

14-3-3 Bindeproteine und deren Rolle in Signaltransduktion und Vesikel- transport in Hydra

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorgelegt von

Barbara Pauly

München, August 2005

meinem Vater

Ehrenwörtliche Erklärung

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, August 2005

Barbara Pauly

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juni 2001 und August 2005 unter Anleitung von PD Dr. Angelika Böttger und Prof. Dr. Charles N. David am Department Biologie II, Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Teile dieser Dissertation sind in folgender Publikation veröffentlicht:

Pauly, B., Stiening, B., Schade, M., Alexandrova, O., Zoubek, R., David, C.N., and Bottger, A. (2003). Molecular cloning and cellular distribution of two 14-3-3 isoforms from Hydra: 14-3-3 proteins respond to starvation and bind to phosphorylated targets. *Exp Cell Res* **285**, 15-26.

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2005

Promotionsgesuch eingereicht am 16. 8. 2005

Erster Gutachter: Prof. Dr. Charles N. David

Zweiter Gutachter: PD Dr. Angelika Böttger

Danksagung

Privatdozentin Frau Dr. Angelika Böttger gilt mein besonderer Dank für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Ihr Wissen und ihre Ideen stecken in dieser Arbeit und ohne ihre Erfahrung wäre so manches Ergebnis nicht so einfach zu interpretieren gewesen.

Herrn Prof. Dr. Charles N. David gilt ebenfalls mein großer Dank. Seine Begeisterungsfähigkeit hat mich immer motiviert und die Diskussionen mit ihm haben mir oft erst das eigentlich Offensichtliche klargemacht.

Allen Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe danke ich für vier sehr schöne Jahre und viele Erinnerungen, die ich mitnehmen werde. Tina Käsbauer (und Flo, dem nettesten und geduldigsten Computerspezialisten der Welt), Alexander Wolf, Dr. Volker Scherhammer, Kimchi Doquang, Dr. Olga Alexandrova (Danke für die Zelle!), Marscha Schade, Beate Stiening, Claudia Roeben, Prof. Harry MacWilliams, Johannes Altstätter, Ekaterina von Dall'Armi, Margherita Lasi und Martina Nymphius danke ich für ihre Freundschaft und Hilfe und dafür, dass ich immer gerne ins Labor gekommen bin. Johannes danke ich außerdem dafür, dass er meine Nachfolge angetreten hat und hoffe, dass er genauso viel Spass an dem Projekt haben wird wie ich. Ich werde euch alle sehr vermissen! Allen Ehemaligen sei ebenfalls gedankt: Karin, Tanja, Regina, Christian, Dominik, Jana, Bernd, Nikola, Mihai, und Micha.

Unseren neuen Nachbarn, besonders Prof. Heinrich Leonhardt und Dr. Ulrich Rothbauer, danke ich für wissenschaftlichen Rat und Cappuccino am Wochenende. Dr. Carol MacKintosh danke ich für die Aufnahme in ihrem Labor in Dundee. Dr. Jörg Regula und Dr. Lars Israel gilt mein Dank für die Durchführung der LC-MS Analysen.

Meinen Freunden außerhalb des Labors, besonders Yvi und Michi, danke ich für ihr Verständnis bei verspätetem Erscheinen oder völligem Ausbleiben zu diversen Essenseinladungen. Ich weiss, dass man Frühlingsrollen schlecht warm halten kann!

Mein größter Dank aber gilt meiner Mutter und meiner Schwester Susanne, dafür dass sie immer zu mir gestanden haben und dass sie immer für mich da sind. Meine Familie wird immer mein wichtigster Rückhalt bleiben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

1. Einleitung 9

1.1 14-3-3 Proteine 9

1.2 Bcl-2 Proteine 13

1.3 Hydra 16

1.4 Zielsetzung 19

2. Ergebnisse 20

2.1. Charakterisierung der Hydra 14-3-3 Proteine 20

 2.1.1 Klonierung von HyA und HyB 20

 2.1.2 Phylogenie 22

 2.1.3 Expression von 14-3-3 HyA und HyB in Bakterien 23

 2.1.4 Der polyklonale Antikörper K19 gegen humanes 14-3-3- β 23

 erkennt Hydra 14-3-3 Proteine

 2.1.5 14-3-3 Proteine werden in allen Zelltypen exprimiert 24

 2.1.6 14-3-3 Proteine kommen in verschiedenen Zellkompartimenten vor 26

 2.1.7 Immunfärbungen zur Untersuchung der intrazellulären 27

 Lokalisation von 14-3-3 Isoformen in Hydrazellen

 2.1.8 14-3-3 Proteine aus Hydra bilden Homo- und Heterodimere 30

 2.1.9 Nachweis phosphorylierter 14-3-3 Bindeproteine in Hydralysaten 33

2.2 Isolierung und Identifizierung von 14-3-3 Bindeproteinen aus Hydra 37

 2.2.1 14-3-3 Affinitätssäule 37

 2.2.2 Identifizierung der 14-3-3 Bindeproteine mit einer Kombination 40

 aus Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS)

 2.2.3 Bcl-2 Familie 46

 2.2.3.1 Klonierung von HyBax, eines Homologen von humanem Bax 46

 2.2.3.2 GST pulldown mit HyBax und 14-3-3 zum Nachweis einer 48

 Interaktion der beiden Proteine

2.3 14-3-3 und Zytoskelett	50
2.3.1 Aktin	50
2.3.1.1 Charakterisierung von Hydra Aktin	50
2.3.1.2 Anfärben von F-Aktin in ganzen Tieren mit Phalloidin	51
2.3.2 Tubulin	53
2.3.2.1 Charakterisierung der beiden in Hydra gefundenen Tubuline	53
2.3.2.2 Ko-Immunpräzipitation zum Nachweis der Interaktion	54
zwischen Tubulin und 14-3-3	
2.3.2.3 Färbung des Tubulin Zytoskeletts in Hydra Mazeraten	56
2.3.3 ppod3 und ppod4	57
2.3.3.1 Aufbau und Domänenstruktur der ppod Proteine	57
2.3.3.2 Klonierung von ppod4 durch nested PCR	64
2.3.3.3 F-Aktin Ko-Sedimentations Versuch	66
2.3.3.4 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen ppod4	68
2.3.3.5 ppod-Protein ist mit Vesikeln an der apikalen Zelloberfläche	69
assoziiert	
2.3.3.6 Die ppod-positiven Vesikel sind keine Endosomen	72
2.3.3.7 Die ppod-positiven Vesikel sind sekretorische Granula	73
2.3.3.8 Isolierung der ppod-positiven Vesikel durch Dounce	76
Homogenisierung	
2.3.3.9 ppod4 ist peripher mit der Vesikelmembran assoziiert	78
2.3.3.10 ppod Protein lässt sich auf der Oberfläche von Vesikeln	79
quervernetzen	
2.3.3.11 Rekombinantes ppod Protein lässt sich quervernetzen	81
2.3.3.12 Das ppod Protein ist mit Peroxidase-positiven Vesikeln	82
assoziiert, besitzt selbst aber keine Peroxidase Aktivität	
2.3.4 Ko-Immunfluoreszenzfärbungen der Zytoskelettproteine	84
mit ppod4 und 14-3-3	
2.3.4.1 ppod4/Tubulin Doppelfärbungen	84
2.3.4.2 14-3-3/Tubulin Doppelfärbungen	86
2.3.4.3 14-3-3/ppod4 Doppelfärbungen	87
2.3.4.4 Ko-Lokalisation von 14-3-3-GFP und Aktin	89

3. Diskussion	92
3.1 Charakterisierung von 14-3-3 Proteinen in Hydra	92
3.2 Isolierung und Identifizierung von 14-3-3 Bindeproteinen aus Hydra mit Hilfe einer 14-3-3 Affinitätssäule und Massenspektrometrie	94
3.3 ppod ist ein neues 14-3-3 Bindeprotein in Hydra	98
3.4 Tubulin ist ein weiteres Zytoskelett Protein, das mit 14-3-3 interagiert	99
3.5 Modell zu einer möglichen Verbindung zwischen sekretorischen Vesikeln, ppod4, dem Aktin-Zytoskelett, Mikrotubuli und 14-3-3 Proteinen	100
3.6 Bcl-2 Proteine und 14-3-3 in Hydra	104
 4. Zusammenfassung und Ausblick	 106
 5. Material und Methoden	 108
 6. Literaturverzeichnis	 138
 7. Abkürzungen	 146
 Anhang	 148

Nachtrag

Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 14-3-3 Proteine

Lebende Organismen stehen in Kontakt zu ihrer Umwelt und, bei Vielzellern, zu benachbarten Zellen. Sie erhalten eine Vielzahl von Informationen, z.B. über Temperatur, osmotischen Stress und Nahrungsangebot. Außerdem erhalten sie von Nachbarzellen chemische Signale, wie z.B. Wachstumsfaktoren. Diese Vielzahl von Informationen verarbeiten sie in komplexen Signalwegen. Entwicklungsbiologische Prozesse, Zelldifferenzierung und Zellteilung müssen so reguliert werden, dass sie zum richtigen Zeitpunkt in den richtigen Zellen an- oder abgeschaltet werden. Unter bestimmten Umständen kann es auch nötig sein, einzelne Zellen abzutöten, um das Überleben des Organismus zu sichern. All diese Signalwege müssen koordiniert ablaufen, um das Funktionieren des gesamten Organismus zu gewährleisten. Zu den regulatorischen Molekülen, die solche Signalwege koordinieren, gehören Proteine der 14-3-3 Familie.

14-3-3 Proteine bilden eine Familie von stark konservierten, sauren Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 30 kD. Sie wurden 1967 in einer systematischen Analyse von Gehirnproteinen entdeckt (Moore and Perez, 1967). Der Name „14-3-3“ basiert auf der Nummer der Fraktion nach DEAE-Zellulose Chromatographie und der Position in der nachfolgenden Gelelektrophorese. Inzwischen wurde gezeigt, dass 14-3-3 Proteine in den meisten Geweben exprimiert werden. Außerdem wurden 14-3-3 Proteine in allen bislang untersuchten eukaryontischen Organismen von Hefe bis Säugern gefunden (Aitken et al., 1992; Aitken, 1995; Tzivion and Avruch, 2002). In Säugern wurden 7 und in Pflanzen mehr als 10 Isoformen entdeckt. Hefe, *D.melanogaster* und *C.elegans* dagegen besitzen nur jeweils zwei Isoformen. Ursprünglich wurden 14-3-3 Proteine als Aktivatoren der Neurotransmittersynthese beschrieben (Isobe et al., 1991). Inzwischen wurde gezeigt, dass 14-3-3 Proteine an der Regulation einer großen Anzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind (Aitken et al., 1992; van Hemert et al., 2001; Tzivion and Avruch, 2002; Hermeking, 2003). Durch Bindung an unterschiedliche Interaktionspartner regulieren sie beispielsweise den Zellzyklus, verschiedene Signaltransduktions-

wege, Apoptose, die Stressantwort einer Zelle, die Organisation des Zytoskeletts, Stoffwechsel und Tumorstadium (Abb. 1.1). Bis jetzt wurden etwa 200 potentielle 14-3-3 Bindeproteine in verschiedenen Organismen entdeckt.

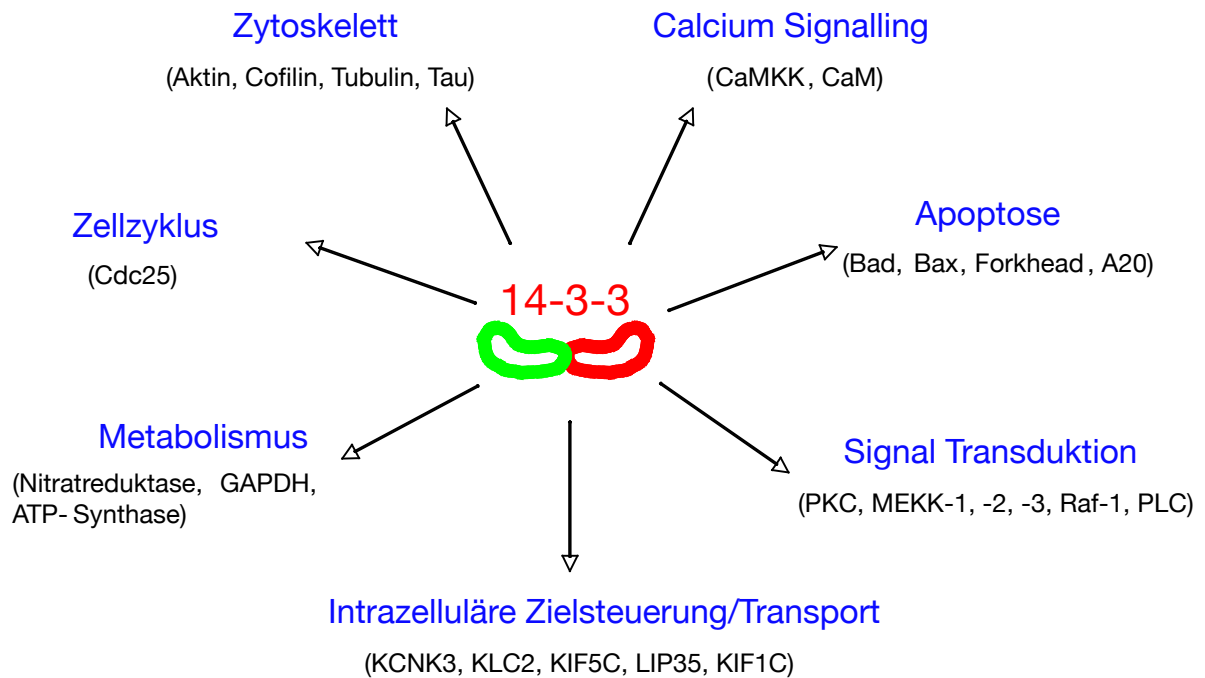


Abb. 1.1: Übersicht über die Beteiligung von 14-3-3 Proteinen an verschiedenen Signalwegen

Ein 14-3-3 Monomer besteht aus 9 α -Helices. In der Regel bilden 14-3-3 Proteine jedoch Dimere, indem sie über ihre N-Termini interagieren. Ein 14-3-3 Dimer bildet einen großen, negativ geladenen Kanal, dessen Boden von den Helices 1, 3 und 5 gebildet wird, während die Wände des Kanals aus Helices 7 und 9 bestehen (Abb. 1.2 A und B) (Xiao et al., 1995). Die Aminosäuren, die mit den Zielproteinen interagieren, befinden sich in Helix 3 (Lys49 und Arg56), sowie in Helix 5 (Arg127 und Tyr128) (Xiao et al., 1995; Fu et al., 2000). Die am stärksten konservierten Aminosäuren befinden sich im Inneren des Kanals, während die Aminosäuren an der Außenseite des Dimers stärker variieren. Die Bindung der meisten Interaktionspartner erfolgt im Kanal (Xiao et al., 1995). Jedes 14-3-3 Dimer ist in der Lage, zwei Zielproteine gleichzeitig zu binden, oder ein Zielprotein, das zwei 14-3-3 Bindemotive enthält (Fu et al., 2000).

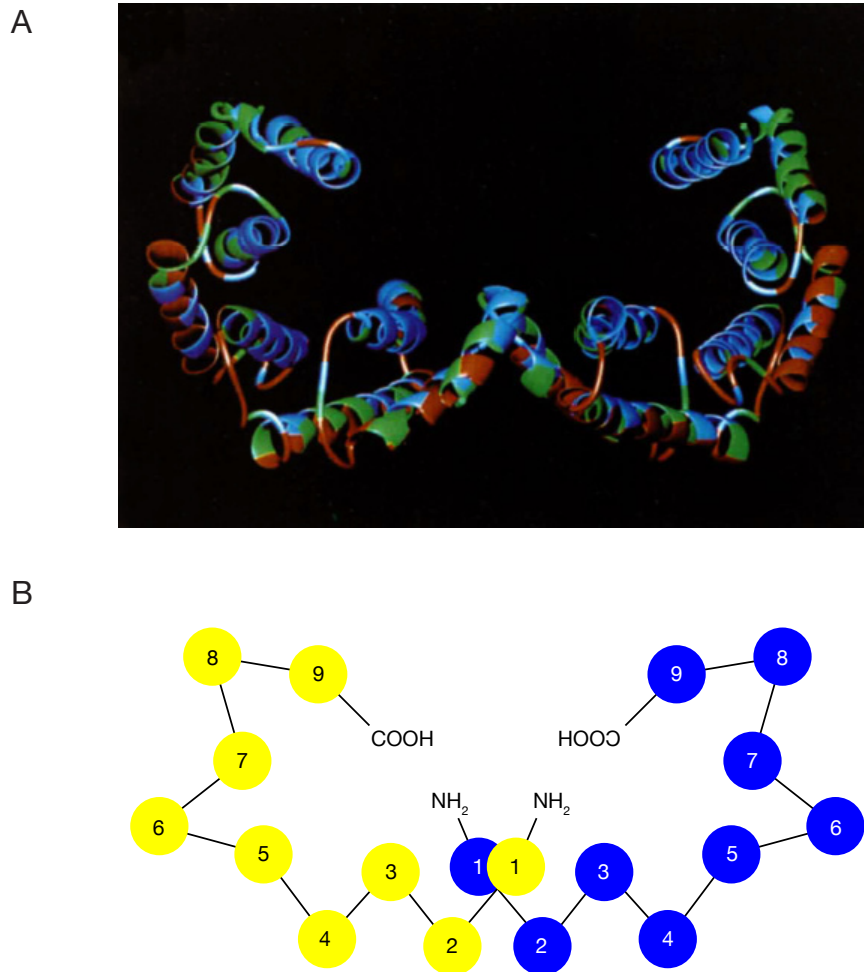


Abb. 1.2: Struktur eines 14-3-3 Dimers

(A) Orthogonale Ansicht eines 14-3-3 Dimers. Hellblaue Regionen markieren identische Aminosäuren bei 24 untersuchten 14-3-3 Isoformen aus Säugern, Hefe, Pflanzen und Amphibien. Rote und grüne Regionen sind stärker variabel. (B) Schematische Darstellung eines 14-3-3 Dimers. Dargestellt ist die Anordnung der neun anti-parallel α -Helices eines jeden Monomers (gelb und blau) (aus Xiao et al., 1995).

14-3-3 Proteine binden die meisten ihrer Interaktionspartner in Abhängigkeit von deren Phosphorylierung. In unabhängigen Studien wurde gezeigt, dass 14-3-3 Proteine phosphorylierte Serin- oder Threoninreste in einem bestimmten, konservierten Motiv in der Sequenz des Zielproteins erkennen (Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997). Eines der oft in 14-3-3 Bindeproteinen vorkommenden Motive hat die Sequenz -RSXpS/pTXP-, ein anderes die Sequenz -RXY/FXpS/pTXP-, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht. Der Argininrest an Position -3 bzw. -4 sowie der Prolinrest an Position +2 ausgehend von dem phosphorylierten Serin oder Threonin sind wichtig, aber nicht

essentiell für die Bindung. Obwohl die Mehrzahl der bekannten 14-3-3 Bindeproteine eines dieser beiden Motive besitzt, gibt es ein Reihe von Proteinen, denen diese Sequenz fehlt und die nicht einmal über eine Phosphorylierungsstelle verfügen.

Andere, weniger gut charakterisierte, Bindemotive sind $-RX_{1-2}SX_{2-3}pS-$ (Liu et al., 1997), $-RXSXpS/pTXP-$ (Yaffe et al., 1997), $-X_3SXSX_3SX_2SX-$ (Vincenz and Dixit, 1996) und $-GHSL-$ (Andrews et al., 1998), $-WLDLE-$ (Petosa et al., 1998) und $-YpTV-$ (Fuglsang et al., 1999).

14-3-3 Proteine können ihre Interaktionspartner auf verschiedene Weise regulieren (Tzivion and Avruch, 2002). Einige Beispiele für die verschiedenen Arten, wie 14-3-3 Proteine ihre Bindepartner regulieren, sind in Abbildung 1.3 dargestellt.

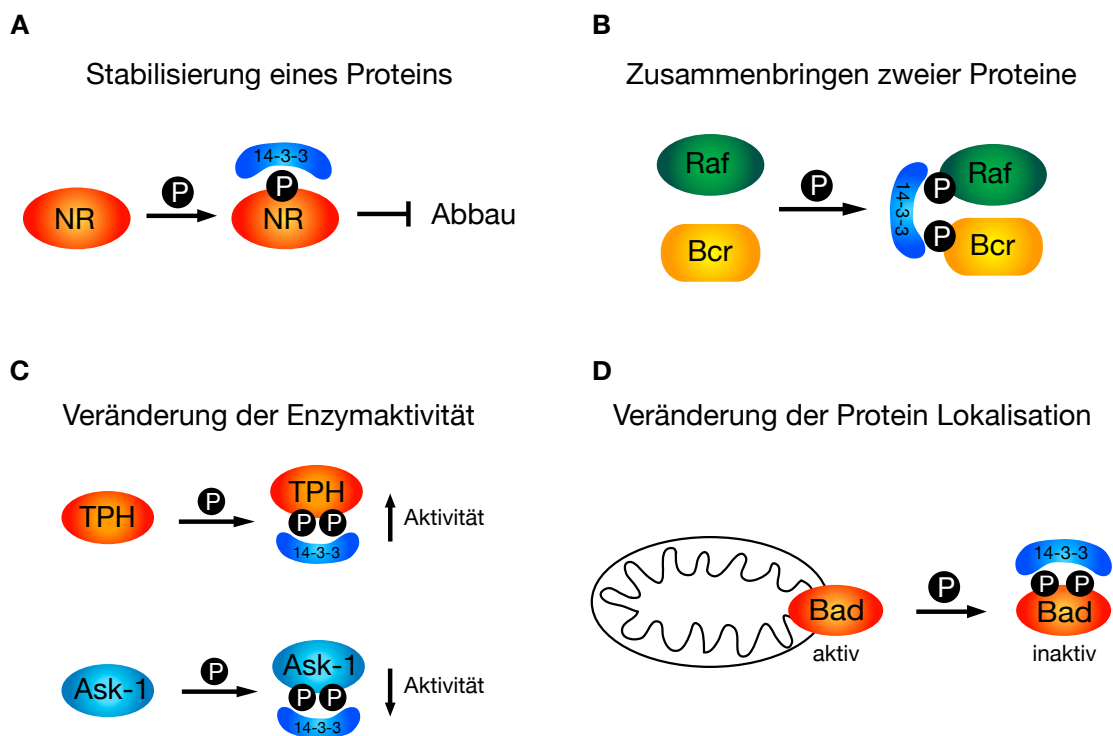


Abb. 1.3: 14-3-3 Proteine können ihre Zielproteine auf unterschiedliche Weise regulieren. (A) Die Bindung von 14-3-3 kann zur Stabilisierung des 14-3-3 Bindeproteins führen. (B) Durch gleichzeitige Bindung an zwei Zielproteine kann ein 14-3-3 Dimer diese in räumliche Nähe zueinander bringen. (C) Die Bindung von 14-3-3 kann auch die Aktivität der Zielproteine modifizieren. (D) Bindung von 14-3-3 kann die Lokalisation eines Bindepartners in der Zelle ändern. Für Details siehe Text (modifiziert nach Tzivion und Avruch, 2002).

Zum einen kann die Bindung von 14-3-3 an ein Zielprotein dieses vor proteolytischem Abbau schützen. Dies wurde beispielsweise für das Enzym Nitratreduktase (NR) aus Pflanzen gezeigt (Cotelle et al., 2000). Gleichzeitig wird Nitratreduktase durch Bindung an 14-3-3 aber auch inaktiviert (Moorhead et al., 1996). Durch ihre dimere Natur können 14-3-3 Proteine auch als Adaptor oder Gerüst dienen und zwei verschiedene Zielproteine gleichzeitig binden und diese dadurch in räumliche Nähe bringen. Dies wurde für die Proteine Raf und Bcr gezeigt (Brasemann and McCormick, 1995). Die Bindung von 14-3-3 kann auch zu einer Veränderung der Enzymaktivität des Zielproteins führen. TPH (Tryptophan-Hydroxylase) wird durch Bindung an 14-3-3 aktiviert (Ichimura et al., 1988), während die Bindung von 14-3-3 an Ask-1 (Apoptosis signal-regulating kinase1) deren Aktivität vermindert (Zhang et al., 1999). Eine weitere Regulationsmöglichkeit ist die Veränderung der intrazellulären Lokalisation von Zielproteinen durch Bindung an 14-3-3. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist das pro-apoptische Protein Bad, ein Mitglied der Bcl-2 Familie (s.u.). Ein anderes Beispiel ist FKHL1 (forkhead transcription factor) (Brunet et al., 1999). Nach Phosphorylierung und Bindung an 14-3-3 wird dieser Transkriptionsfaktor im Zytoplasma zurückgehalten und kann nicht im Kern die Transkription seiner Zielgene aktivieren, wobei der exakte Mechanismus der Regulation durch 14-3-3 noch nicht geklärt ist.

1.2 Bcl-2 Proteine

Programmierter Zelltod, oder Apoptose, ist ein Mechanismus über den vielzellige Organismen ihre Zellzahl während der Entwicklung regulieren bzw. die Homeostase in adulten Geweben aufrechterhalten (Jacobson et al., 1997). Eine zentrale Rolle beim programmierten Zelltod spielen Caspasen. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die ihre Zielproteine C-terminal zu der Aminosäure Aspartat schneiden und in ihrem aktiven Zentrum einen Cysteinrest besitzen (Nicholson and Thornberry, 1997; Wolf and Green, 1999). Nachdem sie aktiviert wurden spalten sie z.B. Lamine, was zu Auflösung der Kernmembran führt. Außerdem spalten sie zytoplasmatische Proteine, Proteine des Endoplasmatischen Retikulums sowie des Zytoskeletts (Jacobson et al., 1997). All dies führt schließlich zum Tod der Zelle. Caspasen können auf unterschiedliche Arten

aktiviert werden. Bei der Ligand-vermittelten Apoptose binden extrazelluläre Liganden an einen Rezeptor, der daraufhin das Signal ins Zellinnere weiterleitet wo Caspasen aktiviert werden (Chinnaiyan et al., 1995; Imai et al., 1999). Auch über das Endoplasmatische Retikulum kann programmierter Zelltod ausgelöst werden (Nakagawa et al., 2000). Zelltod kann auch ausgelöst werden, wenn die Mitochondrien einer Zelle entsprechende Signale erhalten und daraufhin Cytochrom c freisetzen (Mehmet, 2000). Cytochrom c führt dann zusammen mit Apaf-1 zur Aktivierung von Caspase 9.

Die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien wird durch die Bcl-2 Proteinfamilie reguliert. Die Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch die Anwesenheit mindestens einer von insgesamt vier so genannter BH-Domänen (BH1- BH4) aus (Adams and Cory, 1998). In der Bcl-2 Familie gibt es anti- und pro-apoptotische Mitglieder (Abb. 1.4). Die anti-apoptotischen Proteine bilden die Bcl-2 Untergruppe, zu der auch Bcl-2 selber gehört. Die Mitglieder der pro-apoptotischen Gruppe lassen sich weiter in zwei Untergruppen einteilen: Die Proteine der Bax-Untergruppe (Bax, Bak und Bok) besitzen drei BH Domänen (BH1, BH2 und BH3) während die Mitglieder der BH3 Untergruppe nur die BH3-Domäne enthalten (Adams and Cory, 1998).

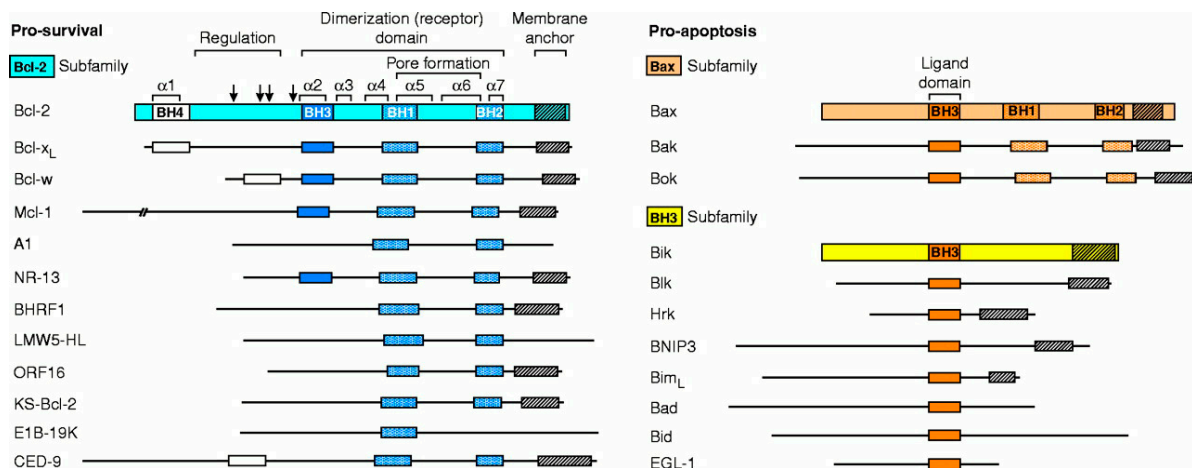


Abb. 1.4: Einteilung der Bcl-2 Familienmitglieder in pro- und anti-apoptotische Proteine (aus Adams and Cory, 1998).

Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-Xl verhindern die Freisetzung von Cytochrom c und damit den programmierten Zelltod (Kluck et al., 1997). Die pro-apoptotischen Proteine (z.B. Bax und Bak) hingegen induzieren die Freisetzung (Jurgensmeier et al., 1998), wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt ist. Möglicherweise bilden Bax und Bak Poren in der Mitochondrienmembran durch die das Cytochrom c ins Zytoplasma gelangen kann (Tsujimoto and Shimizu, 2000).

Pro- und anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie können Heterodimere bilden, was die biologische Aktivität der Interaktionspartner inhibiert. Diese Heterodimerisierung erfolgt durch die Insertion der BH3-Domäne eines pro-apoptotischen Mitglieds in die von BH1-, BH2- und BH3-Domänen gebildete hydrophobe Spalte eines anti-apoptotischen Mitglieds (Tsujimoto and Shimizu, 2000).

Mehrere Mitglieder der Bcl-2 Familie werden durch 14-3-3 reguliert. Ein Beispiel dafür ist Bad, ein Mitglied der pro-apoptotischen BH3 Untergruppe. Bad ist aktiv, wenn es nicht phosphoryliert ist. In dieser Form ist es an Mitochondrien lokalisiert und induziert dort die Freisetzung von Cytochrom c. In Antwort auf ein survival Signal hingegen, z. B. die Bindung von Interleukin-3 (IL-3) an den entsprechenden Rezeptor, wird Bad an mehreren Stellen phosphoryliert. Eine dieser Aminosäuren (Serin-136) liegt in einem klassischen 14-3-3 Bindemotiv (-RSRS¹³⁶AP-) und es konnte gezeigt werden, dass 14-3-3 über diesen phosphorylierten Serinrest an Bad binden kann (Zha et al., 1996). Durch diese Interaktion wird Bad von 14-3-3 im Zytoplasma festgehalten und kann nicht mehr an die Mitochondrien translozieren, um dort Cytochrom c Freisetzung auszulösen. Ein weiterer Serinrest (S112) liegt ebenfalls in einem 14-3-3 Bindemotiv (-RHSS¹¹²YP-), aber die Beteiligung dieses Motives an der 14-3-3-induzierten Inhibierung von Bad ist kontrovers (Zha et al., 1996; Masters et al., 2001).

Vor kurzem konnte auch gezeigt werden, dass die Interaktion von 14-3-3 mit Bad nicht nur vom Phosphorylierungszustand von Bad abhängt, sondern auch die Phosphorylierung von 14-3-3 selbst dabei eine Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass 14-3-3 von der Stress-induzierten c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphoryliert wird und dann nicht mehr in der Lage ist, an Bad zu binden, woraufhin Bad an die Mitochondrien

translozieren und Apoptose auslösen kann (Sunayama et al., 2005). Das Fehlen eines survival Signals und die Aktivierung einer Stress-induzierten Kinase führen also auf unterschiedlichen Wegen (durch fehlende Phosphorylierung von Bad bzw. durch Phosphorylierung von 14-3-3) zur Aktivierung von Bad und damit zum Auslösen von Apoptose.

Ein weiteres Beispiel für ein Bcl-2 Familienmitglied, das durch 14-3-3 reguliert wird, ist das pro-apoptotische Protein Bax. Es wird normalerweise durch Bindung an 14-3-3 im Zytoplasma zurückgehalten. Nach einem apoptotischen Stimulus wird Bax von 14-3-3 freigesetzt und transloziert zu den Mitochondrien. Dort oligomerisiert es und löst die Ausschüttung von Cytochrom c und damit die Aktivierung von Caspasen aus (Samuel et al., 2001; Nomura et al., 2003). Anders als Bad besitzt Bax jedoch kein klassisches 14-3-3 Bindemotiv und bindet Phosphorylierungs-unabhängig an 14-3-3 (Nomura et al., 2003). Wenn 14-3-3 jedoch von JNK phosphoryliert wird kann es nicht mehr an Bax binden. Dies ermöglicht die Translokation von Bax an die Mitochondrien und das Auslösen von programmiertem Zelltod (Tsuruta et al., 2004). JNK wird aktiviert, wenn Zellen Stressbedingungen ausgesetzt sind (Davis, 2000) und dies scheint ein Weg zu sein, wie Stress programmierten Zelltod auslöst (s.o.).

1.3 Hydra

Die Polypen der Gattung Hydra gehören zum Stamm der Cnidarier (Nesseltiere) und gehören damit zu den ersten mehrzelligen Lebewesen. Hydren sind relativ einfache Organismen, die jedoch bereits die meisten der in höheren Eukaryonten vorhandenen Signalwege besitzen. Dies macht sie zu geeigneten Organismen, um die Evolution von Signalwegen zu untersuchen.

Hydren haben einen zylindrischen Körper, der sich aus zwei einschichtigen Epithelien, dem Ektoderm und dem Endoderm, zusammensetzt. Zwischen dem Ekto- und dem Endoderm liegt die Mesoglea, eine azelluläre Matrix. Ekto- und Endoderm umschließen den Gastralraum, an dessen einem Ende sich der Fuß mit einer Fußscheibe und an dessen anderem Ende sich die Mundöffnung (Hypostom) mit dem Tentakelkranz

befindet. Neben den Epithelzellen besitzt Hydra pluripotente Stammzellen (so genannte interstitielle Zellen oder I-Zellen), die zu Nervenzellen, Drüsenzellen und Keimzellen differenzieren. Die Tentakel enthalten außerdem Nematocyten, die ebenfalls ein Differenzierungsprodukt der I-Zellen sind und die eine explosive Nesselkapsel enthalten, mit der die Polypen ihre Beute fangen.

Abbildung 1.5 zeigt eine Übersicht über den Aufbau von Hydra und die Anordnung der einzelnen Zelltypen.

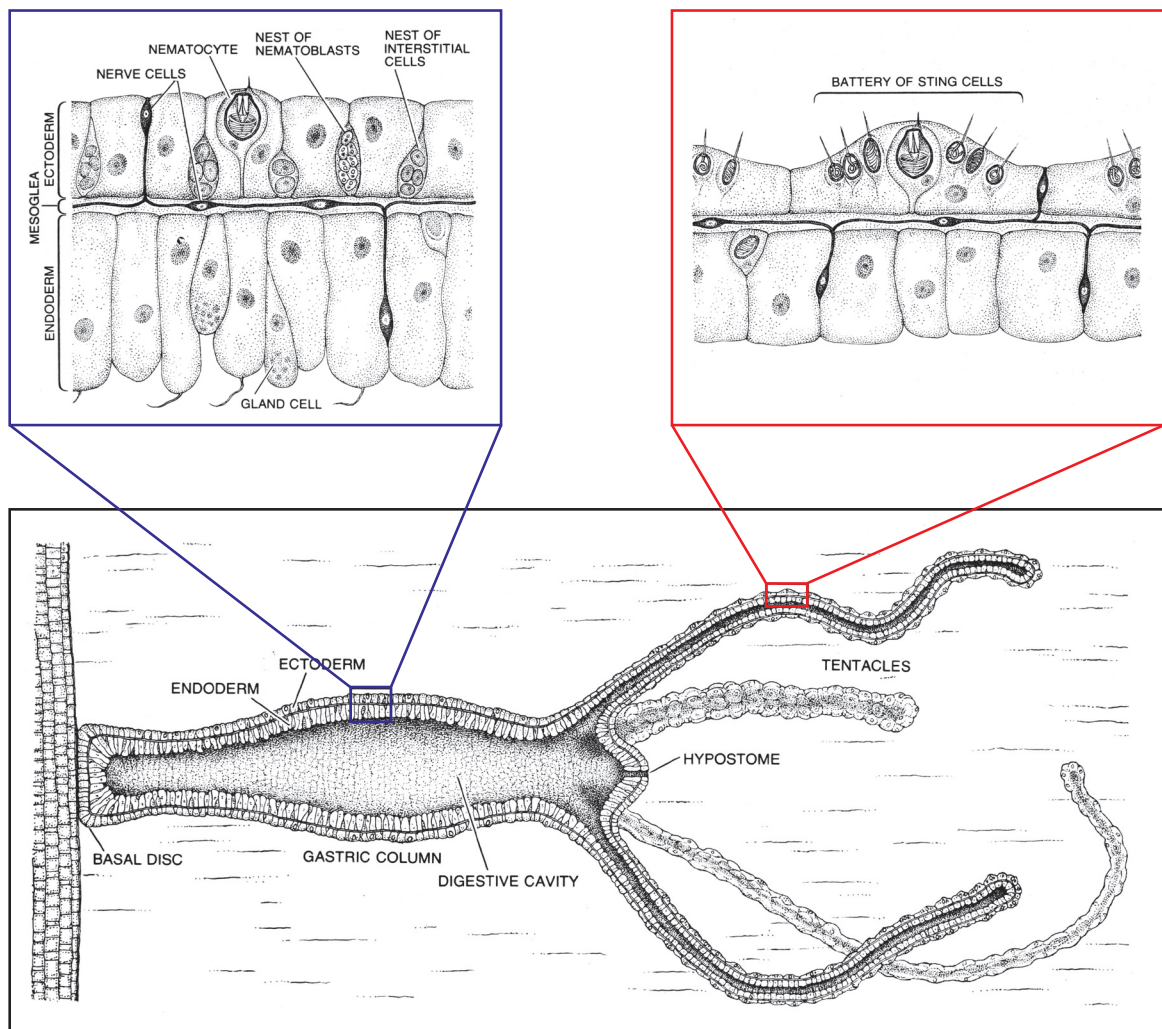


Abb. 1.5: Übersicht über den Aufbau von Hydra (modifiziert aus Gierer, 1974).

