.B., Goebbels, S., Nave, K., Arnold, B.A., Jonas, E.A., Pineda, F.J., Hardwick, J.M.** (2009) Bcl-xL increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons *JCB* **184** 707-719
- Bevan, P.** (2001) Insulin signaling *J cell Sci* **114** 1429-1430
- Biegert, A., und Söding, J.** (2009) Sequence context-specific profiles for homology searching *Proc Natl Acad Sci U S A* **106(10)**:3770-5
- Biggs III, W.H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K., Arden, K.C.** (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** 7421-7426
- Birkenkamp, K.U., Coffey, P.J.** (2003): FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for *Journal of Immunology* **171** 1623-1629
- Birnbaum, M.J., Clem, R.J., Miller, L.K.** (1994) An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs *J.virol.* **68**, 2521-2528
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M.** (2003) A unified model for apical caspase activation *Mol Cell* **11** 529-541
- Borgese, N., Colombo, S., Pedrazzini, E.** (2003) The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane *The Journal of Cell Biology* **161** 1013-1019
- Borgese, N., Brambillasca, S., Colombo, S.** (2007) How tails guide tail-anchored proteins to their destinations *Current Opinion in Cell Biology* **19** 368-375
- Bosch, T.C.G., David, C.N.** (1984) Growth regulation in Hydra: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Dev. Biol.* **104**, 161-171
- Böttger, A., Alexandrova, O.** (2007) Programmed cell death in Hydra *Seminars in Cancer Biology* **17** 134-146
- Böttger, A., Alexandrova, O., Cikala, M., Schade, M., Herold, M., David, C.N.** (2002) GFP expression in Hydra: lessons from the particle gun *Dev. Genes Evol* **212**, 302-305
- Breiter-Hahn, J., Vöth, M.** (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria *Microsc Res Tech* **27** 198-219
- Broggiolo, W., Stocker, H., Tomoatsu, I., Rintelen, F., Fernandez, R., Hafen, E.** (2001) An evolutionary conserved function of the Drosophila insulin receptor and insulin-like peptides in growth control *Curr Biol* **11** 213-221

- Brooks, C., Wei, Q., Feng, L., Dong, G., Tao, Y., Mei, L., Xie, Z., Dong, Z.** (2007) Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins *PNAS* **104** 11649-11654
- Brownawell, A.M., Kops, G.J., Macara, I.G., Burgering, B.M.** (2001). Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factorAFX. *Mol Cell Biol* **21** 3534–3546.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y.** (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303** 2011–2015.
- Burgering, B.M., Kops, G.J.** (2002). Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci* **27** 352–360
- Campbell, N.A.**, (2000) Biologie, 2. korrigierter Nachdruck, *Spektrum Akademischer Verlag*
- Cao, C., Brown, M.R.** (2001) Localization of an insulin-like peptide in brains of two flies *Cell Tissue Res* **304** 317–321
- Chan, S.J., Steiner, D.F.** (2000) Insulin through the ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone *Amer.Zool.* **40** 213-220
- Chapman, J.A., Kirkness, E.F., Simakov, O., Hampson, S.E., Mitros, T., Weinmaier, T., Rattei, T., Balasubramanian, P.G., Borman, J., Busam, D., Disbennett, K., Sumin, N., Sutton, G.G., Viswanathan, L.D., Walenz, B., Goodstein, D.M., Hellsten, U., Kawashima, T., Prochnik, S.E., Putnam, N.H., Shu, S., Blumberg, B., Dana, C.E., Gee, L., Kibler, D.F., Law, L., Lindgens, D., Martinez, D.E., Peng, J., Wigge, P.A., Bertulat, B., Guder, C., Nakamura, Y., Ozbek, S., Watanabe, H., Khalturin, K., Hemmrich, G., Franke, A., Augustin, R., Fraune, S., Hayakawa, E., Hayakawa, S., Hirose, M., Hwang, J.S., Ikeo, K., Nishimiya-Fujisawa, C., Ogura, A., Takahashi, T., Steinmetz, P.R.H., Zhang X, Aufschnaiter, R., Eder, M.K., Gorny, A.K., Salvenmoser, W., Heimberg ,A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Böttger, A., Tischler, P., Wolf, A., Gojobori, T., Remington, T.A., Strausberg, R.L., Venter, J.C., Technau, U., Hobmayer, B., Bosch, T.C.G., Holstein, T.W., Fujisawa, T., Bode, H.R., David, C.N., Rokhsar, D.S., Steele, R.E. *The Dynamic Genome of Hydra*. (eingereichtes Manuskript)**
- Cheatham, B. und Kahn, S.R.** (1995) Insulin action and the insulin signaling network *Endocrine Reviews* **16** 117-142
- Chen, F., Hersh, B.M., Conradt, B., Zhou, Z., Riemer, D., Gruenbaum, Y., Horvitz R.** (2000) Translocation of *C. elegans* CED-4 to Nuclear Membranes During Programmed Cell Death *Science* **287**
- Chen-Levy, Z., Nourse, J., Cleary, M.L.** (1989) The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14:18) translocation *Mol. Cell. Biol.* **9** 701-710
- Cheng, E.H., Kirsch, D.G., Clem, R.J., Ravi, R., Kastan, M.B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J.M.** (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* **278** 1966–1968
- Cheng, E.H., Sheiko, T.V., Fisher, J.K., Craigen, W.J., und Korsmeyer, S.J.** (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis *Science* **301** 513–517

- Chipuk, J.E., Green, D.R.** (2008) How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in cell biology* **18** 157-164
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K.** (2008) Caspases- an update *Comparative Biochemistry and Physiology* **151** 10-27
- Cikala, M.**, (2005) Molekulare Analyse von Caspasen, AIF und PSR in Hydra zur Untersuchung der Evolution des programmierten Zelltods
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Böttger, A., David, C.N.** (1999) Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra *Curr. Biol.* **9**, 959-962
- Clark, K.L., Halay, E.D., Lai, E., Burley, S.K.** (1993). Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **364** 412-420
- Coelho, C.M., Leever, S.J.** (2000) Do growth and cell division rates determine cell size in multicellular organisms? *J Cell Sci* **113** 2927-2934
- Colussi, P.A., Quinn, L.M., Huang, D.C., Coombe, M., Read, S.H., Richardson, H.** (2000) Debcl a proapoptotic Bcl-2 homologue is a component of the *Drosophila melanogaster* cell death machinery *J.Cell.Biol.* **148** 703-714
- Conradt, B., Horvitz, H.R.** (1998) *The C.elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9 *Cell* **93** 519-529
- Conus, S., Rosse, T., Borner, C.** (2000) Failure of Bcl-2 family members to interact with Apaf-1 in normal and apoptotic cells *Cell Death and Differentiation* **7** 947-954
- Cory, S., Adams, J.M.** (2002) The Bcl2 Family: Regulators of the cellular Life-or-Death switch *Nature Reviews* **2**, 647-656
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E.** (1999). Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **13** 2905-2927
- David, C.N.** (1973) A quantitative Method for maceration of hydra tissue *Development Genes and Evolution* **171** 259-268
- David, C.N., Schmidt, N., Schade, M., Pauly, B., Alexandrova, O., Böttger, A.** (2005) Hydra and the evolution of apoptosis *Integr. Comp. Biol* **45**, 631-638
- Delivani, P., Adrain, C., Taylor, R.C., Duriez, P.J., Martin, S.J** (2006) Role for CED-9 and Egl-1 as Regulators of Mitochondrial Fission and Fusion Dynamics *Molecular Cell* **21**, 761-773
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L., Coffey, P.J.** (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol* **10** 1201-1204
- Dlugosz, P.J., Billen, L.P., Annis, M.G., Zhu, W., Zhang, Z., Lin, J., Leber, B., Andrews, D.W.** (2006) Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization *The EMBO Journal* **25** 2287-2296
- Docherty, K., Steiner, D.F.** (1982) Post-translational proteolysis in polypeptide hormone biosynthesis *Annu Rev Physiol* **44** 625-638
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H.** (1999) Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions during Apoptosis *Annu.Rev.Biochem.* **68**, 383-424

- El-Assaad, W., El-Sabban, M., Awaraji, C., Abboushi, N., Dbaibo, G.** (1998) Distinct sites of action of Bcl-2 and Bcl-xL in the ceramide pathway of apoptosis *Biochem J.* **336** 735-741
- Ellis, H.M., und Horvitz, H.R.** (1986) Genetic control of programmed cell death in the nematode *C.elegans*. *Cell* **44** 17-29.
- Erlacher, C.,** (2004) Untersuchungen am Signalweg des Insulinrezeptor Homologs HTK7 (Diplomarbeit)
- Estaquier, J., Arnoult, D.** (2006) CED-9 and EGL-1: A Duo Also Regulating Mitochondrial Network Morphology *Molecular Cell* **21**
- Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., Mihara, K.** (2003) Two Mitofusin Proteins, Mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion *J.Biochem.* **134**, 333-344
- Fernandez, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M., Schlessinger, J.** (1995) The Drosophila insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signalling potential *EMBO J* **14** 3373-3384
- Fields, S., Song, O.,** (1989) A novel genetic method to detect protein-protein interactions *Nature* **340**, 245-246
- Fu, Z., Tindall, D.J.** (2008) FOXOs, cancer and regulation of apoptosis *Oncogene* **27** 2312-2319
- Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I., Mori, N.** (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J* **349** 629–634.
- Garcia-Calvo, M., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Vaillancourt, J.P., Zamboni, R., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A.** (1999) Purification and catalytic properties of human caspase family members *Cell Death and Differentiation* **6**, 362-369
- Gradinger, D.,** (2008) Untersuchungen zum Einfluss des Insulin-Signalweges auf die Regulation des FOXO-Transkriptionsfaktors in Hydra (Diplomarbeit)
- Grens, A., Gee, L., Fisher, A.D., R. Bode, H.R.** (1996) *CnNK-2*, an NK-2 Homeobox Gene, Has a Role in Patterning the Basal End of the Axis in Hydra *Developmental Biology* **180**, 473–488
- Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F.,** (1999) Mitochondrial Evolution *Science* **283**, 1476-1481
- Greer, E.L. und Brunet, A.** (2005) FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression *Oncogene* **24** 7410–7425
- Grunert, M.,** (2006) Die Evolution des programmierten Zelltods Untersuchung von Caspasen in *Hydra vulgaris* (Diplomarbeit)
- Gutsaeva, D.R., Carraway, M.S., Suliman, H.B., Demchenko, I.T., Shitara, H., Yonekawa, H., Piantadosi, C.A.** (2007) Transient Hypoxia stimulates Mitochondrial Biogenesis in Brain Subcortex by a Neuronal Nitric Oxide Synthase-dependent Mechanism *The Journal of Neuroscience* **28** 2015-2024
- Hahn, C., Hirsch, B., Jahnke, D., Dürkop, H., Stein, H.** (1999) Three new types of Apaf-1 in Mammalian Cells *Biochemical and Biophysical Research Communications* **261** 746-749

- Hausmann, G., O'Reilly, L.A., vanDriel, R., Beaumont, J.G., Strasser, A., Adams, J.M., Huang, D.C.S.** (2000) Pro-apoptotic Apoptosis Protease-activating Factor 1 (Apaf-1) has a Cytoplasmic Localization Distinct from Bcl-2 or Bcl-xL *The Journal of Cell Biology* **149** 623-633
- Heath-Engel., H.M., Shore, G.C.** (2006) Regulated targeting of Bax and Bak to intracellular membranes during apoptosis *Cell Death and Differentiation* **13** 1277-1280
- Herberg, J.A., Phillips, S., Beck, S., Jones, T., Sheer, D., Wu, J.J., Prochazka, V., Barr, P.J., Kiefer, M.C., Trowsdale, J.** (1998) Genomic structure and domain organisation of the human Bak gene. *Gene*. **211(1)**:87-94.
- Herold, M., Cikala, M., MacWilliams, H., David, C.N., Böttger, A.** (2002) Cloning and characterisation of PKB and PRK homologs from Hydra and the evolution of the protein kinase family *Dev Genes Evol* **212** 513-519
- Hinds, M.G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J.M., Bailey, M., Huand, D.C.S., Day, C.L.** (2007) Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets *Cell Death and Differentiation* **14** 128-136
- Honda, S., Aihara, T., Hontani, M., Okubo, K., Hirose, S.** (2005) Mutational analysis of action of mitochondrial fusion factor mitofusin-2 *Journal of cell science* **118** 3153-3161
- Hoppins, S., Lackner, L., Nunnari, J.** (2007) The Machines that Divide and Fuse Mitochondria *Annu.Rev.Biochem.* **76** 721-780
- Hossini, A.M., Eberle,J.** (2008) Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 Domain *Biochemical Pharmacology* **76** 1612-1219
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., Hsueh A.J.W.** (1997) Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** 12401-12406
- Huang, P., Yu, T., Yoon, Y.** (2007) Mitochondrial clustering induced by overexpression of the mitochondrial fusion protein Mfn1 causes mitochondrial dysfunction and cell death *European Journal of cell biology* **86** 289-302
- Igaki, T., Miura, M.** (2003) Role of Bcl-2 family members in invertebrates *Biochimica et Biophysica Acta* **1644**, 73-81
- Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., Miura,M.** (2003) Eiger, a TNF superfamily ligand, that triggers the *Drosophila* JNK pathway *EMBO J.* **21** 3009-3018
- Igney, F.H., Krammer, P.H.** (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2(4)**:277-88
- Imaizumi, K., Tsuda, M., Imai, Y., Wanaka, A., Tagaki, T., Tohyama, M.** (1997) Molecular cloning of a novel polypeptide, DP5, induced during programmed cel death *The Journal of Biological Chemistry* **272** (30) 18842-18848
- Jagasia, R., Grote, P., Westermann, B., Conradt, B.** (2005) DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C.elegans* *Nature* **3316**
- Kaestner, K.H., Knochel, W., Martinez, D.E.** (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* **14** 142-146.

- Karbowski, M., Lee, Y.-J., Gaume, B., Jeong, S.Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., Youle, R.J.** (2002) Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis *The Journal of Cell Biology* **159**, 931-938
- Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.-Y., Youle, .RJ.** (2006) Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis *Nature* **443** 658-662
- Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R., Borner, C.** (2003) Characterization of the signal that directs Bcl-cL, but not Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane *The Journal of cell biology* **160** (1) 53-64
- Kaupila, S., Maaty, W.S., Chen, P., Tomar, R.S., Eby, MT., Chapo, J., Chew, S., Rathore, N., Zachariah, S., Sinha, S.K., Abrams, J.M., Chaudhary, P.M.** (2003) Eiger and its receptor, Wengen, comprise a TNF-like system in *Drosophila* *Oncogene* **22** 4860-4867
- Kelekar, A., Thompson, C.B.** (1998) Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in Apoptosis *Trends in Cell Biology* **8**, 324-330
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R.** (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue Genetics *Br. J. Cancer* **26** 239-257
- Kim, P.K., Annis, M.G., Dlugosz, P.J., Leber, B., Andrews, D.W.** (2004) During Apoptosis Bcl-2 changes membrane topology at both the endoplasmic reticulum and mitochondria *Molecular Cell* **14** 523-529
- Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y., Ruvkun, G.** (1997) daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans* *Science* **277** 942-946
- Knapp, R.** (2004) Mitochondrien-Lokalisation von apoptotischen Proteinen und die Identifizierung neuer Caspasegene in *Hydra vulgaris* (Diplomarbeit)
- Kramer, J.M., Davidge, J.T., Lockyer, J.M., Staveley, B.E.** (2003) Expression of *Drosophila* FOXO regulates growth and can phenocopy starvation *BMC Developmental Biology* **3**
- Lalier, L., Cartron, P-F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., Vallette, F.M.** (2007) Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis *Apoptosis* **12** 887-896
- Lasi, M.** (2005) Die Evolution von Mechanismen der Apoptose Caspasen und Proteine der Bcl-2 Familie in *Hydra* (Diplomarbeit)
- Lin, K., Dorman, J.B., Rodan, A., Kenyon, C.** (1997). Daf-16: an HNF-3/ forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* **278** 1319–1322.
- Leervers, S.J.** (2001) Growth control: Invertebrate insulin surprises! *Current Biology* **11** 209-212
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E.** (2001). Molekulare Zellbiologie, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag
- Lovering, R., Hanson, I.M., Borden, K.L.B., Martin, S., O'Reilly, N.J. Evan, G.I., Rahman, D., Pappin, D.J., Trowsdale, J., Freemont, P.S.** (1993) Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**, 2112-2116
- Luo, X., Budihardjo, I., Slaughter, C., Wang, X.** (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface receptors *Cell* **94** 481-490

- Martins de Brito, O., Scorrano, L.** (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria *Nature* **456** 605-610
- Mattusch, C.**, (2007) Binden Insulin ähnliche Peptide in Hydra das Insulinrezeptorhomolog HTK7? (Diplomarbeit)
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., Fukamizu, A.** (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** 11285-11290
- McConnell, S.J., Stewart, L.C., Talin, A., Yaffe, M.P.** (1990) Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance *J.Cell Biol.* **111** 967-76
- MoBiTec** (2004) Grow'n'Glow: The GFP Two-Hybrid System Product Information and Protocols Handbook
- Moldoveanu, T., Liu, Q., Tocilj, A., Watson, M., Shore, G., Gehring, K.** (2006) The X-ray structure of BAK homodimer reveals an inhibitory zinc binding site *Molecular Cell* **24** (5) 677-688
- Moreno, E., Yan, M., Basler, K.** (2003) evolution of TNF signalling mechanisms: JNK-dependent apoptosis triggered by Eiger, the Drosophila homolog of the TNF superfamily *Curr.Biol.* **12** 1263-1268
- Müller-Taubenberger A, Vos M.J, Böttger A, Lasi M, Lai F.P, Fischer M, Rottner K.** (2006) Monomeric red fluorescent protein variants used for imaging studies in different species *Eur J Cell Biol.* Sep;85(9-10):1119-29
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Dixit, V.M.** (1998) An Induced Proximity Model for Caspase-8 Activation *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 2926-2930
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Hsu, Y., Youle, R.J.** (1999) Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death *The EMBO Journal* **18** 2330-2341
- Nelson, D.W., Padgett, R.W.** (2003) Insulin worms its way into the spotlight *Genes Dev* **17** 813-818
- Nicholson, D.W., Thornberry, N.A.** (1997) Caspases: Killer Proteases *TIBS* **22**, 299-306
- Oberst, A., Bender, C., Green, D.R.** (2008) Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals *Cell Death and Differentiation* **15** 1139-1146
- Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A.** (1997) The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans* *Nature* **389** 994-999
- Okamoto, K. und Shaw, J.** (2005) Mitochondrial Morphology and Dynamics in Yeast and Multicellular Eukaryotes *Annu. Rev. Genet.* **39** 503-36
- Oltvai, N., Millman, C., Korsmeyer, S.** (1993) Bcl-2 Heterodimerizes In Vivo with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programed Cell Death *Cell* **74**, 609-619
- Orci, L., Halban, P., Amherdt, M., Ravazzola, M., Vassali, D., Perrelet, A.** (1984) Nonconverted, Amino Acid Analog-modified Proinsulin Stays in a Golgi-derived Clathrin-coated Membrane Compartment *The Journal of Cell Biology* **99** 2187-2192
- Paradis, S., Ruvkun, G.** (1998). *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev* **12** 2488-2498