Hydren vermehren sich in der Regel asexuell durch Knospung. Dabei werden im unteren Teil des Körpers Knospen gebildet, die schließlich vom Muttertier abfallen.

Hydren können ihr Wachstum je nach Nahrungsangebot regulieren. In gefütterten Tieren verdoppelt sich die Zellzahl alle zwei bis drei Tage. Nachdem die Tiere eine bestimmte Größe erreicht haben, werden neue Zellen zur Bildung von Knospen verwendet. In gehungerten Tieren steigt die Zellzahl weniger schnell an, obwohl die Zellproliferation, also die Teilungsrate, genauso hoch ist wie bei gefütterten Tieren (Bosch and David, 1984). Dies bedeutet, dass gehungerte Tiere Zellen bilden, die später verschwinden. Dabei spielt die Apoptose, oder programmierter Zelltod, eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass es bei diesen Zellen zur Apoptose und schließlich zur Phagozytose durch Nachbarzellen kommt.

Die Faktoren, die Zellwachstum, Metabolismus und Zelltod in Hydra unter verschiedenen physiologischen Zuständen kontrollieren, sind nicht bekannt. Mögliche Proteine mit einer solchen regulatorischen Funktion sind Mitglieder der 14-3-3 Familie.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

14-3-3 Proteine sind an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen beteiligt. Einige dieser Signalwege sind schon in den ersten mehrzelligen Tieren vorhanden. In der vorliegenden Arbeit sollten die beiden 14-3-3 Isoformen HyA und HyB aus Hydra näher charakterisiert werden, um ihre Rolle in bestimmten Signalwegen zu untersuchen. Es sollte untersucht werden, welche Proteine in Hydra von 14-3-3 gebunden werden und ob die Interaktionen zwischen 14-3-3 und seinen Bindeproteinen Phosphorylierungs-abhängig sind.

Über die Identifizierung von 14-3-3 Bindeproteinen sollte unter anderem versucht werden, die Regulation von Wachstum und Proliferation in Hydra unter verschiedenen physiologischen Bedingungen besser zu verstehen. Es sollte auch geklärt werden, ob 14-3-3 Proteine den Prozess des programmierten Zelltods in Hydra regulieren können, wie es aus höheren Eukaryonten bekannt ist und speziell, ob Mitglieder der Bcl-2 Familie durch Bindung an 14-3-3 reguliert werden.

2. Ergebnisse

2.1. Charakterisierung der Hydra 14-3-3 Proteine

2.1.1 Klonierung von HyA und HyB

Um 14-3-3 Gene per PCR aus Hydra zu klonieren, wurden degenerierte Primer gegen stark konservierte Bereiche von 14-3-3 entworfen. Eine touch-down PCR mit diesen Primern ergab eine Hauptbande der erwarteten Größe von 600 bp, sowie mehrere schwächere, kleinere Banden. Die PCR Banden wurden in den pCR[®]2.1-TOPO[®] Vektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert. Zwei Sequenzen mit starker Homologie zu 14-3-3 von Säugern wurden erhalten. Diese wurden verwendet, um Digoxigenin-markierte Sonden herzustellen, mit denen eine Hydra cDNA Bank nach den Volllängeklonen durchsucht wurde. Die dabei gefundenen Gene wurden HyA und HyB genannt (Pauly et al., 2003). Kürzlich wurde eine dritte Isoform in der Hydra EST Datenbank identifiziert. Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden jedoch ausschließlich mit den Isoformen HyA und HyB durchgeführt.

Abbildung 2.1 zeigt einen Sequenzvergleich der drei 14-3-3 Isoformen aus Hydra mit der humanen γ Isoform.

hs 14-3-3 γ	M---VDREQLVQKARLAEQAERYDDMAAAMKNVTELNEP-LSNEERNLLSVAYK
14-3-3 HyA	M-SHLSEQELVDMAKLAEQAERYDDMVKFMKELTVKSKK-LSDEHRNLLSVAFK
14-3-3 HyB	MASTDSKEILIQRAKLAEQAERYDDMAAAMKQVTKMTDEPLTGEERNLLSVAYK
14-3-3 HyC	MLE--DRAQLIARAKLAEQAERYEDMASAMKKVTEMGGS-LQNEERNLLSVAYK
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> helix 1 helix 2 helix 3 </div>
hs 14-3-3 γ	NVVGARSSSWRVISSIEQKTSADGNEKKIEMVRAYREKIEKELEAVCQDVL SLL
14-3-3 HyA	NVVGARSAWRIISSIESKQEEKGDST--ELTTKYKKEIEHELQERCREVLDLL
14-3-3 HyB	NIVGAKSSSWRVITSIEQKANDK-----QALAAQYRSNIEKELKGVCEEVLELL
14-3-3 HyC	NVVGSRSSSWRVITGIESSRKDGVNKRTELAKEYRLKV-EKELQDVCSEVLKLL
	helix 4
hs 14-3-3 γ	DNVLIKNCSE-----ETQYESKVFY LKMKGDYYRYLAEVATGEKRAT
14-3-3 HyA	DNHLLVEVDSGCNGENGN-----EGKVFYQKMKGDYYRYLVEVSSSEKRNE
14-3-3 HyB	AKYLVNKSIERVDPANKKT-----LESAVFY LKMKGDYYRYLAEVAVDEERKR
14-3-3 HyC	NDYLI PSVDSALTGFNGTEEEEEKLI ESKVFYWKMKGDYYRYLAEVVSDEKEKH
	helix 5
hs 14-3-3 γ	VVESSE-KAYSEAHEI SKEHMQP THPIRLGLALNYSVFY YEI QNAPEQACHLAK
14-3-3 HyA	LAAKSQQ-AYDEATKTAEKLPN-THPISLGLALNFSVFHYEIMNDSPKACALAK
14-3-3 HyB	VIFEADA-AYKQASEISENLIS-TDPIRLGLALNYSVFHYEIRNKPSEACTLAK
14-3-3 HyC	DVVL DSEKAYIEAQNASNMKA-TNPIRLGLALNFSVFY YEIRGDQTKACGLAK
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> helix 6 helix 7 </div>
hs 14-3-3 γ	TAFDDAIAELDTLNEDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTS DQQDDDGEGNN
14-3-3 HyA	KAFDGAIAELDSLKEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSETEQDEQNE
14-3-3 HyB	KAFDDAIVELDSLAEEDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTADADATTEE
14-3-3 HyC	KSFDEAIAELDTLSEDSYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSEVDDNQDDDEQGN
	<div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> helix 8 helix 9 </div>

Abb. 2.1: Sequenzvergleich von humanem 14-3-3 γ mit den drei in Hydra gefundenen Isoformen HyA, HyB und HyC. Identische Aminosäuren sind gelb hinterlegt. Die Aminosäuren in Helix 3 und 5, die für die Interaktion mit den 14-3-3 Bindeproteinen wichtig sind, sind in allen drei Hydra Isoformen konserviert und rot markiert. Die neun α -Helices sind unterstrichen.

2.1.2 Phylogenie

Um die beiden 14-3-3 Proteine aus Hydra mit den verschiedenen Isoformen aus anderen Organismen zu vergleichen, wurde ein Stammbaum mit ClustalX und Tree view Programmen erstellt (Abb. 2.2). Es wurden sieben 14-3-3 Isoformen aus Vertebraten, elf Isoformen aus *A.thaliana*, sowie die Isoformen aus *Chlamydomonas*, Hefe, Entamoeba, *C.elegans*, *Schistosoma* und *D.melanogaster* in die Analyse eingeschlossen. Die beiden 14-3-3 Proteine aus Hydra liegen an der Basis der Metazoen Gruppe und gehören keiner der bekannten Gruppen von 14-3-3 Isoformen an.

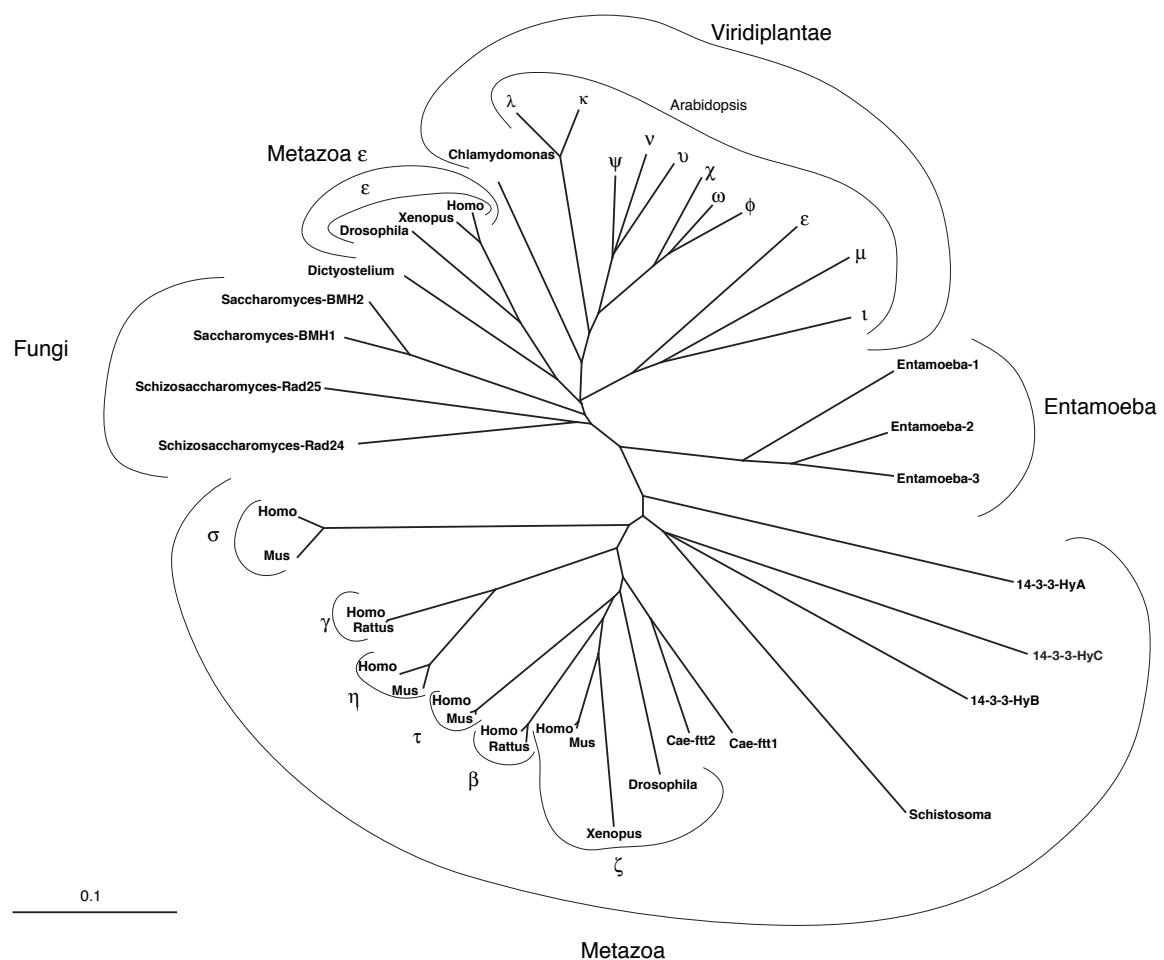


Abb. 2.2: Phylogenetischer Stammbaum, der die Verwandtschaft der Hydra Isoformen HyA, HyB und HyC zu 14-3-3 Proteinen aus Tieren, Pflanzen und Pilzen zeigt. Für Details siehe Text.

2.1.3 Expression von 14-3-3 HyA und HyB in Bakterien

Die beiden Gene HyA und HyB wurden in den Vektor pRSET A (Invitrogen) kloniert (Zoubek, 2001). Dieser Vektor codiert N-terminal einer Geninsertionsstelle (multiple cloning site) für sechs Histidinreste (His-Tag). Die beiden Hydra 14-3-3 Isoformen wurden in den mit BamHI und EcoRI geschnittenen Vektor kloniert. Anschließend wurden sie in Bakterien exprimiert und mit Hilfe ihres His-Tags über eine Nickel-Affinitätssäule gereinigt.

2.1.4 Der polyklonale Antikörper K19 gegen humanes 14-3-3 β erkennt Hydra 14-3-3 Proteine

Abbildung 2.3 zeigt, dass der kommerziell erhältliche Antikörper K19 gegen humanes 14-3-3 β rekombinantes 14-3-3 aus Bakterienlysaten erkennt. In Spur 2 und 3 (rekombinantes HyA und HyB) des Westernblots in Abb. 2.3 ist gezeigt, dass der K19 Antikörper beide Isoformen erkennt. Er erkennt auch 14-3-3 Protein in einem Hydralysat (Spur 1). Im Hydralysat erkennt man zwei starke Banden bei 32 bzw 34 kD sowie eine schwächere bei etwa 35 kD. Diese Banden könnten den unterschiedlichen 14-3-3 Isoformen entsprechen. HyA hat ein Molekulargewicht von 28,6 kD, HyB von 28,1 kD und HyC von 29,8 kD. Wenn man die relativen Molekulargewichte der drei 14-3-3 Isoformen vergleicht, ist es am wahrscheinlichsten, dass die oberste Bande der größten Isoform HyC, die mittlere Bande der Isoform HyA und die untere Bande der Isoform HyB entspricht. Aus der Hydra EST Datenbank ist bekannt, dass die mRNA von HyC seltener ist als die von HyA oder HyB. Diese schwächere Expression ist konsistent mit dem schwächeren Signal der HyC Isoform mit dem Antikörper. Die rekombinanten Proteine HyA und HyB in Spur 2 und 3 haben aufgrund ihres Histidin-Tags ein größeres Molekulargewicht als endogenes 14-3-3.

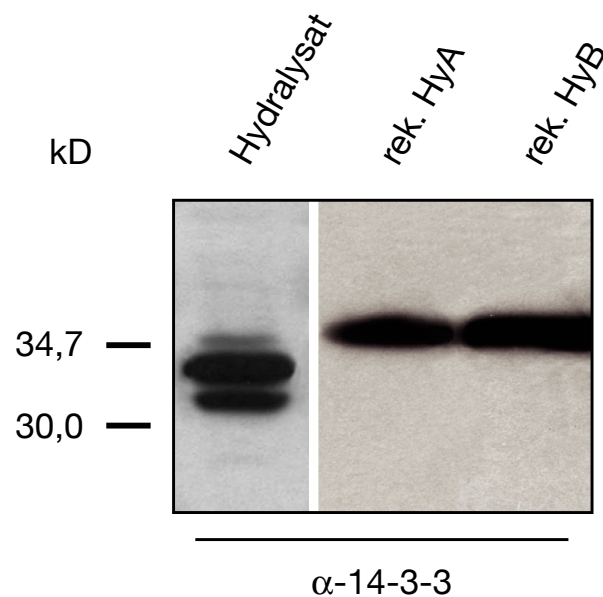


Abb. 2.3: Der 14-3-3 Antikörper K19 erkennt Hydra 14-3-3 Proteine.

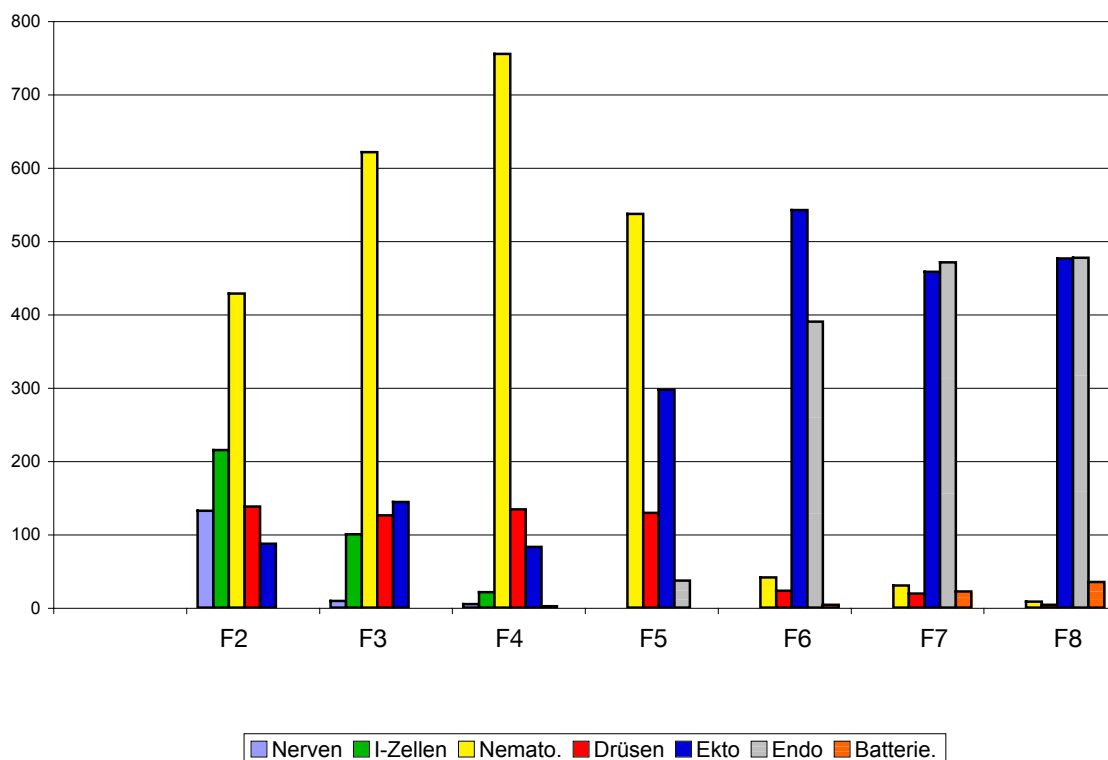
Hydralysat bzw. rekombinantes 14-3-3 HyA und HyB wurden in einem 12% SDS Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Western Blot wurde mit dem 14-3-3 Antikörper K19 inkubiert.

2.1.5 14-3-3 Proteine werden in allen Zelltypen exprimiert

Um zu testen, ob 14-3-3 in allen Zelltypen exprimiert wird, wurden die verschiedenen Zelltypen von Hydra durch Counterflow-Elutriation von einander getrennt. Bei dieser Methode werden unterschiedlich große Zellen durch eine Kombination von Sedimentation per Zentrifugation und Counterflow-Elutriation getrennt. Auf jede Zelle in der Elutriationskammer wirken dabei zwei entgegengerichtete Kräfte: die Zentrifugalkraft (weg von der Drehachse) und der Medium Fluss (hin zur Drehachse). Die Zellen in der Kammer wandern entsprechend ihrer Sedimentationsraten zu einer Position, wo sich beide Kräfte im Gleichgewicht befinden. Kleine Zellen bewegen sich dabei schneller als große Zellen weg von der Drehachse und werden zuerst aufgefangen (Greber et al., 1992).

Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde mikroskopisch bestimmt und ist in Abbildung 2.4 A dargestellt. Abbildung 2.4 B zeigt einen 14-3-3 Westernblot der einzelnen Fraktionen. Dazu wurde von den Fraktionen F2 - F8 je 10 µg Protein geladen und mit dem K19-Antikörper auf Anwesenheit von endogenem 14-3-3 getestet. Die Fraktion 1 enthielt neben intakten Zellen auch aufgebrochene Zellen und Zellklumpen und wurde daher nicht in die Auswertung miteinbezogen. Wie bei dem Zellysat aus ganzen Hydren (vgl. Abb 2.3) erkennt der K19 Antikörper auch hier drei unterschiedliche Banden. 14-3-3 ist in allen Elutriationsfraktionen und somit in allen Zelltypen vorhanden. Die Verteilung der unterschiedlichen Banden ist jedoch in den einzelnen Fraktionen nicht gleich. In Fraktionen 4 und 5, die hauptsächlich Nematocyten enthalten, ist nur die mittlere Bande vorhanden. In Fraktionen 7 und 8, die die großen ektodermalen und endodermalen Epithelzellen enthalten, ist neben der unteren und der mittleren Bande auch die obere Bande sichtbar.

A



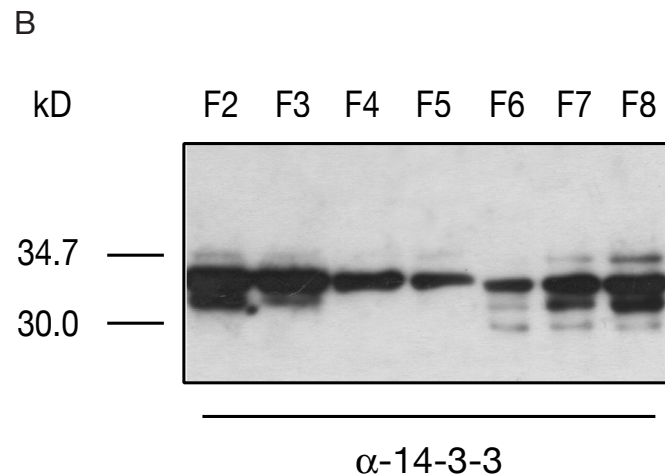


Abb. 2.4: Elutriation zur Trennung der verschiedenen Zelltypen in Hydra.

(A) Die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen wurde mikroskopisch bestimmt.
(B) Western Blot mit dem 14-3-3 Antikörper K19. Je 10 μ g jeder Fraktion wurden in einem 12% SDS Gel aufgetrennt, geblottet und die Anwesenheit von 14-3-3 Protein mit dem Antikörper K19 untersucht.

2.1.6 14-3-3 Proteine kommen in verschiedenen Zellkompartimenten vor

Anschließend wurde genauer untersucht, in welchen intrazellulären Kompartimenten 14-3-3 lokalisiert ist. Dafür wurde Hydragewebe durch Dounce Homogenisierung lysiert. Anschließend wurden die einzelnen subzellulären Kompartimente per differentieller Zentrifugation getrennt (nach Alberts et al., 1994). Bei 800 g sedimentieren die Kerne sowie nicht-aufgeschlossene Zellen. Im nächsten Schritt wird der dabei entstandene Überstand bei 17.000 g zentrifugiert (low speed Zentrifugation). Dabei werden Mitochondrien und größere Vesikel pelletiert. Bei der abschließenden Zentrifugation bei 100.000 g (high speed Zentrifugation) werden Mikrosomen sedimentiert. Der Überstand enthält die Zytoplasmafraktion.

Anschließend wurden von allen Fraktionen gleiche Proteinmengen aufgetragen, per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Abbildung 2.5 zeigt einen Western Blot mit dem 14-3-3 Antikörper K19. 14-3-3 Protein ist in allen Zellkompartimenten vorhanden. Wie bei den elutrierten Zellen sind jedoch die

einzelnen Isoformen nicht gleichmäßig in allen Kompartimenten verteilt. So fehlt z.B. die größte Isoform (vermutlich HyC) in der Mikrosomenfraktion. Die 40 kD-Bande in der Mitochondrienfraktion wurde nicht immer von dem 14-3-3 Antikörper erkannt und scheint daher ein unspezifisches Signal zu sein.

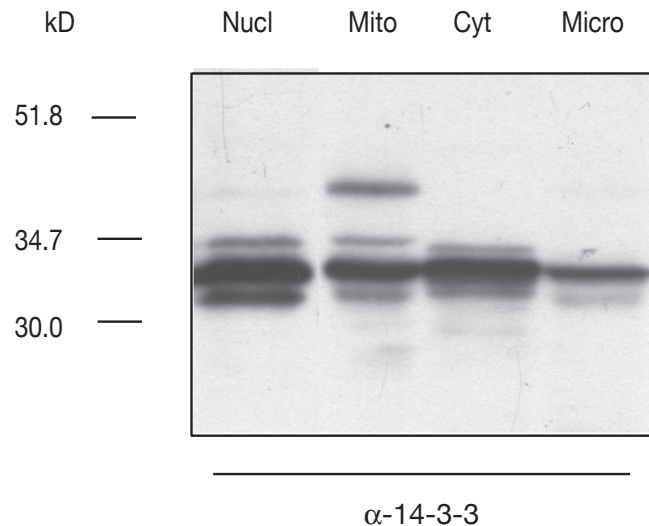


Abb. 2.5: 14-3-3 Proteine kommen in verschiedenen Zellkompartimenten vor.

Nach der Dounce Homogenisierung wurden gleiche Proteinenmengen jeder Fraktion in einem SDS Gel aufgetrennt, geblottet und mit dem K19 Antikörper auf die Anwesenheit von 14-3-3 Protein hin untersucht. Nucl: Kernfraktion, Mito: Mitochondrienfraktion, Cyt: Zytoplasmafraktion, Micro: Mikrosomenfraktion

2.1.7 Immunfärbungen zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von 14-3-3 Isoformen in Hydrazellen

Anschließend wurde der 14-3-3 Antikörper verwendet, um die Lokalisation von 14-3-3 Proteinen in Hydrazellen zu untersuchen. Dabei kann nicht zwischen den beiden Isoformen HyA und HyB unterschieden werden. In Immunfärbungen von Hydra Maze-raten (David, 1973) wird sichtbar, dass alle Zelltypen 14-3-3 enthalten (Abb. 2.6). Alle Bilder wurden mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen und stellen Projektionen mehrerer Einzelschnitte dar. Abbildung 2.6 a-c zeigt ektodermale Epithelzellen. 14-3-3 ist gleichmäßig in allen Teilen der Zelle vorhanden, wenngleich die Färbung granulär und nicht homogen erscheint. In Abbildung 2.6 d-e sind zwei endodermale Epithel-

zellen abgebildet. Auffallend in Endodermzellen ist die starke Färbung von Nahrungsgranula (markiert durch Sternchen), die teilweise auch mit dem Kernfarbstoff TO-PRO-3 (Invitrogen) angefärbt sind (schwarzer Punkt). In einigen Fällen (z.B. Bild d) sind außer den Granula keine weiteren Bereiche der Zelle gefärbt. Die 14-3-3-positiven Granula stellen Nahrungsvakuolen dar und waren auch mehrere Wochen nach dem letzten Füttern noch sichtbar. Abbildung 2.6 f zeigt zwei interstitielle Zellen mit granulärer Färbung. Abbildung 2.6 g und h zeigen zwei Nervenzellen mit 14-3-3 Färbung im Zellkörper und den Nervenfortsätzen.

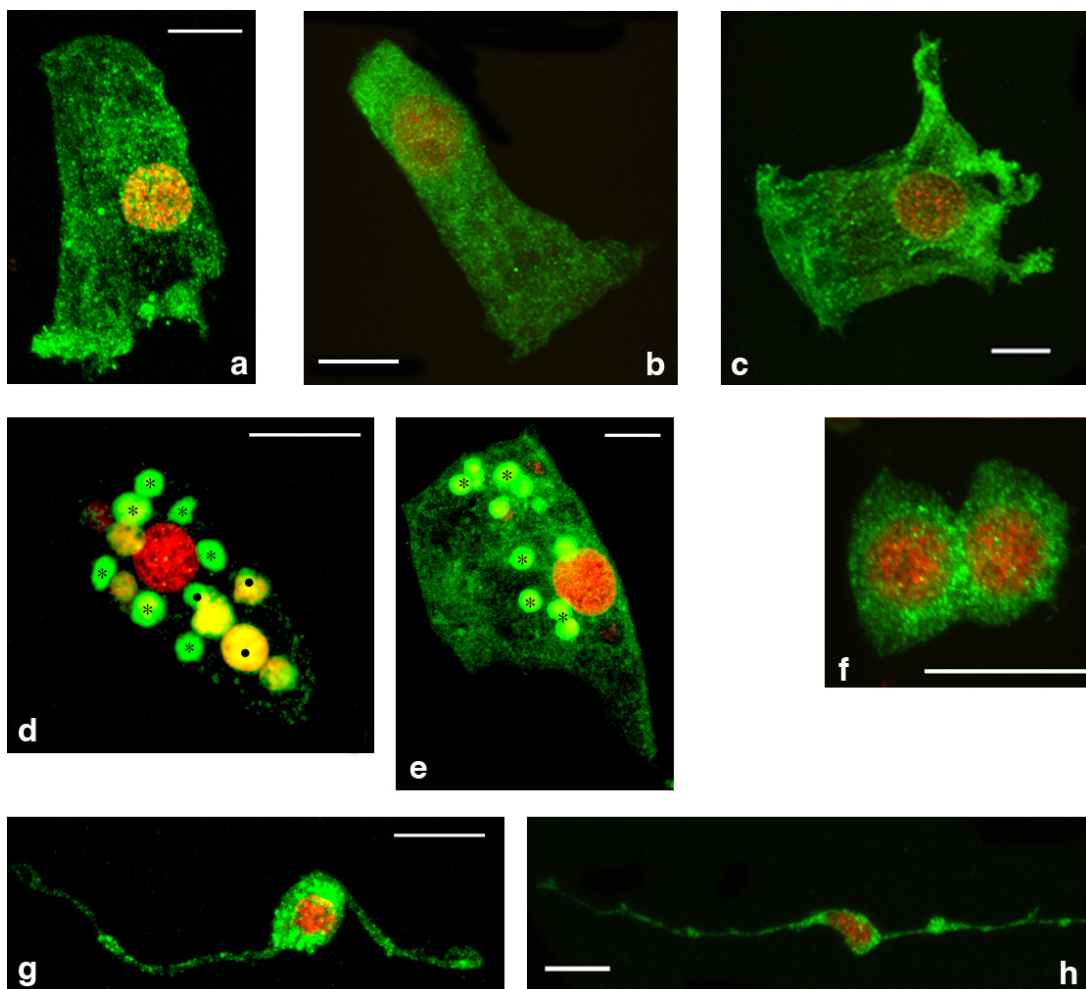


Abb. 2.6: 14-3-3 Antikörperfärbungen auf Hydra Mazeraten.

Hydraxellen wurden mazeriert und anschließend mit dem 14-3-3 Antikörper K19 gefärbt. Bei allen gezeigten Zellen handelt es sich um Projektionen mehrerer optischer Schnitte. Die 14-3-3 Färbung ist in grün und die Kernfärbung in rot dargestellt. Sternchen markieren Nahrungsgranula in endodermalen Epithelzellen, die 14-3-3 enthalten. Punkte markieren Nahrungsgranula, die sowohl positiv für 14-3-3 als auch für den Kernfarbstoff TO-PRO-3 sind. Der Größenstandard entspricht 10 μ m.

Wenn man statt Projektionen einzelne Schnittebenen betrachtet, zeigt sich, dass 14-3-3 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vorkommt. Abbildung 2.7 zeigt Einzelschnitte von 0,3 μm Dicke durch Hydrazellen in Mazeraten. In a-c und d-f sind zwei ektodermale Epithelzellen, und in g-i zwei interstitielle Zellen abgebildet. Im grünen Kanal ist die 14-3-3 Färbung und im roten Kanal die Kernfärbung (TO-PRO-3) dargestellt. c,f und i zeigt die Überlagerung von 14-3-3- und TO-PRO-3 Signal. Man sieht, dass auch im Bereich der Kerne 14-3-3 Protein vorhanden ist. 14-3-3 ist also sowohl zytoplasmatisch als auch Kern-lokalisiert. Allerdings sieht man im Bereich der Kerne keine gelbe Färbung (als Überlagerung von grünem 14-3-3- und rotem DNA Signal), was darauf hindeutet, dass sich 14-3-3 zwar im Kern, nicht jedoch an den gleichen Stellen wie das Chromatin befindet.

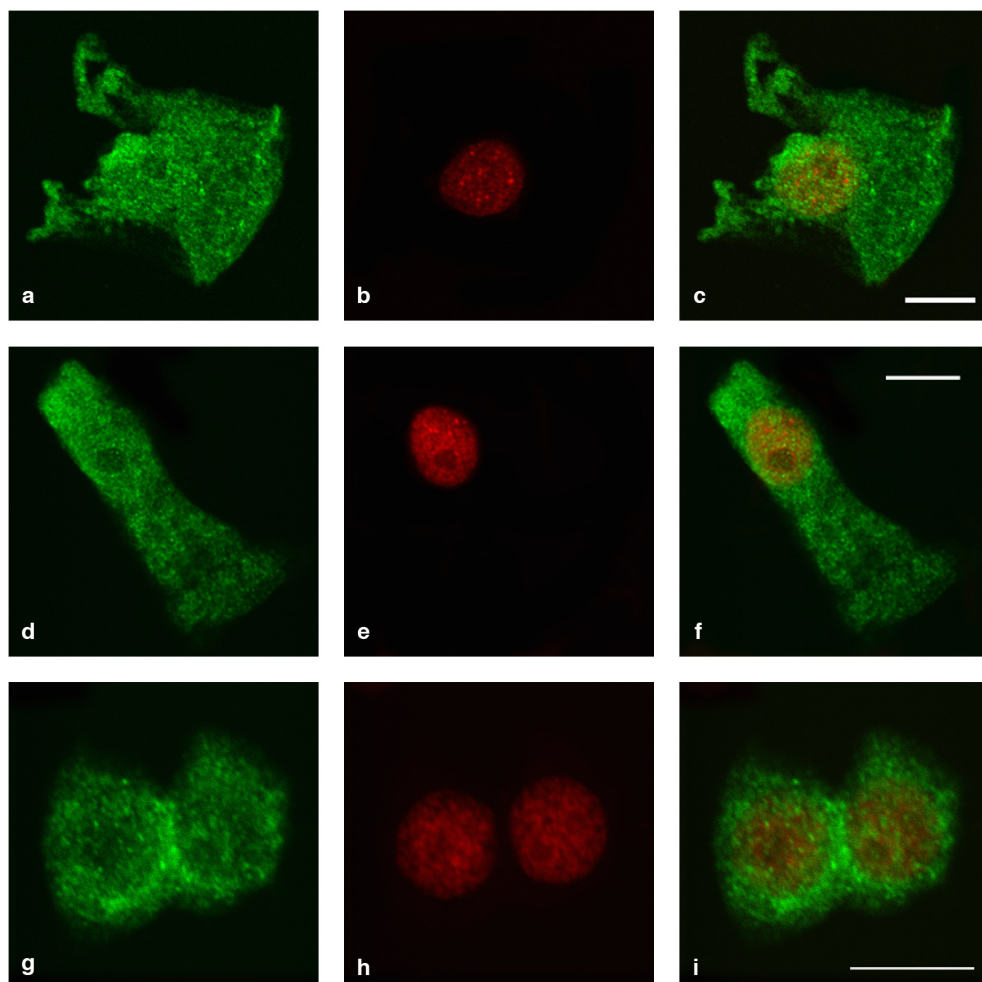


Abb. 2.7: Einzelne optische Schnitte durch Hydra Mazerate.

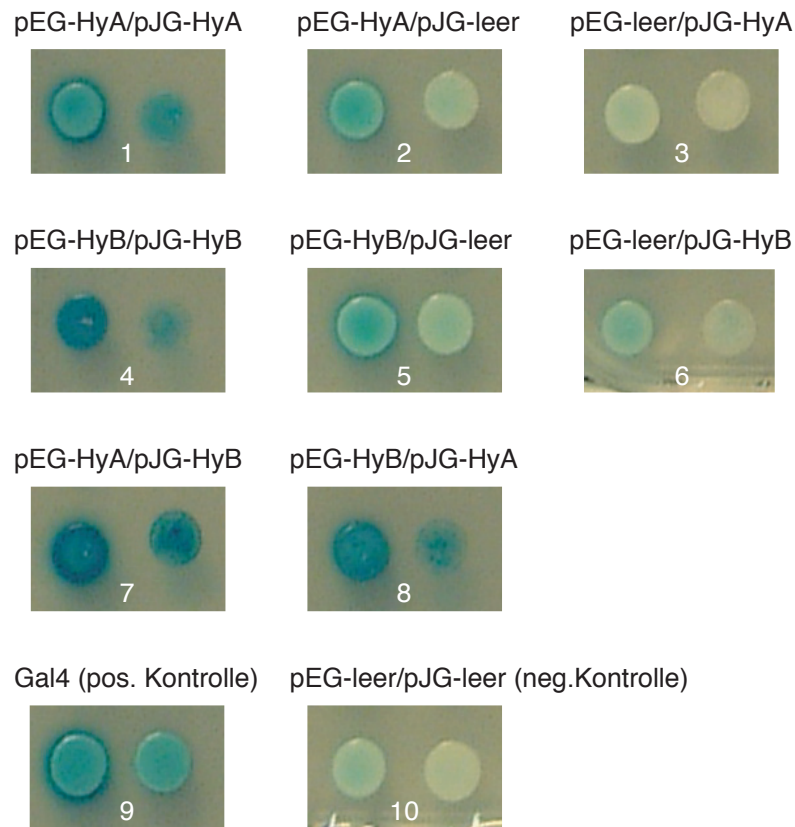
a-c: ektodermale Epithelzelle; d-f: ektodermale Epithelzelle; g-i: interstitielle Zellen
Das 14-3-3 Signal ist grün, das Kernsignal rot dargestellt.

c, f, i: Überlagerung von 14-3-3- und Kernsignal. Die Schnittdicke beträgt 0,3 μm . Der Größenstandard ist 10 μm .