- Park, B.L., Kim, L.H., Cheong, H.S., Cho, H.Y., Kim, E.M., Shin, H.D., Kim, Y.S., Lee, C.** (2004) Identification of variants in cyclin D1 (CCND1) and B-Cell CLL/lymphoma 2 (BCL2). *J Hum Genet.* **49(8)**:449-54.
- Patzelt, C., Labrecque, A. D. , Duguid, J. R. , Carroll, R. J., Keim, P. S. , Henrikson, R. L., Steiner, IF.** (1978) Detection and kinetic behavior of preproinsulin in pancreatic islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:1260-1264
- Pauly, B.,** (2005) 14-3-3 Bindeproteine und deren Signaltransduktion und Vesikeltransport in Hydra (Dissertation)
- Pauly B, Lasi M, MacKintosh C, Morrice N, Imhof A, Regula J, Rudd S, David C.N, Böttger A.** (2007)
Proteomic screen in the simple metazoan Hydra identifies 14-3-3 binding proteins implicated in cellular metabolism, cytoskeletal organisation and Ca²⁺ signalling
BMC Cell Biol. Jul 25;8:31.
- Pierce, S.B., Costa, M., Wisotzkey, R., Devafhar, S., Homburger, S.A., Buchman, A.R., Ferguson, K.C., Heller, J., Platt, D.M., Pasquinelli, A.A., Liu, L.X., Doberstein, S.K., Ruvkun, G.** (2001) Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse *C.elegans* insulin gene family *Genes & Development* **15** 672-686
- Pittman IV, I., Philipson, L.H., Steiner, D.F.** (2004) Insulin Biosynthesis, secretion, structure and structure-activity relationships *Endotext.com* Chapter 3
- Popp, T.,** (2004) Die Bcl-2 Proteinfamilie in Hydra (Diplomarbeit)
- Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, M.L., Tjian, R.** (2003): Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway *Genes & Development* **17** 2006–2020.
- Puig, O., Tjian, R.** (2005). Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes Dev* **19** 2435–2446
- Puthalakath, H., Strasser, A.** (2002) Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins *Cell Death and Differentiation* **9** 505-512
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L.A., Beaumont, J.G., Coultas, L., Cheney, R.E., Huang, D.C.S., Strasser, A.** (2001) Bmf: A Proapoptotic Bh3-Only Protein Regulated by Interaction with the Myosin V Actin Motor Complex, Activated by Anoikis *Science* **293** 1829-1832
- Prakash, S., Tian, L., Ratliff, K.S., Lehotzky, R.E., Matouschek, A.** (2004) An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation *Nat Struct Mol Biol* **11** 830-837
- Quinn, L, Coombe, M., Millis, K., Daish, T., Colussi, P., Kumar, S.** (2003) Buffy a Drosophila bcl-2 protein has anti-apoptotic and cell cycle inhibitory functions *EMBO J.* **22** 3568-3579
- Ramage, P., Cheneval, D., Chvei, M., Graff, P., Hemmig, R., Heng, R.** (1995) Expression, refolding, and autocatalytic proteolytic processing of the interleukin-1 beta-converting enzyme precursor. *J Biol Chem* **270** 9378-83.
- Reichert, A.S., Neupert, W.** (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria – role in protein transport *Biochim.Biophys.Acta* **1592** 41-49

- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., Lombès, A.** (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo *Journal of Cell Science* **115**, 1663-1674
- Saltiel, A.R., Kahn, C.R.** (2001) Insulin signalling and regulation of glucose and lipid metabolism *Nature* **13** 799-806
- Santel, A., Fuller, M.T.** (2001) Control of mitochondrial morphology by a human Mitofusin *J Cell Sci* **114** 867-874
- Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L.H., Thompson, C.B., Golemis, E, Fong, L., Wang, H.G.** (1994) Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91(20)**:9238-42.
- Schmidt, N.** (2003) Evolution des programmierten Zelltods: Biochemische und Immunhistochemische Untersuchungen an Caspasen in Hydra (Dissertation)
- Schwartz, T.W.** (1990) The processing of peptide precursors. In: Okamoto H (ed) *Molecular Biology of the Islets of Langerhans Cambridge University press*, Cambridge, 153-205
- Seidah, N.G., Chretien, M.** (1992) Proprotein and prohormone convertases of the subtilisin family Recent developments and future perspectives *Trends Endocrinol Metab* **3** 133-140
- Sesaki, H., Jensen, R.E.** (1999) Division versus Fusion: Dnm1p and Fzo1p Antagonistically Regulate Mitochondrial Shape *The Journal of Cell Biology* **147** 699-706
- Setoguchi, K., Otera, H., Mihara, K.** (2006) Cytosolic factor-and TOM independent import of C-tail anchored mitochondrial outer membrane proteins *EMBO J* **25** 5635-5647
- Sevrioukov, E.A., Burr, J., Huang, E.W., Assi, H.H., Monserrate, J.P., Purves, D.C.** (2007) Drosophila Bcl-2 proteins participate in stress induced apoptosis, but are not required for normal development *Genesis* **45** 184-193
- Shi Y.** (2002) Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9** 459-70
- Shibue, T., Suzuki, S., Okamoto, H., Yoshida, H., Ohba, Y., Takaoka, A., Taniguchi, T.** (2006) Differential contribution of Puma and Noxa in dual regulation of p53-mediated apoptotic pathways *EMBO J* **25** 4952-4962
- Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S., van der Bliek, A.M.** (1998) A Human Dynamin-related Protein controls the Distribution of Mitochondria *The Journal of Cell Biology* **143** 351-358
- Stefanis, L., Park, D.S., Friedman, W.J., Greene, L.A.** (1999) Caspase-dependent and independent death of camptothecin-treated embryonic cortical neurons *The Journal of Neuroscience* **19** (15) 6235-6247
- Stojanovski, D., Koutsopoulos, O.S., Okamoto, K., Ryan, M.T.** (2004) Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology *Journal of Cell Science* **117** 1201-1210
- Sulston, J.E., und Horvitz, H.R.** (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56** 110-56.

- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzi, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Manion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G.** (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor *nature* **6718** 387-389
- Suzuki, M., Youle, R.J., Tjandra, N.** (2000) Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intercellular localization *Cell* **103** 645-654
- Steele, R.E., Lieu, P., Mai, N.H., Shenk, M.A., Sarras, jr.M.P.**(1996) Response to insulin and the expression pattern of a gene encoding an insulin receptor homologue suggest a role for an insulin-like molecule in regulating growth and patterning in Hydra *Development Genes and Evolution* **206** 247–259
- Tan, F.J., Fire, A.Z., Hill, R.B.** (2007) Regulation of apoptosis by *C.elegans* CED-9 in the absence of the C-terminal transmembrane domain *Cell Death and Differentiation* **14** 1925-1935
- Tamura, T., Ueda, S., Yoshida, M., Matsuzaki, M., Mohri, H., Okubo, T.** (1996) Interferon-gamma induces Ice gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line *Biochem Biophys. Res. Commun.* **229**, 21-26
- Tang, T.T., Dowbenko, D., Jackson, A., Toney, L., Lewin, D.A., Dent, A.L.** (2002). The forkhead transcription factor AFX activates apoptosis by induction of the BCL-6 transcriptional repressor. *J Biol Chem* **277** 14255–14265
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., Martin, S.J.** (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (3) 231-41
- Thomenius, M.J., Distelhorst, C.W.** (2003) Bcl-2 on the endoplasmic reticulum: protecting the mitochondria from a distance *Journal of Cell Science* **116** 4493-4499
- Thorburn, A.** (2004) Death receptor-induced cell killing *Cell Signal.* **16** 139-144
- Tran, H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, Jr A.J., DiStefano, P.S.** (2002) DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* **296** 530–534
- Van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K. Rodriguez, I., Ruiz-Carillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R., Vandenabeele, P.** (2001) Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-dependent DNA degradation. *Cell Death and Differentiation* **8** 1136-1142
- Van Obberghen, E., Baron, V., Delahaye, L., Emanuelli, B., Filippa, N., Giorgetti-Peraldi, S., Lebrun, P., Mothe-Satney, I., Peraldi, P., Rocchi, S., Sawka-Verhelle, D., Tartare-Dechert, S., Giudicelli, J.** (2001) Surfing the insulin signalling web *Eur J Clin Invest* **31** 966-977
- Vaux, D.L., Silke J.** (2005) IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (4):287-97
- Vivanco, I., Sawyers, C.L.** (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2** 489–501
- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., Rapoport, T.A.** (2006) A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum *Cell* **124** 573-586
- Wang, K., Gross, A., Waksman, G., Korsmeyer, S.** (1998) Mutagenesis of the BH3 Domain of BAX identifies residues critical for Dimerization and Killing *Molecular and cellular biology* **18** (19) 6083-6089

- Wang, C.X., Song, J.H., Song, D.K., Yong, V.W., Shuaib, A., Hao, C.** (2006) Cyclin-dependent kinase-5 prevents neuronal apoptosis through ERK-mediated upregulation of Bcl-2
Cell Death and Differentiation **13** 1203-1212
- Wagner, A.** (2009) Evolution von Mechanismen der Apoptose: APAF-1 und Bax-Inhibitor-1 aus *Hydra vulgaris* (Diplomarbeit)
- Wehner, R., Gehring, W.** (1995). Zoologie, 23. Auflage, Georg Thieme Verlag
- Willis, S., Day, C.L., Hinds, M.G., Huang, D.C.S.** (2003) The Bcl-2-regulated apoptotic pathway
Journal of Cell Science **116**, 4053-4055
- Wittlieb, J., Khalturin, K., Lohmann, J.U., Anton-Erxleben, F., Bosch, T.C.G.,** (2006)
Transgenic Hydra allow in vivo tracking of individual stem cells during morphogenesis
Proc Natl Acad Sci U S A. **103(16)** 6208-11
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., Youle, R.J** (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis *J Cell Biol.*
139(5):1281-92.
- Xie, Z., Schendel, S., Matsuyama, S., Reed, J.C.** (1998) Acidic pH Promotes Dimerization of Bcl-2 Family Proteins *Biochemistry* **37** 6410-6418
- Yan, N., Chai, J., Lee, E.S., Gu, L., Liu, Q., He, J.** (2005) Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*
Nature **437**, 831-837
- Youle, R.J., Karbowski, M.** (2005) Mitochondrial fission in apoptosis *Nature Rev.Mol.Cell.Biol.* **6** 657-664
- Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J., McNiven, M.A.** (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1 *Mol.Cell.Biol.* **23** 5409-5420
- Yoshida, H., Kong, Y-Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M. Mak T.W.** (1998) Apaf1 Is Required for Mitochondrial Pathways of Apoptosis and Brain Development *Cell* **94** 739-750
- Yuan, Z., Becker, E.B.E., Merlo, P., Yamada, T., DiBacco, S., Konishi Y., Schaefer, E.M., Bonni, A.** (2008) Activation of FOXO1 by Cdk1 in Cycling Cells and Postmitotic Neurons *Science* **21** 1665-1668
- Youle, R. J. & Strasser, A.** (2008) The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death *Nature Cell Biology* **9** 47-59
- Zhang, H.M., Cheung, P., Yanagawa, B., McManus, B.M., Yang, D.C.** (2003)
BNips: a group of pro-apoptotic proteins in the Bcl-2 family. *Apoptosis* **8(3):**229-36.

7. Abkürzungen

α	anti
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	<i>Bcl-2-associated agonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2-antagonist/killer</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell-lymphoma 2</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bik	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
Bmf	<i>Bcl-2 modifying factor</i>
BNip	<i>Bcl-2 nineteen kilodalton interacting protein</i>
Bok	<i>Bcl-2-related ovarian killer</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment and Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxy-Uridin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
°C	Grad Celsius
C-	Carboxy-
cDNA	<i>complementary DNA</i>
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cyt c	Cytochrom c
Δ	Deletion des entsprechenden Gens
Da	<i>Dalton</i>
ddH ₂ O	MilliQ ddH ₂ O
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat

DTT	Dithiotreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
<i>H.vulgaris/Hy</i>	<i>Hydra vulgaris</i>
<i>H.sapiens/Hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)- piperazinethansulfonat
HRK	<i>Activator of apoptosis harakiri</i>
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
M	Mutante bei Proteinanalysen
M	Mol/Liter bei Konzentrationsangaben
mA	Milliampere
Mcl	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-[N-morpholino] propansulfonat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mito-/mt-	mitochondrial

µg	Mikrogramm / 10 ⁻⁶ Gramm
µl	Mikroliter / 10 ⁻⁶ Liter
µm	Mikrometer / 10 ⁻⁶ Meter
µM	Mikromolar / 10 ⁻⁶ Mol/Liter
Noxa	lat. Für Schaden; alternativer Name des Proteins: <i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
N-	Amino-
nt	Nukleotide
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia hydrogenii (neg.dek. Logarithmus der Wasserstoff-Anionen-conz)
Puma	<i>p53 up-regulated modulator of apoptosis</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sec	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
Tet	Tetracyclin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Volt
WT	Wildtyp

8. Anhang

BH 4 Domäne

C_HsBcl-2	-----MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQ	RGYEWADAGDVGAAPPGAAPGIFSSQPGH	55
C_HsBax	-----	MDGSGEQPRGGGPTSSEQIMKTGALL	26
C_HyBcl-2-like1	MKDPMMARFMNE	CCEINNNNSPDYNYINYDANDTVEQDFLRSIE	DDTEKHRGFIRKLAND 60
C_HyBcl-2-like2	-----	MSDTPINFNTPEAKIAKE	18
C_HyBcl-2-like3	-----MARYVNSSCETNNN	-TTDHNYNHYDTRDIVEQDYFRSIEDNTEKHRGFIRKLAND	54
C_HyBcl-2-like4	-----	MAGPPNAQEDNYKRIVKS	18
C_HyBcl-2-like5	-----	MTTNSFSNVL	CNLETPCNKNVEPCDKKNIENTLNNE 36
C_HyBcl-2-like6	-----	MTTVTLSPTICPSHRKCLKLQNSEEKKSIINTAFAI	36
C_HyBcl-2-like7	-MDSKIIRKKKTSFKDN	VIKIREIMQGAL	GSNFVPPDNLWIHIFRQERLSRCLNGLNAT 59
C_HyBak-like1	-----	MAEAADDLHKQEEQQVANDTEKVFCSFVYKRLTSE	35
C_HyBak-like2	-----MAEHECNGSSDDLQITKT	AENIVRCFIYRMLEKVINKSSCEENFRLHFSSLLPEP	55

BH 3 Domäne

C_HsBcl-2	TPHPAASRDVPARTSPLQTPAAPGAAAGPALSPVP	-----P	VVHLTLRQAGDDFSRRY 108	
C_HsBax	LQGFIQDRA	GRMGGEAPELALDPVPQDAST	-----K	KLSECLKRIGDELDSN- 73
C_HyBcl-2-like1	HIHYKLF	GKGTINICDTDIKMNPFEKKLTT	-----T	VVTLRRVSELEDMDH 106
C_HyBcl-2-like2	VAYQLIQ	KKTKGNIKNQIRKET	-----E	ELMMRLVEEIEIKH 55
C_HyBcl-2-like3	HIHYKLF	GKGIINICDDDIKMNPF	FEKKLTT-----T	AVTLRRVSELEDMDH 100
C_HyBcl-2-like4	YVGEKLR	KKGLKIRGYEGEELKPPVIEIAK	-----T	LQRVGDELESAN 61
C_HyBcl-2-like5	IKLSKTY	IDSLLVATYVVKKRIGIQQYK	-----I	GEKVFELCLELVSKH 82
C_HyBcl-2-like6	AMYIIPFH	LRSVSVQENLRGLPKQYLIPPQQP	-----S	HLFTTVAKLCSNMELDN 86
C_HyBcl-2-like7	SDFEVL	TQAILEQLVDHEMK	MQSDDHSPMKKHNSDSKMPTP	PVDIIIAILQLKNSLLKLS 119
C_HyBak-like1	IDKESD	GSLEVGNVITNLRSEVTEFRN	DESNGET-----E	NLGRVLASFGDEINDKY 89
C_HyBak-like2	VLCEIRAV	KEYLRKCESSYSTEMKDSWFIHK	-----A	VQILEEQGGIAIQY 101

BH 1 Domäne

C_HsBcl-2	RRDFAEMSSQLHLTPF	--T	ARGRFATVVEELFRDG-VN	WGRIVAFFEFGVMCVESVNR- 164	
C_HsBax	-MELQRMIA	AVDTD---S	PREVFFRVAADMFSDGNFNWGRV	VALFYFASKLVLKALCT- 127	
C_HyBcl-2-like1	IDFFENV	CHAINEE---N	AGEVFNEVSQKVLTDN	NLWGRVVSILITFGGKLAQWFWAR- 161	
C_HyBcl-2-like2	ELFLSNM	CKRLNLNTE--N	AQSMFHTIAEEIFSDG-IN	WGRIVVLYAFAGKIAEHCRKS- 111	
C_HyBcl-2-like3	IDFFKNV	CHAINEE---N	VGEVFNEVSQEVLADDN	NLWGRVVSILITFGGKLAQWFWAR- 155	
C_HyBcl-2-like4	DFFKNM	CDQLQITPS--T	AYPTFQSIADEIFVSG-KN	WGRVVAFLTFFGGNFVAVHICALRA 118	
C_HyBcl-2-like5	ETFFNNL	TNELNISRD--N	IKVIVLRNLKDS-INFGR	ITSILAVCMIVSEHCYKN- 138	
C_HyBcl-2-like6	AFFFKGL	PNRVNLNAH--N	AQSVFMSVAKETFADG	TKNWGRVLAIYTLAGCMSLYFLLQ- 143	
C_HyBcl-2-like7	PGLYNDI	GAKLDFLLVDKRA	ACKTYSNFSEAMFEK	CISWPLIVSFLFSA	NLAAECIKN- 178
C_HyBak-like1	RQVFS	DMLCRLNIETED-V	AYETFANIARRLFENG-IN	WGRIVALLCFGYEVAFAIKRN 147	
C_HyBak-like2	HHAFLS	LINQLQITDEYNFA	YTFQFVEVAKKLFEND	NIAWSHIVSLICFGVEISVYIVEHG 161	