2.1.8 14-3-3 Proteine aus Hydra bilden Homo- und Heterodimere

14-3-3 Proteine formen Homo- und Heterodimere und binden ihre Zielproteine auch in dieser Form (Fu et al., 2000; Shen et al., 2003). Die Frage, ob 14-3-3 HyA und HyB Homo- und Heterodimere bilden können, wurde im Yeast Two Hybrid System untersucht. Dabei wird das eine zu testende Protein in dem Vektor pEG202 mit der DNA-bindenden Domäne des bakteriellen Repressorproteins LexA fusioniert (Brent and Ptashne, 1985). Das andere zu testende Protein wird in dem Vektor pJG4-5 als Fusionsprotein mit der Transkriptions-aktivierenden Domäne B42 exprimiert (Ma and Ptashne, 1987; Ruden, 1992). Keines der beiden Fusionsproteine alleine sollte in der Lage sein, ein Reporter gen (in diesem Fall das lacZ Gen in dem Reporterplasmid pSH18-34), das in seinem Promotorbereich LexA Bindestellen besitzt, anzuschalten. Nur wenn beide Proteine (HyA und HyB) miteinander interagieren, wird das lacZ Gen aktiviert und setzt das zugegebene Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff um. 14-3-3 HyA und 14-3-3 HyB wurden in die entsprechenden Hefektoren kloniert und in Hefezellen exprimiert. Die Interaktion der getesteten Proteine wird durch die Aktivierung des lacZ Genes und die anschließende Umsetzung des Farbstoffes X-Gal zu einem blauen Spaltprodukt nachgewiesen.

Abbildung 2.8 zeigt, dass HyA im Yeast Two Hybrid System sowohl mit sich selbst (Bild 1) als auch mit HyB interagieren kann (Bild 7 und 8). HyA kann also sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden. HyB kann ebenfalls mit sich selbst (Bild 4) und mit HyA interagieren (Bild 7 und 8), ist also ebenfalls in der Lage Homo- und Heterodimere zu bilden. In den Bildern 2 und 3 sind die jeweiligen Selbstaktivierungskontrollen für HyA und in Bild 5 und 6 die Kontrollen für HyB gezeigt. Der Test auf Selbstaktivierung erfolgte in Kombination mit einem leeren Vektor. Beide 14-3-3 Isoformen sind schwach selbst-aktivierend, was an der hellblauen Farbe zu erkennen ist. Als Positivkontrolle (Bild 9) diente das Plasmid pSH2-1-Gal4. pSH2-1-Gal4 kodiert für ein LexA-Gal4 Fusionsprotein, das die transkriptionsaktivierende Domäne des Hefeproteins Gal4 enthält. In Hefezellen, die dieses Plasmid enthalten, wird die Transkription des Reporter genes ohne weitere Proteininteraktionen aktiviert. Als Negativkontrolle (Bild 10) dienten Hefezellen, die mit den beiden leeren Vektoren pEG202 und pJG4-5 transformiert worden waren.

**Abb. 2.8: 14-3-3 Proteine in Hydra bilden Homo- und Heterodimere.**

Hefezellen wurden mit verschiedenen Kombinationen der beiden 14-3-3 Isoformen transformiert. Anschließend wurde die Expression der Proteine durch Ausplattieren auf Galaktose-haltigem Medium induziert. Der Test auf Aktivierung des lacZ-Reportergens und somit auf Interaktion der 14-3-3 Proteine erfolgte nach Auftropfen verschiedener Verdünnungen auf Hefepplatten mit 40 µg/ml X-Gal.

In einem weiteren Test auf Dimerisierung wurde rekombinantes, gereinigtes 14-3-3 HyA und 14-3-3 HyB mit Digoxigenin markiert und als Sonde auf Westernblots mit rekombinanten, nicht-markiertem HyA und HyB verwendet (Far Western Overlay) (Abb. 2.9). Der Nachweis von DIG-14-3-3 erfolgte mit einem anti-Digoxigenin Antikörper.

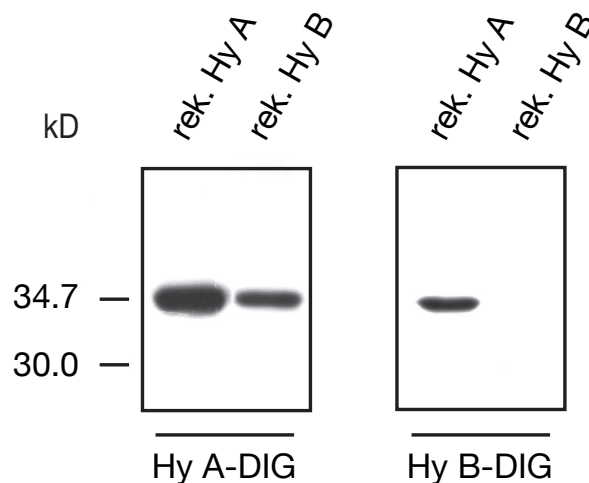


Abb. 2.9: Nachweis der Homo- und Heterodimerisierung von 14-3-3 Proteinen im Far Western Overlay. Rekombinantes 14-3-3 HyA und HyB wurden in einem SDS Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion der 14-3-3 Proteine erfolgte mit einer Sonde aus rekombinatem HyA, das mit Digoxigenin markiert wurde (links) bzw. mit einer HyB-DIG Sonde (rechts).

DIG-markiertes HyA (links) erkennt sowohl rekombinantes 14-3-3 HyA als auch 14-3-3 HyB. 14-3-3 HyA ist also im Far Western Overlay in der Lage, Homo- und Heterodimere zu bilden. DIG-markiertes HyB dagegen erkennt im Far Western Overlay nur rekombinantes HyA, nicht jedoch rekombinantes HyB (rechts). Daraus kann man schließen, dass 14-3-3 HyB unter diesen Bedingungen zwar heterodimerisieren, nicht jedoch homodimerisieren kann.

Die unterschiedlichen Ergebnisse für 14-3-3 HyB im Far Western Overlay und im Yeast Two Hybrid System könnten mit den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zusammenhängen. Im Far Western Overlay interagiert ein natives Protein mit einem denaturierten Protein, das auf einer Membran immobilisiert wurde. Im Yeast Two Hybrid System dagegen interagieren zwei native Proteine miteinander. Möglicherweise kann 14-3-3 HyB nur Homodimere bilden wenn beide Monomere korrekt gefaltet sind.

2.1.9 Nachweis phosphorylierter 14-3-3 Bindeproteine in Hydralysaten

Anschließend wurde getestet, ob 14-3-3 im Far Western Overlay Assay auch mit endogenen Hydra Proteinen interagieren kann. Dazu wurden Hydralysate in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und mit DIG-markiertem Hydra 14-3-3 auf die Anwesenheit von 14-3-3 Bindeproteinen getestet (Abb. 2.10). Die 14-3-3 HyA-Sonde zeigt drei sehr starke Banden mit einem Molekulargewicht von 32, 34 bzw. 35 kD (Abb. 2.10 links). Diese drei Banden stimmen von der Größe her mit den drei Banden überein, die auch der 14-3-3 Antikörper K19 erkennt (vgl. Abb. 2.3, Spur 1), wobei die oberste Bande von der 14-3-3 HyA-Sonde wesentlich stärker erkannt wird als von dem K19 Antikörper. Die 14-3-3 HyB-Sonde dagegen erkennt nur die 34 kD-Bande (Abb. 2.10 rechts). Da DIG-markiertes 14-3-3 HyB im Overlay nur mit rekombinantem HyA interagieren kann (s. Abb. 2.9), kann man davon ausgehen, dass diese Bande die HyA-Isoform ist. Die beiden anderen Banden (32 und 35 kD), die von DIG-markiertem HyA erkannt werden, könnten die zwei anderen Isoformen, HyB und HyC darstellen. Da HyC ein größeres Molekulargewicht als HyB hat (29,8 kD im Vergleich zu 28,1 kD) stellt die obere Bande möglicherweise die HyC-Isoform und die untere Bande die HyB Isoform dar. Die Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kD, die von beiden 14-3-3 Sonden erkannt wird, ist ein potentielles 14-3-3 Bindeprotein in dem Hydralysat.

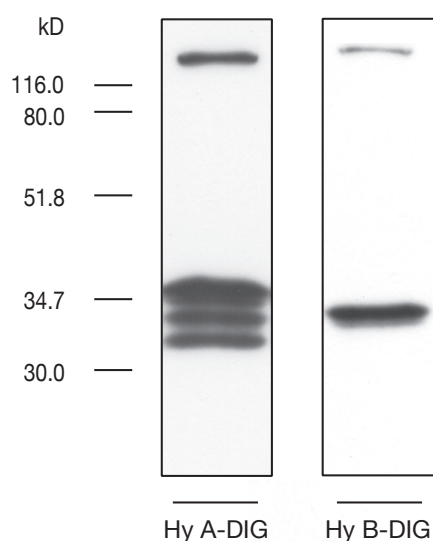


Abb. 2.10: Interaktion von 14-3-3 Sonden mit endogenem 14-3-3 in Hydralysaten.

Hydralysate wurden in einem SDS Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Anschließend wurden die Membranen mit HyA-DIG Sonde (links) bzw. HyB-DIG Sonde (rechts) inkubiert.

Beim Auftragen einer sehr großen Menge von Hydralysat im Far Western Overlay wurden auch eine Reihe schwächerer Banden im Bereich von 50-100 kD sichtbar (nicht gezeigt). Diese Banden stellen weitere 14-3-3 Bindeproteine dar. Da die DIG-markierten Hydra 14-3-3 Sonden nur sehr schwache Signale mit solchen Bindeproteinen lieferten, wurden für alle weiteren Versuche DIG-markierte Hefe 14-3-3 Proteine (BMH1 und 2) verwendet, die sich zum Einen besser rekombinant in Bakterien herstellen ließen und zum anderen im Far Western Overlay mehr Signale detektierten.

Abbildung 2.11 zeigt, dass DIG-markiertes Hydra 14-3-3 mit rekombinantem Hefe 14-3-3 im Far Western Overlay interagieren kann.

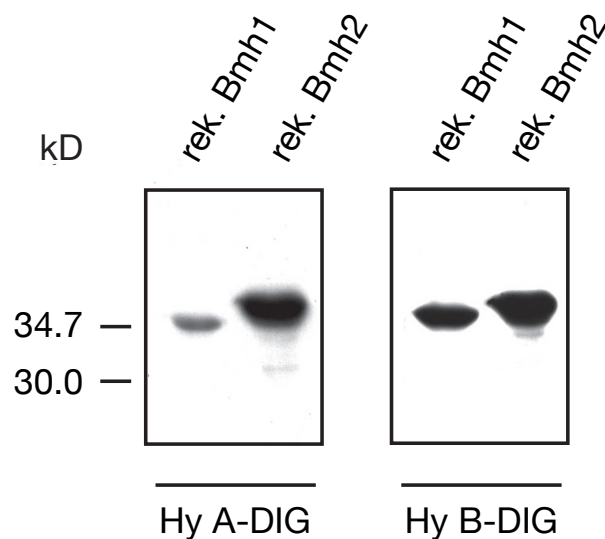


Abb. 2.11: Hydra 14-3-3 Sonden interagieren mit rekombinantem Hefe 14-3-3. Rekombinantes Hefe 14-3-3 (Bmh1 und Bmh2) wurde in einem SDS Gel aufgetrennt und geblottet. Die Membranen wurden mit einer HyA-DIG Sonde (links) bzw. einer HyB-DIG Sonde (rechts) inkubiert.

Um 14-3-3 Bindeproteine in Hydra nachzuweisen, wurden im nächsten Schritt Zelllysate von *H. vulgaris* in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit DIG-markiertem 14-3-3 aus Hefe auf die Anwesenheit von 14-3-3 Bindeproteinen getestet werden. In Abbildung 2.12 wurde ein solches Zelllysate von *H.vulgaris* mit DIG-markiertem Hefe 14-3-3 (BMH2-DIG) im Far Western Overlay auf die Anwesenheit von 14-3-3 Bindeproteinen untersucht.

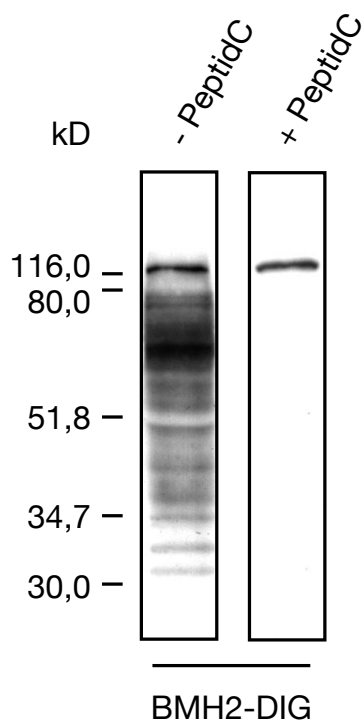


Abb. 2.12: Nachweis von 14-3-3 Bindeproteinen in Hydralysaten.

Hydralysate wurden in einem SDS Gel aufgetrennt und geblottet. Die Detektion von 14-3-3 Bindeproteinen erfolgte durch Inkubation der Membranen mit einer Bmh2-DIG Sonde. Vorinkubation der Sonde für 1h mit 1mM des phosphorylierten 14-3-3 Bindepeptids Peptid C führte zum Verlust der Bindung der 14-3-3 Sonde an die Zielproteine (rechts).

Im Bereich von 30-116 kD sind deutliche Banden sichtbar (linke Spur). Sie stellen 14-3-3 Bindeproteine dar. Vorinkubation der DIG-markierten 14-3-3 Sonde mit einem Phosphopeptid (Peptid C), das dem 14-3-3 Konsensusmotiv in 14-3-3 Zielproteinen entspricht, blockierte die Bindung der Sonde an die Hydraproteine im Lysat bis auf die Bande bei 116 kD (rechte Spur). Damit wurde gezeigt, dass die Interaktion der Hydraproteine mit 14-3-3 spezifisch und Phosphorylierungs-abhängig ist.

Außerdem ging die Bindung der Hydraproteine an die 14-3-3 Sonde ebenfalls verloren, wenn die Hydralysate mit λ -Phosphatase behandelt wurden (Abb. 2.13). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Interaktion der 14-3-3 Bindeproteine mit 14-3-3 Phosphorylierungs-abhängig ist.

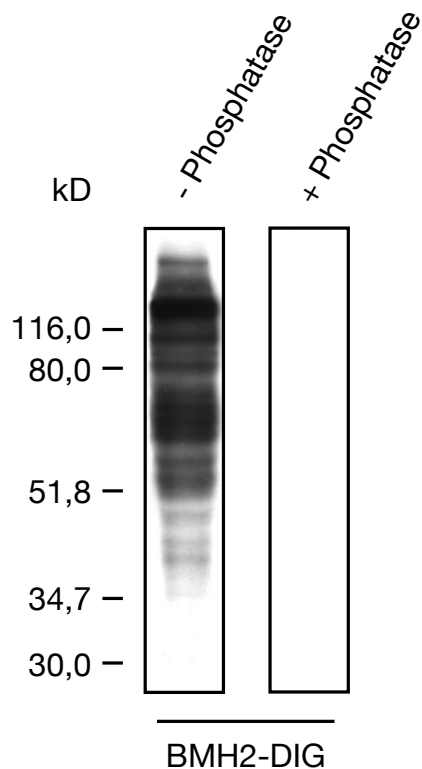


Abb. 2.13: Die Interaktion der 14-3-3 Bindeproteine mit der 14-3-3 Sonde ist Phosphorylierungs-abhängig.

Die Detektion von 14-3-3 Bindeproteinen in Hydralysaten erfolgte wie in Abb. 2.12 beschrieben. Wenn die Lysate vor dem Far Western Overlay für 1 h mit 200 Units λ -Phosphatase bei 30°C inkubiert wurden, ließen sich mit der 14-3-3 Sonde keine Bindeproteine mehr nachweisen (rechts).

2.2 Isolierung und Identifizierung von 14-3-3 Bindeproteinen aus Hydra

2.2.1 14-3-3 Affinitätssäule

Um die 14-3-3 Bindeproteine aus Hydralysaten zu isolieren wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt (Abb. 2.14 und Moorhead et al., 1999). Dazu wurde 8 mg rekombinantes Hefe 14-3-3 (BMH1 und BMH2 im Verhältnis 1:1) an aktivierte CH Sepharose 4B (Amersham Biosciences) gekoppelt. Aus etwa 100.000 Hydren wurde ein Zelllysat hergestellt. Das Hydralysat wurde dann mit der Sepharose-14-3-3 Mischung inkubiert, so dass 14-3-3 Bindeproteine in dem Lysat an das rekombinante 14-3-3 binden konnten. Anschließend wurde eine Plastiksäule mit dieser Mischung beladen. Nach Öffnen des Ventils der Säule konnte das Lysat mit nicht-gebundenen Proteinen abfließen (Durchfluss). Proteine, die an das rekombinante 14-3-3 gebunden hatten, wurden zurückgehalten. Die Säule wurde dann dreimal mit HEPES Puffer (50 mM HEPES pH 7,5/500 mM NaCl/1 mM DTT) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wurde die Säule mit einem phosphorylierten Kontrollpeptid (-WFYpSFLE-) gewaschen, das nicht an 14-3-3 bindet. Da diese Sequenz nicht dem konservierten 14-3-3 Bindemotiv entspricht, sollten mit diesem Kontrollpeptid keine 14-3-3 Bindeproteine von der Säule gewaschen werden. Nach dem Kontrollpeptid wurde noch dreimal mit HEPES Puffer gewaschen. Im letzten Schritt wurden die 14-3-3 Bindeproteine mit 1 mM eines Phosphopeptids der Sequenz -ARAApSAPA- (Peptid C) von der Säule eluiert. Diese Sequenz entspricht dem konservierten 14-3-3 Bindemotiv, das in vielen 14-3-3 Zielproteinen vorkommt. Das Phosphopeptid verdrängt dadurch die Bindeproteine von der Säule, so dass sich diese im Eluat wiederfinden. Insgesamt wurden etwa 80 µg Protein von der Säule gewaschen.

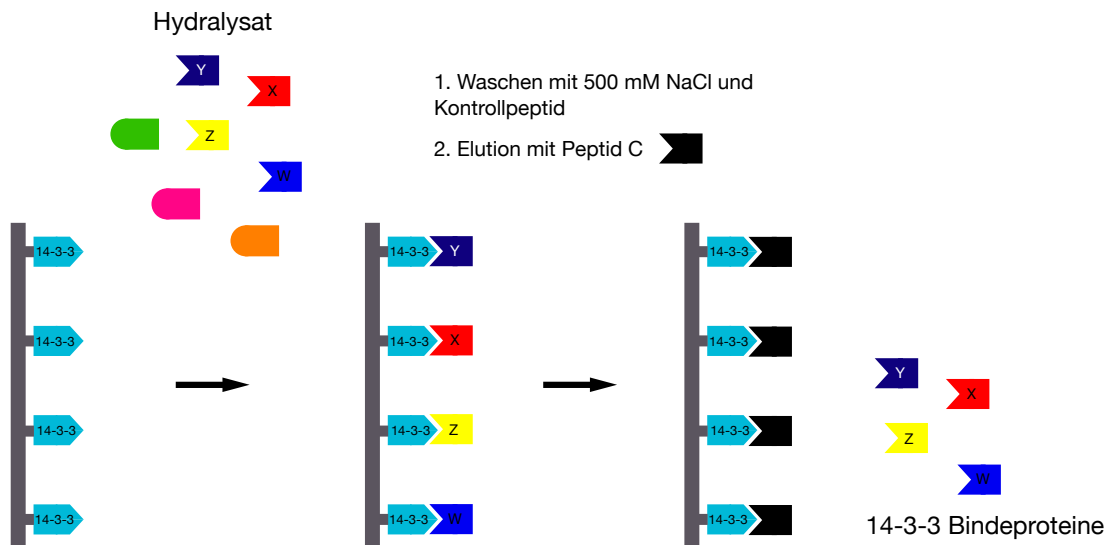


Abb. 2.14: Prinzip der 14-3-3 Affinitätssäule

Um zu überprüfen, ob Proteine spezifisch an die Säule gebunden hatten, wurden jeweils gleiche Mengen des Durchflusses, der Waschfraktionen, der Kontrollpeptidfraktion sowie der Fraktion nach der Elution mit dem spezifischen Phosphopeptid (Peptid C) in einem SDS-Gel aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und im Far Western Overlay mit einer BMH1/2-DIG Sonde auf die Anwesenheit von 14-3-3 Bindeproteinen untersucht (Abb. 2.15). Sowohl der Durchfluss, als auch die Waschfraktionen und die Fraktion des Kontrollpeptides sind frei von 14-3-3 Bindeproteinen. Lediglich die Fraktion mit dem spezifischen Phosphopeptid (Peptid C) enthält 14-3-3 bindende Proteine. Die Tatsache, dass sich im Durchfluss keine 14-3-3 bindenden Proteine mehr befinden, lässt darauf schließen, dass alle potentiellen 14-3-3 Zielproteine in dem Hydralsat an die Säule gebunden wurden. Die Elution der Bindeproteine von der Säule erfolgte spezifisch durch das Phosphopeptid mit der 14-3-3 Erkennungsequenz.

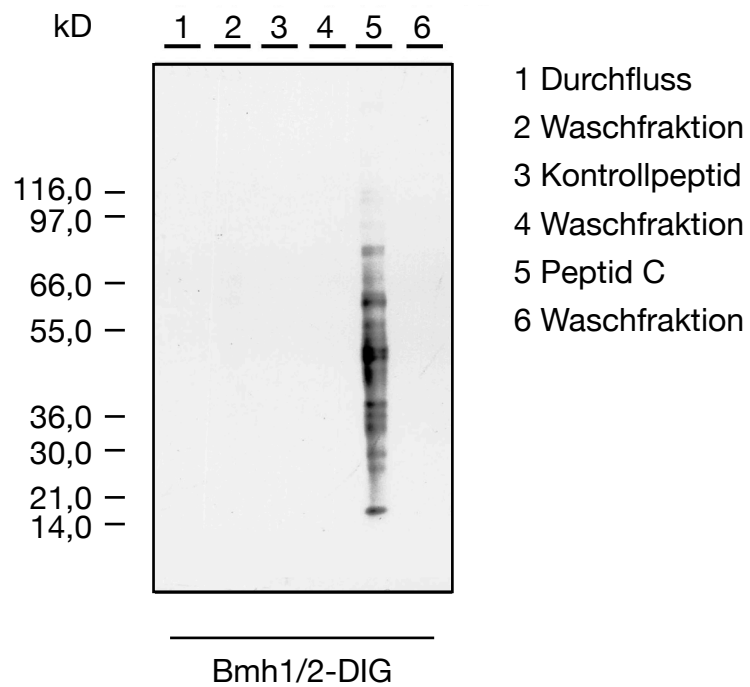


Abb. 2.15: 14-3-3 Bindeproteine wurden spezifisch von der 14-3-3 Affinitätssäule eluiert.

Jeweils gleiche Mengen der einzelnen Fraktionen (Durchfluss-, Wasch-, Kontrollpeptid- und Elutions-Fraktion) wurden in einem SDS Gel aufgetrennt und im Far Western Overlay mit DIG-markiertem Hefe 14-3-3 (Bmh1/2-DIG) auf die Anwesenheit von 14-3-3 Bindeproteinen untersucht.

2.2.2 Identifizierung der 14-3-3 Bindeproteine mit einer Kombination aus Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS)

Nachdem im Overlay Assay gezeigt worden war, dass die Proteine in dem Eluat an 14-3-3 binden konnten, sollte deren Identität ermittelt werden. Dazu wurde ein Teil des Eluats (20 µg Gesamtprotein) in einem SDS-Gel aufgetrennt und die darin enthaltenen Proteine mit kolloidalem Coomassie gefärbt (Abb. 2.16). Einzelne Proteinbanden wurden entsprechend der Nummern ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mittels LC-MS analysiert.

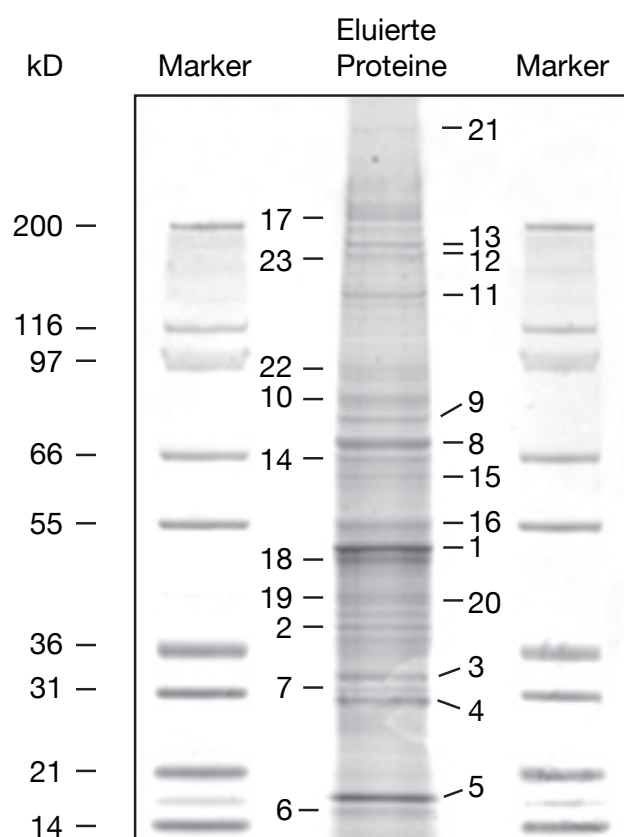


Abb. 2.16: Coomassie Gel der von der 14-3-3 Affinitätssäule eluierten Bindeproteine.

20 µg der 14-3-3 Bindeproteine wurden in einem 4-12% SDS Gel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Einzelne Proteinbanden wurden entsprechend der Nummern ausgeschnitten und mit massenspektroskopischen Methoden untersucht.

Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Ionisierung der tryptisierten Peptide, die dann anhand ihres Masse/Ladungsverhältnisses getrennt und detektiert werden. Anschließend werden die Massen der so generierten Peptide mit in silico tryptisierten Proteindatenbanken verglichen, um so Rückschlüsse auf das ursprüngliche Protein zu ziehen.

Da im Falle von Hydra noch keine Genomsequenz vorliegt, musste stattdessen auf eine Hydra EST Datenbank zurückgegriffen werden, um die LC-MS Daten auswerten zu können (<http://hydra.ics.uci.edu/blast/jf/>). Die verwendete Hydra EST Datenbank enthielt zum Zeitpunkt der vorliegenden Doktorarbeit etwa 40.000 ESTs. ESTs (expressed sequence tags) sind DNA-Sequenzen, die durch reverse Transkription aus mRNA entstehen. Sie stellen somit im Idealfall die Gesamtheit aller transkribierten Gene einer Zelle dar. Es ist oftmals schwierig, den richtigen Leserahmen (ORF) eines Gens in einem EST zu identifizieren. In Zusammenarbeit mit Dr. Stephen Rudd von der GSF in München gelang es jedoch, die ORFs in den Hydra ESTs mit großer Sicherheit vorherzusagen und so die ESTs in Peptide umzuwandeln. Die von Stephen Rudd entwickelte Methode (<http://sputnik.btk.fi>) beruht auf der relativen Häufigkeit Hydra-spezifischer Hexanukleotid Sequenzen und lässt verlässlichere Voraussagen über mögliche offene Leserahmen zu als dies die Verwendung von Triplett-Codons kann (Rudd et al., 2003). Dabei wird die Zahl der ESTs durch optimierte Clustering-Techniken reduziert.

Die Peptide, die aus den Hydra ESTs abgeleitet worden waren, wurden in silico tryptisiert. Die Massen der tryptischen Peptide wurden dann mit den LC-MS Massen der isolierten, tryptisierten 14-3-3 Bindeproteine verglichen. Dadurch konnten 23 der isolierten Proteine identifiziert werden. Das Ergebnis der Massenspektrometrie ist in Abbildung 2.17 dargestellt.

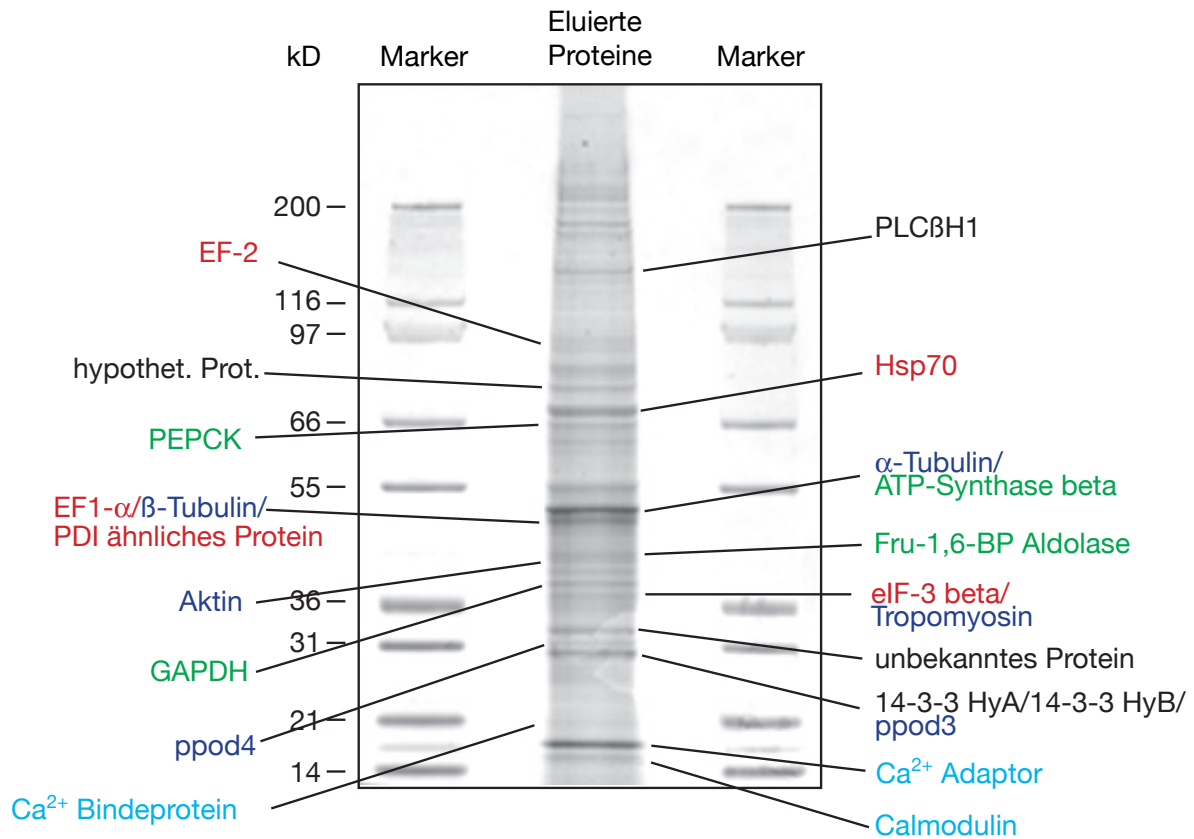


Abb. 2.17: Darstellung der mit LC-MS identifizierten 14-3-3 Bindeproteine.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die identifizierten 14-3-3 Bindeproteine. Bei allen außer zwei der identifizierten Proteine entspricht das erwartete Molekulargewicht der Größe der jeweiligen Bande im SDS-Gel. Außerdem ist der Protein score gezeigt. Er ist angegeben als $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, dass der beobachtete Treffer ein zufälliges Ereignis ist. Protein score Werte von > 50 wurden als signifikant betrachtet. Daneben ist auch die Anzahl der gefundenen LC-MS Peptide in dem jeweiligen Protein und die Anwesenheit eines klassischen 14-3-3 Bindemotivs in der Tabelle aufgelistet. In zwei Fällen, in denen die Hydra ESTs nicht das ganze Gen abdeckten, wurde die Größe des jeweiligen humanen Homologen (hs) bzw. des homologen Proteins aus *Danio rerio* (dr) angegeben. Die Sequenzen der gefundenen Proteine, sowie die mit LC-MS gefundenen Peptide sind dem Anhang zu entnehmen.

<u>Identifizierung</u>	<u>Protein score</u> (<u>gefundene Peptide</u>)	<u>Größe des</u> <u>Hydraproteins</u> (kD)	<u>Größe der</u> <u>Gelbande</u> (kD)	<u>14-3-3 Binde-</u> <u>motiv</u>	<u>als 14-3-3 Bindeprotein in</u> <u>anderen Organismen gefunden</u>
Stoffwechsel					
Fru-1,6-BP Aldolase	98 (6)	36	41	nein	
GAPDH	172 (9)	36,5	37	ja (3)	(Cotelle et al., 2000; Bustos and and Iglesias, 2003; Rubio et al., 2004)
PEPCK	53 (3)	71 (hs)	64	ja (hs)	
ATP-Synthase β	217 (13)	56	50	ja (2)	(Bunney et al., 2001; Rubio et al., 2004)
Proteinbiosynthese/-faltung					
EF-2	51 (3)	97	96	ja	(Rubio et al., 2004)
EF1-alpha	156 (8)	51	50	ja (2)	(Rubio et al., 2004)
eIF-3 beta	132 (5)	36	36	ja (2)	
Hsp70	174 (10)	75	70	ja	(May and Soll, 2000) (Jarvis and Soll, 2002) (Rubio et al., 2004)
PDI-ähnliches Protein	78 (6)	48 (dr)	50	ja	
Calcium Signalwege					
Calmodulin	71 (6)	17	17	nein	(Luk et al., 1999) (Rubio et al., 2004)
Calcium Bindeprotein	134 (9)	20	20	nein	
Calcium Adaptor	112 (7)	17	17	nein	

<u>Identifizierung</u>	<u>Protein score</u> (gefundene Peptide)	<u>Größe des</u> <u>Hydraproteins</u> (kD)	<u>Größe der</u> <u>Gelbände</u> (kD)	<u>14-3-3 Binde-</u> <u>motiv</u>	<u>als 14-3-3 Bindeprotein in</u> <u>anderen Organismen gefunden</u>
Zytoskelett					
Tubulin alpha	102 (6)	53	53	nein	(Rubio et al., 2004)
Tubulin beta	89 (5)	50	50	ja	(Rubio et al., 2004)
Aktin	186 (8)	41	40	ja	(Chen and Yu, 2002) (Rubio et al., 2004)
Tropomyosin	101 (7)	27	37	ja	(Rubio et al., 2004)
ppod3	212 (10)	30	30	nein	
ppod4	290 (8)	32	32	ja	
Weitere Proteine					
PLCBH1	86 (8)	116	120	ja (2)	
14-3-3 HyA	157 (6)	28,6	30	-	
14-3-3 HyB	187 (8)	28,1	30	-	
Unbekanntes Protein	51 (4)	19	32	nein	
Hypothetisches Protein	95 (6)	24	80	nein	

Zur Verifizierung diente zunächst das Molekulargewicht. Das Molekulargewicht der identifizierten Proteine wurde mit der aus dem SDS Gel ermittelten Größe der ausgeschnittenen Banden verglichen. In allen Fällen (außer bei dem unbekanntem Protein und dem hypothetischen Protein) stimmte das theoretische Molekulargewicht der Proteine mit der Größe der ausgeschnittenen Banden überein. Außerdem wurden die identifizierten Proteine auf die Anwesenheit eines 14-3-3 Bindemotivs hin untersucht (Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997). 13 der 23 isolierten Proteine besitzen ein klassisches 14-3-3 Bindemotiv, das mit Hilfe der Motivsuchmaschine scansite (<http://scansite.mit.edu/>) identifiziert wurde. Zwei der 10 Proteine ohne 14-3-3 Bindemotiv sind 14-3-3 HyA und HyB selbst, die nicht über ein solches Motiv, sondern über ihre N-Termini miteinander interagieren. Einige der gefundenen Proteine sind außerdem bereits in anderen Organismen als 14-3-3 Bindeproteine identifiziert worden. Die entsprechenden Referenzen sind ebenfalls in der Tabelle 1 angegeben.

Die isolierten 14-3-3 Bindeproteine fallen in unterschiedliche funktionelle Gruppen. Eine Gruppe (grün) beinhaltet Proteine, die an der Regulation von Stoffwechsellvorgängen beteiligt sind. Drei der isolierten Proteine (GAPDH, PEPCK, Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase) sind an Glucose-Stoffwechsel und eines (ATP-Synthase) an der mitochondrialen Energiegewinnung beteiligt. Eine weitere Gruppe (rot) ist an der Regulation von Proteinbiosynthese bzw. -faltung und damit auch an der Regulation von Wachstum beteiligt (EF-2, EF1-alpha, eIF-3, Hsp70, PDI-ähnliches Protein). Auch in dieser Gruppe gibt es 14-3-3 Interaktionspartner (EF-2, EF1-alpha und Hsp70), die bereits aus anderen Organismen bekannt sind (Rubio et al., 2004).

Eine dritte Gruppe (hellblau) enthält Proteine, die an Calcium Signalwegen beteiligt sind (Calmodulin, Calcium Bindeprotein und Calcium Adaptor). Allerdings besitzt keines der drei Proteine ein klassisches 14-3-3 Bindemotiv.

Eine weitere Gruppe umfasst Proteine, die an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind (blau). Zwei Proteine dieser Gruppe (ppod3 und ppod4) kommen nur in Hydra vor (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002) und stellen deshalb neue 14-3-3 Interaktionspartner dar. Ppod-Proteine besitzen Fascin-Domänen und könnten daher ebenfalls an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sein.

2.2.3 Bcl-2 Familie

2.2.3.1 Klonierung von HyBax, eines Homologen von humanem Bax

Mit der Affinitätssäule wurden keine 14-3-3 Bindeproteine gefunden, die an der Regulation von Apoptose beteiligt sind, obwohl aus anderen Organismen bekannt ist, dass 14-3-3 an diesem Prozess beteiligt ist (Zha et al., 1996) und die enzymatische Maschinerie des programmierten Zelltods in Hydra konserviert ist (Cikala et al., 1999). Möglicherweise sind solche 14-3-3 Bindeproteine unter normalen Bedingungen nur sehr schwach exprimiert und konnten daher nicht als sichtbare Banden aus dem Gel ausgeschnitten werden.