BH 2 Domäne

C_HsBcl-2	EMS--	PLVDNIALWMTEYLN	-RHLHTWIQDNG-G	WDAFVELYGPSMRPLFD----- 211
C_HsBax	-KVP-	ELIRTIMGWTLDFLR	-ERLLGWIQDQG-G	WDGLLSYFGTPTWQT----- 172
C_HyBcl-2-like1	QPNN-	ELIEEIEDWLTESLS	-DKKD-WIKQKG-G	WDDFNRTFTKPAQN----- 205
C_HyBcl-2-like2	-NDE-	QIIDKIALWVAGFVA	-KKSS-WIRDSGRG	WNGFIENFDVKQDS----- 155
C_HyBcl-2-like3	QPNN-	ELIEEIEDWLTESLS	-DKKD-WIIEKG-G	WDFNRTFTKPVQS----- 199
C_HyBcl-2-like4	DMGE-	EYVDRVVNWISKYMA	-VNLDYWINQOQ-G	WDGFLIFFEKTKNNDDE----- 166
C_HyBcl-2-like5	ESMS-	DKVCLIVETTAEIIY	-ENRK-WFEANG-A	WDGLMKYFFNPTDY----- 182
C_HyBcl-2-like6	-NEL-	VIVKSIPYVWKEFVS	-IHLADWIEEQG-G	WDDLPPKLSNDSNNS----- 189
C_HyBcl-2-like7	--GRH	KLVARNIYDWATLFTT	-LKLKGWIIENG-G	WEGLASFAKQDRKKPKRKYVILDIGN 234
C_HyBak-like1	ARGFGK	FLRKLIRFVVD	IVNEKIAKWIANG-G	WLAALVGLKKVDDSS----- 195
C_HyBak-like2	KVGLAS	FLKIKCSFIVDFIVKEEILQWIA	QHG-GWIKMID	FFDDPNCQFRTNHILAAM-- 218

Transmembrandomäne

C_HsBcl-2	-----	FSWLSL-KTLLSLALVGACITL	GAYLGHK----- 239	
C_HsBax	-----	VTIFVAGVLTASLTIIKKMG	----- 192	
C_HyBcl-2-like1	-----	TWWKTS	SLWVGLSASLAAAFVMKSLR- 230	
C_HyBcl-2-like2	-----	WVQGLFAATLGLGTIAAALYIKS	----- 178	
C_HyBcl-2-like3	-----	TWWKTS	SLWVGLSASLVAALAMKFLR- 224	
C_HyBcl-2-like4	-----	QGSQSVFLVSALAGLVGALLMLTFK	----- 192	
C_HyBcl-2-like5	-----	FWKGFVTTVGLGAMAGLLYAKS	----- 205	
C_HyBcl-2-like6	-----	SWSKVIAVGGVVAATAGLFLFSTGMR	----- 212	
C_HyBcl-2-like7	FFNHPL	SIKTL	SVLIWIPILILLFAWLNSQVKNKYFKSIFKQ	TENKDFQNFVSNEL 291
C_HyBak-like1	-----	DVWFKRIVILGSI	IATVYMIHRITR----- 220	
C_HyBak-like2	--	AISELTNIEVWLQRFV	VASLVSGIIVIAWRKWHQP----- 253	

Abb. 62: Sequenzvergleich aller HyBcl-2-like Proteine mit humanem Bcl-2 (Zugangsnummer NP_000624) und humanem Bax (Zugangsnummer NP_620116). Rosa hervorgehoben sind die mit dem Programm *PredictProtein* (<http://www.predictprotein.org/>) vorhergesagten Helices. Die Bcl-2 Homologie-Domänen sind mit einem blauen Balken gekennzeichnet, die Transmembrandomäne ist mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. In humanem Bax sind Serin 184 und Asparaginsäure 98 grün hervorgehoben, diese beiden Aminosäuren können eine Wasserstoffbrücke ausbilden und das Einklappen des C-Terminus vermitteln.

BH4 Domäne		
HsBcl-2	-----MAHAGRTGY DNREIVMKYIHYKLSQ RGYEWDAGDVGAAPPGAAPAGIFSSQPG	54
NvBcl-2-like1	-----MEYPRND----PRQSYPELVHQQLLAKDLISYRLG	32
NvBcl-2-like2	-----MAGATAALAAEGISHTLDTSAFSA LEKDIVQEA FALTVDYIPIYRLR	46
NvBcl-2-like3	-----MAALQAQRKP----CSET LET LNROAHFLAQDLISYRTG	35
NvBcl-2-like4	-----MPVQVNTQ SHE MVKDFIGYKLR	22
NvBcl-2-like5	-----MASAGDLPPEEGVQ QEPS EDSEKTVVSETEGVFRYFMYQRFQ	42
NvBcl-2-like6	MSKLRPSPTKRLSWNDMASTTSKIRLTRLVQLQDQKT AARLLDQAKQLCTEFIDGKLG	60
NvBcl-2-like7	-----MPPIEGYDNANAVAARKMKT PEEKIAHELAKDFIGYKLG	39
NvBcl-2-likeU4	-----MAPGGVPQGSKRDEGDGPPPPQRPSPYNRATS VDDVSGQTPAIVKSF LAICFQ	52
BH3 Domäne		
HsBcl-2	HTPHPAASRDVPARTSPLQTPAAPGAAAGPALSPVPP VVHLTLRQAGDDFSRRYRRDFAE	114
NvBcl-2-like1	KN-----PKPPNAN----- AETLRKLADKIEEQYPALLNH	62
NvBcl-2-like2	SKFDQSQLAGLPRGYLIPHSP STS ----- ENKLRSLASHMEAEY PDLFET	91
NvBcl-2-like3	NG-----RIST SLT ----- ARNMRRLSDELEERHG PLLCN	65
NvBcl-2-like4	QNNIFLEGF-----N MESPTKA ----- SKHLRIVADELIADNSEL FHS	60
NvBcl-2-like5	DEAERGDETVQFTEARSDALEELRSCN--DTSR QHIATIGRRLGEV GDEIDAKYRDQFHD	100
NvBcl-2-like6	REGLK RAGITAWTGNTFDG DEKWP ----- TISKRAQEVGMWLEECY PRLYAD	107
NvBcl-2-like7	KG-----TRLN TKS ----- ALILRKL SNQIENK HELFLRN	69
NvBcl-2-likeU4	QDGV EPPADLTD---GQRET NTK ----- VAHALREIGDQLTN--DATL NN	92
BH1 Domäne		
HsBcl-2	MSSQLHLTPFTARGR --- FATVVEELFRDG -VNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNR-EMSPL	169
NvBcl-2-like1	LCHKLNISRSTAYST --- FVEIAGEVFADG -VNWGRIVVLYAFGGRLAVYCEQH-NMKDL	117
NvBcl-2-like2	ACTKLGITPATARST --- FFSVAKEIFQTG -INWGRIVALFTFGGVVAHFFIES-ERPEM	146
NvBcl-2-like3	MCNSLNM TANSAHEK--- FVQVADEVFKDG -INWGRIVAVFTFGGRLAQFCARN-GLHDG	120
NvBcl-2-like4	MCDQLHLTPISTYPT --- FVGIANEIFQSG -KNWGRVVAFLAFGATLAVYCAQREELHEL	116
NvBcl-2-like5	MIESLHLTPGTAYDT --- FAAVARRLFRSG -ISWGRIIALLCFGYEAITVIRRGFSGSF	156
NvBcl-2-like6	ISRHVNASFTSETV VHDFVSSVCTEIVKDG--NWARIIAVYTFAGALATECYKD-SRSVF	164
NvBcl-2-like7	MCDRLDIRQH NAPET--- FKQVADEIFGDG -INWGRIVVLYTFAGKVAKY QCE --NQLDN	123
NvBcl-2-likeU4	LIAE CHVTKDTAFDT--- FLAVALQIFQDGV INWGRIVTLFYFGYKLALKVLNQ---IPL	146
BH2 Domäne		
HsBcl-2	VDNIALWMTEYLNRH -LHTWIQDNGGWD AFVELYGPS -----MRPL FD FS	213
NvBcl-2-like1	VQSVTDWVGK YIAG--LSEWIANEGGWD LKEQFRD -----NNTND TF	158
NvBcl-2-like2	VPHVVEWIP SFIADN-LLSWIMENGGWV LLSTLSQND -----EGVG NT F	190
NvBcl-2-like3	VREVEAWLGDY IAN--LSHWIQTQGGWV CTFETSQS -----HDSA	158
NvBcl-2-like4	VNDIV EWVSRYMDQN-LSCWIRENGGWD GFIDFFQREDDS -----SDQDSK RG NG	165
NvBcl-2-like5	LRRIIRFVVD FIFRER IARWIAEHGGWRSVMDFRLSE -----PSWY TV	199
NvBcl-2-like6	VTEVSNW YEF TALH -LVDWIKKRG GVIFSGRFHTPVSLIISLR --- HAVDGVCW TT SR	220
NvBcl-2-like7	AENVATW VGNYVAS--KSDWVKKAGG WEAFNEQFKDV -----QEE HEK F	165
NvBcl-2-likeU4	LKMI IEWVVK FVKEK -LVKWIFQGG WESAMDYFNG -----LQ TRQ TV	188
Transmembrandomäne		
HsBcl-2	WLSLKTL LSLALVGACIT LGAYLGHK -----	239
NvBcl-2-like1	WWKGV FITTLGIGIT LALVYTR -----	180
NvBcl-2-like2	RVSM LAATMY TFD MTVD-----	209
NvBcl-2-like3	NFARF -----	163
NvBcl-2-like4	RWGMA AVAGLGIG ALLMLACR -----	186
NvBcl-2-like5	GTVI ILGT VVALWAANRLKK -----	219
NvBcl-2-like6	DWSL ILSSTSGKPPGHTYK NCHCYP TRRSRQ TSFPVIFCNK SLNQ	265
NvBcl-2-like7	WN SL CTTLGLGSLA AVLY MKS -----	188
NvBcl-2-likeU4	EFFFV LGACV SLGLVYI WHSR-----	210

Abb. 63: Sequenzvergleich aller NvBcl-2-like Proteine mit humanem Bcl-2 (Zugangsnummer NP_000624). Rosa hervorgehoben sind die mit dem Programm *PredictProtein* (<http://www.predictprotein.org/>) vorhergesagten Helices. Die Bcl-2 Homologie-Domänen sind mit einem blauen Balken gekennzeichnet, die Transmembrandomäne ist mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet.

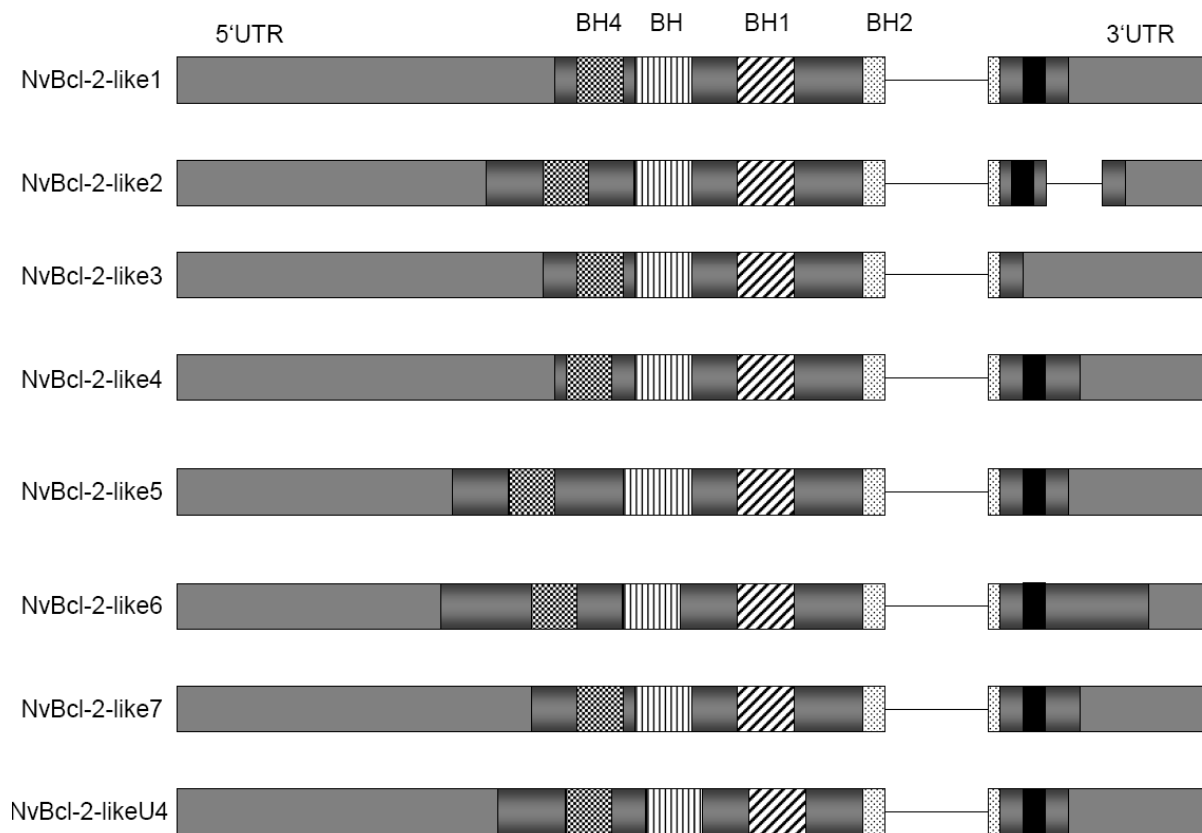






Abb. 64: Analyse der genomischen Struktur von Bcl-2 ähnlichen Genen in *Nematostella vectensis*.

Dargestellt sind Exons (Kästchen) und Introns (Linien) sowie die Bcl-2-Homologie Domänen mit strukturierten Kästchen (BH1 , BH2 , BH3  und BH4 ) und die Transmembrandomäne (schwarz; TM). Grau schattiert sind die 5' und 3' untranslatierten Bereiche (UTR) dargestellt.

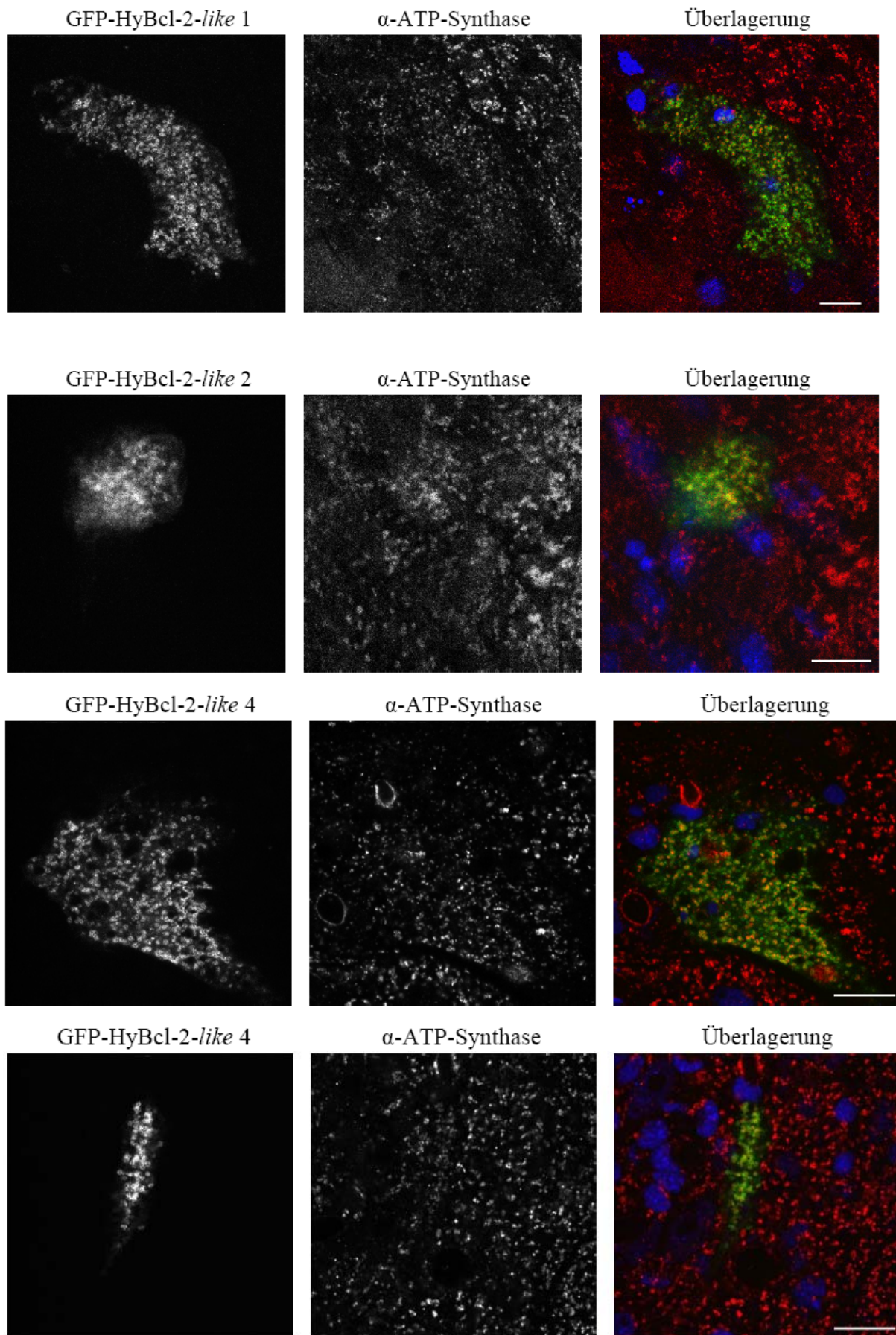


Abb. 65: Expression von HyBcl-2-like Proteinen in Hydra (fortgesetzt auf der nächsten Seite).