Um dennoch eine mögliche Verbindung zwischen 14-3-3 und programmiertem Zelltod in Hydra zu untersuchen, wurde ein anderer Ansatz verfolgt. In der Hydra EST Datenbank wurde eine Bax EST Sequenz gefunden. Bax gehört zur Familie der Bcl-2 Proteine, die Apoptose regulieren. Die Bcl-2 Familie enthält sowohl pro- als auch anti-apoptotische Mitglieder. Bax ist ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie. Es ist bekannt, dass Bax durch Bindung an 14-3-3 im Zytoplasma zurückgehalten wird und nicht an die Mitochondrien translozieren kann, um dort seine pro-apoptotische Wirkung zu entfalten (Samuel et al., 2001; Nomura et al., 2003). Anhand der EST Sequenzen wurden spezifische Oligonukleotide entworfen, mit denen das Bax Gen aus einer Hydra cDNA Bank im pBluescript Vektor (Stratagene) amplifiziert werden konnte (Popp, 2004). Um die fehlenden 5' bzw. 3' Enden der ESTs zu vervollständigen, wurde jeweils ein spezifischer primer aus dem Gen zusammen mit einem primer aus dem Vektor außerhalb der multiplen Klonierungsstelle verwendet. Auf diese Weise konnte ein Vollängenklon für Hydra Bax, der HyBax genannt wurde, erhalten werden.

Das Gen für HyBax ist 693 nt lang, was einer Länge von 230 aa und einem Molekulargewicht von 26,8 kD entspricht. Abbildung 2.18 zeigt die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz von HyBax.

```

ATGAAAGATC CTATGATGGC GAGATTTATG AATGAATGTT GCGAGATTAA
TAATAACAAC TCACCTGATT ACAATTATAT AAACCTACGAT GCAAATGACA
CGGTAGAGCA AGATTTTTTTG AGATCGATAG AAGACGACAC AGAAAAACAC
CGCGGTTTCA TTCGAAAAC TGTCTAATGAC CACATACATT ATAAACTGTT
TGGTAAAGGA ACTATAAACA TATGCGATAC AGATATAAAA ATGAACCCTT
TTGAAAAAAA ACTCACAACA ACAGTCGTTA CATTACGTCG TGTCAGTAGT
GAGCTAGAAG ATATGCATAT TGATTTTTTTT GAAAATGTAT GCCATGCAAT
TAACGAAGAA AACGCGGGTG AAGTTTTTCAA TGAAGTTTCG CAAAAGGTTT
TGACTGATGA CAATTTAAAT TGGGGACGGG TTGTTAGTTT AATTACATTT
GGTGGAAAGT TAGCTCAATG GTTTTGGGCT AGACAACCAA ATAATGAACT
GATTGAAGAA ATCGAGGATT GGTAAACCGA AAGCTTATCA GATAAAAAAG
ACTGGATTAA ACAAAAAGGA GGCTGGGACG ATTTCAATCG CACATTTACA
AAGCCAGCAC AAAACACATG GTGGAAAAC AGCCTTTGGG TTGGATTAAG
CGCATCTCTA GCGGCAGCAT TTGTTATGAA ATCGCTAAGG TAA

MKDPMMARFM NECCEINNNN SPDYNYINYD ANDTVEQDFL RSIEDDTEKH
RGFIRKLAND HIHYKLFKKG TINICDTDIK MNPFEKLT TVVTLRRVSS
ELEDMHIDFF ENVCHINEE NAGEVFNEVS QKVLTDNLN WGRVVSLITF
GGKLAQWFWA RQPNNELIEE IEDWLTESLS DKKDVIKQKG GWDDFNRTFT
KPAQNTWWKT SLWVGLSASL AAFFVMKSLR •

```

Abb. 2.18: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von HyBax

Abbildung 2.19 zeigt einen Vergleich der Hydra Bax Sequenz mit humanem Bax α . Identische Aminosäuren sind gelb hervorgehoben, während ähnliche Aminosäuren blau hinterlegt sind. Die Positionen der BH-Domänen sind durch blaue Kästen gekennzeichnet.

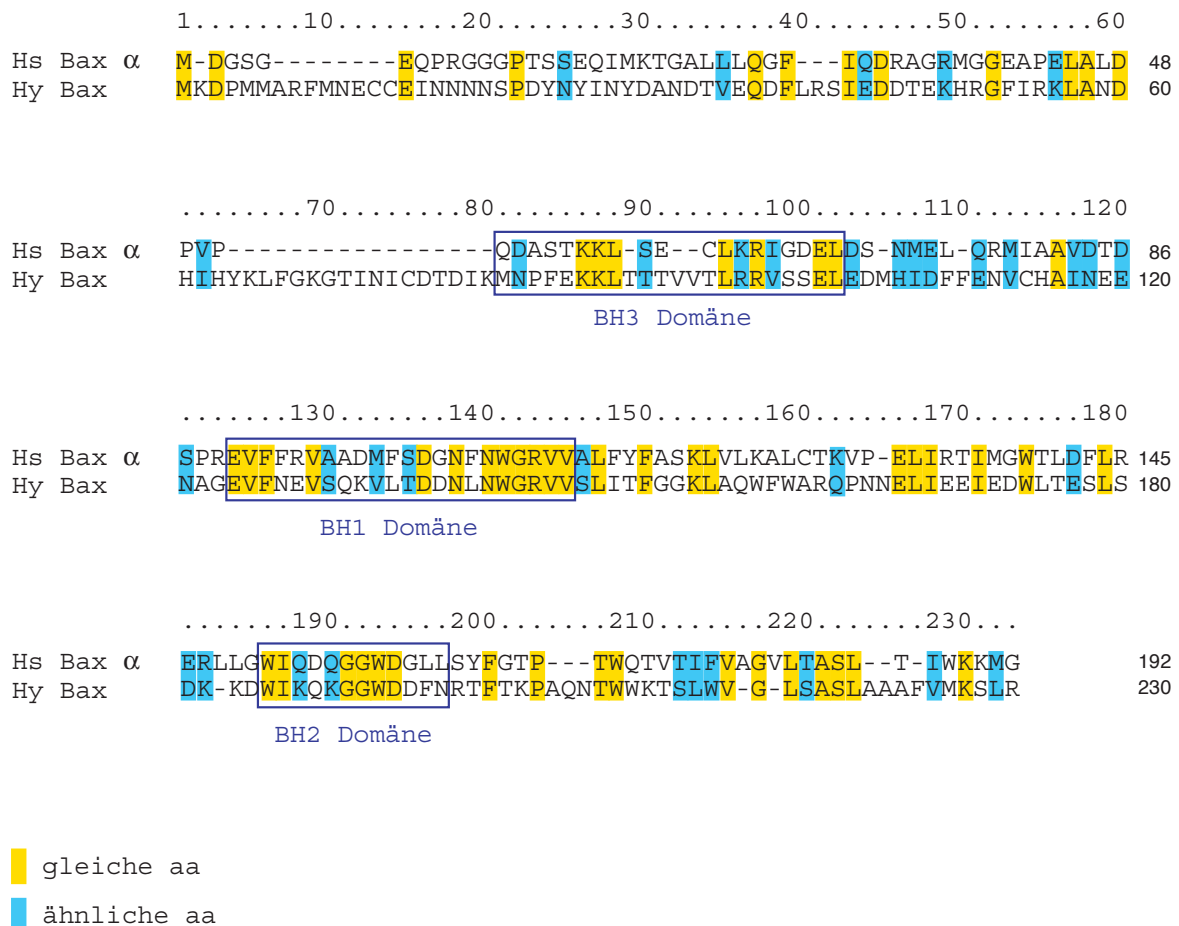


Abb. 2.19: Sequenzvergleich von HyBax mit humanem Bax α .

Identische Aminosäuren sind gelb, ähnliche blau hinterlegt. Die konservierten BH-Domänen sind durch blaue Kästen hervorgehoben.

2.2.3.2 GST pulldown mit HyBax und 14-3-3 zum Nachweis einer Interaktion der beiden Proteine

Um zu untersuchen, ob HyBax mit 14-3-3 interagieren kann, wurde ein GST pulldown Experiment durchgeführt (Lasi, 2005). Dazu wurde HyBax in den Vektor pGEX-4T-1 (Amersham Biosciences) kloniert. Dort lag das Gen als C-terminale Fusion mit Glutathion S-Transferase vor (GST-HyBax). Nach Transformation des Plasmides in Bakterien wurde die Expression mit IPTG induziert. Das Bakterienlysat wurde anschließend mit Glutathion-Sepharose beads inkubiert. Nachdem GST-HyBax an die beads gebunden

hatte, wurden die beads abzentrifugiert und gewaschen. Die gewaschenen beads wurden dann mit gereinigtem, rekombinantem 14-3-3 HyA bzw. HyB inkubiert. Das Gemisch wurde daraufhin abzentrifugiert, die Pellets gewaschen und schließlich die gebundenen Proteine mit Glutathion eluiert. Nach Auftrennung der Proben im SDS-Gel wurde in einem Western Blot mit 14-3-3 Antikörper untersucht, ob 14-3-3 Protein an GST-HyBax gebunden hatte. Abbildung 2.20 zeigt, dass 14-3-3 HyB an HyBax binden kann (rechts). Die Bindung von 14-3-3 HyA ist dagegen schwächer (links).

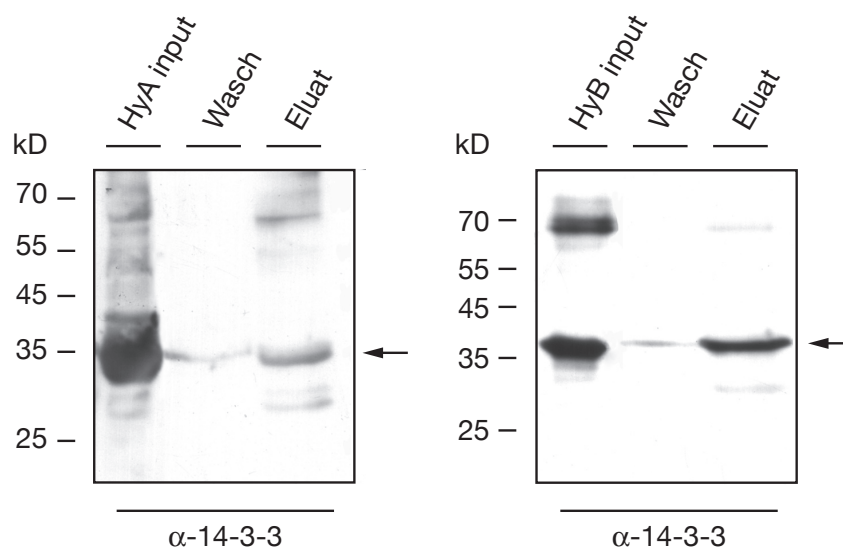


Abb. 2.20: GST pulldown Versuch mit rekombinantem 14-3-3 und GST-HyBax.

GST-HyBax wurde in Bakterien exprimiert und mit Glutathion-Sepharose beads aus dem Bakterienlysat gereinigt. Anschließend wurde es 1 h bei Raumtemperatur mit rekombinantem 14-3-3 HyA bzw. HyB inkubiert und nach mehreren Waschschritten von den beads eluiert. Der Nachweis von gebundenem 14-3-3 erfolgte im Westernblot mit dem 14-3-3 Antikörper K19. Rekombinantes 14-3-3 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

2.3 14-3-3 und Zytoskelett

Eine Gruppe von 14-3-3 Bindeproteinen, die mit der Affinitätssäule isoliert wurden, wurde im Folgenden näher untersucht. Diese Gruppe beinhaltet Proteine, die an der Bildung und Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind (siehe Tabelle 1, S. 43 f). Tubulin alpha und beta, Aktin und Tropomyosin sind bereits in anderen Organismen als 14-3-3 Bindeproteine identifiziert worden (Chen and Yu, 2002; Rubio et al., 2004). ppod3 und ppod4 dagegen kommen nur in Hydra vor und stellen daher neue 14-3-3 Interaktionspartner dar.

2.3.1 Aktin

2.3.1.1 Charakterisierung von Hydra Aktin

Ein 14-3-3 Bindeprotein, das in die Zytoskelettgruppe fällt, ist Aktin. In der Hydra EST Datenbank wurden zwei große Gruppen von Aktingenen gefunden. Beide Gene sind sehr ähnlich und unterscheiden sich nur in den letzten 70 Aminosäuren voneinander. Das Aktin, das als 14-3-3 Bindepartner isoliert wurde, wurde als nicht-muskuläres Aktin beschrieben (Fisher and Bode, 1989). Es besteht aus 376 Aminosäuren, was einem Molekulargewicht von 41,8 kD entspricht. Dies entspricht auch der Größe der Gelbande, die nach der Affinitätssäule ausgeschnitten wurde und schließlich zur Identifizierung von Aktin geführt hat. Insgesamt passten 18 LC-MS Peptide zu der Sequenz des Aktin Proteins. Außerdem besitzt Hydra Aktin ein 14-3-3 Bindemotiv, das mit Hilfe der Motivsuchmaschine scansite (<http://scansite.mit.edu/>) identifiziert wurde. Die Aminosäuresequenz von Hydra Aktin sowie die identifizierten LC-MS Peptide (rot und blau) und das 14-3-3 Bindemotiv (grün) sind in Abbildung 2.21 dargestellt.

MADDEVAALV VDNGSGMCKA GFAGDDAPRA VFPSIVGRPR HQGVMVGMGQ
 KDSYVGDEAQ SKRGILTTLKY PIEHGIVTNW DDMEKIWHHT FYNELRVAPE
 EHPVLLTEAP LNPKANREKM TQIMFETFNS PAMYVAIQAV LSLYASGRRT
 GIVLDSGDGV SHTVPIYEGY ALPHAIIRLD LAGRDLTDYL MKILTERGYS
 FTTTAEREIV RDIKEKLSYV ALDFEQEMQT AASSSSLEKS YELPDGQVIT
 IGNERFRCPE TLFQPSFIGM ESAGIHETTY NSIMKCDVDI RKDLYANTVL
 SGGTTMFPGI ADRMQKEISA LAPPTMKIKI IAPPERKYSV WIGGSILASL
 STFQQMWISK QEYDESGPSI VHRKCF

Abb. 2.21: Aminosäuresequenz von Hydra Aktin.

Das Protein besteht aus 376 Aminosäuren. Die identifizierten LC-MS Peptide sind in Rot und Blau dargestellt. Das 14-3-3 Bindemotiv ist in Grün gezeigt.

2.3.1.2 Anfärben von F-Aktin in ganzen Tieren mit Phalloidin

Um das Aktin Zytoskelett in Hydra sichtbar zu machen, wurde Phalloidin verwendet. Phalloidin ist ein bicyclisches Peptid und bindet an filamentöses Aktin (F-Aktin), nicht jedoch an globuläres Aktin (G-Aktin). Das Aktin Zytoskelett in Zellen ist aus F-Aktin aufgebaut und wird durch diesen, mit Rhodamin gekoppelten, Farbstoff sichtbar gemacht.

Nach Relaxierung der Tiere in Urethan wurden die Hydren mit 4% Paraformaldehyd in Hydramedium fixiert. Die Fixierung erfolgte unterschiedlich lange bei 4°C. Bei kurzen Fixierungszeiten (30 min) wurden hauptsächlich die Muskelfasern der Tiere, die entlang der Mesoglea verlaufen, gefärbt. Bei längerer Fixierung (1-3 h) wurde auch das kortikale Aktin Zytoskelett an der apikalen Seite der Zellen gefärbt, wenn auch deutlich schwächer als die prominenten Muskelfasern im Basalbereich. Abbildung 2.22 zeigt Phalloidin-Färbungen von Einzelschnitten durch Rumpfgewebe von Hydra. Bilder a und b sind jeweils basale Schnitte, Bilder c und d die dazugehörigen apikalen Schnitte des gleichen Ausschnittes von Hydra. Die Schnittdicke beträgt jeweils 1 µm. Die Kerne im rechten Teil der Abbildung sind mit TO-PRO-3 gegengefärbt (blau dargestellt). In den basalen Schnitten (a und b) sind deutlich die längs der Körperachse (oral – aboral) verlaufenden Muskelfasern der ektodermalen Zellen sowie die quer dazu verlaufenden Muskelfasern der Endodermzellen zu erkennen. In den apikalen Schichten (c und d) gibt es keine Muskelfasern. Dafür färbt Phalloidin hier das kortikale Aktin entlang der Zellgrenzen des Ektoderms und, etwas schwächer, die apikale Oberfläche der Zellen.

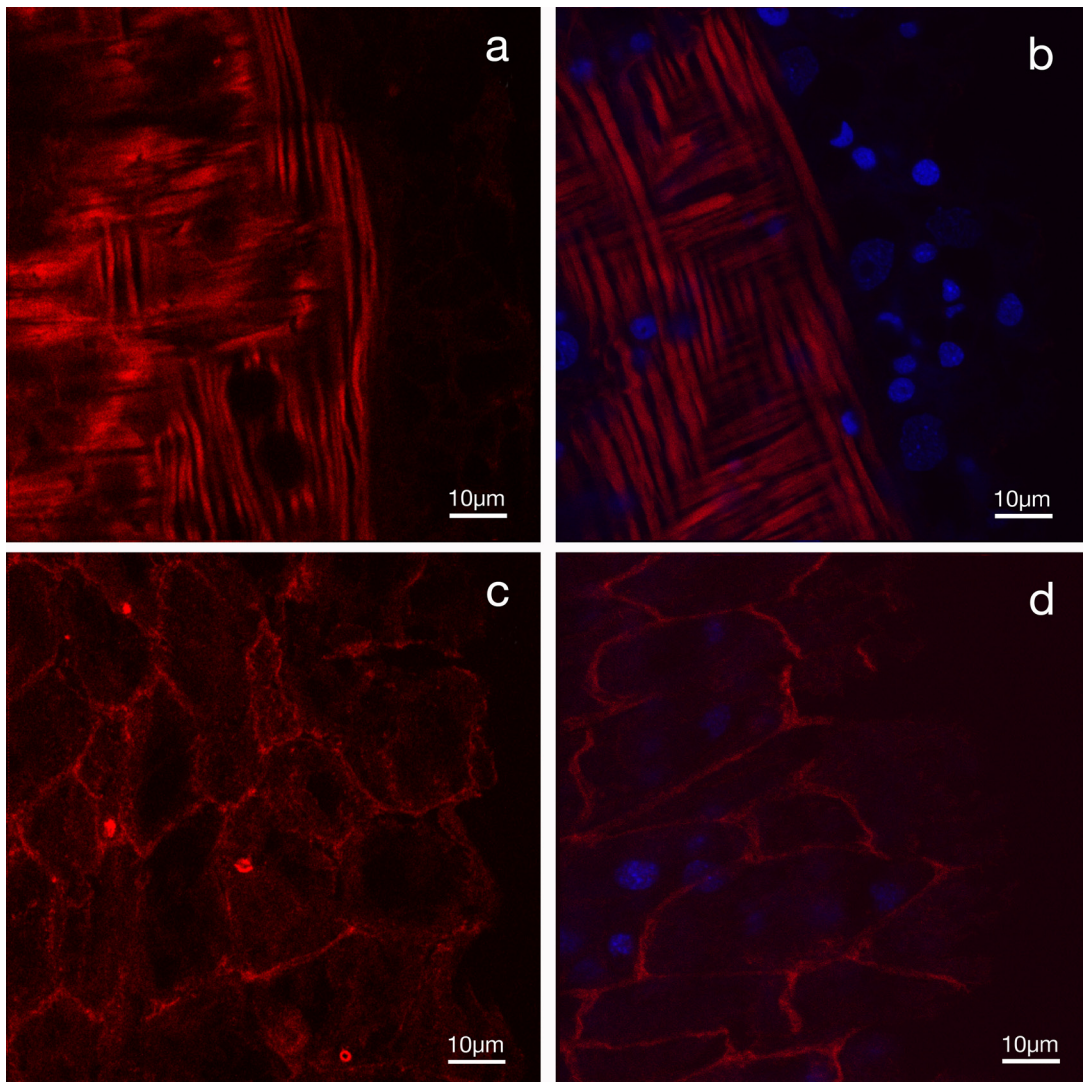


Abb. 2.22: Phalloidin Färbung von F-Aktin in Hydra.

a,b: Schnitte durch den Basalbereich eines gefärbten Tieres.

c,d: entsprechende Schnitte durch den Apikalbereich des gleichen Tieres.

Die Phalloidin Färbung ist in Rot, die TO-PRO-3 Kernfärbung (in b und d) in Blau dargestellt. Bei allen vier Bildern handelt es sich um einzelne konfokale Schnitte mit einer Dicke von 1 μm . Die Fixierung erfolgte bei 4°C mit 4% PFA in Hydramedium.

2.3.2 Tubulin

2.3.2.1 Charakterisierung der beiden in Hydra gefundenen Tubuline

Ein weiteres 14-3-3 Bindeprotein, das in die Zytoskelettgruppe fällt, ist Tubulin. Eine Zelle besitzt zwei verschiedene Arten von Tubulin, α und β Tubulin, die zusammen die Mikrotubuli bilden. Beide Proteine wurden als potentielle 14-3-3 Bindeproteine gefunden (siehe Abb. 2.17 und Tabelle 1, S.43 f). Die α Tubulin Bande war etwas über 50 kD groß, die β Tubulin Bande war etwas kleiner. Dies korreliert gut mit den errechneten Molekulargewichten für Hydra Tubuline (siehe unten).

α Tubulin besteht aus 450 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 50 kD. Sechs LC-MS Peptide passten zu der Sequenz von α Tubulin. Die Motivsuchmaschine scansite fand kein klassisches 14-3-3 Bindemotiv. β Tubulin ist 447 aa lang und hat ebenfalls ein Molekulargewicht von 50 kD. Fünf LC-MS Peptide passten zu der Sequenz von β Tubulin. Die Motivsuchmaschine scansite fand ein 14-3-3 Bindemotiv mit der Sequenz $^{-282}\text{RALTVP}^{287}$.

Die Sequenzen von α und β Tubulin sind in Abbildung 2.23 gezeigt. Die identifizierten LC-MS Peptide sind in Rot und Blau gekennzeichnet. Das 14-3-3 Bindemotiv in β Tubulin ist außerdem in Grün dargestellt.

Tubulin alpha

```

LEITSSRCFA KLTS DIXLAN SNLFINCKTS IKFKMRECIS IHLGQAGCQI
GNACWELYCL EHGIQPDGQM PSDKSIGGGD DSFNTEFFSET GGGKHXAAV
FVDLEPTVVD EIRTGTYRQL FHPEQLVTGK EDAANNYARG HYTVGKELID
QVLDRIRKLA DQCTGLQGFL IFHSFGGGTG SGFTSLLMER LSVDYGKKSK
LEFAVYPAPQ VSTAVVEPYN SVLTHTTTLE HSDCAF MVDN EALYDICRRN
LDIERPTYTN LNRLIGQIVS SITASLRFDG ALNVDLTEFQ TNLVPYPRIH
FPLATYSPVI SAEKAYHEQL TVSEITNACF EPANQMVKCD PRHGKYMACC
LLYRGDVVVK DVNSAIAXNQ DETHYSVRDW CPTGFKVGIN YQPPTVPPGG
DLAKVQRAVC MLSNTTAAIAE AWARLDHKFD LMYAKRAFVH WYVGEGMEEG
EFSEAREDMA ALEKDYEEVG VDSVDEEAAG EGDE

```

Tubulin beta

```

MREIVHLQAG QCGNQIGAKF WEVISDEHGI DPTGTYHGDS DLQLERINVY
YNEATGGKYV PRAVLVDLEP GTMDSVRS GP FGQIFRPDNF VFGQSGAGNN
WAKGHYTEGA ELVDSVLDVV RKEAESCDCL QGFQLTHSLG GGTGSGMGTL
LISKIREEYP DRIMNTFSVV PSPKVS DTVV EPYNATLSVH QLVENTDETF
CIDNEALYDI CFRTLKLTTP TYGDLNHLVS ATMSGVTTCL RFPGQLNADL
RKLAVNMVPF PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ YRALTVPELT QQMFDKNMM
AACDPRHGRY LTVAAMFRGR MSMKEVDEQM LNVQNKNSY FVEWIPNNVK
TAVCDIPPRG LKMSATFIGN STAIQELFKR ISEQFTAMFR RKAFLHWYTG
EGMDEMEFTE AESNMNDLVS EYQQYQDATA EEEGEFDEEE GEEEEAA

```

Abb. 2.23: Aminosäuresequenzen von Hydra Tubulin alpha und beta.

Die identifizierten LC-MS Peptide sind in Rot und Blau dargestellt. Das 14-3-3 Binde-motiv in β Tubulin ist in Grün gezeigt.

2.3.2.2 Ko-Immünpräzipitation zum Nachweis der Interaktion zwischen Tubulin und 14-3-3

Um zu bestätigen, dass 14-3-3 in Hydra mit Tubulin interagieren kann, wurden neben den Doppelfärbungen Ko-Immünpräzipitationsversuche durchgeführt. Dazu wurden Hydralysate mit einem IgG Antikörper gegen 14-3-3 (K19) inkubiert. Anschließend wurde Protein A-Sepharose zugegeben und das Gemisch zentrifugiert. Protein A bindet an die Fc Region von IgG Molekülen. Der zugegebene 14-3-3 Antikörper bindet daher an den Protein A-Sepharose Komplex und wird zusammen mit dem endogenen Hydra 14-3-3 sedimentiert. Proteine, die an 14-3-3 binden, sollten ebenfalls sedimentiert werden. Die Pellets wurden anschließend gewaschen und in einem 12%-igen SDS Gel aufgetrennt. Die Anwesenheit von Tubulin im Pellet wurde im Westernblot mit dem monoklonalen Tubulin Antikörper WA3 (M. Schliwa, München) getestet. Es wurde auch untersucht, ob die Bindung von Tubulin an 14-3-3 durch das Phosphopeptid Peptid C gehemmt werden kann. Dieses Peptid entspricht der Konsensussequenz der klassischen 14-3-3 Bindestelle. Das Hydralysat wurde vor Zugabe von 14-3-3 Antikörper mit Peptid C inkubiert (Abb. 2.24, Spur 3). Dabei konnte das Phosphopeptid die Bindungsstellen der endogenen 14-3-3 Proteine absättigen und 14-3-3 sollte nicht mehr in der Lage sein, an Zielproteine mit einem solchen Motiv zu binden. Ein weiterer Ansatz sollte zeigen, ob die Interaktion von Tubulin mit 14-3-3 Phosphorylierungs-abhängig ist. Dazu wurde das Hydralysat vor der IP mit λ -Phosphatase dephosphoryliert (Abb. 2.24, Spur 4).

Die Anwesenheit von Tubulin in Spur 1 zeigt, dass Tubulin mit 14-3-3 interagieren kann. In Spur 2 wurde kein 14-3-3 Antikörper zugegeben, um zu prüfen, ob Tubulin unspezifisch an Protein A-Sepharose binden kann. Dies war nicht der Fall. Überraschenderweise hatte aber weder 1 mM Peptid C (Spur 3) noch vorherige Dephosphorylierung des Lysates (Spur 4) einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Tubulin und 14-3-3.

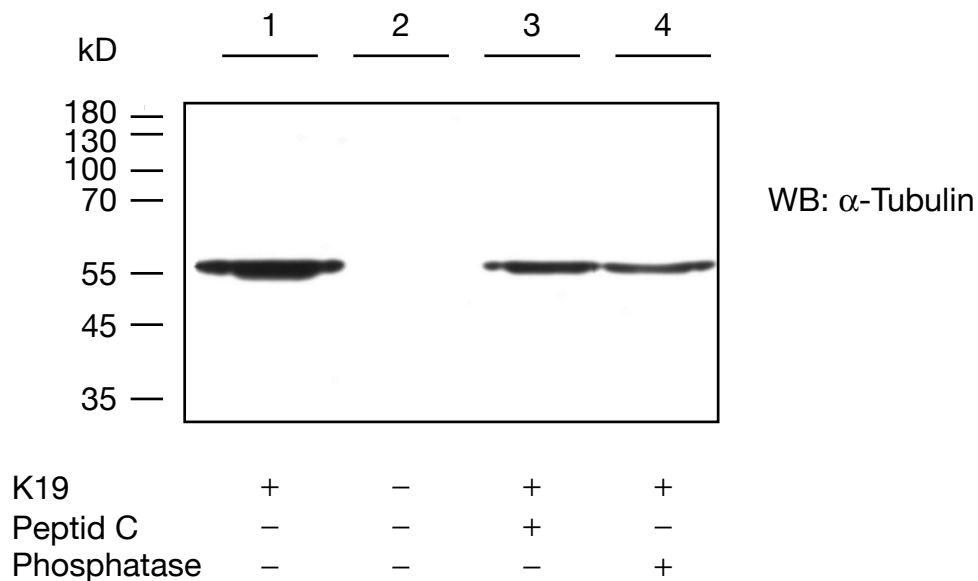


Abb. 2.24: Ko-Immünpräzipitation von 14-3-3 und Tubulin aus Hydralysaten.

Zur Präzipitation von 14-3-3 aus Hydralysaten wurde 5 µg 14-3-3 Antikörper K19 eingesetzt (Spur 1, 3 und 4). Zur Kontrolle diente Hydralysat, dem kein 14-3-3 Antikörper zugesetzt wurde (Spur 2). In Spur 3 wurde 1 mM Peptid C zu dem Lysat gegeben und 2 h bei 4°C inkubiert, bevor die Immunpräzipitation durchgeführt wurde. In Spur 4 wurde das Hydralysat für 30 min bei 30°C mit 200 U λ-Phosphatase behandelt, bevor die Immunpräzipitation durchgeführt wurde. Der Nachweis von, durch Bindung an 14-3-3 präzipitiertes, Tubulin erfolgte in einem Westernblot mit dem Tubulin Antikörper WA3.

2.3.2.3 Färbung des Tubulin Zytoskeletts in Hydra Mazeraten

Der monoklonale Antikörper WA3 aus Maus, der gegen β Tubulin gerichtet ist, wurde verwendet, um das Mikrotubuli Zytoskelett in Mazeraten von Hydrazellen sichtbar zu machen. Abbildung 2.25 zeigt zwei ektodermale Epithelzellen, die mit dem Tubulin Antikörper gefärbt wurden (grün). Die Kerne wurden mit TO-PRO-3 gegengefärbt und sind im roten Kanal zu sehen. Die Mikrotubuli entspringen an mehreren Stellen der basalen Seite der Epithelzellen und verlaufen bis dicht unter die apikale Oberfläche.

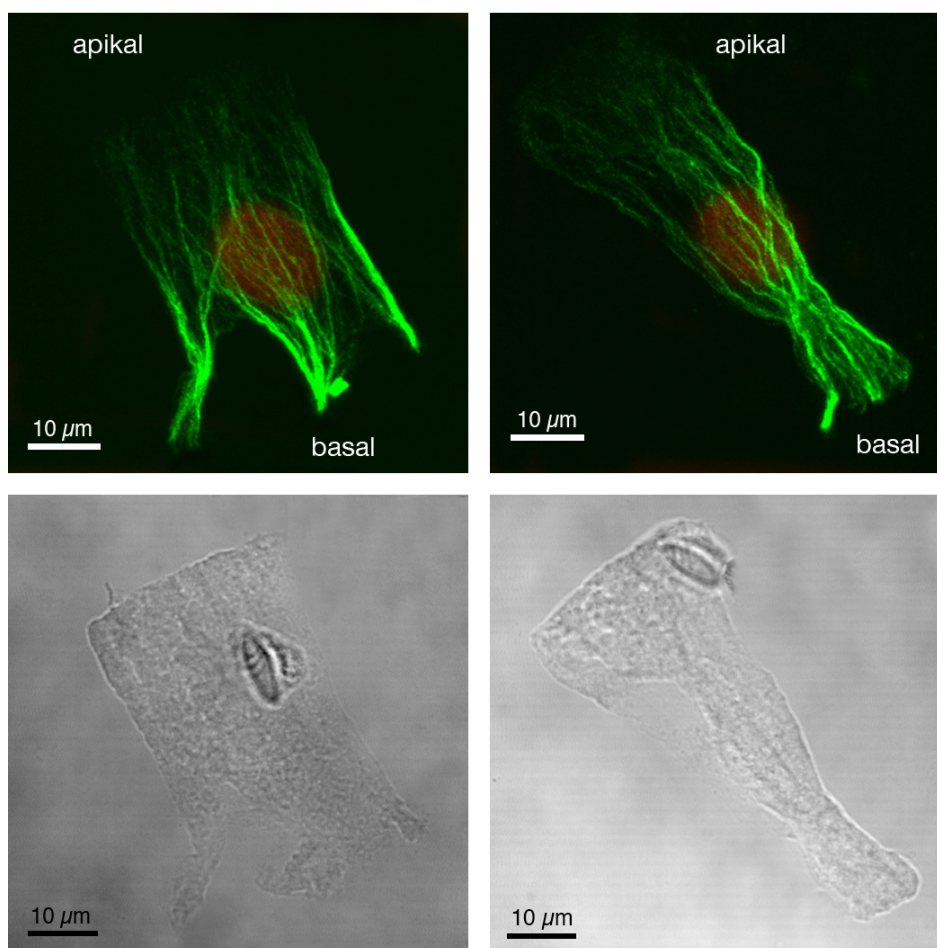


Abb. 2.25: Färbung des Tubulin Zytoskeletts in Hydra Mazeraten.

Hydragewebe wurde durch Mazeration in Einzelzellen zerlegt. Diese Zellen wurden mit dem Tubulin Antikörper WA3 gefärbt. Es werden Projektionen mehrerer konfokaler Schnitte von zwei ektodermalen Epithelzellen gezeigt. Das Tubulin-Signal wird in Grün und das Kernsignal in Rot gezeigt. In der unteren Reihe sind die jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen gezeigt.

2.3.3 ppod3 und ppod4

2.3.3.1 Aufbau und Domänenstruktur der ppod Proteine

Die Funktion der ppod Proteine ist bislang nicht bekannt. Ppod3 wurde als 30 kD-Bande aus dem Gel der 14-3-3 Bindeproteine ausgeschnitten (Abb. 2.17). Die ppod4-Bande war etwas größer (32 kD). Insgesamt gibt es vier verschiedene ppod-Isoformen in Hydra. Ppod1 und ppod2 wurden ursprünglich in Zusammenhang mit einer Peroxidase-Aktivität in Granula hauptsächlich in der Fußregion von Hydra isoliert und wurden daher ppod (für putative peroxidase) genannt (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002). Es konnte jedoch mittlerweile gezeigt werden, dass die isolierten Proteine nicht für die gemessene Peroxidase-Aktivität verantwortlich sind und daher der Name „ppod“ irreführend ist (s.u.). Abbildung 2.26 zeigt einen Sequenzvergleich der vier ppod Proteine in Hydra. Die vier Isoformen weisen starke Sequenzähnlichkeiten auf.

	10	20	30	40	50
ppod1	MKLYITVLMILT	CVFAKEKRG	GIPGWNKAYTVAIKS	FINGKVFVCAENI	GNQ
ppod2	MKLCI-LFMMV	TSLFAKEKRAT	LEWKKVYTVAIKS	LINGKVFVCAEKNG	SE
ppod3	MKLCITVFMV	ICVIAKEKRDT	PAWTKAYTVALKS	FINGKVFVCAENV	GSQ
ppod4	MKLCI-MFMMV	ICMFAKEKRAT	LEWKKVYTVAIKS	FINGKVFVCAENNG	NE
	60	70	80	90	100
ppod1	PLIANRDAIGLW	ETFEIRFTNAQ	TFAKSHADGKFV	SAGNGGNLLIAN	K
ppod2	PLIANKDSFGL	WETFEICFIDT	QAIALKSYNGKF	VAVNTDTNLLAN	K
ppod3	PLIANRDAIGL	WETFEIRFTNA	QTFALKSHANGKF	VASAGNGGNLLIAN	K
ppod4	PLIANRDSIGL	WETFEIRFTDA	QTFVLKSHANEK	FVTEVNSENNLLIAN	K
	110	120	130	140	150
ppod1	DHAAVWETFTLV	PKNGAFGFKS	NGNAKLVTAEEAG	NKPLAANRIVLDV	WE
ppod2	DQATVWETFTLV	PSFGTFGFKS	HGNSKLVTAEEAG	NKPLTANRDVLDV	WE
ppod3	DQAAVWETFTLV	PNYGTGFKS	NGNAKFVAEEAG	SKSLAANRNALDV	WE
ppod4	DQATVFETFTLV	PRFGTFGFKS	NDNKKLVTAEEAG	KKPLAANRKLVDV	WE
	160	170	180	190	200
ppod1	MFSLVYVWPSV	VHKVAIKALV	NGLFVCAENAGK	QSLIANRGOIGPW	ETFEI
ppod2	MFSLVYVWPSV	VHKVAIKALV	NGLFVCAEKAGK	QSLRANRAOIGPW	ETFEI
ppod3	MFSLVYVWPSV	VHKVAIKALV	NGLYVCAENAGK	QSLIANRGOIGPW	ETFEI
ppod4	MFNLVYVWPSV	VHKVAIKALV	NGLFVCAENAGK	QSLIANRGOIGPW	ETFEI
	210	220	230	240	250
ppod1	RFTNLQTF	TLLKSLANGK	LVCAENNGKS	PLIANREHIGPW	ETFTLVQNK
ppod2	SFSDSQTL	TLLKFFANGK	FVCAEKNGQF	PLIANRDQAGPW	ETFTIVPNK
ppod3	RFTDHQTF	TLLKSLANGK	LVCAENNGQS	PLIANRDQIGPW	ETFTLVQNK
ppod4	SFTDLQTF	TLLKSFANGK	LVCAENSGQF	PLIANRDQAGPW	ETFTIVPNK
	260	270	280	290	
ppod1	FAFKSHANGK	LVTAEAGHSN	LIANRDNPD	IWERFVFIYL	
ppod2	VALKSHANGK	FVTAENAGK	SYLIANRDN	ADIWERFVFIYL	
ppod3	VAFKSHANGK	LVTAEAGHD	NLIANRDN	PDWERFVFIYL	
ppod4	VALKSHANGK	FVTAENAGN	GNLIANRD	KADIWERFVFIYL	

Abb.2.26: Sequenzvergleich der vier ppod Isoformen
Identische Aminosäuren sind gelb hinterlegt.

Von den beiden isolierten ppod-Proteinen (ppod3 und ppod4) wies nur eines (ppod4) ein klassisches 14-3-3 Bindemotiv auf (Abb. 2.27). Daher beziehen sich alle weiteren Versuche auf diese Isoform.