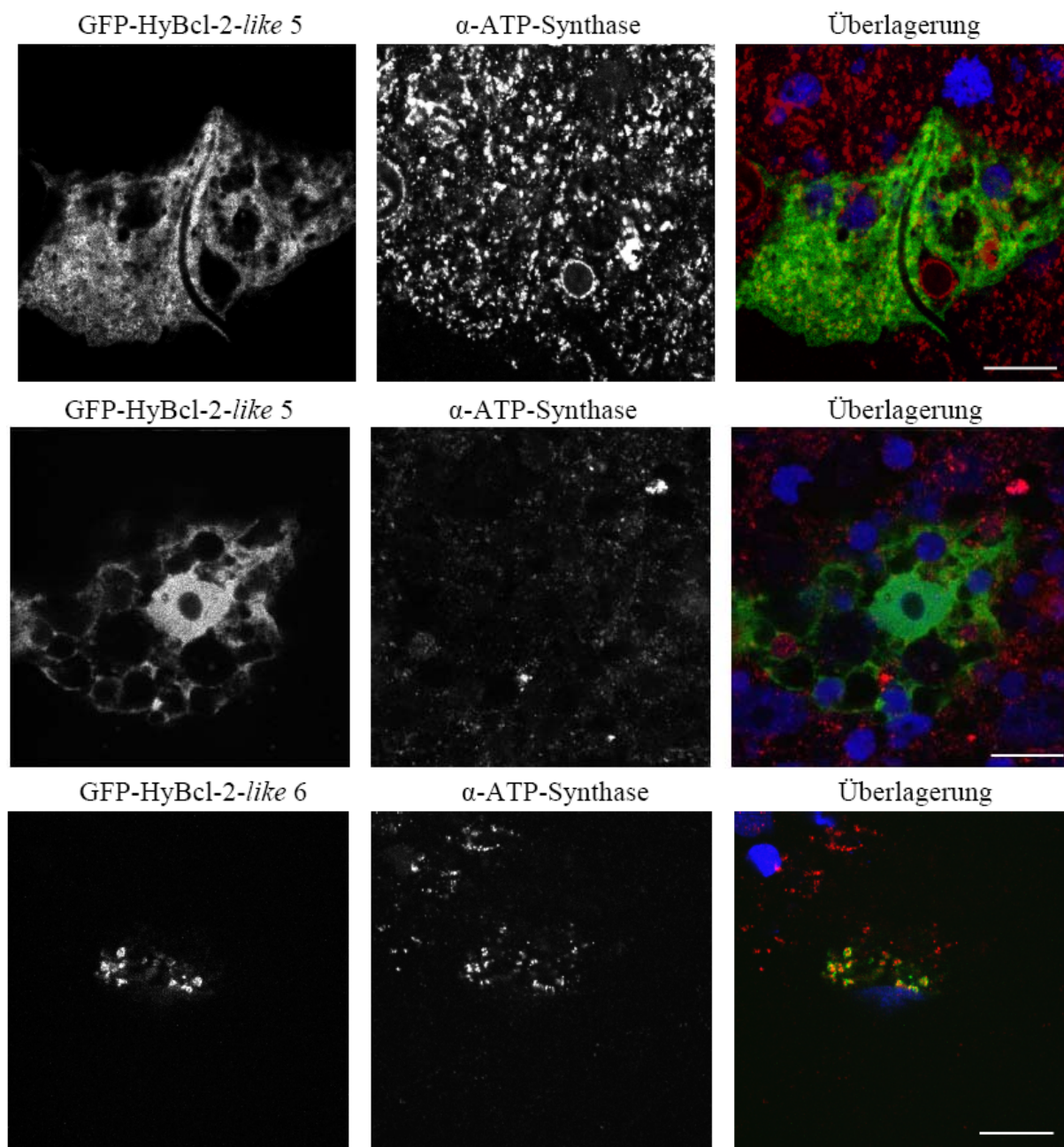


Abb. 65: Expression von HyBcl-2-like Proteinen in Hydra. Dargestellt ist jeweils ein optischer Schnitt mit einer Dicke von 0,3 μ m durch eine ektodermale Epithelzelle von Hydra, welche das GFP-HyBcl-2-like Fusionsprotein exprimiert (links). Als mitochondrialer Marker diente der α -ATP-Synthase Antikörper (Mitte). Rechts ist in der Überlagerung zusätzlich die Kernfärbung (mit TO-PRO-3) in blau gezeigt, das GFP-Signal ist hier in grün und das α -ATP-Synthase Signal (bzw. RFP-Signal) in rot dargestellt. Der Größenmaßstab beträgt 10 μ m

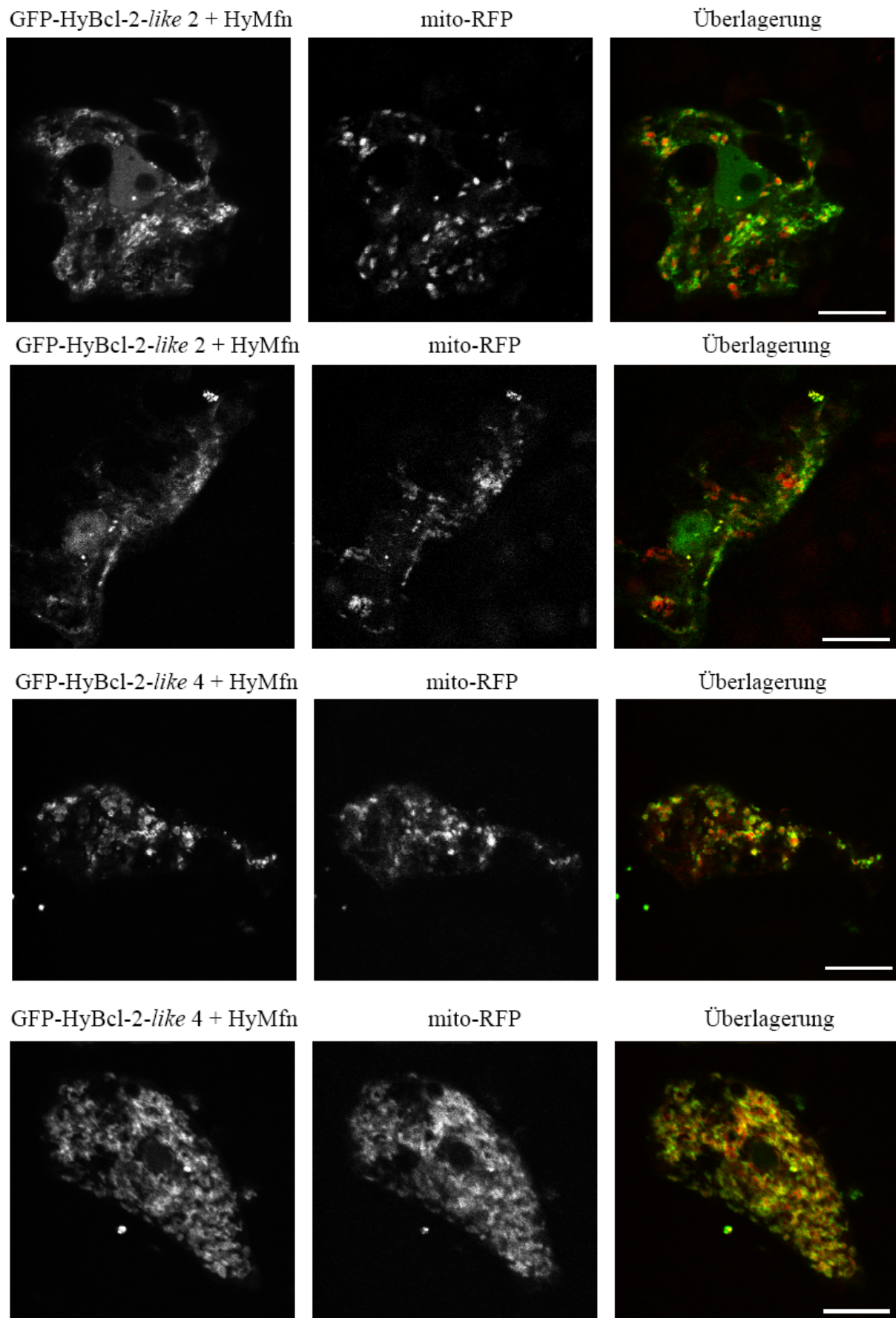


Abb. 66: Analyse der Mitochondrienmorphologie in Hydra bei Ko-Expression von HyBcl-2-like/ HyBak-like Proteinen mit HyMfn (fortgesetzt auf der nächsten Seite).