Das ppod4 Protein besteht aus 290 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 32,4 kD. Bei der LC-MS Analyse der entsprechenden Gelbande nach der 14-3-3 Affinitätssäule wurden 8 tryptische Peptide gefunden, die zur Sequenz von ppod4 passen. Dies entspricht einer Abdeckung von 37%. Die Verteilung der tryptischen Peptide ist in Abbildung 2.27 dargestellt (blaue und rote Peptide entsprechen den tryptischen Peptiden aus der LC-MS Analyse). Das 14-3-3 Bindemotiv ist grün dargestellt, wobei der Threoninrest, der phosphoryliert wird, fett gedruckt ist.

ppod4

```

MKLCIMFMMV ICMFAKEKRA TLEWKKVYTV AIKSFTNGKF VCAENNGNEP
LIANRDSIGL WETFEIRFTD AQTFVLKSHA NEK FVTEVNS ENNLLIANKD
QATVFETFTL VPRFGTFGFK SNDNKLVTA EEAGKKPLAA NRKVLDVWEM
FNLVYVWPSV HKVAIKALVN GLFVCAENAG KQSLIANRGQ IGPWETFVIS
FTDLQTFTLK SFANGLVCA ENSGQFPLIA NRDQAGPWET FTIVPNKEGV
ALKSHANGKF VTAENAGNGN LIANRDKADI WERFVIVYL

```

Abb. 2.27: Aminosäuresequenz von ppod4

Die mit LC-MS identifizierten Peptide sind in Rot und Blau dargestellt. Das 14-3-3 Bindemotiv ist in Grün gezeigt, wobei der Threoninrest, der phosphoryliert wird, fett hervorgehoben wurde.

Abbildung 2.28 zeigt den Aufbau des ppod4 Proteins aus unterschiedlichen Domänen. Am N-Terminus befinden sich mehrere hydrophobe Aminosäuren (rot). Das auffälligste Merkmal ist das Vorhandensein zweier so genannter Fascin-Domänen (gelb und blau hinterlegt).

```

MKLCIMFMMV ICMFAKEKRA TLEWKKVYTV AIKSFTNGKF VCAENNGNEP
LIANRDSIGL WETFEIRFTD AQTFVLKSHA NEKFVTEVNS ENNLLIANKD
QATVFETFTL VPRFGTFGFK SNDNKKLVTA EEAGKKPLAA NRKVLVDWEM
FNLVYVWPSV HKVAIKALVN GLFVCAENAG KQSLIANRGQ IGPWETFVIS
FTDLQTFTLK SFANGKLVCA ENSGQFPLIA NRDQAGPWET FTIVPNKEGV
ALKSHANGKF VTAENAGNGN LIANRDKADI WERFVIVYL

```

Abb. 2.28: Domänenstruktur von ppod4.

Die zwei Fascin-Domänen sind gelb und blau hinterlegt. Das 14-3-3 Bindemotiv ist in grün dargestellt. Hydrophobe Aminosäuren am N-Terminus des Proteins wurden rot hervorgehoben.

Das Protein Fascin wurde erstmals in den 70er Jahren beschrieben (Bryan and Kane, 1978; Otto et al., 1979). Es wurde Fascin genannt, weil es Aktin in stabilen Bündeln quervernetzen kann (lateinisch *fasciculus*, das Bündel). Fascin ist ein globuläres Protein mit einem Molekulargewicht von 55 kD. In Vertebraten gibt es drei Isoformen: Fascin 1 wird in mesenchymalen Geweben und im Nervensystem exprimiert. Die Expression von Fascin 2 ist auf die Photorezeptoren der Retina beschränkt, während Fascin 3 Hoden-spezifisch ist (Adams, 2004). Fascin hat zwei Aktin-Bindestellen und ist an der Bildung von dynamischen, kortikalen Zellfortsätzen wie z.B. Lammellipodien, Filopodien, Mikrovilli und Dendriten, sowie an der Ausbildung zytoplasmatischer Mikrofilamentbündel beteiligt (Kureishy et al., 2002).

Abbildung 2.29 vergleicht den Aufbau von humanem Fascin 1 mit dem von ppod4. Fascin 1 besteht aus vier Fascin- oder β -trefoil Domänen. Ppod Proteine haben nur strukturelle, keine sequenzmäßige Homologie zu Fascin und bestehen nur aus zwei Fascin-Domänen. Hisactophilin A, ein weiteres Protein mit β -trefoil Struktur, enthält nur eine solche Domäne.

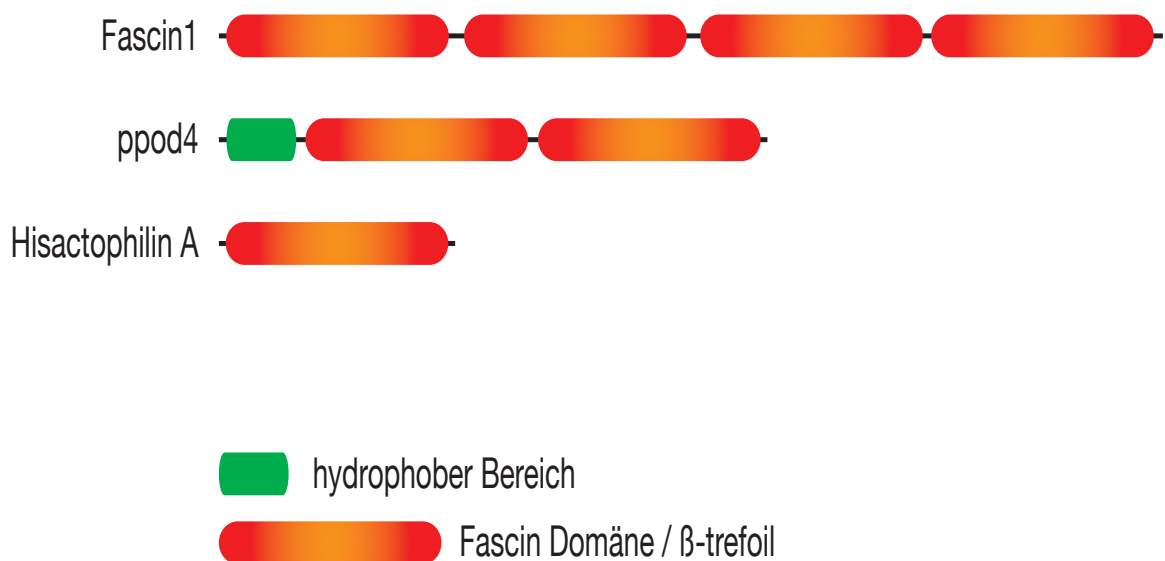


Abb. 2.29: Vergleich der Domänenstruktur von Fascin 1, ppod4 und Hisactophilin. Erläuterungen siehe Text.

Eine β -trefoil Struktur oder Fascin-Domäne besteht aus sechs zweisträngigen β -hairpins, von denen drei ein Fass bilden, während die anderen drei einen dreieckigen Deckel auf dem Fass bilden (Murzin, 1992; Swindells and Thornton, 1993). Obwohl ppod4 beim Vergleich der Aminosäuresequenzen nur sehr geringe Ähnlichkeiten zu Fascin besitzt, so zeigt es doch auf Ebene der Sekundärstruktur Ähnlichkeiten. Abbildung 2.30 A zeigt die Sequenz der ersten Fascin-Domäne von humanem Fascin 1 (Aminosäuren 13-134). In Abbildung 2.30 B ist die erste Fascin-Domäne von ppod4 in gleicher Weise gezeigt (Aminosäuren 33-153).

Eine β -trefoil Struktur enthält drei interne Wiederholungen. Jede dieser Wiederholungen besteht aus vier β -Strängen. Die drei internen Wiederholungen sind durch farbige Kästen hinterlegt (grün, gelb, rot). Die vier β -Stränge einer jeweiligen Wiederholung sind über der Sequenz durch Balken in den entsprechenden Farben dargestellt. Die Strukturvorhersage wurde mit dem Programm PredictProtein (<http://www.predictprotein.org/>) erstellt (Rost and Sander, 1993).

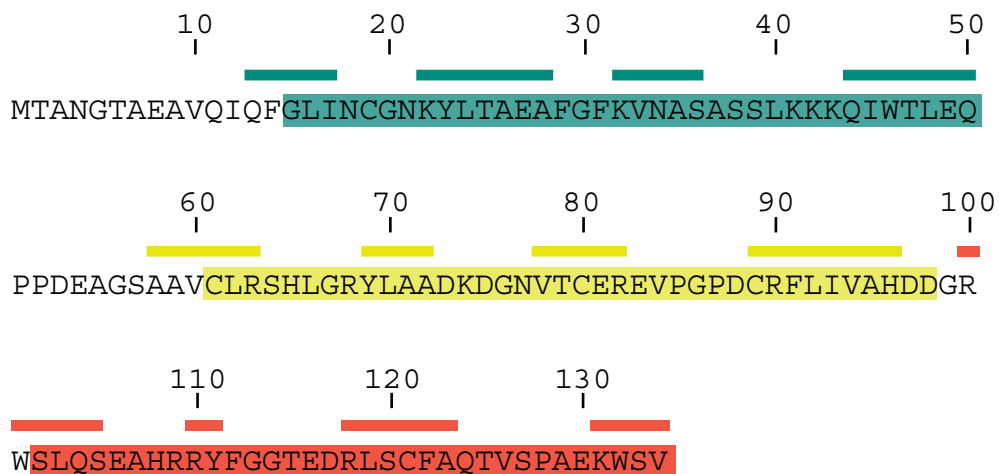
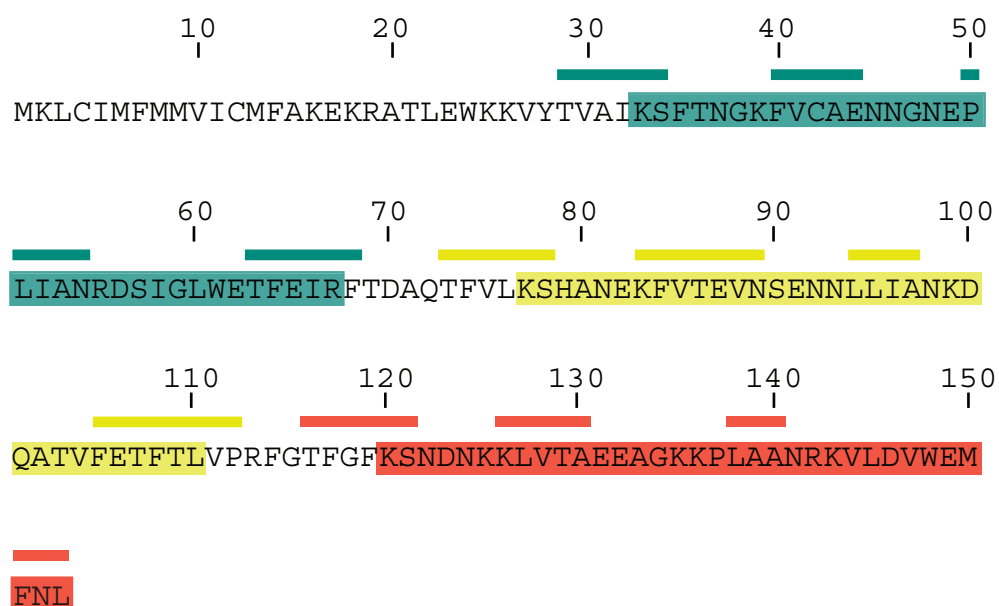
A Fascin-Domäne 1 aus humanem Fascin 1**B Fascin-Domäne 1 aus ppod4**

Abb. 2.30: Vergleich der Sekundärstruktur von Fascin 1 aus Mensch und ppod4 aus Hydra.

(A) Fascin-Domäne 1 aus Fascin 1 (B) Fascin-Domäne 1 aus ppod4. Die drei internen Wiederholungen der β -trefoil Struktur sind durch farbige Kästen hinterlegt. Die vier β -Stränge einer jeden Wiederholung sind durch farbige Balken oberhalb der Sequenz dargestellt. Die Nummern über den Sequenzen entsprechen den Positionen der Aminosäuren im Protein.

Abbildung 2.31 zeigt die β -trefoil Domäne von Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF), einem weiteren β -trefoil Protein, für das es, im Gegensatz zu Fascin und ppod, eine Kristallstruktur gibt. Die vier β -Stränge einer jeden Wiederholung sind hier durch Pfeile in den entsprechenden Farben gezeigt.



Abb. 2.31: β -trefoil Struktur des Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF).

Die vier β -Stränge einer jeden Wiederholung sind durch Pfeile in den entsprechenden Farben gezeigt. Die vier grün gezeigten β -Stränge liegen in der ersten der drei internen Wiederholungen. Die vier gelben β -Stränge liegen in der zweiten und die vier roten β -Stränge in der dritten internen Wiederholung (aus Ponting and Russell, 2000).

Der Aufbau der Fascin Domänen aus je drei Triplet-Wiederholungen (s.o.) in ppod4 wird in Abbildung 2.32 B noch einmal im Detail gezeigt. Die beiden Fascin-Domänen in ppod4 wurden auf Aminosäureebene miteinander verglichen. Zur Veranschaulichung ist ebenfalls noch einmal die Gesamtsequenz von ppod4 aus Abb. 2.28 (s.o.) gezeigt (Abb. 2.32 A). In beiden Darstellungen wurde die Fascin-Domäne 1 gelb und die Fascin-Domäne 2 blau hinterlegt. In Abbildung 2.32 B sind außerdem die drei internen Wiederholungen durch schwarze Boxen gekennzeichnet. Jede Wiederholung besteht aus 33 aa und zeigt ein hohes Maß an Sequenzidentität sowohl zu den anderen beiden Wiederholungen der gleichen Fascin-Domäne, als auch zu den Wiederholungen der zweiten Fascin-Domäne. Identische Aminosäuren in Abbildung 2.32 B sind rot dargestellt. Nummern ober- bzw. unterhalb der Sequenz weisen auf die entsprechenden Aminosäurepositionen hin.

A

MKLCIMFMMV ICMFAKEKRA TLEWKKVYTV AIKSFTNGKF VCAENNGNEP
 LIANRDSIGL WETF EIRFTD AQTFVLKSHA NEKFVTEVNS ENNLLIANKD
 QATVFETFTL VPRFGTFGFK SNDNKKLVTA EEAGKKPLAA NRKVLVDVWEM
 FNLVYVWPSV HKVAIKALVN GLFVCAENAG KQSLIANRGQ IGPWETFVIS
 FTDLQTFTLK SFANGKLVCA ENSGQFPLIA NRDQAGPWET FTIVPNKEGV
 ALKSHANGKF VTAENAGNGN LIANRDKADI WERFVIVYL

B

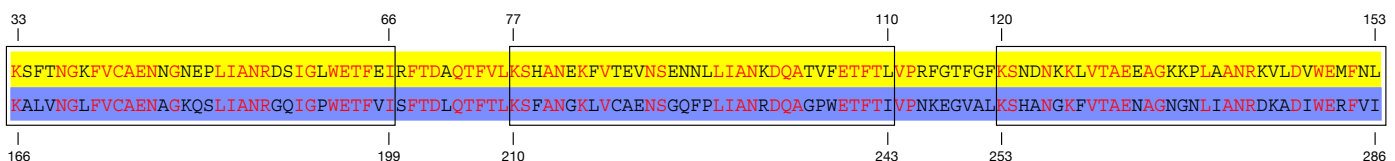


Abb. 2.32: Sequenzvergleich der beiden Fascin-Domänen aus ppod4.

(A) Aminosäuresequenz von ppod4 mit Angabe der beiden Fascin-Domänen. Für Details siehe Abb. 2.28. (B) Beide Fascin-Domänen zeigen ein hohes Maß an Sequenzidentität und bestehen aus je drei internen Wiederholungen. Identische Aminosäuren sind rot dargestellt. Die Triplet-Wiederholungen sind durch schwarze Boxen gekennzeichnet. Die Nummern ober- und unterhalb der Sequenzen beziehen sich auf die Aminosäurepositionen innerhalb der jeweiligen Fascin-Domäne.

2.3.3.2 Klonierung von ppod4 durch nested PCR

Die kodierende Region von ppod4 umfasst 870 Nukleotide (ATG → Stop). Da die DNA-Sequenzen der vier ppod-Isoformen sehr ähnlich waren, konnten keine PCR Primer entworfen werden, die spezifisch nur die ppod4 Isoform amplifiziert hätten. Die einzigen Bereiche, die relativ variabel waren, waren die 5' und 3' UTRs (untranslated regions) (Abb. 2.33).

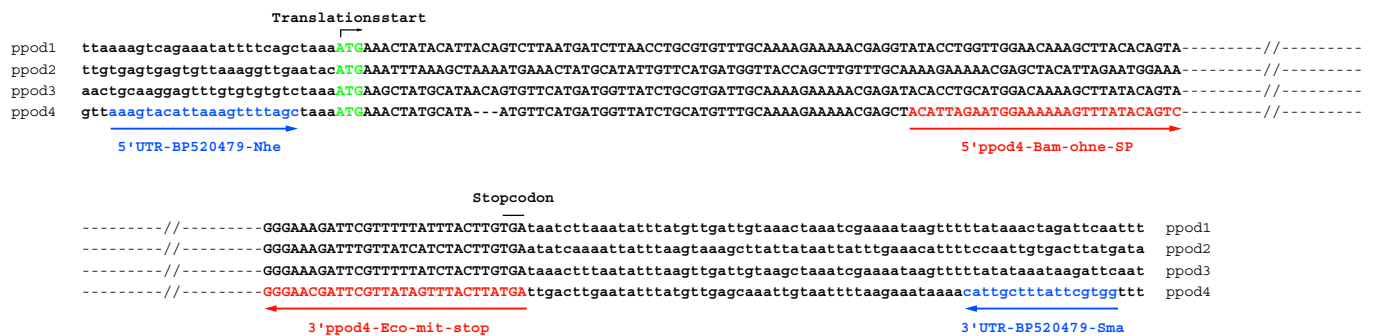


Abb. 2.33: Klonierungsstrategie für ppod4.
Erläuterungen siehe Text.

Daher wurden zwei Primer-Paare für das ppod4 Gen entworfen. Die äußeren Primer (5'UTR-BP520479-Nhe bzw. 3'UTR-BP520479-Sma) waren gegen die ppod4-spezifischen UTRs gerichtet und amplifizierten daher spezifisch diese Isoform. In der ersten PCR mit den äußeren Primern erhielt man ein PCR Produkt von 960 Nukleotiden Länge (siehe Abb. 2.34, Spur 1). Dieses wurde als Template für eine weitere PCR verwendet. Für die zweite PCR wurden Primer aus der kodierenden Sequenz von ppod4 gewählt (5'ppod4-Bam-ohne-SP bzw. 3'ppod4-Eco-mit-stop). Diese PCR ergab ein Produkt von 810 Nukleotiden Länge (siehe Abb. 2.34, Spur 2). Dies entspricht dem ppod4-Gen ohne den N-terminalen hydrophoben Bereich (Nukleotide 61-870 bzw. Aminosäuren 21-290). Der N-terminale hydrophobe Bereich wurde weggelassen, um Probleme bei der Expression des Proteins in Bakterien zu vermeiden.

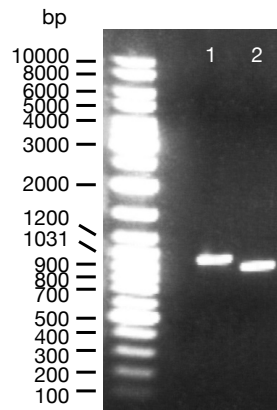


Abb. 2.34: Amplifizierung des ppod4 Gens aus Hydra cDNA.

In Spur 1 ist das PCR Produkt bei Verwendung der äußeren Primer (5'UTR-BP520479-Nhe und 3'UTR-BP520479-Sma) gezeigt. Als Template für diese PCR diente Hydra cDNA. Das PCR Produkt hat eine Länge von 960 nt. In Spur 2 ist das PCR Produkt bei Verwendung der inneren Primer (5'ppod4-Bam-ohne-SP und 3'ppod4-Eco-mit-stop) gezeigt. Als Template für diese PCR diente das PCR Produkt aus Spur 1. Das PCR Produkt in Spur 2 hat eine Länge von 810 nt.

Die Nukleotid Sequenz von ppod4 sowie die Positionen der verwendeten Primer sind in Abbildung 2.35 dargestellt.

```

AATCCAAGCA TATTGTGTGC GTGTTAAAGT ACATTAAAGT TTTAGCTAAA
ATGAAACTAT GCATAATGTT CATGATGGTT ATCTGCATGT TTGCAAAAAGA
AAAACGAGCT ACATTAGAAT GGAAAAAAGT TTATACAGTC GCTATCAAAT
CGTTTACCAA CGGGAAATTT GTATGTGCTG AAAATAACGG AAATGAACCA
TTGATTGCCA ACAGGGACTC TATTGGTTTA TGGGAAACTT TTGAAATTG
TTTCACTGAC GCACAAACAT TTGTATTTAA ATCCCATGCA AACGAAAAAT
TTGTCACGGA AGTTAATAGC GAAAATAACT TGCTCATTGC CAATAAAGAC
CAGGCTACAG TATTTGAGAC TTTCACCTTA GTTCCAAGAT TCGGAACTTT
TGGTTTTAAA TCAAATGATA ATAAAAAATT AGTGACAGCT GAAGAAGCAG
GAAAAAAACC ACTTGCAGCT AACCGCAAAG TTCTTGACGT CTGGGAAATG
TTTAATTTGG TCTACGTGTG GCCTTCAGTA CATAAAGTGG CGATAAAAGC
ATTAGTCAAT GTTTTGTTG TATGCGCTGA AAATGCCGGA AAACAATCCT
TAATTGCTAA TAGAGGCCAA ATAGGCCCTT GGGAAACATT TGTAATTAGC
TTTACTGACC TCCAAACATT TACTCTTAAA TCTTTTGCTA ATGGCAAATT
GGTTTGC GCA GAAAATAGTG GACAATTTCC CTTTATTGCA AACAGAGATC
AAGCTGGACC ATGGGAGACA TTCACAATAG TTCCAAATAA GGAAGGTGTT
GCGCTAAAAT CACACGCTAA TGGAAAATTT GTGACCGCTG AAAATGCAGG
AAATGGTAAC CTAATTGCTA ATCGCGATAA GGCCGATATT TGGGAACGAT
TCGTTATAGT TFACTTATGA TTGACTTGAA TATTTATGTT GAGCAAATTG
TAATTTTAAG AAATAAAACA TTGCTTTATT CGTGGTTTAC TAAAAATGTT
TTTTTAAATT TAGTTTTT CAG TATAGTAAAT GTTAAGCAAC AGATAAATAG
AAAACGTGTTA TTTTATTCT TAATATTGTT ATTATTGAGA CTAATTTAGT
TTTTTGTACA AATATTTCTA TAAATGGAAA GTT

```

Abb. 2.35: Nukleotidsequenz von ppod4.

Die kodierende Sequenz ist in Rot, die untranslatierten Bereiche in Schwarz dargestellt. Die beiden äußeren Primer sind blau hervorgehoben, während die beiden inneren Primer unterstrichen sind.

Mit Hilfe der durch die PCR angefügten Restriktionsschnittstellen BamH1 im Primer 5'ppod4-Bam-ohne-SP sowie EcoR1 im Primer 3'ppod4-Eco-mit-stop wurde das PCR Produkt in den Vektor pRSET A (Invitrogen) kloniert, wodurch es einen N-terminalen Histidin-Tag erhielt. Anschließend wurde es in Bakterienzellen exprimiert und über eine Nickelsäule gereinigt.

2.3.3.3 F-Aktin Ko-Sedimentations Versuch

Die Anwesenheit der beiden Fascin-Domänen in ppod4 eröffnete die Möglichkeit, dass ppod4, ebenso wie Fascin, an Aktin binden kann. Um diese Hypothese zu testen, wurde ein Aktin-Bindeassay durchgeführt. Bei diesem Versuch wurde rekombinantes, gereinigtes ppod4 mit F-Aktin aus Hühnchen (M. Schleicher, München) gemischt und anschließend bei 50.000 g zentrifugiert. Bei dieser Geschwindigkeit pelletiert Aktin. Wenn ppod4 an Aktin binden kann, wird es zusammen mit Aktin ko-sedimentiert. Abbildung 2.36 zeigt das Ergebnis des Aktin-Bindeassays.

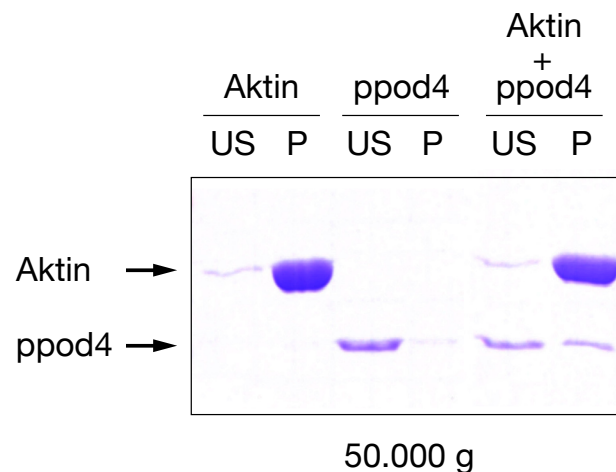


Abb. 2.36: F-Aktin Ko-Sedimentations Versuch.

Aktin aus Hühnchen und rekombinantes ppod4 wurden entweder einzeln oder gemeinsam bei 50.000 g zentrifugiert. Die Überstände (US) sowie die Pellets (P) wurden in einem SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Wenn ppod4 allein zentrifugiert wird (Spur 3 und 4) findet sich kein Protein im Pellet wieder (Spur 4). Das meiste ppod4 befindet sich noch im Überstand (Spur 3). Wenn man dagegen ppod4 mit Aktin mischt und zentrifugiert, bleibt zwar immer noch ein Teil des ppod4 Proteins im Überstand, es findet sich aber deutlich mehr ppod4 im Pellet als bei Zentrifugation von ppod4 allein (vgl. Spur 6 mit Spur 4). Um auszuschließen, dass ppod4 unspezifisch von Aktin gebunden wurde, wurde BSA (bovine serum albumin) mit Aktin gemischt und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. In diesem Fall fand sich kein BSA im Pellet (nicht gezeigt). Man kann also davon ausgehen, dass ppod4 spezifisch an Aktin gebunden hat, wenn auch nicht sehr effizient, da immer noch ein großer Teil des Proteins im Überstand bleibt.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob ppod4 nicht nur an Aktin binden, sondern es auch, wie Fascin, quervernetzen kann. Dazu wurde ein ähnlicher Versuch durchgeführt, außer dass nun nur bei 15.000 g zentrifugiert wurde. Bei dieser langsameren Zentrifugation kann F-Aktin nur dann sedimentieren, wenn es von einem zugegebenen Protein vernetzt wird. In diesem Fall finden sich beide Protein im Pellet. Abbildung 2.37 zeigt das Ergebnis dieses Versuches.

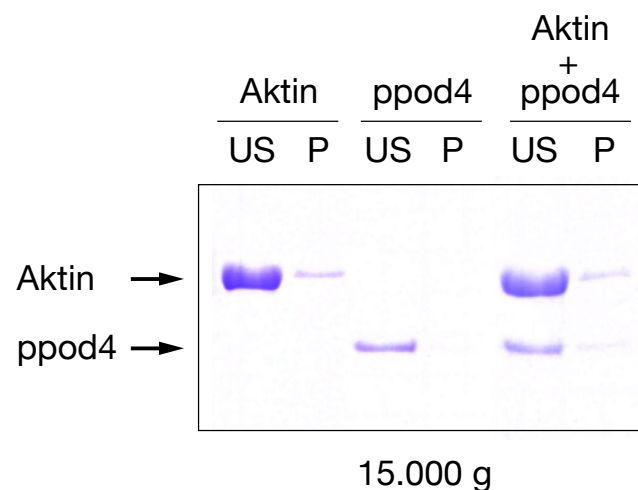


Abb. 2.37: Test auf Aktin-Bündelung Aktivität von ppod4.

Aktin aus Hühnchen und rekombinantes ppod4 wurden entweder einzeln oder gemeinsam bei 15.000 g zentrifugiert. Die Überstände (US) sowie die Pellets (P) wurden in einem SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Aktin allein kann unter diesen Bedingungen nicht sedimentieren und bleibt größtenteils im Überstand (Spur 1). Ppod4 allein kann ebenfalls nicht sedimentieren (Spur 3). Mischt man Aktin und ppod4, so sieht man, dass ppod4 das Aktin nicht quervernetzen kann und dieses daher im Überstand bleibt (Spur 5). Würde man den gleichen Versuch mit Fascin durchführen, so würde Aktin sedimentieren weil es von Fascin vernetzt worden wäre.

Abschließend kann man sagen, dass ppod4 an Aktin binden kann, es aber nicht, wie Fascin, quervernetzen kann.

2.3.3.4 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen ppod4

Um die Lokalisation von ppod in Hydraszellen zu untersuchen, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen ppod4 hergestellt. Dafür wurde ppod4 (Aminosäuren 21-290) in Bakterien exprimiert, und gereinigt. Das gereinigte Protein wurde dann zur Immunisierung von Hühnchen verwendet. Abbildung 2.38 zeigt einen Westernblot mit dem aus dem Eiklar der Hühnereier gewonnenen Antikörper.

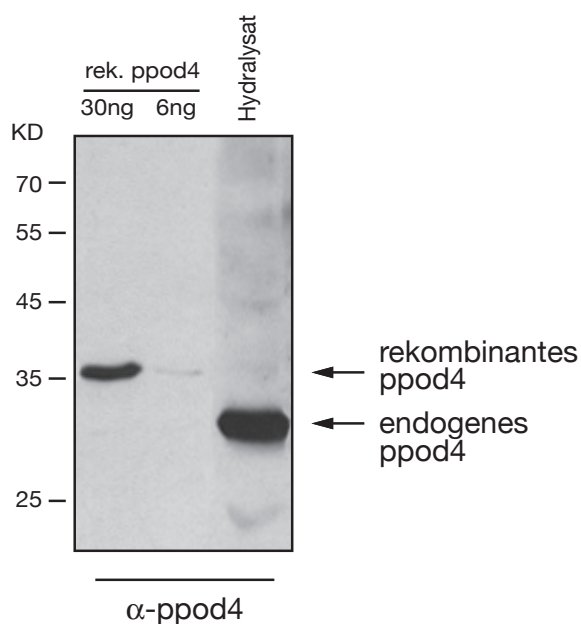


Abb. 2.38: Western Blot zum Testen des gegen ppod4 gerichteten Antikörpers.

Rekombinantes ppod4 in den angegebenen Konzentrationen wurde zusammen mit Hydralysat in einem SDS Gel aufgetrennt und geblottet. Die Membran wurde anschließend mit dem α -ppod4 Antikörper inkubiert.

In Spur 1 und 2 sind 30 bzw. 6 ng des rekombinanten ppod4 Proteins aufgetragen, das zur Immunisierung verwendet wurde. Der Antikörper erkennt gerade noch die 6 ng Menge (Spur 2). In Spur 3 ist Hydralysat aufgetragen. Der Antikörper erkennt eine Bande bei etwa 30 kD, was dem Molekulargewicht von ppod4 entspricht. Es ist aber wahrscheinlich, dass der polyklonale Antikörper nicht nur die ppod4 Isoform, sondern aufgrund der sehr ähnlichen Aminosäuresequenzen auch die anderen drei ppod Isoformen erkennt. Das rekombinante ppod4 Protein ist aufgrund des im pRSET A Vektor vorhandenen His-Tags größer als das endogene Protein.

2.3.3.5 ppod-Protein ist mit Vesikeln an der apikalen Zelloberfläche assoziiert

Nachdem gezeigt wurde, dass der ppod4 Antikörper sowohl rekombinantes ppod4 als auch endogenes ppod in Hydralysaten erkennt wurde er verwendet, um in Immunfluoreszenzstudien zu untersuchen, was für Strukturen der Antikörper in Hydrazellen färbt.

Antikörperfärbungen auf ganzen Hydren zeigen, dass der Antikörper Vesikel anfärbt, die sich dicht unter der apikalen Zelloberfläche befinden.

Abbildung 2.39 zeigt zwei optische Schnitte durch das Ektoderm eines Tieres, das mit dem α -ppod4 Antikörper und einem sekundären, FITC-markierten Zweitantikörper gefärbt wurde.

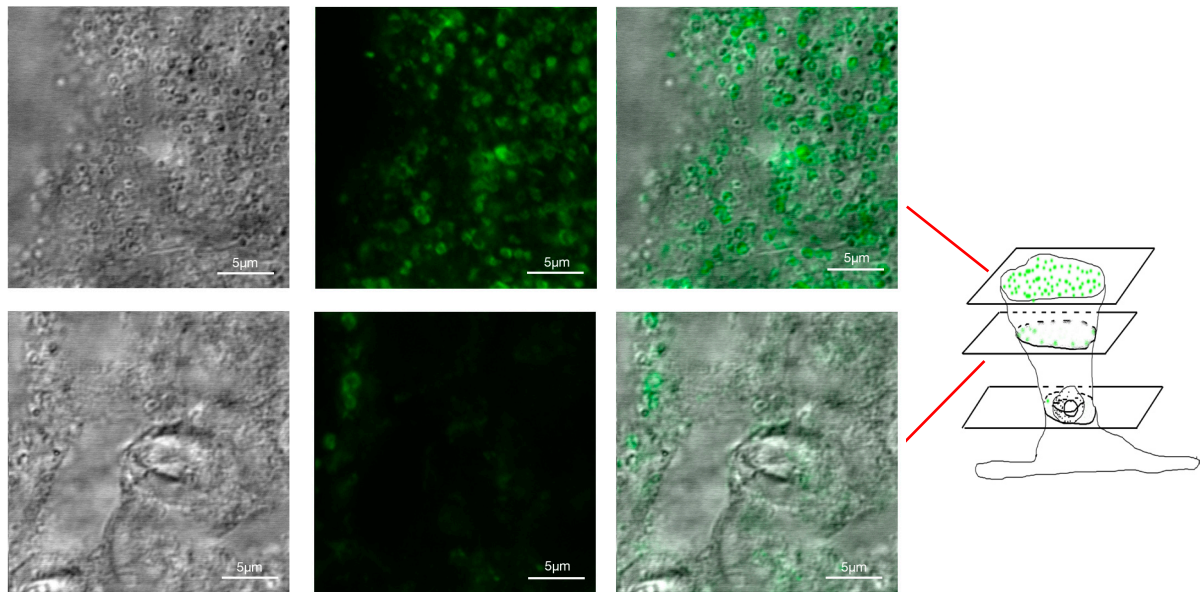


Abb. 2.39: Immunfärbungen von ganzen Tieren mit dem α -ppod4 Antikörper.

Hydren wurden mit Lavdovsky fixiert und mit dem α -ppod4 Antikörper gefärbt. Die obere Reihe zeigt 0,3 μm dicke Schnitte durch den Basalbereich des Ektoderms. Die untere Reihe zeigt 0,3 μm dicke Schnitte durch den entsprechenden Apikalbereich des Ektoderms. Die ppod-Färbung ist in Grün dargestellt.

Es sind einzelne konfokale Schnitte mit einer Dicke von 0,3 μm dargestellt. In einer Reihe sind jeweils das Phasenkontrastbild (links), die ppod-Färbung (Mitte) sowie eine Überlagerung beider Bilder (rechts) gezeigt. Die obere Reihe zeigt einen Schnitt etwa 1 μm unterhalb der apikalen Zelloberfläche. Es sind deutlich die ppod-positiven Vesikel zu erkennen. Diese Vesikel sind auch im Phasenkontrast sichtbar. Die Vesikel sind etwa 1-2 μm groß und scheinen von dem ppod Protein nicht ausgefüllt zu sein. Vielmehr ist nur die Vesikelmembran von dem Antikörper angefärbt. Die untere Reihe in Abbildung 2.39 zeigt den gleichen Ausschnitt des Tieres etwa 7 μm unterhalb der Zelloberfläche. In diesem tieferen Schnitt sind erheblich weniger ppod-positive Vesikel sichtbar. Die Immunfärbungen mit dem ppod4 Antikörper zeigen, dass das Protein nicht homogen in der Zelle verteilt ist, sondern sich nur dicht unterhalb der apikalen Oberfläche der Zelle befindet.

Der ppod4 Antikörper wurde auch verwendet, um Einzelzellen in Hydra Mazeraten anzufärben. Dies ist in Abbildung 2.40 gezeigt.

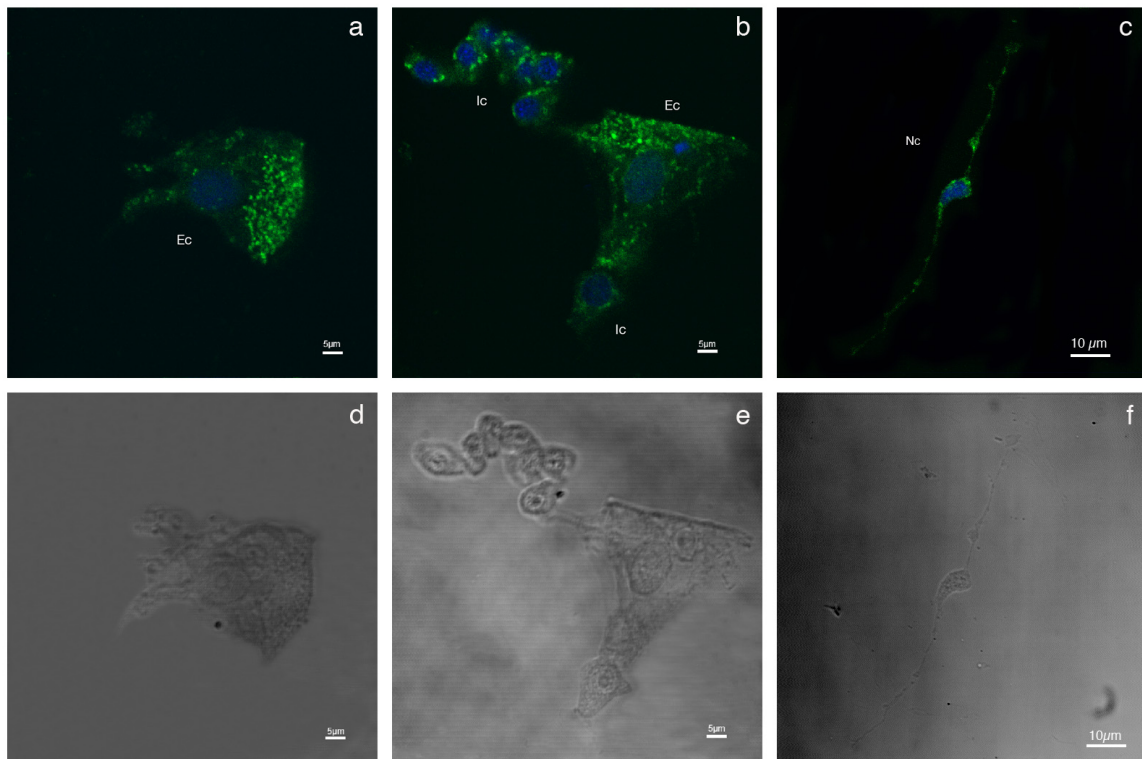


Abb. 2.40: Immunfärbungen von Hydra Mazeraten mit dem ppod4 Antikörper.

Die ppod-Färbung ist in Grün, die Kernfärbung in Blau dargestellt. In der oberen Reihe (a-c) sind die ppod-Färbungen, in der unteren Reihe (d-f) die entsprechenden Phasenkontrast Bilder gezeigt. Es handelt sich um einzelne optische Schnitte mit einer Dicke von 0,3 µm. Die Größenstandards sind 5 µm (in a,b,d,e) bzw. 10 µm (in c,f). Ec: ektodermale Zelle; Ic: interstitielle Zelle; Nc: Nervenzelle

In der oberen Reihe (a-c) ist die ppod Färbung in Grün dargestellt, während die Kerne mit TO-PRO-3 gegengefärbt wurden (blau). In der unteren Reihe (d-f) sind die jeweiligen Phasenkontrastaufnahmen gezeigt. Es handelt sich um einzelne optische Schnitte mit einer Dicke von 0,3 µm. In Bild a und b sind zwei ektodermale Epithelzellen (Ec), in Bild b außerdem interstitielle Zellen (Ic) und in Bild c eine Nervenzelle (Nc) gezeigt. In den Epithelzellen ist deutlich die Anreicherung von ppod-positiven Vesikeln an der apikalen Zelloberfläche zu erkennen. Interstitielle Zellen und Nervenzellen dagegen weisen eine homogenere Verteilung der Vesikel auf. Dies kann damit zusammenhängen, dass diese Zellen nicht polarisiert sind, also keine basale bzw. apikale Seite haben.

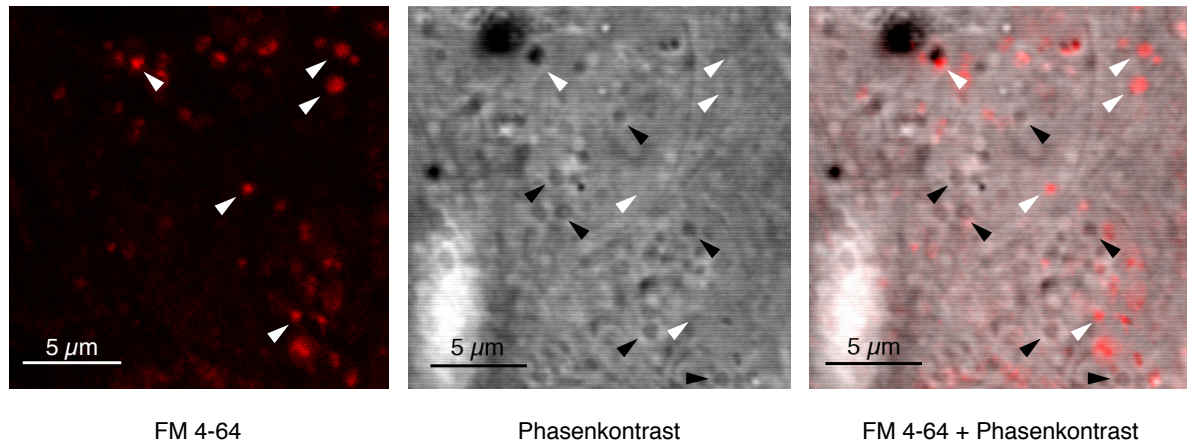
In Färbungen von Hydra Mazeraten schien es, im Gegensatz zu Färbungen von ganzen Tieren, so, als sei nicht nur die Vesikelmembran, sondern auch das Lumen gefärbt. Dies kann eine Folge der Mazerierung sein, bei der unter Umständen Vesikel kollabieren können.

2.3.3.6 Die ppod-positiven Vesikel sind keine Endosomen

Es stellte sich die Frage, um was für Vesikel es sich bei den mit dem ppod4 Antikörper gefärbten Strukturen handelt. Eine Möglichkeit war, dass die ppod-positiven Vesikel Endosomen darstellen.

Versuche mit dem endosomalen Marker FM 4-64 (Molecular Probes) sollten dies klären. Dieser rot-fluoreszierende, lipophile Farbstoff färbt biologische Membranen. Bei längerer Inkubation bilden die gefärbten Membranen Vesikel, die sich von der Membran abschnüren und im Zytoplasma Endosomen bilden. Wenn die ppod-positiven Vesikel Endosomen sind, sollten sie mit FM 4-64 angefärbt werden. Da der Farbstoff jedoch nicht fixierbar ist, konnten die mit FM 4-64 gefärbten Tieren nicht mit dem ppod4 Antikörper nachgefärbt werden, sondern mussten lebend am konfokalen Mikroskop gescannt werden. Man kann jedoch am lebenden Präparat die ppod-positiven Vesikel im Phasenkontrast erkennen.

Abbildung 2.41 zeigt einen Ausschnitt der apikalen Zelloberfläche eines mit FM 4-64 behandelten Tieres. Die weißen Pfeilspitzen zeigen auf FM 4-64-gefärbte Endosomen, die nicht im Phasenkontrast zu sehen sind, also keine ppod-Vesikel darstellen. Die schwarzen Pfeilspitzen zeigen auf ppod-Vesikel im Phasenkontrast, die nicht mit FM 4-64 gefärbt sind. Aus der fehlenden Überlagerung der rot gefärbten Endosomen mit den Phasenkontrast Vesikeln kann man schließen, dass die ppod-positiven Vesikel keine Endosomen sind.



FM 4-64

Phasenkontrast

FM 4-64 + Phasenkontrast

Abb. 2.41: Färbung lebender Tiere mit dem endosomalen Marker FM 4-64.

Die Tiere wurden 1 h in 500 μm FM 4-64 inkubiert und anschließend lebend unter dem konfokalen Mikroskop untersucht. Es handelt sich um 0,5 μm dicke optische Schnitte. Weiße Pfeilspitzen markieren FM 4-64 positive Endosomen, die nicht im Phasenkontrast sichtbar sind. Schwarze Pfeilspitzen markieren im Phasenkontrast sichtbare ppod-Vesikel, die nicht mit FM 4-64 gefärbt sind.

Dieses Ergebnis wurde auch durch Versuche mit TRITC-Dextran beads bestätigt. Dextran wird von Zellen per Pinozytose aufgenommen und färbt darum ebenfalls Endosomen. Auch hier zeigte sich keine Ko-Lokalisation von TRITC-Dextran-positiven und ppod-positiven Vesikeln (nicht gezeigt).

2.3.3.7 Die ppod-positiven Vesikel sind sekretorische Granula

Um die Lokalisation von ppod in Hydrazellen zu untersuchen, wurde das ppod Gen mit GFP fusioniert und Hydrazellen damit transformiert. Dazu wurde es in den Vektor HotG kloniert, wo es als N-terminales Fusionsprotein mit GFP exprimiert wird. Nach Einbringen des Vektors in Hydrazellen durch Partikelbeschuss (Bottger et al., 2002) wurde die Lokalisation des ppod-GFP Fusionsproteins mit dem konfokalen Mikroskop untersucht. Da die Transformationseffizienz bei Verwendung von ppod4-GFP sehr schlecht war, wurde stattdessen ppod2-GFP transformiert (Alexandrova, unveröffentlicht). Da alle vier ppod Isoformen jedoch sehr starke Sequenzähnlichkeiten zeigen, ist es wahrscheinlich, dass sie auch eine ähnliche Lokalisation in Zellen haben.

Abbildung 2.42 zeigt einen Ausschnitt des Rumpfes eines beschossenen Tieres mit einer transformierten Epithelzelle. Es sind zwei Einzelschnitte mit einer Dicke von $0,5\ \mu\text{m}$ zu sehen (a und b). Das obere Bild (a) zeigt einen Schnitt etwa $1\ \mu\text{m}$ unterhalb der apikalen Oberfläche der transformierten Zelle. Bild b ist ein Schnitt durch die gleiche Zelle, allerdings etwa $7\ \mu\text{m}$ unterhalb der Zelloberfläche. Die Schnittebenen durch die Epithelzelle sind daneben schematisch dargestellt. Bei Überexpression von ppod2-GFP zeigten sich Vesikel, die in Größe und Lokalisation denen glichen, die mit dem ppod4-Antikörper gefärbt wurden. Sie waren etwa $1\text{-}2\ \mu\text{m}$ im Durchmesser und befanden sich hauptsächlich dicht unter der apikalen Oberfläche der transformierten Epithelzellen. Tiefer in der Zelle waren weitaus weniger ppod-positive Vesikel zu sehen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Immunfluoreszenzfärbungen des ppod4 Antikörpers, mit dem ebenfalls Vesikel dicht unter der Zelloberfläche gefärbt wurden.

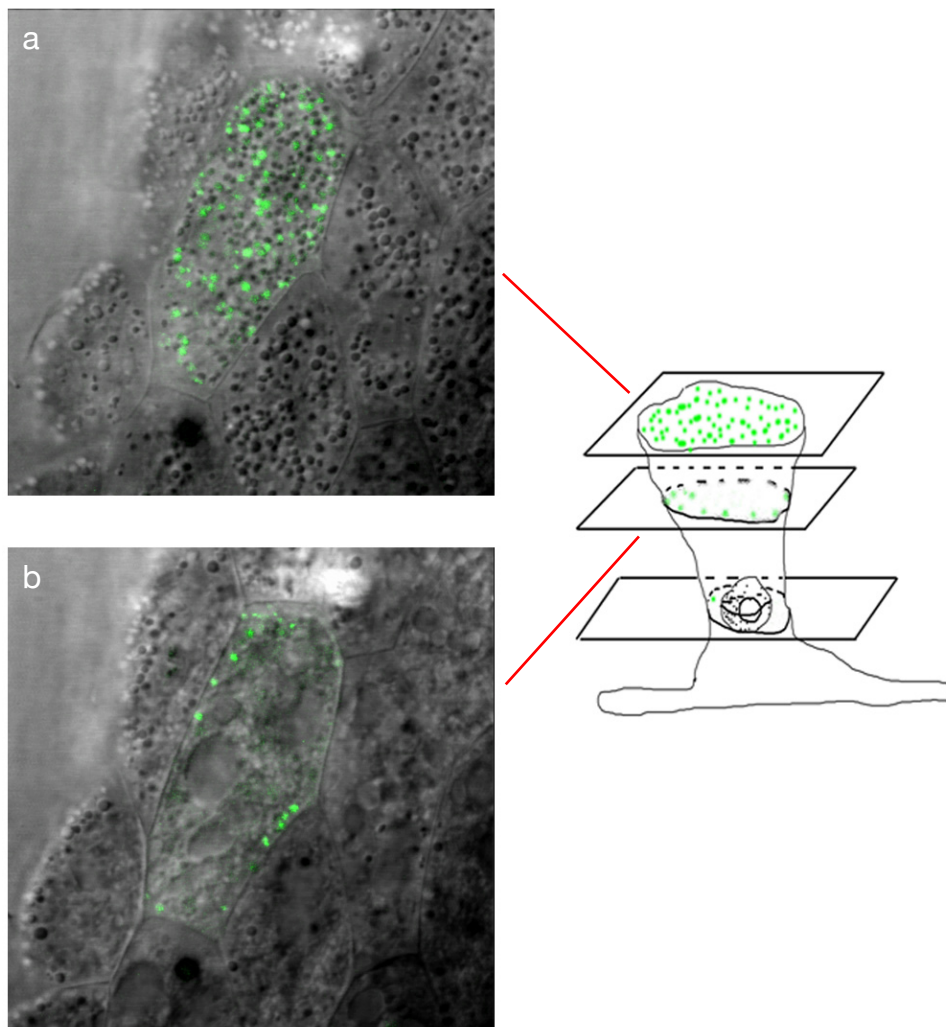


Abb. 2.42: Expression von ppod2-GFP in Hydra.

Die Grenzen der transformierten Zelle sind deutlich zu erkennen. Die umliegenden Zellen sind nicht transformiert. Die Anordnung der Schnitte ist in der schematischen Zeichnung einer Hydra Epithelzelle gezeigt (rechts). Details siehe Text.

Beim Vergleich mit dem Expressionsmuster eines typischen sekretierten Proteins verstärkt sich die Vermutung, dass es sich bei den ppod-positiven Vesikeln um sekretorische Vesikel handelt. Abbildung 2.43 zeigt die Expression des sekretierten Proteins PDGF (platelet derived growth factor) fusioniert mit GFP (PDGF-GFP) in Hydrazellen (Alexandrova, unveröffentlicht). Es wurden Granula gefärbt, die den ppod2-GFP Granula in Größe und Lokalisation an der apikalen Seite der Zellen gleichen.

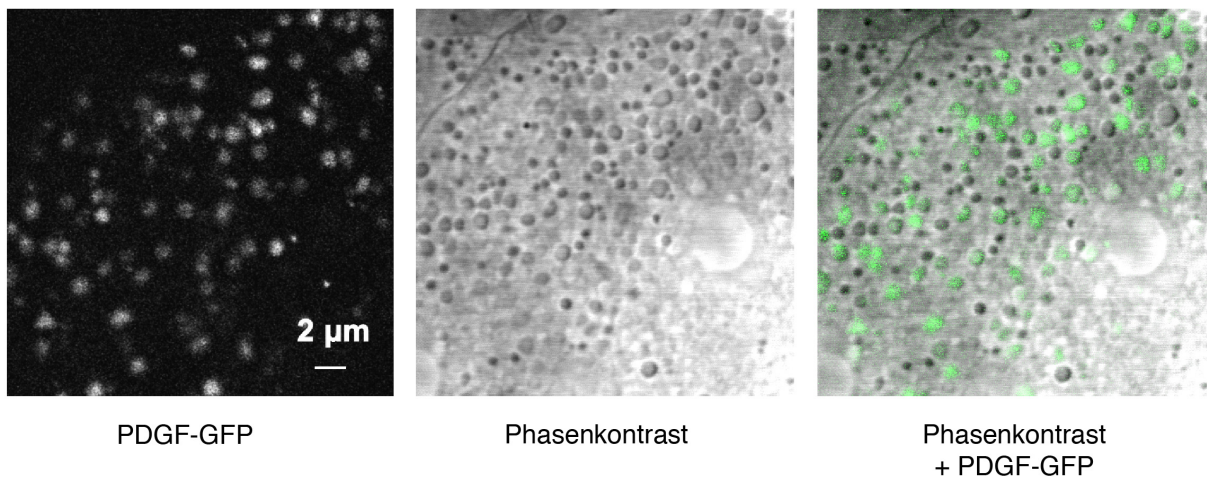


Abb. 2.43: Expression von PDGF-GFP in Hydrazellen.

0,5 µm dicker optischer Schnitt durch eine transformierte Epithelzelle etwa 1 µm unterhalb der apikalen Zelloberfläche. PDGF ist in Vesikeln lokalisiert, die im Phasenkontrast sichtbar sind.

Ein weiterer Hinweis, der auf Exozytose hinweist, sind elektronenmikroskopische Bilder (Lentz, 1966), die Vesikel zeigen, deren Größe und Position mit denen der ppod-positiven Vesikel übereinstimmen (Abb. 2.44, markiert durch Pfeile). Diese Vesikel sind, genau wie die ppod-positiven Vesikel, etwa 1 µm groß und sind auf der apikalen Seite von Epithelzellen lokalisiert. Sie sind von einer Membran umschlossen und gehen aus dem Golgi-Apparat hervor. Hydren werden von einer Glycocalyxschicht umhüllt, die aus Glycoproteinen und Polysacchariden besteht. Sie dient dem Schutz der Hydraoberfläche und, in der Fußregion, der Anheftung an das Substrat. Vermutlich dienen die im Elektronenmikroskop sichtbaren Vesikel der Sezernierung der Glycocalyx Komponenten.

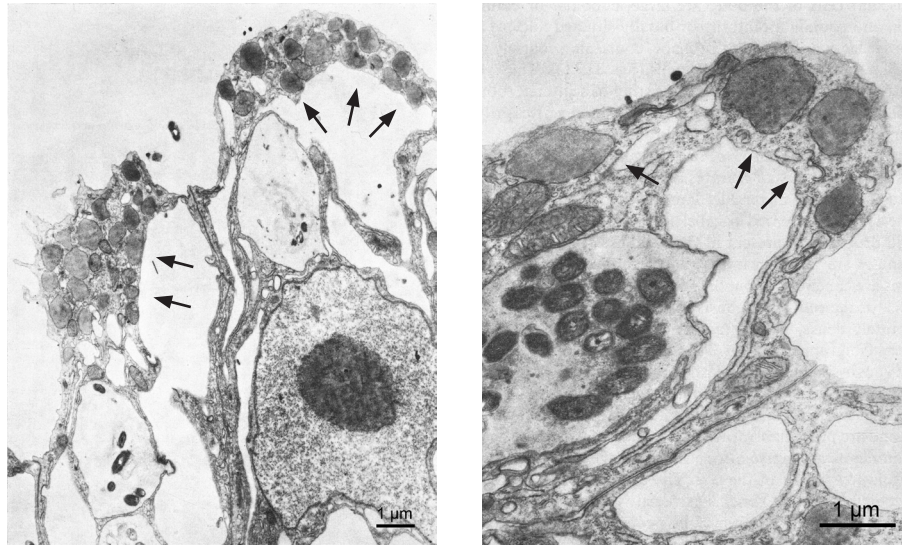


Abb. 2.44: Elektronenmikroskopische Schnitte durch Hydra Epithelzellen.

Im apikalen Bereich der Zellen sind etwa 1 µm große Vesikel sichtbar, die in Größe und Lokalisation den ppod-Vesikeln ähneln (aus Lentz, 1966).

Aufgrund der unter Punkt 2.3.3.6 und 2.3.3.7 beschriebenen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den ppod-positiven Vesikeln nicht um Endosomen, sondern um sekretorische Vesikel handelt.

2.3.3.8 Isolierung der ppod-positiven Vesikel durch Dounce Homogenisierung

Um die Vesikel zu isolieren, wurden Hydrazellen per Dounce Homogenisierung aufgeschlossen und die einzelnen Zellkompartimente durch differentielle Zentrifugation voneinander getrennt. Nach Abtrennung der Kerne und nicht-aufgeschlossener Zellbestandteile bei 800 g wurde der dabei entstandene Überstand einer low speed Zentrifugation bei 17.000 g unterzogen. Das so erhaltene low speed Pellet wurde in isotonischem Puffer (Puffer M) aufgenommen. Der bei der low speed Zentrifugation entstandene Überstand wurde daraufhin bei 100.000 g zentrifugiert (high speed Zentrifugation) und das high speed Pellet ebenfalls in isotonischem Puffer aufgenommen. Der Überstand stellt die Zytoplasmafraktion (high speed Überstand) dar. Die Mengen jeder Fraktion, die jeweils 5 Hydren entsprachen, wurden in einem Westernblot auf Anwesenheit von ppod Protein untersucht. Dies ist in Abbildung 2.45 gezeigt.

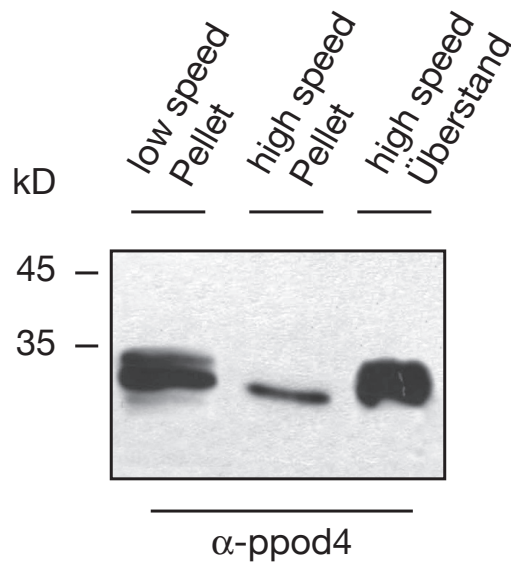


Abb. 2.45: ppod Protein ist sowohl in der low speed wie auch in der high speed Vesikelfractionen vorhanden. Die Mengen jeder Fraktion, die jeweils 5 Hydren entsprechen, wurden in einem Gel aufgetrennt, geblottet und mit dem ppod4 Antikörper auf die Anwesenheit von ppod Protein hin untersucht.

Man sieht, dass das ppod Protein sowohl im low speed als auch im high speed Pellet vorkommt. Im low speed Pellet (17.000 g) finden sich vor allem auch die etwa gleich großen Mitochondrien. In Ko-Immunfluoreszenzstudien mit dem ppod4 Antikörper und einem Antikörper gegen Mitochondrien-assoziierte Caspase (Schmidt, 2003) konnte jedoch gezeigt werden, dass die ppod-positiven Vesikel keine Mitochondrien sind (nicht gezeigt). Für die nachfolgenden Versuche wurden die Vesikel aus dem high speed Pellet verwendet. Auch im high speed Überstand findet sich ppod Protein, obwohl der ppod4 Antikörper in Immunfärbungen praktisch keine zytoplasmatische Färbung zeigt (vgl. Abb. 2.39 und 2.40). Möglicherweise werden die ppod-positiven Vesikel bei der Dounce Homogenisierung beschädigt, so dass das ppod Protein von der Membran abgelöst wird und in den Überstand gelangt.

2.3.3.9 ppod4 ist peripher mit der Vesikelmembran assoziiert

Die Immunfärbungen mit dem ppod4 Antikörper, sowie die Anwesenheit von ppod in der Vesikelfraktion, hatten gezeigt, dass ppod mit Vesikeln assoziiert ist. Bei den Antikörperfärbungen sah es außerdem so aus, als ob nicht das Vesikellumen, sondern nur die Vesikelmembran (vgl. Abb. 2.39) gefärbt wird. Daher sollte nun getestet werden, wie ppod mit den Vesikeln assoziiert ist. Da ppod4 keine Transmembrandomäne besitzt, wurde vermutet, dass das Protein nur peripher mit der Vesikelmembran assoziiert ist.

Um zu testen, ob ppod peripher mit der Vesikelmembran assoziiert ist, wurden die oben isolierten Vesikel mit 0,5 M NaCl inkubiert. Nach der Inkubation mit NaCl wurden die Vesikel bei 100.000 g zentrifugiert. Pellet und Überstand wurden per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Im Anschluss daran wurde im Western Blot mit dem ppod4 Antikörper untersucht, in welcher Fraktion sich das ppod Protein befindet. Wenn das ppod Protein peripher mit der Vesikelmembran assoziiert ist, wird es durch die hohe Salzkonzentration von der Membran abgelöst und befindet sich nach der Zentrifugation im Überstand. Wenn es dagegen integral in der Membran verankert ist, wird es durch das Salz nicht von der Membran gelöst, sondern bleibt weiterhin mit den Vesikeln assoziiert. Nach Zentrifugation findet sich das Protein dann im Pellet wieder.

Abbildung 2.46 zeigt das Ergebnis der Behandlung der Vesikel mit NaCl. In Spur 1 und 2 (Vesikel ohne NaCl) sieht man, dass sich der Großteil des ppod Proteins noch im Pellet, also immer noch assoziiert mit der Membran befindet. Nur ein sehr geringer Teil des Proteins befindet sich im Überstand. In Spur 3 und 4 dagegen (Vesikel mit NaCl) wurde der größte Teil von ppod von der Membran abgelöst und befindet sich nun im Überstand. Dies bedeutet, dass das ppod Protein nicht integral, sondern nur peripher mit der Vesikelmembran assoziiert ist.

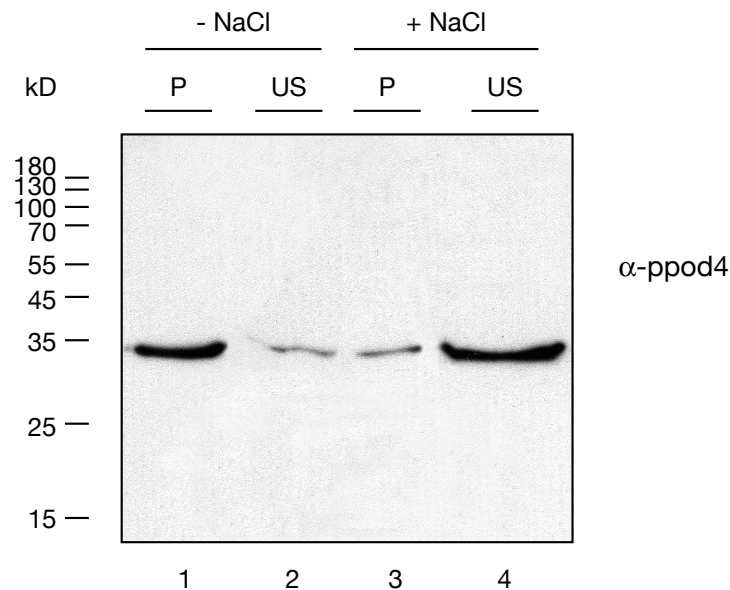


Abb. 2.46: ppod Protein ist peripher mit der Vesikelmembran assoziiert.

Isolierte Vesikel wurden mit 0,5 M NaCl inkubiert und anschließend zentrifugiert. Die Überstände (US) sowie die Pellets (P) wurden in einem SDS Gel aufgetrennt und mit dem ppod4 Antikörper im Westernblot die Verteilung des ppod Proteins untersucht.

2.3.3.10 ppod Protein lässt sich auf der Oberfläche von Vesikeln quervernetzen

Nachdem gezeigt worden war, dass das ppod Protein mit der zytoplasmatischen Seite der Vesikelmembran assoziiert ist, sollte untersucht werden, ob sich das Protein auf der Vesikeloberfläche quervernetzen lässt. Dazu wurde der chemische Crosslinker Bis(sulfosuccinimidyl) Suberat (BS^3) (Pierce) verwendet. BS^3 ist ein wasserlöslicher, Membran-impermeabler, homobifunktionaler N-hydroxysuccinimid Ester, der mit primären Aminogruppen stabile Amidbindungen eingeht (Abb. 2.47).

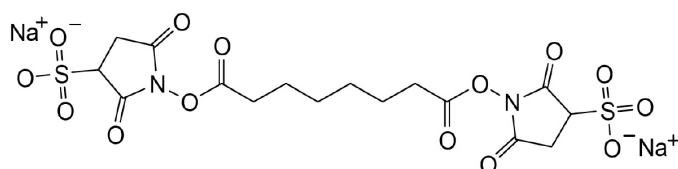


Abb. 2.47: Struktur von BS^3

Je 10 μ l einer frischen Vesikelpräparation wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Crosslinker versetzt und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 20 mM Tris, pH 7,5 gestoppt. Daraufhin wurden die Proben mit

SDS-Ladepuffer versetzt, aufgeköcht und in einem 15%-igen SDS-Gel aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran wurde mit dem ppod4-Antikörper untersucht, ob ppod weiterhin als Monomer bei etwa 30 kD vorliegt oder aber quervernetzt wurde und mit einem höheren Molekulargewicht läuft.

Das Ergebnis des Crosslinking Versuchs ist in Abbildung 2.48 gezeigt. In Spur 1 ist die Negativkontrolle zu sehen, bei der kein Crosslinker zugegeben wurde. Erwartungsgemäß läuft ppod bei etwa 30 kD. Bei Inkubation mit 2 mM Crosslinker ist eine deutliche Verschiebung der ppod-Bande zu erkennen, obwohl immer noch ein Teil als Monomer vorliegt (Spur 2). Bei einer Crosslinker Konzentration von 5 mM verschwindet die Monomerbande völlig und das gesamte ppod läuft in einem Komplex, mit einem Molekulargewicht von 60-70 kD (Spur 3). Außerdem gibt es auch noch einen hochmolekularen Komplex, der allerdings in dem 15%-igen Gel nicht mehr weiter aufgetrennt werden konnte. In späteren Versuchen wurde gezeigt, dass ppod schon nach zwei Minuten quervernetzt wurde (s.u.). Es war also nicht nötig, 1,5 h zu inkubieren.

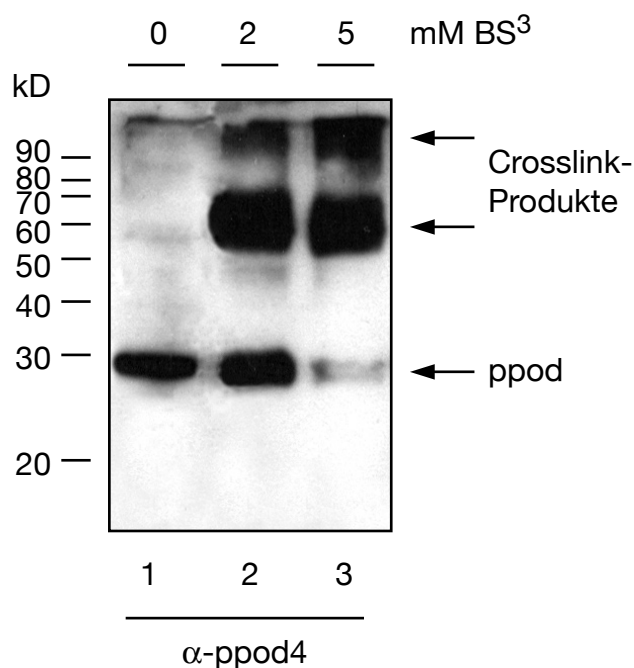


Abb. 2.48: ppod Protein lässt sich auf der Oberfläche von Vesikeln quervernetzen.

Isolierte Vesikel wurden 1,5 h lang mit unterschiedlichen Konzentrationen von BS³ inkubiert und anschließend in einem 15% SDS Gel aufgetrennt. Ohne Crosslinker läuft ppod als Monomer bei 30 kD (Spur 1). Bei 2 mM BS³ ist etwa die Hälfte des ppod Proteins quervernetzt (Spur 2). Bei 5 mM BS³ wird etwa 90% des ppod Proteins vernetzt (Spur 3).

2.3.3.11 Rekombinantes ppod Protein lässt sich quervernetzen

Der obige Versuch zeigt, dass ppod auf der Vesikeloberfläche quervernetzt werden kann. Man kann allerdings nicht ausschließen, dass nicht noch andere Proteine auf der Vesikeloberfläche mit ppod vernetzt wurden.

Um dies zu klären, wurde getestet, ob rekombinantes ppod4 quervernetzt werden kann, ob ppod also in Lösung als Dimer oder sogar als Multimer vorliegt. Dazu wurde rekombinantes, gereinigtes ppod4 Protein verwendet, dem die hydrophobe Sequenz am N-Terminus fehlte. Dieses Protein wurde mit 2 mM BS³ unterschiedlich lang inkubiert. Nach den jeweiligen Inkubationen wurden die Reaktionen mit 20 mM Tris, pH 7,5 abgestoppt, die Proben mit Ladepuffer versetzt, in einem 8% SDS Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen. Die unterschiedlichen Ansätze wurden dann mit dem ppod4-Antikörper auf die Anwesenheit von ppod-Komplexen hin untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 2.49 dargestellt. Selbst bei einer nur zweiminütigen Inkubation mit BS³ ist schon das gesamte monomere ppod zu einem multimeren Komplex vernetzt (Spur 1). Es fällt jedoch auf, dass bei der 2 minütigen Vernetzung noch Dimere bei etwa 70 kD vorhanden sind. Je länger quervernetzt wird, desto weniger Dimere liegen vor. Bei einer 100 minütigen Inkubation mit dem Crosslinker liegt sämtliches ppod4 als multimerer Komplex vor.

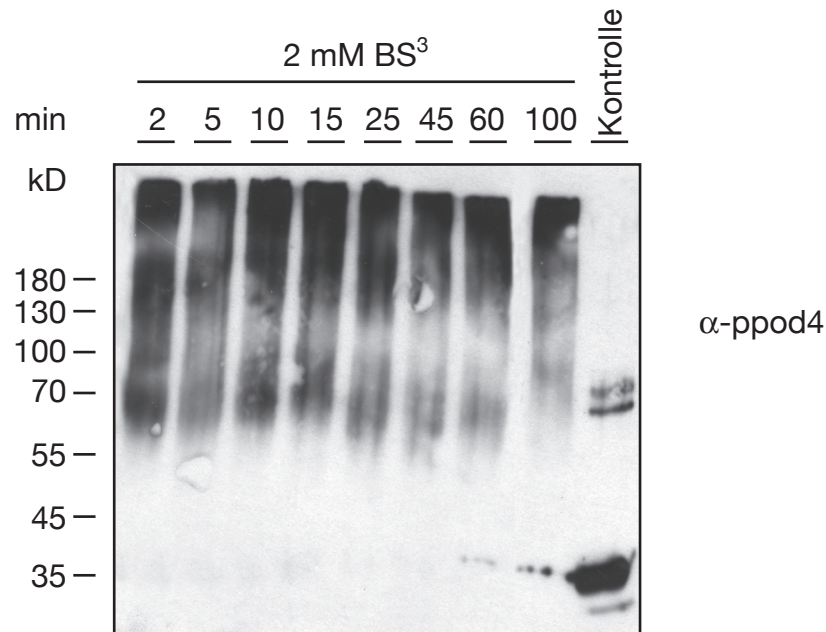


Abb. 2.49: Quervernetzung von rekombinantem ppod4 Protein.

Rekombinantes ppod4 wurde mit 2 mM BS³ versetzt und unterschiedlich lange inkubiert. Bereits nach 2 min liegt ppod4 nicht mehr als 30 kD-Monomer vor (Spur1). Bei längerer Inkubation nimmt die Menge des dimeren Komplexes (70 kD) ab und das meiste ppod liegt in hochmolekularen Komplexen von über 200 kD vor (Spur 8). In Spur 9 wurde rekombinantes ppod4 ohne Crosslinker als Negativkontrolle aufgetragen.

2.3.3.12 Das ppod Protein ist mit Peroxidase-positiven Vesikeln assoziiert, besitzt selbst aber keine Peroxidase Aktivität

Die Mitglieder der ppod-Familie wurden ursprünglich als Vesikel-assoziierte Peroxidasen beschrieben (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002). Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass das ppod Protein selbst die Peroxidaseaktivität in der Vesikelfraktion darstellte. Um dies zu untersuchen, wurden Vesikel aus Hydra isoliert und einem in-Gel Peroxidase Assay unterzogen (Dutta and Henry, 1990; Hoffmeister-Ullerich et al., 2002). Dazu wurden isolierte Vesikel in einem LDS-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde in der Nachbarspur rekombinantes ppod4 geladen. In einem LDS-Gel herrschen im Gegensatz zu einem SDS-Gel semi-native Bedingungen, so dass Enzyme ihre Aktivität nicht verlieren. Der Nachweis der Peroxidase Aktivität erfolgte mit dem unlöslichen Substrat Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid.

Abbildung 2.50 zeigt das Ergebnis des Peroxidase-Assays. Es wurden jeweils Vesikel und rekombinantes ppod4 aufgetragen. Im linken Teil der Abbildung ist in der Vesikelfraktion deutlich die Peroxidase-positive Bande zu erkennen. In der Spur daneben wurde rekombinantes ppod4 Protein aufgetragen, das eindeutig keine Peroxidase Aktivität zeigt. In mittleren Teil der Abbildung 2.50 ist ein Westernblot mit dem α -ppod4-Antikörper gezeigt. Für diesen Westernblot wurden die gleichen Proben wie für das Peroxidase Gel in einem identischen LDS-Gel aufgetrennt. Man sieht, dass das ppod Protein zwar in der Vesikelfraktion enthalten ist, aber wesentlich kleiner ist als die Peroxidase-positive Bande in dem Gel des linken Teils der Abbildung. Der rechte Teil der Abbildung zeigt das entsprechende Coomassie Gel.

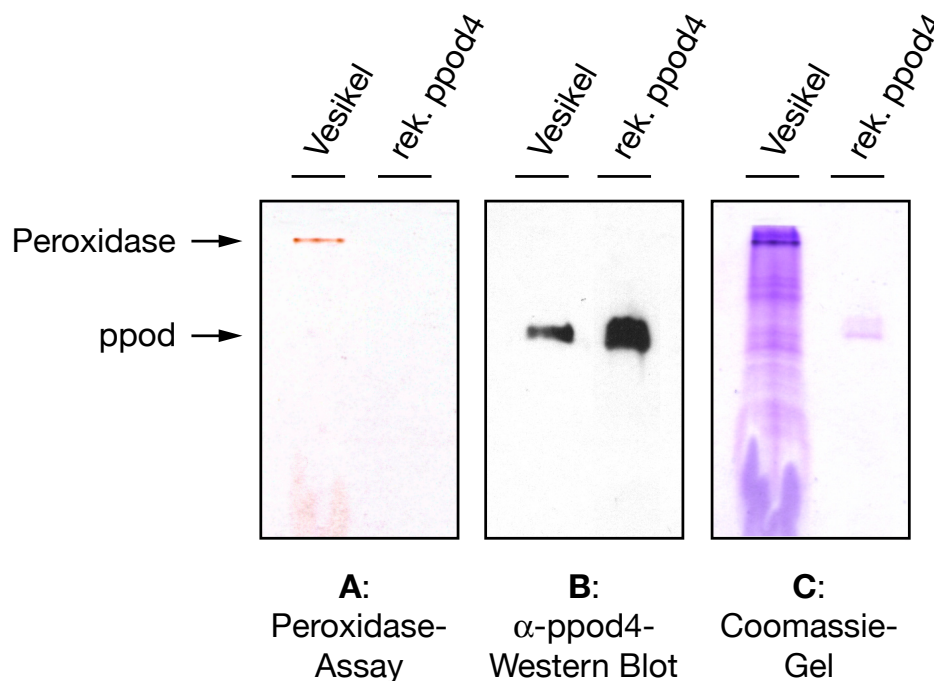


Abb. 2.50: Peroxidase Assay mit isolierten Vesikeln.

(A) Die isolierten Vesikel enthalten ein Protein mit Peroxidase-Aktivität (Pfeil). Rekombinantes ppod4 dagegen zeigt keine Peroxidaseaktivität.

(B) Ein Westernblot mit dem ppod4 Antikörper zeigt im Vergleich mit dem Peroxidase-Gel in (A), dass die in den Vesikeln enthaltene Peroxidase eine andere Größe als das ppod Protein hat.

(C) Coomassie Gel der Vesikelfraktion und des rekombinanten ppod4 Proteins. Die Peroxidase und das ppod Protein sind jeweils durch Pfeile gekennzeichnet.

Dieser Versuch hat gezeigt, dass ppod4 zwar in der gleichen Fraktion wie die Peroxidase-positiven Vesikel vorkommt, selbst aber keine Peroxidase Aktivität besitzt.

2.3.4 Ko-Immunfluoreszenzfärbungen der Zytoskelettproteine mit ppod4 und 14-3-3

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen 14-3-3 und den Zytoskelettproteinen Aktin, Tubulin sowie ppod, die alle als potentielle 14-3-3 Bindeproteine isoliert wurden, herzustellen, wurden Doppelfärbungen von Hydrazellen durchgeführt.

2.3.4.1 ppod4/Tubulin Doppelfärbungen

Zunächst wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen ppod4 und Tubulin durchgeführt. Dazu wurden Hydrazellen durch Mazeration vereinzelt und anschließend zuerst mit α -ppod4 und danach mit α -Tubulin (WA3) Antikörpern gefärbt. Abbildung 2.51 zeigt Ausschnitte von zwei ektodermalen Epithelzellen (Zelle 1 = Bild a-c und Zelle 2 = Bild d-f). Es handelt sich um einzelne konfokale Schnitte mit einer Dicke von 0,3 μm . Im roten Kanal ist jeweils das Mikrotubuli Zytoskelett zu sehen (a, d) und im grünen Kanal die ppod-positiven Vesikel (b, e). Außerdem ist die Überlagerung beider Kanäle sowie die Kernfärbung (blau) gezeigt (c,f). Bereiche beider Zellen, die vergrößert gezeigt werden, sind durch einen weißen Rahmen hervorgehoben und unter den jeweiligen Zellen abgebildet.

Man sieht, dass die ppod-positiven Vesikel in Bahnen entlang der Mikrotubuli laufen, was darauf hindeutet, dass sie entlang der Mikrotubuli transportiert werden.

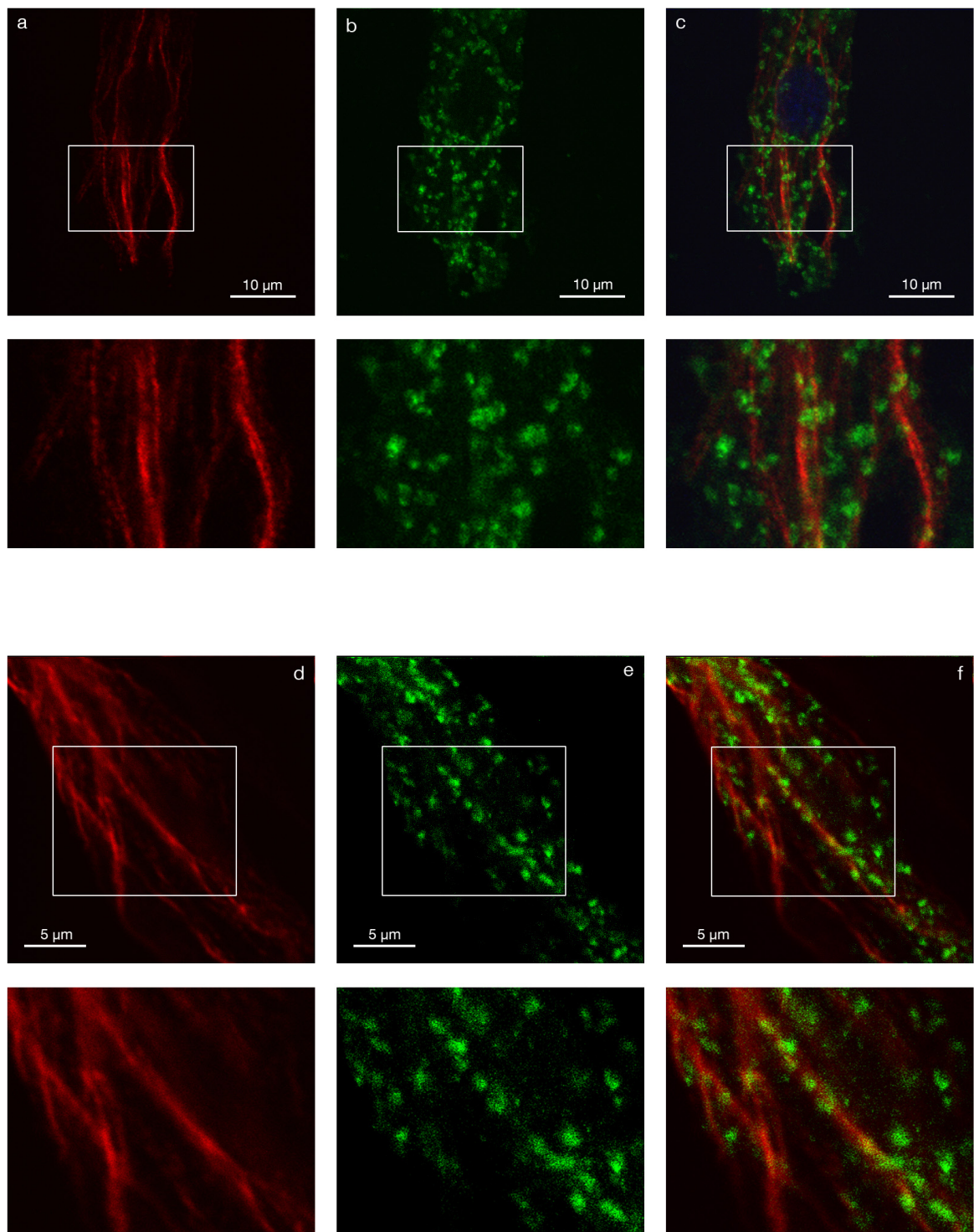


Abb. 2.51: ppod4/Tubulin Doppelfärbungen auf Hydra Mazeraten.

Optische Schnitte (0,3 µm) durch zwei ektodermale Epithelzellen (Zelle 1: a-c, Zelle 2: d-f). Die Mikrotubuli sind in Rot und die ppod-Färbung in Grün gezeigt. In c ist außerdem der Kern mit TO-PRO-3 gegengefärbt (blau). Die weiß umrandeten Bereiche sind unter den jeweiligen Bildern vergrößert gezeigt. Bilder c und f sowie die entsprechenden Vergrößerungen zeigen die Überlagerung des Tubulin- und des ppod-Signals.

2.3.4.2 14-3-3/Tubulin Doppelfärbungen

Ebenso wie für ppod4 und Tubulin wurden auch für 14-3-3 und Tubulin Doppelfärbungen auf Hydra Mazeraten gemacht. Da Tubulin als 14-3-3 Bindeprotein isoliert wurde, und in Ko-Immunpräzipitationen gezeigt wurde, dass beide Proteine interagieren (Abb. 2.24), erwartete man zumindest partielle Ko-Lokalisation. Abbildung 2.52 zeigt einen Ausschnitt aus einer ektodermalen Epithelzelle in einem Mazerat, die mit dem Tubulin Antikörper WA3 (rot) und dem 14-3-3 Antikörper K19 (grün) gefärbt wurde. Die Mikrotubuli sind deutlich zu erkennen. Die 14-3-3 Färbung ist nicht nur homogen, sondern auch punktförmig. In einigen Fällen scheinen die 14-3-3 Punkte entlang der Mikrotubuli Bahnen zu verlaufen, was auf eine Interaktion zwischen 14-3-3 und Tubulin bzw. zwischen 14-3-3 und Mikrotubuli-assoziierten Vesikeln hindeuten könnte.

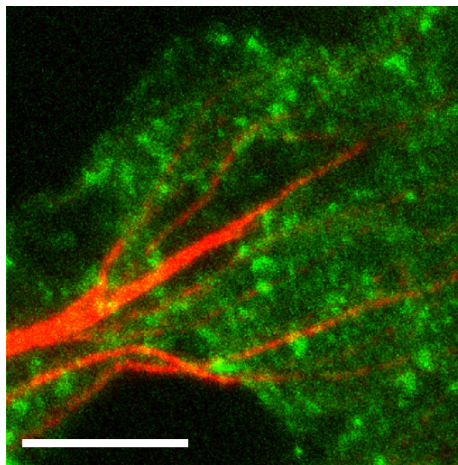


Abb. 2.52: 14-3-3/Tubulin Doppelfärbungen auf Hydra Mazeraten.

Ausschnitt einer ektodermalen Epithelzelle, die mit Antikörpern gegen Tubulin und 14-3-3 gefärbt wurde. Die Mikrotubuli sind in Rot und die 14-3-3 Färbung in Grün dargestellt. Es handelt sich um eine Projektion mehrerer optischer Schnitte. Der Größenstandard entspricht 10 μm .

2.3.4.3 14-3-3/ppod4 Doppelfärbungen

Da ppod4 als 14-3-3 Bindeprotein isoliert wurde, wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen 14-3-3 und ppod4 durchgeführt, um zu untersuchen, ob die beiden Proteine ko-lokalisieren. Abbildung 2.53 zeigt optische Schnitte durch ein intaktes Tier, das nach Fixierung mit Lavdovsky zuerst mit dem 14-3-3 Antikörper K19 und anschließend mit dem Antikörper gegen ppod4 gefärbt wurde. Dargestellt sind einzelne konfokale Schnitte nahe der apikalen Zelloberfläche mit einer Dicke von 0,5 µm. Im roten Kanal sieht man jeweils die 14-3-3 Färbung, während im grünen Kanal die ppod-Färbung zu sehen ist. In der rechten Spalte wurden beide Färbungen übereinandergelegt. Man sieht, dass es an einigen Stellen zu einer Überlagerung der 14-3-3- und der ppod-Färbung kommt (dies führt an diesen Stellen zu einer gelben Färbung). Stellen, wo eine solche Ko-Lokalisation besonders deutlich ist, wurden umrahmt. Es sind jedoch nicht alle ppod-positiven Vesikel auch positiv für 14-3-3. Dies kann möglicherweise mit der großen Vielzahl von 14-3-3 Bindeproteinen in einer Zelle erklärt werden. Der Teil der 14-3-3 Proteine, der in diesen Färbungen nicht an ppod zu binden scheint, war im Moment der Fixierung an andere zelluläre Zielproteine gebunden.

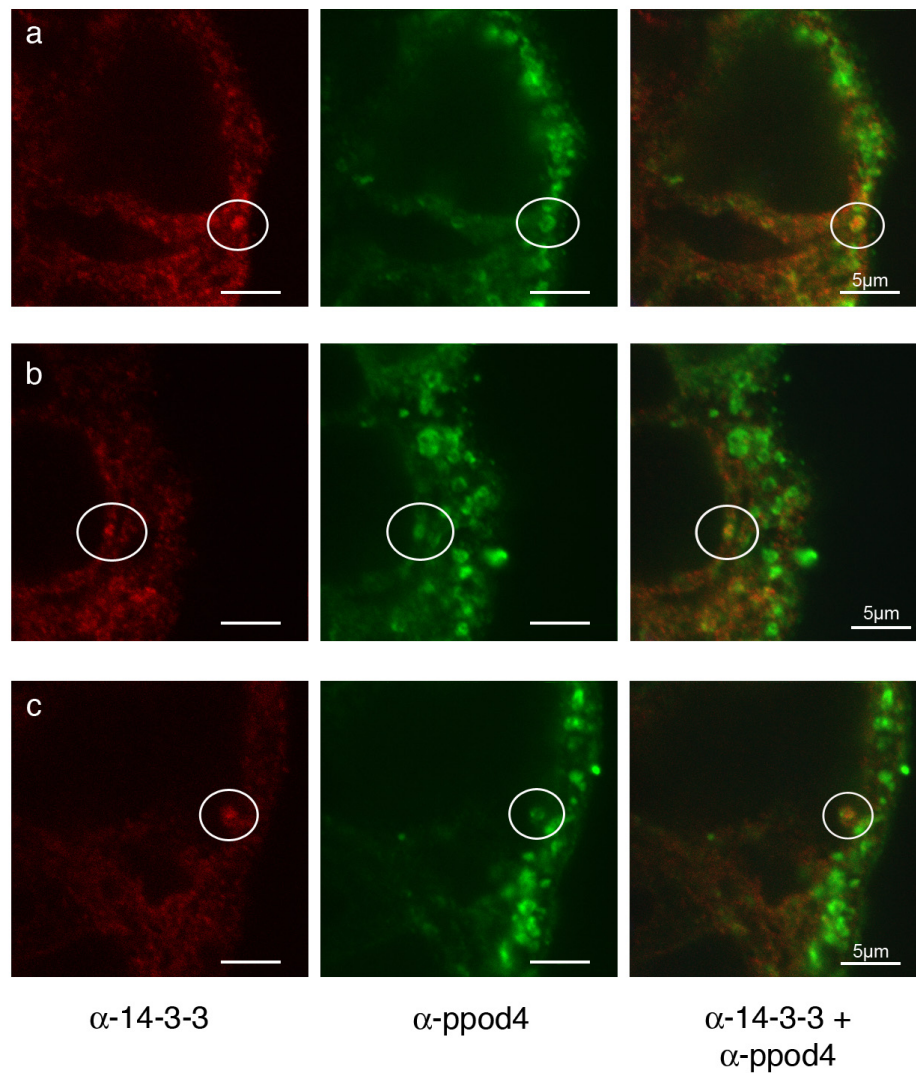


Abb. 2.53: 14-3-3/ppod4 Doppelfärbungen auf intakten Tieren.

Optische Schnitte (0,5 μ m) durch drei verschiedene Regionen (a, b, c) eines mit Lavdovsky fixierten Tieres. Das 14-3-3 Signal ist in Rot, das ppod Signal in Grün dargestellt. In der rechten Spalte ist die Überlagerung beider Signale gezeigt.

2.3.4.4 Ko-Lokalisation von 14-3-3-GFP und Aktin

Aktin wurde als 14-3-3 Bindeprotein isoliert. Daher sollte untersucht werden, ob in Immunfärbungen eine Ko-Lokalisation von 14-3-3 und Aktin nachgewiesen werden konnte. Dafür wurden die 14-3-3 Gene in den HotG-Vektor kloniert, wo sie unter Kontrolle des Hydra Aktinpromotors als N-terminales Fusionsprotein mit GFP exprimiert wurden (HyA-GFP bzw. HyB-GFP). Die Plasmid-DNA wurde auf Gold-Kügelchen gefällt und diese per particle gun in Hydrazellen eingebracht (Bottger et al., 2002). Die Verteilung des Fusionsproteins wurde per konfokaler Mikroskopie untersucht. Das Aktin Zytoskelett in den mit 14-3-3-GFP transformierten Zellen wurde mit Phalloidin sichtbar gemacht. Abbildung 2.54 zeigt verschiedene Ausschnitte von ganzen Tieren mit einzelnen transformierten ektodermalen Epithelzellen. In den Bildern a-c sind Einzelschnitte durch den Basalbereich dieser Epithelzellen mit einer Dicke von 1 μm dargestellt. Im roten Kanal ist jeweils das Aktin Zytoskelett und im grünen Kanal das GFP-Signal gezeigt. Man kann deutlich die im Basalbereich der Epithelzellen liegenden, mit Phalloidin angefärbten, Muskelfasern erkennen (vergleiche dazu auch die Phalloidinfärbungen in Abb. 2.22). Im Bereich der Muskelfasern kommt es zu einer Überlagerung des 14-3-3- und des Aktin-Signals, was an der gelben Farbe zu erkennen ist. In der rechten Spalte sind zur Orientierung alle optischen Schnitte als Projektionen übereinandergelagert und außerdem die Kernfärbung (blau) gezeigt.

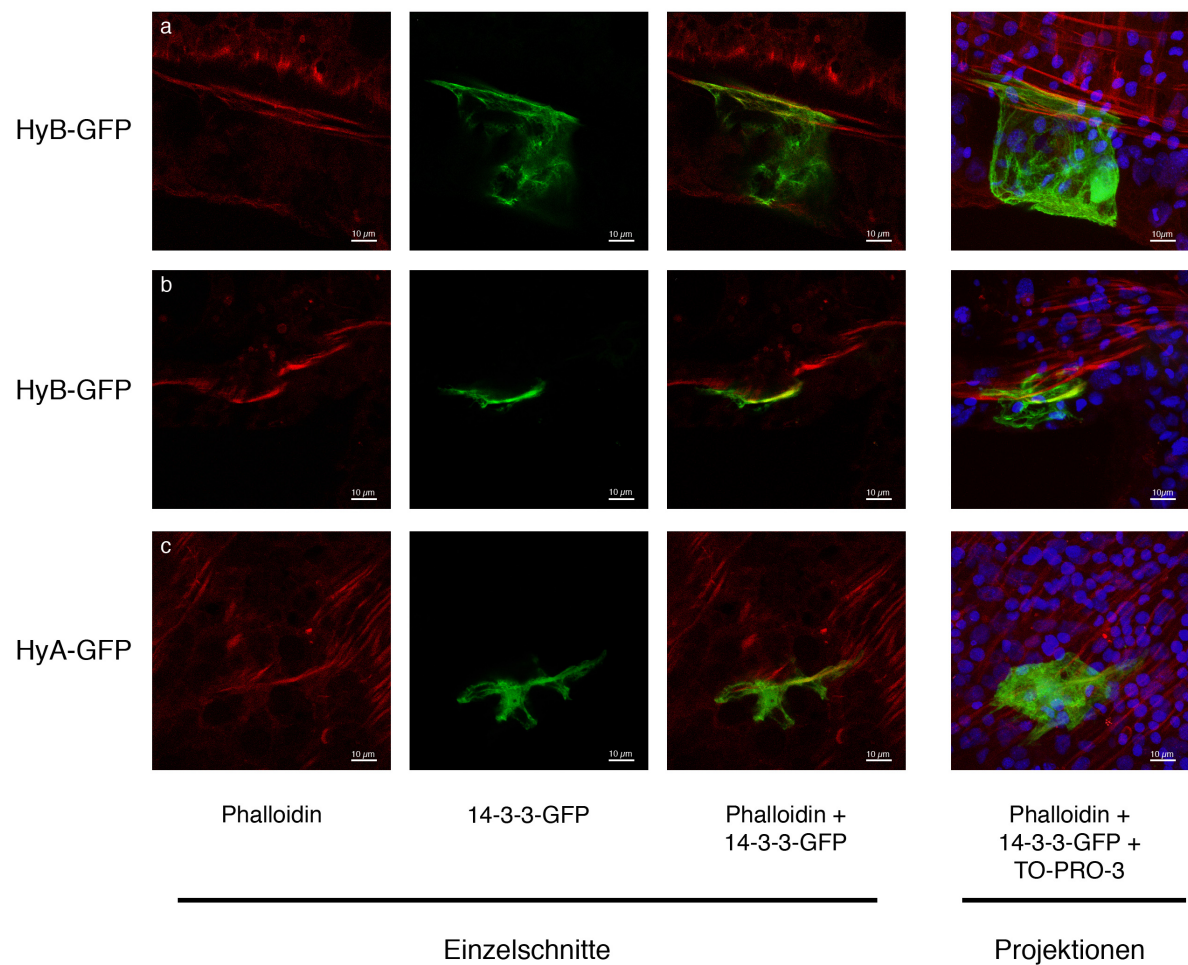


Abb. 2.54: Ko-Lokalisation von 14-3-3-GFP und Aktin im Basalbereich von Epithelzellen. Hydren wurden mit 14-3-3-GFP beschossen, 1 h bei 4°C mit 4% PFA in Hydramedium fixiert und mit Phalloidin nachgefärbt. Dargestellt sind drei verschiedene transformierte Zellen (a, b, c). Das GFP-Signal ist im grünen und das Phalloidin-Signal im roten Kanal zu sehen. In den Spalten 1, 2 und 3 sind Einzelschnitte mit einer Dicke von 1 µm gezeigt. In Spalte 4 sind zur Verdeutlichung der Zellformen die entsprechenden Projektionen gezeigt. Ko-Lokalisation von 14-3-3 und Aktin führt zu einer gelben Farbe.

Anschließend wurden Einzelschnitte der Apikalbereiche solcher transformierter und mit Phalloidin nachgefärbter Zellen im konfokalen Mikroskop untersucht. Im Apikalbereich von Epithelzellen kommt Aktin hauptsächlich entlang der Zellgrenzen vor, was in der Aufsicht als Ring erscheint. Die apikale Oberfläche ist schwächer gefärbt als die Zellgrenzen. Das 14-3-3-GFP-Signal überlappt an einigen Stellen mit dem kortikalen

Aktin, besonders im Bereich der Zellgrenzen. Dies ist in Abbildung 2.55 dargestellt. Gezeigt sind 1 μm dicke Einzelschnitte der apikalen Oberflächen zweier mit HyB-GFP transformierter Zellen. Das kortikale Aktin ist im roten (a, d) und das GFP Signal im grünen Kanal (b, e) dargestellt. In c und f sind beide Kanäle übereinander gelegt. Im Bereich der Zellgrenzen ist eine Überlagerung des 14-3-3- mit dem Aktin-Signal an der gelben Farbe in diesem Bereich zu erkennen.

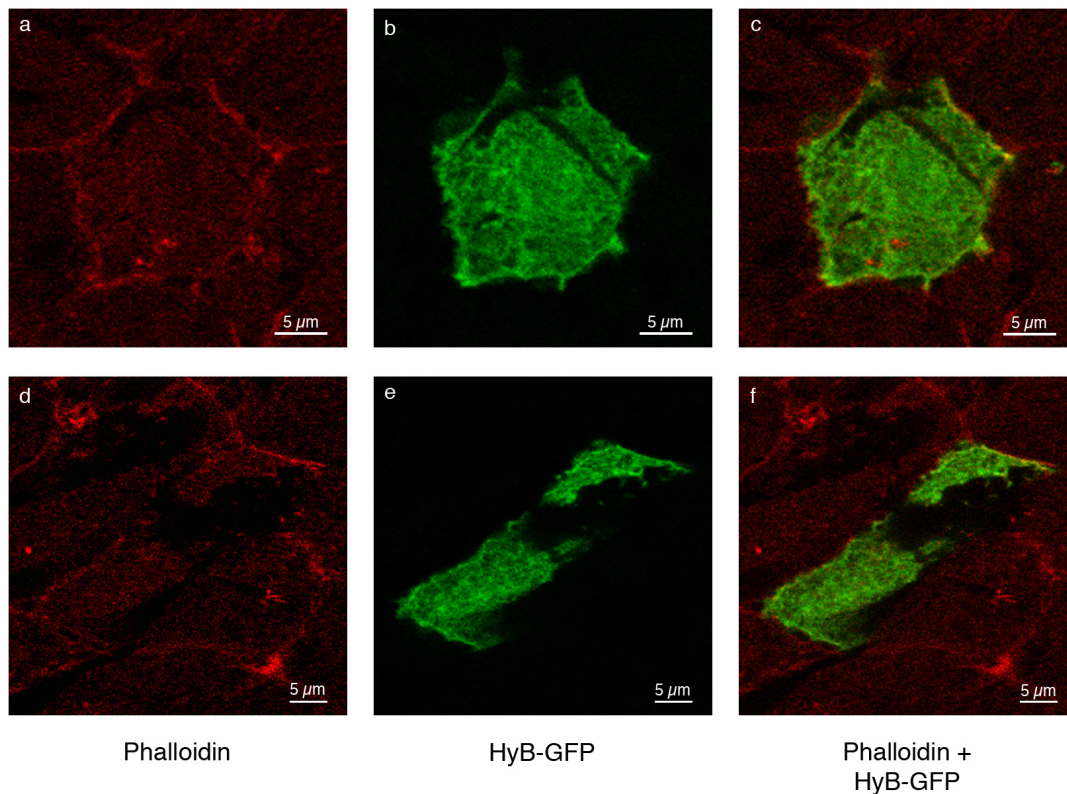


Abb. 2.55: Ko-Lokalisation von 14-3-3-GFP und Aktin im Apikalbereich von Epithelzellen. Apikale Schnitte (1 μm) durch Hydren, die, wie in Abb. 2.54 beschrieben, mit 14-3-3-GFP transformiert und mit Phalloidin nachgefärbt wurden. Im roten Kanal ist das apikale Aktin Zytoskelett zu sehen (a, d). Im grünen Kanal ist das GFP Signal in diesem Bereich dargestellt (b, e). In c und f wurden beide Färbungen übereinander gelagert. Bereiche, in denen 14-3-3 und Aktin ko-lokalisieren erscheinen gelb.

Zusammenfassend kann man sagen, dass 14-3-3 und Aktin sowohl im Bereich der basalen Muskelfasern als auch im apikalen Bereich von Epithelzellen teilweise ko-lokalisieren.

3. Diskussion

3.1 Charakterisierung von 14-3-3 Proteinen in Hydra

14-3-3 Proteine sind stark konservierte Proteine, die in allen bisher untersuchten Eukaryonten vorkommen. Durch Bindung an phosphorylierte und nicht-phosphorylierte Zielproteine regulieren 14-3-3 Proteine eine Vielzahl unterschiedlicher Signaltransduktionswege. In höheren Tieren und in Pflanzen gibt es multiple Isoformen. In phylogenetisch einfachen Vielzellern existieren dagegen meist nur zwei Isoformen. In einer Hydra EST Sammlung wurden drei 14-3-3 Isoformen gefunden, wobei die beiden Isoformen HyA und HyB häufigere mRNAs darstellen und daher vermutlich stärker exprimiert werden als HyC. In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen nur auf HyA und HyB eingegangen. Die drei in Hydra gefundenen 14-3-3 Proteine zeigen starke Sequenzhomologie zu 14-3-3 Proteinen aus anderen Organismen (Abb. 2.1). Die Aminosäuren, die an der Bindung von Zielproteinen beteiligt sind, sind ebenfalls konserviert.

14-3-3 Proteine werden in allen Zelltypen von Hydra exprimiert. Die Auftrennung der einzelnen Zelltypen durch Elutriation zeigte aber, dass die einzelnen Isoformen nicht in allen Zellen gleich stark exprimiert werden (Abb. 2.4). Es ist bekannt, dass es in elutrierten Zellen Zelltyp-spezifische Expression von Genen gibt (Holstein et al., 1992).

14-3-3 Proteine in Hydra bilden Homo- und Heterodimere

Es ist bekannt, dass 14-3-3 Isoformen aus Pflanzen und Tieren Homo- und Heterodimere bilden können und dass die Kombination der unterschiedlichen Isoformen die Basis für das breite Spektrum an zellulären Funktionen bildet (Wu et al., 1997).

In Far Western Overlay Versuchen wurde gezeigt, dass Hydra 14-3-3 Proteine ebenfalls Homo- und Heterodimere bilden können (Abb. 2.9). HyA bildet sowohl Homodimere mit sich selbst als auch Heterodimere mit rekombinantem HyB. In Zelllysaten von Hydra interagiert es mit mehreren Isoformen. HyB dagegen bildet im Far Western Overlay

keine Homo-, sondern nur Heterodimere mit rekombinantem HyA. In Zelllysaten interagiert es nur mit einer Isoform, so dass man davon ausgehen kann, dass diese Isoform HyA darstellt. Western Blots mit dem 14-3-3 Antikörper K19 zeigen, genau wie Far Western Overlays mit Dig-markiertem HyA, drei Banden, die den drei Isoformen entsprechen könnten.

Obwohl 14-3-3 HyB im Far Western Overlay keine Homodimere bilden kann, kann es im Yeast Two Hybrid System mit sich selbst interagieren (Abb. 2.8). Die unterschiedlichen Ergebnisse für 14-3-3 HyB im Overlay und im Yeast Two Hybrid System könnten mit den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen zusammenhängen. Im Far Western Overlay interagiert ein natives Protein mit einem denaturierten Protein, das auf einer Membran immobilisiert wurde. Im Yeast Two Hybrid System dagegen interagieren zwei native Proteine miteinander. Möglicherweise kann 14-3-3 HyB nur Homodimere bilden, wenn beide Monomere korrekt gefaltet sind.

Intrazelluläre Lokalisation von 14-3-3 Proteinen

Immunfluoreszenzstudien mit einem 14-3-3 Antikörper haben gezeigt, dass 14-3-3 Proteine in Hydra im Zytoplasma sowohl homogen als auch vesikulär vorkommen (Abb. 2.6 und 2.7). Außerdem gibt es auch 14-3-3 Proteine im Kern (Abb. 2.7). Kernlokalisation von 14-3-3 ist sowohl aus Pflanzen als auch aus Säugern bekannt (Bihn et al., 1997; Imhof and Wolffe, 1999; Brunet et al., 2002; Paul et al., 2005). Das Vorkommen von 14-3-3 in verschiedenen Zellkompartimenten wurde in Westernblots bestätigt (Abb. 2.5). Die unterschiedliche Lokalisation repräsentiert vermutlich die Verteilung unterschiedlicher Bindepartner. Umgekehrt kann 14-3-3 durch Bindung an ein Zielprotein auch dessen intrazelluläre Verteilung verändern. In Hydra verstärkte sich die Kernlokalisation von 14-3-3, wenn man die Tiere hungern ließ (Pauly et al., 2003). Dieser Befund deutet darauf hin, dass 14-3-3 in Hydra eine Rolle bei der Regulation von Transkription unter verschiedenen physiologischen Zuständen spielt.

Dies wird unterstützt von der Tatsache, dass 14-3-3 in Nahrungsgranula von Epithelzellen vorkommt. Die Nahrungsgranula enthalten nicht nur direkt nach dem Füttern, sondern auch mehrere Wochen später noch 14-3-3 Proteine (Pauly et al., 2003). In Pflanzen wurde die Rolle von 14-3-3 Proteinen bei der Regulation von Metabolismus beschrieben. 14-3-3 Proteine regulieren dort die Stabilität von Enzymen, die am Zucker-Haushalt beteiligt sind (MacKintosh, 1998; Cotelle et al., 2000) und haben Einfluss auf die Speicherung von Stärke (Sehnke et al., 2001). Man kann spekulieren, dass 14-3-3 in Hydra eine ähnliche metabolische Rolle in den Nahrungsgranula spielt. Möglicherweise reguliert es dort Enzyme, die bei der Speicherung von Nahrung gebraucht werden.

3.2 Isolierung und Identifizierung von 14-3-3 Bindeproteinen aus Hydra mit Hilfe einer 14-3-3 Affinitätssäule und Massenspektrometrie

Verschiedene Mechanismen der Interaktion zwischen 14-3-3 Proteinen und deren Bindepartnern

Es wurden zwei verschiedene Methoden angewendet, um 14-3-3 Bindeproteine in Hydra nachzuweisen. Zum Einen wurden die Bindeproteine mit DIG-markierten 14-3-3 Sonden im Far Western Overlay nachgewiesen. Zum Anderen wurden 14-3-3 Bindeproteine in einer Affinitätssäule an immobilisiertes 14-3-3 gebunden. Die beiden Methoden unterscheiden sich jedoch in der Art und Weise, wie die Zielproteine dabei an 14-3-3 binden. Aus diesem Grund können bei beiden Versuchen unterschiedliche 14-3-3 Bindeproteine gefunden werden.

Im Far Western Overlay binden DIG-markierte 14-3-3 Proteine an die auf einer Membran immobilisierten, denaturierten Bindeproteine. Dabei werden nur direkte Interaktionen nachgewiesen. Wenn die 14-3-3 Sonde mit dem Phosphopeptid Peptid C vorinkubiert wurde, verschwand die Bindung an die Zielproteine (Abb. 2.12). Dies beweist, dass die Interaktion dieser Proteine mit 14-3-3 spezifisch ist. Wenn das Zelllysate vorab mit λ -Phosphatase inkubiert wurde, ging die Bindung an 14-3-3 ebenfalls verloren

(Abb. 2.13). Dies bestätigt, dass die Interaktionen der Hydraproteine mit der 14-3-3 Sonde Phosphorylierungs-abhängig sind.

Bei der Affinitätssäule dagegen binden native Proteine an 14-3-3. Dabei gibt es, anders als beim Far Western Overlay, mehrere Möglichkeiten der Bindung. Zum einen binden, wie beim Overlay, Proteine mit einem klassischen 14-3-3 Bindemotiv in einer Phosphorylierungs-abhängigen Weise direkt an 14-3-3. Diese Proteine werden durch Zugabe des phosphorylierten Kompetitor Peptids (Peptid C) eluiert.

Daneben gibt es jedoch auch noch die Möglichkeit der indirekten Bindung an 14-3-3. Dabei binden Proteine ohne 14-3-3 Bindemotiv an ein Protein im Hydralysat, das ein solches Motiv besitzt und an 14-3-3 binden kann („Huckepack“-Mechanismus). Über die Interaktion mit einem 14-3-3 Bindeprotein würden solche Proteine ebenfalls mit Peptid C eluiert werden. Im Far Western Overlay könnten diese Proteine jedoch nicht an 14-3-3 binden. Ein ähnlicher Mechanismus könnte erklären, warum beide 14-3-3 Isoformen ebenfalls an die 14-3-3 Säule binden und von ihr eluiert wurden. Möglicherweise interagierten die 14-3-3 Proteine schon im Hydralysat mit Zielproteinen. Wenn ein Zielprotein zwei 14-3-3 Bindestellen hat, könnte es gleichzeitig an endogenes 14-3-3 aus dem Lysat und an das rekombinante 14-3-3 der Säule binden. Auf diese Weise könnten endogene 14-3-3 Proteine in einem Huckepackmechanismus an der Säule zurückgehalten worden sein. Andere Arbeitsgruppen, die mit einer Affinitätssäule 14-3-3 Zielproteine suchten, fanden ebenfalls 14-3-3 Isoformen im Eluat (Rubio et al., 2004).

Es gibt jedoch auch eine Reihe von 14-3-3 Bindeproteinen, die ein nicht-klassisches Bindemotiv enthalten (Jaspert and Oecking, 2002; Mangin et al., 2004) oder die kein solches Motiv besitzen und die sogar Phosphorylierungs-unabhängig an 14-3-3 binden (Andrews et al., 1998; Petosa et al., 1998; Masters et al., 1999; Zhai et al., 2001). Ein Beispiel für eine solche Bindung an 14-3-3 ist ADP-Ribosyltransferase Exoenzym S (ExoS) von *Pseudomonas aeruginosa*. Obwohl die Bindung dieses Enzyms an 14-3-3 unabhängig von Phosphorylierung ist, kann die Interaktion dennoch durch ein phosphoryliertes Peptid unterbunden werden (Masters et al., 1999). Dies deutet

darauf hin, dass die Bindung des nicht-phosphorylierten Proteins ExoS ebenfalls in dem amphipatischen Kanal des 14-3-3 Dimers erfolgt, also an der gleichen Stelle wie die Bindung phosphorylierter Proteine. Dies würde auch erklären, warum Proteine, die kein klassisches 14-3-3 Bindemotiv enthalten, trotzdem mit dem Kompetitor Peptid C von der 14-3-3 Säule eluiert wurden. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass die Bindung von Peptid C zu einer Konformationsänderung im 14-3-3 Dimer führt, so dass Proteine, die kein phosphoryliertes Bindemotiv haben, nicht mehr mit 14-3-3 interagieren können und deshalb von der Säule eluiert werden.

Die isolierten 14-3-3 Bindeproteine fallen in unterschiedliche Gruppen

Mit der 14-3-3 Affinitätssäule wurden 23 14-3-3 Bindeproteine identifiziert (siehe Tabelle 1, S. 43f). Die Größen aller Proteine bis auf zwei Ausnahmen stimmen mit der Größe der jeweiligen Gelbande überein, die mit LC-MS analysiert wurde.

13 der Proteine besitzen ein klassisches 14-3-3 Bindemotiv, das mit Hilfe der Motivsuchmaschine scansite (<http://scansite.mit.edu/>) identifiziert wurde. 10 Proteine enthielten kein klassisches Bindemotiv. Zwei dieser 10 Proteine sind HyA und HyB selbst, die nicht über ein solches Motiv, sondern über ihre N-Termini dimerisieren. Mögliche Mechanismen, wie Proteine ohne klassisches Bindemotiv an der Affinitätssäule zurückgehalten werden können, wurden im vorangegangenen Abschnitt diskutiert.

Die isolierten 14-3-3 Bindeproteine fallen in unterschiedliche funktionelle Gruppen. Eine Gruppe enthält Proteine, die an der Regulation von Stoffwechselfvorgängen beteiligt sind. Bislang war die Beteiligung von 14-3-3 Proteinen an der Regulation des Stoffwechsels hauptsächlich aus Pflanzen bekannt (Moorhead et al., 1999). Vorangegangene Arbeiten ließen bereits auf eine Beteiligung von 14-3-3 an der Regulation von Metabolismus in Hydra schließen (Pauly et al., 2003). Einige der hier in Hydra gefundenen Proteine (ATP-Synthase, GAPDH) sind schon aus Pflanzen als 14-3-3 Bindeproteine bekannt (Bunney et al., 2001; Huber et al., 2002; Bustos and Iglesias, 2003). Mittlerweile wurden metabolische 14-3-3 Interaktionspartner auch in anderen tierischen Zellen gefunden (Rubio et al., 2004). Die Durchführung einer weiteren 14-3-3

Affinitätssäule, dann aber mit gehungerten Hydren, könnte Aufschluss darüber geben, ob sich unter geänderten physiologischen Zuständen andere 14-3-3 Bindeproteine isolieren lassen.

Eine zweite Gruppe beinhaltet Proteine, die an der Regulation von Proteinbiosynthese bzw. -faltung und damit auch an der Regulation von Wachstum beteiligt sind. Auch in dieser Gruppe gibt es 14-3-3 Interaktionspartner (EF-2, EF1-alpha und Hsp70), die bereits aus anderen Organismen bekannt sind (Rubio et al., 2004).

Eine weitere Klasse von 14-3-3 Bindeproteinen beinhaltet Proteine, die an Calcium Signalwegen beteiligt sind. Allerdings besitzt keines der drei Proteine dieser Gruppe ein klassisches 14-3-3 Bindemotiv. Es besteht daher die Möglichkeit, dass diese Proteine in einem Huckepack-ähnlichen Mechanismus durch Interaktion mit einem 14-3-3 Bindeprotein in der Säule zurückgehalten wurden (s.o.). Es gibt Hinweise darauf, dass 14-3-3 indirekt an der Regulation von Calcium-abhängigen Prozessen in der Zelle beteiligt ist (Chow and Davis, 2000; Thulin et al., 2001; Davare et al., 2004; Li et al., 2004), hauptsächlich durch Bindung von Proteinen, die in Calcium-abhängiger Weise phosphoryliert werden. Im Fall von Calmodulin wurde im Yeast Two Hybrid System und in in vitro Bindestudien außerdem gezeigt, dass dieses Protein direkt mit 14-3-3 interagieren kann (Luk et al., 1999).

Eine vierte Gruppe umfasst Zytoskelett Proteine. Auch einige Proteine dieser Gruppe (Aktin, Tubulin α und β , Tropomyosin) sind bereits als 14-3-3 Bindeproteine bekannt (Chen and Yu, 2002; Jin et al., 2004; Rubio et al., 2004). Mögliche Funktionen von 14-3-3 bei der Regulation des Zytoskeletts und des Vesikeltransports wurden vorgeschlagen, aber bis jetzt ergibt sich noch kein klares Bild (Roth and Burgoyne, 1995; Roth et al., 1999; Gohla and Bokoch, 2002). Zwei Proteine dieser Gruppe (ppod3 und ppod4) wurden bisher nur in Hydra identifiziert und stellen deshalb neue 14-3-3 Interaktionspartner dar. Ppod-Proteine besitzen Fascin-Domänen und könnten daher ebenfalls an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sein.

3.3 ppod ist ein neues 14-3-3 Bindeprotein in Hydra

Es gibt vier ppod-Isoformen in Hydra (ppod1-4). Die Isoformen zeigen auf Aminosäureebene sehr starke Ähnlichkeiten. Ppod1 wird hauptsächlich im Fuß exprimiert, während ppod2 im Rumpf exprimiert wird (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002). Über die Expressionsmuster von ppod3 und ppod4 liegen noch keine Daten vor. Alle vier Proteine besitzen jeweils zwei so genannte Fascin- oder β -trefoil Domänen.

Neben Fascin selber gibt es eine Reihe weiterer Proteine, die eine ähnliche Domänenstruktur aufweisen. Beispiele hierfür sind Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGFs), Interleukin-1 (IL-1) und Hisactophilin (Habazettl et al., 1992; Ponting and Russell, 2000). Die Kristallstruktur von FGF hat gezeigt, dass ein β -trefoil aus sechs zweisträngigen β -hairpins besteht, von denen drei ein Fass bilden, während die anderen drei einen dreieckigen Deckel auf dem Fass bilden (Abb. 2.31) (Murzin, 1992; Swindells and Thornton, 1993).

Fascin besteht aus vier Fascin- oder β -trefoil Domänen. Die ppod Proteine aus Hydra dagegen enthalten nur zwei Fascin-Domänen (Abb. 2.28 und 2.29). Auf Aminosäureebene zeigen die ppod Proteine nur sehr geringe Homologie zu Fascin. Auf Ebene der Sekundärstruktur weisen sie jedoch Ähnlichkeiten zu Fascinen auf, da sie eine ähnliche Anordnung von β -Strängen und internen Wiederholungen haben (Abb. 2.30 und 2.31).

Wir fanden in genomischen Sequenzen sowohl von Maus als auch von *Danio rerio* (Zebrafisch) jeweils ein ppod-ähnliches Protein. Diese Proteine haben, genau wie die ppod Proteine in Hydra, nur zwei Fascin Domänen. Über die Funktion dieser Proteine ist noch nichts bekannt.

Ein gegen das ppod4 Protein gerichteter Antikörper, der aufgrund der starken Sequenzübereinstimmungen der ppod-Isoformen aber vermutlich auch die drei anderen Isoformen erkennt, färbt Membranen von sekretorischen Vesikeln, die an der apikalen Seite ektodermaler Epithelzellen in Hydra konzentriert sind (Abb. 2.39 und 2.40). In nicht-epithelialen Zellen (interstitiellen Zellen, Nervenzellen und Drüsenzellen) werden ähnliche Vesikel gefärbt, die jedoch gleichmäßig verteilt sind.

Ppod-Proteine wurden in Hydra erstmals in Zusammenhang mit einer Vesikel-assoziierten Peroxidase Aktivität beschrieben (Hoffmeister-Ullerich et al., 2002). Hoffmeister-Ullerich et al. klonierten die Isoformen ppod1 und ppod2. Das ppod1 Protein wurde zusammen mit Peroxidase-positiven Vesikeln aus Fußgewebe von Hydra isoliert. Damals wurde postuliert, dass ppod selbst diese Peroxidase sei. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass ppod keine Peroxidase ist (Abb. 2.50). Es ist vielmehr peripher mit Vesikeln assoziiert, die diese Peroxidase-Aktivität besitzen.

Aufgrund der Anwesenheit von zwei Fascin Domänen in ppod untersuchten wir die Fähigkeit des Proteins, an Aktin zu binden und fanden Aktin bindende, aber nicht bündelnde Aktivität (Abb. 2.36 und 2.37). Außerdem wurde Aktin ebenfalls mit der Affinitätssäule gefunden (siehe Tabelle 1, S. 43f).

3.4 Tubulin ist ein weiteres Zytoskelett Protein, das mit 14-3-3 interagiert

Mit der 14-3-3 Affinitätssäule wurde Tubulin α und β als potentielles 14-3-3 Bindeproteine identifiziert (siehe Tabelle 1, S. 43 f). In vitro wurde bestätigt, dass Tubulin in Immunpräzipitationsversuchen mit 14-3-3 interagieren kann (Abb. 2.24). Allerdings ist diese Interaktion weder durch vorherige Inkubation der 14-3-3 Sonde mit Peptid C noch durch Behandlung mit Phosphatase zu inhibieren. Dies kann mehrere Gründe haben. Die Tatsache, dass Tubulin trotz Anwesenheit des Kompetitors Peptid C an 14-3-3 binden kann, könnte bedeuten, dass Tubulin nicht über ein klassisches Bindemotiv, sondern über eine andere Domäne mit 14-3-3 interagiert. Tatsächlich besitzt Tubulin α kein 14-3-3 Bindemotiv. Da nicht bekannt ist, welche der beiden Tubulin Formen der verwendete Tubulin Antikörper erkennt und beide Formen eine ähnliche Größe haben, könnte es sich bei dem Protein, das mit 14-3-3 ko-präzipitiert wird, um Tubulin α handeln. Dies würde auch erklären, warum die Behandlung mit λ -Phosphatase keinen Einfluss auf die Interaktion hat. Viele der Interaktionen, die nicht über ein klassisches Bindemotiv stattfinden, sind Phosphorylierungs-unabhängig (Masters et al., 1999). Tubulin wurde von anderen Gruppen mehrfach als 14-3-3 Interaktionspartner identifiziert (Jin et al., 2004; Rubio et al., 2004).

Zusammenfassend wurden folgende Befunde erzielt: Ppod, Aktin und Tubulin interagieren mit 14-3-3 Proteinen in Hydra. Ppod ist außerdem in der Lage, direkt an Aktin zu binden. Es stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen ppod-assoziierten, sekretorischen Vesikeln und dem Aktin- bzw. Tubulin Zytoskelett in Hydra gibt und ob 14-3-3 Proteine bei der Regulation der Sekretion beteiligt ist. Aufschluss darüber gaben die Ko-Lokalisationsexperimente (siehe Punkt 3.5).

3.5 Modell zu einer möglichen Verbindung zwischen sekretorischen Vesikeln, ppod Proteinen, dem Aktin-Zytoskelett, Mikrotubuli und 14-3-3 Proteinen

Es wurde gezeigt, dass ppod Proteine mit sekretorischen Vesikeln assoziiert sind, die in ektodermalen Epithelzellen dicht unter der apikalen Oberfläche konzentriert sind. Ähnliche Vesikel wurden in interstitiellen Zellen, Nervenzellen und Drüsenzellen gefunden. Ob es sich hierbei ebenfalls um sekretorische Vesikel handelt, ist unklar. Möglicherweise stellen ppod Proteine in Hydra eine Art von Vesikel-Hüllprotein dar. Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen ppod4 und Tubulin zeigen die Anordnung ppod-positiver Vesikel entlang von Mikrotubuli (Abb. 2.51). Dies könnte bedeuten, dass die ppod-positiven, sekretorischen Vesikel entlang von Mikrotubuli zur apikalen Zelloberfläche transportiert werden, wo es dann zur Verschmelzung der Vesikelmembran mit der Plasmamembran und zur Sekretion des Vesikelinhaltes kommt.

Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen 14-3-3 und Tubulin ergeben ein ähnliches Bild (Abb. 2.52). 14-3-3 liegt in granulären Strukturen vor, die zumindest teilweise mit Mikrotubuli überlappen. Bei Färbungen mit Antikörpern gegen ppod4 und 14-3-3 zeigen sich einige Vesikel sowohl positiv für ppod als auch für 14-3-3 (Abb. 2.53). Da ppod4 ein 14-3-3 Bindemotiv hat und an die 14-3-3 Affinitätssäule gebunden hat, ist die Ko-Lokalisation ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion zwischen 14-3-3 und ppod4. Die Tatsache, dass nicht alle ppod-positiven Vesikel auch positiv für 14-3-3 sind, ist dadurch zu erklären, dass 14-3-3 Proteine sehr viele verschiedene Bindepartner haben. Man würde daher nicht erwarten, dass zu jedem Zeitpunkt alles ppod von 14-3-3 gebunden ist und es dadurch zu einer vollständigen Ko-Lokalisation von 14-3-3 und ppod kommt.

Hydra Aktin wurde ebenfalls mit der 14-3-3 Affinitätssäule gefunden und besitzt ein 14-3-3 Bindemotiv (siehe Tabelle 1, S. 43f). Es wurde gezeigt, dass 14-3-3-GFP sowohl im Bereich der basalen Muskelfasern als auch im Bereich des Zellkortex mit Aktin ko-lokalisiert (Abb. 2.54 und 2.55). Es ist aus anderen Organismen bekannt, dass Aktin mit 14-3-3 interagieren kann (Chen and Yu, 2002; Rubio et al., 2004).

Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgendes Arbeitsmodell ableiten: Sekretorische Vesikel, deren Membran mit ppod Proteinen assoziiert ist, werden entlang von Mikrotubuli zur Zellperipherie transportiert. Es ist bis jetzt nicht bekannt, ob ppod direkt mit Tubulin interagieren kann oder über Adaptoren, z.B. Motorproteine. Ko-Immünpräzipitationen oder GST pulldowns mit Tubulin und ppod müssen dies klären. An der Zellperipherie verschmilzt die Vesikelmembran mit der Plasmamembran und der Inhalt der Vesikel wird sezerniert. Da ppod4 an Aktin binden kann, kann man spekulieren, dass die Vesikel über ppod an das kortikale Aktin Zytoskelett binden. Leider fehlten die notwendigen Antikörper, um diese Ko-Lokalisation direkt nachzuweisen. Da 14-3-3 im Bereich des Zellkortex partiell mit Aktin ko-lokalisiert, könnte es die Sekretion der ppod-positiven Vesikel regulieren. Die zum jetzigen Zeitpunkt vorhandenen Daten über die Lokalisation von Aktin, Tubulin, ppod und 14-3-3 sind in Abbildung 3.1 zusammengefasst.

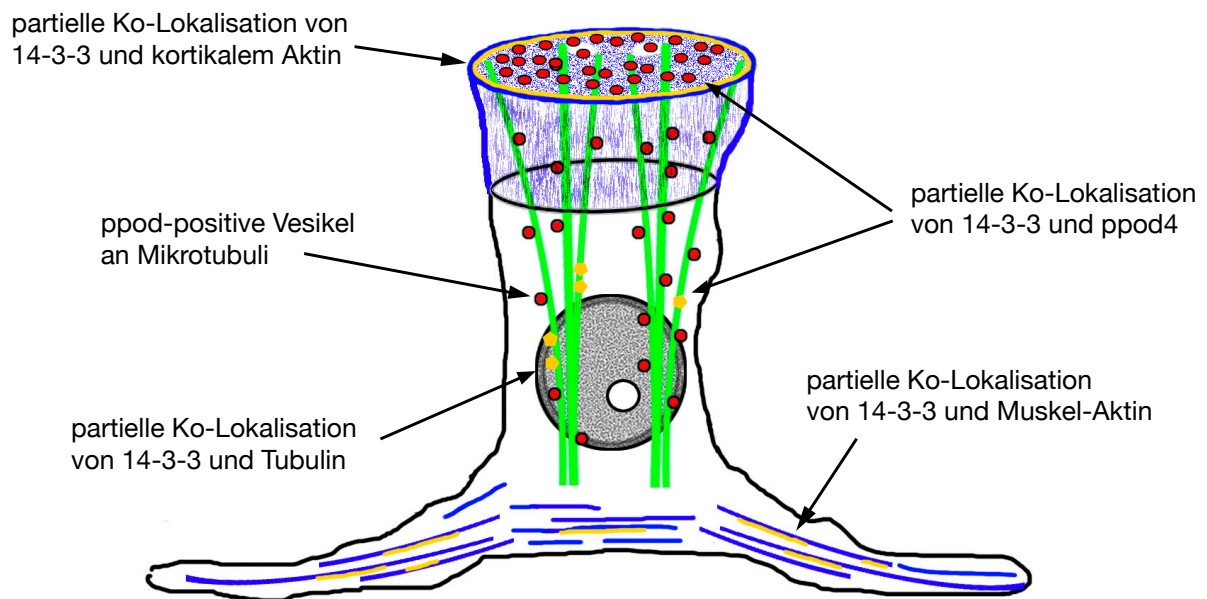


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Ko-Lokalisationen von 14-3-3, ppod, Aktin und Tubulin in Hydra Epithelzellen.

Das Aktin Zytoskelett (basales Muskelaktin und kortikales Aktin) ist in Blau dargestellt. Die Mikrotubuli sind grün und die ppod-positive Vesikel rot eingezeichnet. 14-3-3 ist in Gelb dargestellt, wobei anzumerken ist, dass 14-3-3 überall in der Zelle lokalisiert ist, es aber nur an Stellen eingezeichnet wurde, an denen es entweder mit Tubulin, Aktin oder ppod ko-lokalisiert.

Es gibt einige Hinweise auf eine Rolle von 14-3-3 bei Sekretion (Morgan and Burgoyne, 1992; Jones et al., 1995). Dabei ist sowohl bei Hefe als auch bei höheren Eukaryonten das Zytoskelett beteiligt. Interessanterweise gibt es dabei jedoch Unterschiede zwischen Hefe und höheren Eukaryonten.

In Hefe führt die Expression von dominant-negativem 14-3-3 zu Defekten im Aktin Zytoskelett und bei der Zielsteuerung von Vesikeln (Roth et al., 1999). Wenn filamentöses Aktin in Hefe als „Transportschiene“ für Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Zelloberfläche dient (Ayscough et al., 1997; Finger and Novick, 1998), könnte eine Störung des Aktin Zytosketts durch dominant-negatives 14-3-3 zur Folge haben, dass die sekretorischen Vesikel nicht mehr korrekt sortiert werden.

Bei Säugern dagegen wurde beobachtet, dass 14-3-3 Proteine Exozytose in permeabilisierten Nebennierenzellen stimulieren können, indem sie das kortikale Aktin Zytoskelett, das als Barriere der Sekretion entgegenwirkt, reorganisieren bzw. abbauen (Morgan and Burgoyne, 1992; Roth and Burgoyne, 1995). In Säugerzellen liegt Aktin nicht in Form von filamentösen „Schienen“ vor, sondern hauptsächlich als kortikale Barriere, die reorganisiert werden muss, damit Sekretion stattfinden kann. 14-3-3 in Hefe ist also nötig für den Aufbau/die Aufrechterhaltung des Aktin Zytoskeletts, damit die Vesikel korrekt sortiert werden können. In Säugern dagegen wird 14-3-3 benötigt, um das Aktin Zytoskelett abzubauen, oder zumindest zu reorganisieren, damit Vesikel sezerniert werden können.

In höheren Eukaryonten verläuft der Langstreckentransport vielmehr über das Mikrotubuli Zytoskelett. Die hier beobachteten ppod-positiven Vesikel, die an Tubulin Schienen lokalisiert sind, bestätigen dies und deuten an, dass ppod beim Tubulin-abhängigen Vesikeltransport eine Rolle spielen könnte. Es ist außerdem bekannt, dass 14-3-3 mit Tubulin und Mikrotubuli Motoren wie z.B. Kinesin interagieren kann und diese reguliert (Dorner et al., 1999; Ichimura et al., 2002; Jin et al., 2004; Rubio et al., 2004).

Bislang ist noch nicht klar, ob und auf welche Weise 14-3-3 in Hydra das Aktin- bzw. Tubulinzytoskelett und/oder die Exozytose von sekretorischen Vesikeln reguliert. Auch ist nicht klar, welche Rolle ppod dabei spielt. Es muss untersucht werden, ob Sekretion in Hydrazellen abhängig von ppod Proteinen ist. Dies kann in Zellen geschehen, in denen die Expression von ppod Proteinen durch RNAi herunter reguliert wird. In solchen Zellen könnte dann untersucht werden, ob sekretorische Vesikel immer noch zur apikalen Oberfläche transportiert werden.

3.6 Bcl-2 Proteine und 14-3-3 in Hydra

Mit der 14-3-3 Affinitätssäule wurden keine 14-3-3 Bindeproteine gefunden, die an der Regulation von Apoptose beteiligt sind. Dies war überraschend, da in anderen tierischen Zellen gezeigt wurde, dass 14-3-3 Proteine programmierten Zelltod regulieren, indem sie an Proteine binden, die in Antwort auf anti-apoptotische Stimuli phosphoryliert werden. Aus diesem Grund hätte man erwartet, mit der Affinitätssäule ebenfalls apoptotische 14-3-3 Bindeproteine in dem Hydralysat zu finden. Ein gut untersuchtes Beispiel für eine Regulation durch 14-3-3 ist Bad, ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie (Zha et al., 1996; Masters et al., 2001). In seiner nicht-phosphorylierten, aktiven Form assoziiert Bad mit der Mitochondrienmembran und führt zusammen mit anderen Mitgliedern der Bcl-2 Familie zur Ausschüttung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Lim et al., 2002). Cytochrom c aktiviert dann seinerseits die Prozessierung von Procaspasen und somit den programmierten Zelltod. Wenn Bad jedoch in Antwort auf ein Wachstumsfaktor Signal phosphoryliert wird, wird es von 14-3-3 gebunden und im Zytoplasma festgehalten und kann nicht mehr die Ausschüttung von Cytochrom c aktivieren. Ein weiteres Beispiel ist Bax, das ebenfalls durch die Interaktion mit 14-3-3 inhibiert wird (s.u.).

Die Tatsache, dass keine Mitglieder der Bcl-2 Familie als 14-3-3 Bindeproteine in Hydra gefunden wurden, kann mehrere Gründe haben. Es ist möglich, dass diese Proteine in so geringen Mengen exprimiert werden, dass sie nicht als sichtbare Proteinbanden aus dem Coomassie Gel der 14-3-3 Bindeproteine ausgeschnitten werden konnten. Die identifizierten 14-3-3 Bindepartner, z.B. GAPDH, Aktin oder Tubulin sind in normalen, unstimulierten Zellen vermutlich stärker exprimiert als pro-apoptotische Proteine. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass einige der in anderen tierischen Organismen beschriebenen apoptotischen Gene gar nicht in Hydra vorkommen. So wurde z.B. bis jetzt kein Gen für Bad in den Hydra ESTs gefunden. Allerdings sind die ESTs noch nicht komplett, so dass selten transkribierte Gene eventuell noch nicht sequenziert wurden und erst noch auftauchen. Im Falle von Bax, einem pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-2 Familie, das auch von 14-3-3 reguliert wird, besteht außerdem die Möglichkeit, dass es zwar an die 14-3-3 Säule gebunden hat, aber nicht von ihr eluiert werden

konnte. Der Grund hierfür liegt in der besonderen Art, wie Bax an 14-3-3 bindet. Bax bindet im nicht-phosphorylierten Zustand zwischen Helix 7 und Helix 9 an das 14-3-3 Dimer, während die meisten anderen Proteine mit Aminosäuren in Helix 3 und 5 von 14-3-3 interagieren (Tsuruta et al., 2004). Da die Interaktion nicht über den Kanal erfolgt, ist dies eine mögliche Erklärung, warum Bax nicht von dem Peptid C verdrängt und von der Säule eluiert werden konnte.

Deshalb wurde in einem unabhängigen Ansatz das Bax Gen per PCR aus Hydra cDNA amplifiziert und in Bakterien exprimiert. In einem GST pulldown Experiment konnte gezeigt werden, dass rekombinantes, bakteriell exprimiertes HyBax an rekombinantes 14-3-3 aus Hydra bindet (Abb. 2.20). Diese Interaktion erfolgte Phosphorylierungsunabhängig, da Proteine, die in Bakterien gebildet werden, nicht phosphoryliert sind. Der Befund, dass die Interaktion zwischen Bax und 14-3-3 nicht von einer Phosphorylierung des Bax Proteins abhängt, wird durch Versuche in Säugerzellen bestätigt.

Es wurde gezeigt, dass nicht-phosphoryliertes Bax in gesunden, nicht-apoptotischen Zellen von 14-3-3 im Zytoplasma festgehalten wird (Samuel et al., 2001; Nomura et al., 2003). Dies verhindert, dass Bax an die Mitochondrien translozieren und zur Ausschüttung von Cytochrom c und der Aktivierung von Caspasen führen kann. Nach einem apoptotischen Stimulus wird 14-3-3 (nicht Bax!) von c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) phosphoryliert (Tsuruta et al., 2004). Im phosphorylierten Zustand kann 14-3-3 nicht mehr an Bax binden, so dass dieses von der inhibitorischen Bindung an 14-3-3 befreit wird, an die Mitochondrien translozieren und dort Apoptose auslösen kann. Dies ist einer der wenigen Fälle, in denen die Interaktion zwischen 14-3-3 und einem Partner nicht von dem Phosphorylierungszustand des 14-3-3 Bindeproteins, sondern von der Phosphorylierung des 14-3-3 Proteins selbst abhängt. Weitere Tests müssen zeigen, ob die Interaktion zwischen HyBax und 14-3-3 auch in vivo stattfindet und ob 14-3-3 über die Interaktion mit Bax an der Regulation von programmiertem Zelltod in Hydra beteiligt ist.

4. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden 14-3-3 Proteine in Hydra näher charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass 14-3-3 HyA und HyB in allen Zelltypen exprimiert werden. Sie kommen sowohl im Zytoplasma als auch im Kern vor. Sie bilden Homo- und Heterodimere und binden an phosphorylierte Proteine in Hydralysaten.

Mit einer 14-3-3 Affinitätssäule wurden 23 14-3-3 Bindeproteine aus Hydra isoliert und durch Massenspektrometrie in Verbindung mit einer Hydra EST Datenbank identifiziert. Die 14-3-3 Bindeproteine fallen in verschiedene funktionelle Gruppen: metabolische Enzyme, Zytoskelett Proteine, Proteine, die an Calcium Signalwegen beteiligt sind, sowie solche mit Funktionen bei der Proteinbiosynthese. 14-3-3 Bindeproteine mit Stoffwechselfunktionen waren zu Beginn der vorliegenden Doktorarbeit nur aus Pflanzen bekannt. Inzwischen wurde jedoch auch in anderen tierischen Zellen gezeigt, dass 14-3-3 Proteine Stoffwechsellenzyme regulieren.

Neben den bekannten 14-3-3 Bindeproteinen wurden auch zwei neue Interaktionspartner identifiziert, die nur in Hydra vorkommen und denen bislang noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (ppod3 und ppod4). Ppod Proteine zeichnen sich durch die Anwesenheit so genannter Fascin-Domänen aus. Es konnte gezeigt werden, dass ppod Proteine in Epithelzellen mit der Membran sekretorischer Vesikel assoziiert sind, die dicht unterhalb der apikalen Zelloberfläche konzentriert sind. Ähnliche Vesikel kommen in interstitiellen Zellen, Nervenzellen und Drüsenzellen vor. In diesen Zelltypen sind die ppod-positiven Vesikel gleichmäßig im Zytoplasma verteilt. Es konnte gezeigt werden, dass ppod4 eine schwache Aktinbindefähigkeit hat, Aktin aber nicht bündeln kann, wie es für Fascin gezeigt wurde. Weitere Versuche sind nötig, um die genaue Funktion von ppod Proteinen beim Vesikeltransport oder der Vesikelbildung aufzuklären. Da ppod4 an Aktin binden kann, besteht die Möglichkeit, dass es die Vesikel am Aktin Zytoskelett verankert. Es muss untersucht werden, um was für Vesikel es sich bei den ppod-positiven Strukturen handelt, welche Rolle ppod bei deren Bildung und/oder Transport spielt, ob der Transport entlang des Tubulin Zytoskeletts verläuft und ob dieser Prozess von 14-3-3 reguliert wird.

Es wurde außerdem gezeigt, dass das pro-apoptotische Bcl-2 Familienmitglied HyBax in vitro an 14-3-3 binden kann und dass diese Interaktion Phosphorylierungsunabhängig ist. Es muss nun geklärt werden, ob die beiden Proteine auch in vivo miteinander interagieren und was für Auswirkungen diese Interaktion für HyBax und den programmierten Zelltod in Hydra hat. Dies könnte z.B. getestet werden, indem isolierte Mitochondrien mit HyBax inkubiert werden und die Freisetzung von Cytochrom c ins Medium nachgewiesen wird. Dann könnte untersucht werden, ob die Zugabe von 14-3-3 diese Bax-abhängige Cytochrom c-Freisetzung und damit das Auslösen von Apoptose verhindern kann, indem 14-3-3 Bax im Zytoplasma zurückhält.

5. Material und Methoden

Materialien und Bezugsquellen

Chemikalien

Acetonitril	Merck
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	Biorad
Agarose	Gibco BRL
Aktivierte CH Sepharose	Amersham Biosciences
Ammoniumhydrogencarbonat	BDH
Ampicillin	Sigma
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
APS	Sigma
Bacto Agar	Difco
Bromphenolblau	Merck
Calyculin A	Calbiochem
Chaps	Serva
Chloramphenicol	Serva
Coomassie-Blau	Roth
DAPI	Sigma
Diaminobenzidin	Fluka
Digoxigenin	Roche
DTT	Roche
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
FM 4-64	Invitrogen
HEPES	Sigma
Iodacetamid	Sigma
Isopropanol	Roth
Kolloidales Coomassie	Invitrogen
Leupeptin	Sigma
Magermilchpulver	Naturaflor, Töpfer
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Roth

Magnesiumsulfat	Fluka
Manganchlorid	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Roth
Natriumhydrogenphosphat-Hexahydrat	Merck
N-Octyl Glucosid	Sigma
Nukleotidtriphosphate	Peqlab
Ocadaic Acid (Natrium Salz)	Calbiochem
Pepstatin A	Sigma
Ponceau	Sigma
Pronase E	Fluka
Saccharose	Roth
SDS	Roth
Sucrose	Roth
Temed	Merck
TO-PRO-3 Iodid	Invitrogen
Trifluoressigsäure	Fluka
Tris	Gibco BRL
Triton X-100	Sigma
Trypsin (sequencing grade)	Roche
Vectashield	Vector Laboratories
X-Gal	Loewe Biochemica

Enzyme

Enzym	Hersteller
BamHI	New England Biolabs
EcoRI	New England Biolabs
Nhe1	New England Biolabs
Not1	New England Biolabs
Taq DNA-Polymerase	Peqlab
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs
SAP	USB
Sma1	New England Biolabs
λ -Phosphatase	New England Biolabs

Oligonukleotide

Primer	Nukleotidsequenz (5' → 3')
5' primer	AA(CT)(CT)T(ACGT)(CT)T(ACGT)(AT)(GC)(ACGT)GT(ACGT) GC(ACGT)TA(CT)AA(AG)AA(CT)
3' primer	TGCAT(AGT)AT(ACGT)A(AG)(ACGT)GT(ACGT)(GC)(AT)(AG) TC(CT)TT(AG)TA
5' HyA-EcoR1	CGGAATTCATGTCTCATCTAAGTGAGC
3' HyA-Xho1	CCGCTCGAGTTATTCGTTTTGTTTCATCTTGC
5' HyB-EcoR1	CGGAATTCATGGCTTCAACAGATTCTAAAGAAATTTTG
3' HyB-Xho1	CCGCTCGAGCTATTCTTCGGTAGTAG
5' HyA-Nhe1	CTAGCTAGCATGTCTCATCTAAGTGAGC
3' HyA-Sma1_ohne_Stop	TCCCCCGGGTTCGTTTTGTTTCATCTTGC
5' HyB-Nhe1	CTAGCTAGCATGGCTTCAACAGATTCTAAAG
3' HyB-Sma1_ohne_Stop	TCCCCCGGGTTCCTTCGGTAGTAGC
5' HyBax1_BamH1	CGGGATCCATGAAAGATCCTATGATGGCGAGATTTATG
3' HyBax1_Not1	ATAGTTTAGCGGCCGCTTAGCGATTTTCATAACAAATGCT GCCGC
5' ppod4-Bam-ohne-SP	CGGGATCCACATTAGAATGGAAAAAAGTTTATACAGTC
3' ppod4-Eco-mit-stop	CGGAATTCCTCATAAGTAACTATAACGAATCGTTCCC
5' UTR-BP520479-Nhe	CTAGCTAGCAAAGTACATTAAAGTTTTAGC
3' UTR-BP520479-Sma	TCCCCCGGGCCACGAATAAAGCAATG

Vektoren

pCR2.1-TOPO	Invitrogen
pRSET A	Invitrogen
HotG	Mihai Cikala, München
pGex4T-1	Amersham Biosciences

Hefe Vektoren (Dr. Heidi Feldmann, München)

pEG202	trägt das HIS3 Gen
pJG4-5	trägt das TRP1 Gen
pSH18-34	trägt das lacZ-Reporter gen und als Selektionsmarker das URA3 Gen;
pSH2-1-Gal4	Positivkontrolle

Protease-Inhibitor

Pefabloc SC (400 mM in DMSO) Roche

Phosphatase-Inhibitor

Phosphatase-Inhibitor I und II	Sigma
Vanadat	Sigma

Peptide

Name	Sequenz
Peptid C	-ARAApSAPA-
Kontrollpeptid	-WFYpSFLE-

Antikörper**Erstantikörper**

Antikörper	Firma	Verdünnung
anti-14-3-3 (K19)	Santa Cruz	1: 1000 (WB); 1: 500 (IF)
anti-ppod4	Davids	1: 1000 (WB); 1: 500 (IF)
anti-Tubulin (WA3)	Prof. M. Schliwa	1: 10
anti-GST	Karl Smythe, Dundee	1: 5000
Phalloidin-Alexa543	Dr. Ralph Gräf	1: 1000

Zweitantikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung
anti-DIG-HRP	Roche	1: 1000
anti-Kaninchen-HRP	Vector	1: 3000
anti-Maus-HRP	Vector	1: 3000
anti-Hühnchen-HRP	Sigma	1: 15000
anti-Maus-FITC	Sigma	1: 50
anti-Maus-Cy5	Dianova	1: 100
anti-Maus-Alexa633	Invitrogen	1: 100
anti-Hünchen-FITC	Sigma	1: 160
anti-Kaninchen-Cy3	Dianova	1: 500

Marker

DNA-Marker (Ladder Mix)	MBI-Fermentas
Protein-Marker (SDS-PAGE Standard Marker, Low Range)	Bio Rad
peqGOLD Prestained Protein-Marker IV	Peqlab
10 kD ladder	Gibco-BRL

Bakterienstämme

BL21 (DE3)	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3)
XL1-Blue MRF ⁻ -Stamm	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F ['] proAB lacIqZ ^q M15 Tn10 (Tetr)]

Hefestamm

EGY48	MATa, trp1, ura3, his3, leu2::pLexAop6-LEU2
-------	---

Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Amidoschwarz Färbelösung	250 µg/ml Amidoschwarz 90% Methanol 10% Essigsäure
Amidoschwarz Waschlösung	90% Methanol 10% Essigsäure
Ampicillin-Lösung	50 mg/ml Ampicillin in H ₂ O bidest, sterilfiltriert
APS-Lösung	0,1 g/ml APS
C10 Protease Inhibitor	1 mg/ml Pepstatin A 1 mg/ml Leupeptin 1 mg/ml Aprotinin
Chloramphenicol-Lösung	34 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol, sterilfiltriert
Coomassie-Blau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Brilliant Blue R250 10 % (v/v) Isopropanol 7 % (v/v) Essigsäure
Coomassie Schnellentfärber	40 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie Entfärber	10 % (v/v) Isopropanol 7 % (v/v) Essigsäure
Coupling Puffer	0,1 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl

DNA-Auftragspuffer (5x)	30% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylenblau
DIG-Puffer	25 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl
Dissoziationsmedium	3,6 mM KCl 6 mM CaCl ₂ 1,2 mM MgSO ₄ 6 mM Natrium Citrat 6 mM Natrium Pyruvat 6 mM Glucose 12,5 mM TES Puffer 50 mg/ml Rifampicin pH 6,9
EB Puffer	10 mM Tris/Cl pH 8,0
Entsalzungspuffer für Proteine	25 mM Hepes 1 mM DTT 20% Glycerol
Ethidiumbromidfärbelösung	1 µg/ml EtBr in TAE-Puffer
Gelfixierlösung	20% Methanol 3% Glycerol
HEPES Puffer	50 mM HEPES pH 7,5 500 mM NaCl 1 mM DTT
Hoch pH Puffer (pH 8,0)	50 mM Tris-Cl 0,5 M NaCl

Hydra Lysispuffer	<p>1% Triton X-100 1% Chaps 10 µg/ml Antipain Phosphataseinhibitor I + II (1:100 verdünnt) 4 mM Pefabloc 10 µg/ml C10 1 mM Vanadat 2 mM Mg-ATP 240 nM Ocadaic Acid Natrium Salz 1 µM Calyculin A TBS</p>
Lösung I	<p>50 mM Glucose 25 mM Tris/Cl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0</p>
Lösung II	<p>0,2 N NaOH 1% SDS</p>
Lösung III	<p>60 ml 5 M Kaliumacetat 11,5 ml Essigsäure 28,5 ml Wasser</p>
Niedrig pH Puffer (pH 4,0)	<p>50 mM Na Acetat 0,5 M NaCl</p>
Nativer Bindepuffer	<p>500 mM NaCl 20 mM NaPO₄ pH 7,4</p>
Osmotic shock Puffer	<p>20 mM Tris/Cl pH 8,0 2,5 mM EDTA 10 mM DTT 4 mM Pefabloc 10 µg/ml C10</p>

PBS (1 x für Proteine)	120 mM NaCl 10 mM NaHPO ₄ 2,7 mM KCl
PBS (25 x für Immuncytochemie)	3 M NaCl 1,25 M K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O 0,3 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
Ponceau-Färbelösung	0,1% Ponceau 5% Essigsäure
Proteaseinhibitor Cocktail (10x)	5 mg Pepstatin A 5 mg Approtinin 5 mg Leupeptin in 2,5 ml H ₂ O bidest lösen
Proteinauftragspuffer (2x)	85 mM Tris-HCl, pH 6.8 18 % (v/v) Glycerin 3,6 % (w/v) SDS 9 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Proteinauftragspuffer (4x)	170 mM Tris-HCl, pH 6.8 36 % (v/v) Glycerin 7,2 % (w/v) SDS 18 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Puffer M	250 mM Sucrose 5 mM Tris/HCl pH 7,5 10 µg/ml Antipain Phosphataseinhibitor I + II (1:100 verdünnt) 4 mM Pefabloc 10 µg/ml C10 1 mM Vanadat 2 mM Mg-ATP

SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 1,9 M Glycin 1 % (w/v) SDS pH 8.3
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris/Acetate, pH 8,3 5,71% Essigsäure 50 mM EDTA
TBS (10x)	250 mM Tris 1,4 M NaCl 27 mM KCl pH 7.4
TBS-Tween	0,1 % (v/v) Tween 20 in 1 x TBS
TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-HCl (pH 7.5) 10 mM EDTA (pH 8.0) autoklaviert
Wet-Blot Puffer (10x)	25 mM Tris 190 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol
Zytoplasmapuffer	25 mM HEPES pH 7,5 5 mM MgCl ₂ 10 µg/ml Antipain Phosphataseinhibitor I + II (1:100 verdünnt) 4 mM Pefabloc 10 µg/ml C10 1 mM Vanadat 2 mM Mg-ATP 240 nM Ocadaic Acid Natrium Salz 1 µM Calyculin A

Lösungen für Immunfärbungen

Lavdovsky	5 Teile Formaldehyd 2 Teile Essigsäure 25 Teile Ethanol 20 Teile Wasser
Permeabilisierungslösung	0,5% Triton X-100 in PBS
Blockierungslösung	1% BSA 0,1% Triton X-100 in PBS
Mazerierungsflüssigkeit	1 Teil Glycerin 1 Teile Essigsäure 13 Teile Wasser
PBS (25 