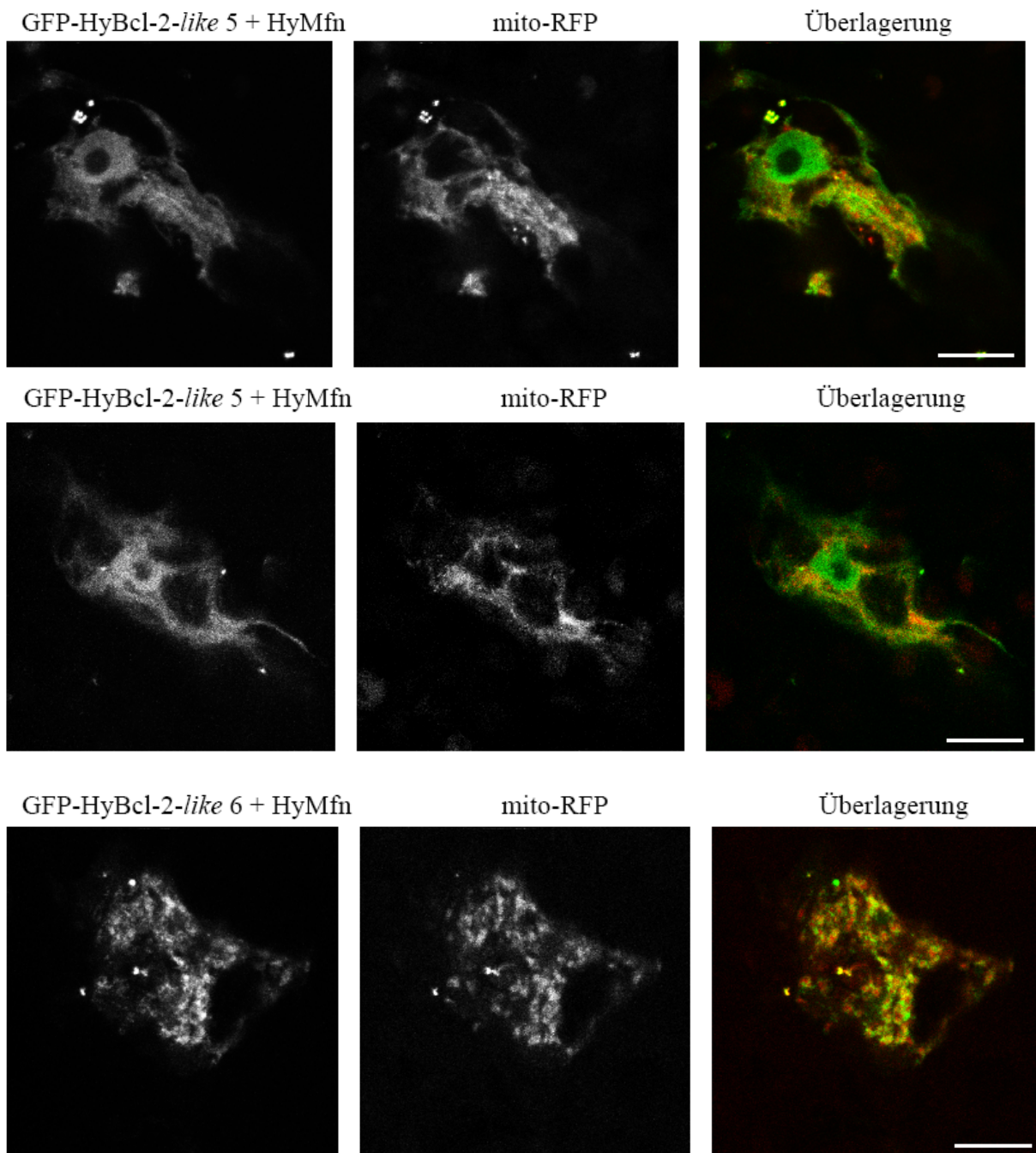


Abb. 66: Analyse der Mitochondrienmorphologie in Hydra bei Ko-Expression von HyBcl-2-like/ HyBak-like Proteinen mit HyMfn (fortgesetzt auf der nächsten Seite).

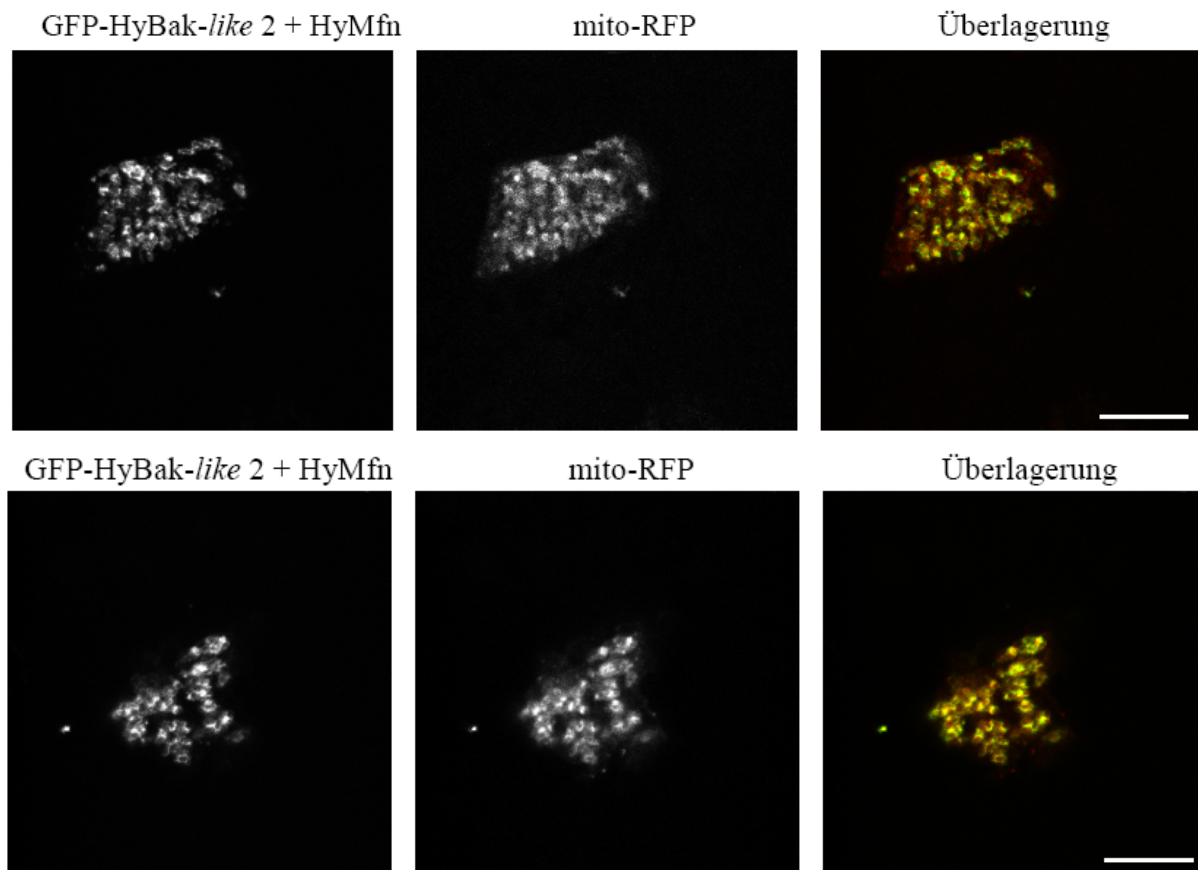


Abb. 66: Analyse der Mitochondrienmorphologie in Hydra bei Ko-Expression von HyBcl-2-like/HyBak-like Proteinen mit HyMfn. Hydrazellen wurden jeweils mit einem GFP-markiertem HyBcl-like Protein, unmarkiertem HyMfn und dem Marker mito-RFP transfiziert. Die Überlagerung der Signale ist ebenfalls dargestellt, hierbei ist das GFP-Signal grün, das RFP-Signal rot und das TO-PRO-3 Kernsignal blau dargestellt. Maßstab 10 μ m, dargestellt sind optische Schnitte mit einer Dicke von 0,3 μ m.

Publikationen:

Müller-Taubenberger, A., Vos, M.J., Böttger, A., **Lasi, M.**, Lai, F.P., Fischer, M., Rottner, K.
(2006)
Monomeric red fluorescent protein variants used for imaging studies in different species
Eur J Cell Biol. Sep;85(9-10):1119-29

Böttger, A., Strasser, D., Alexandrova, O., Levin, A., Fischer, S., **Lasi, M.**, Rudd, S., David, C.N.
(2006)
Genetic screen for signal peptides in Hydra reveals novel secreted proteins and evidence for non-
classical protein secretion
Eur J Cell Biol. 2006 Sep; 85(9-10):1107-17

Pauly, B., **Lasi, M.**, MacKintosh, C., Morrice, N., Imhof, A., Regula, J., Rudd, S., David, C.N.,
Böttger, A. (2007)
Proteomic screen in the simple metazoan Hydra identifies 14-3-3 binding proteins implicated in
cellular metabolism, cytoskeletal organisation and Ca²⁺ signalling
BMC Cell Biol. Jul 25;8:31.

Manuskript in Vorbereitung:

Lasi, M., Pauly, B., Wagner, A., Cikala, M., Grunert, M., Knapp, R., Popp, T., Käsbauer, T.,
Schmidt, N., David, C.N., Böttger, A.
Evolution of apoptosis: Caspases and Bcl-2 family members in Hydra

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein allergrößter Dank gilt als erstes Frau Prof. Dr. Angelika Böttger, die mir dieses interessante und vielseitige Thema zur Bearbeitung in meiner Doktorarbeit zur Verfügung gestellt hat. Die gute Betreuung, Lob und konstruktive Kritik trugen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Charles N. David, für die wissenschaftliche Unterstützung und Anregungen für neue Versuche. Seiner Vorlesung verdanke ich meine Begeisterung für die Zellbiologie.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei all meinen jetzigen und früheren Kollegen, darunter besonders bei Andrea, Sandra, Alex, Anita, Daniel, Michaela, Coco und Astrid, bedanken. Alle haben zum angenehmen Arbeitsklima beigetragen. Andrea und Sandra möchte ich ganz besonders für den freundschaftlichen Zusammenhalt auch außerhalb des Labors danken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich immer motiviert und unterstützt haben. Abschließend möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meinem Freund Christian Kemper bedanken, der immer für mich da war und mich bei allem was ich mache ganz lieb unterstützt. Danke auch für die vielen fachlichen Ratschläge!

Lebenslauf

Name: Anna Maria Margherita Lasi

Geburtsdatum: 20.05.1981

Geburtsort: München

Schulische Ausbildung:

1987-1991: Besuch der Grundschule in der Klenzestraße in München

1991-2000: Besuch des Gymnasiums Theresia-Gerhardinger-Gymnasium am Anger in München

2000: Abitur

Universität:

2000-2005: Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München (Hauptfach Zoologie (Zellbiologie), Nebenfächer Genetik, physiologische Botanik, Anthropologie und Humangenetik)

10/2004-07/2005: Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. Charles N. David und Prof. Dr. Angelika Böttger an der LMU in München am Institut für Zoologie Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie, Thema:
„Die Evolution von Mechanismen der Apoptose: Caspasen und Proteine der Bcl-2 Familie in Hydra“

Seit 10/2005: Dissertation im Labor von Prof. Dr. Angelika Böttger an der LMU in München am Institut für Zoologie, Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie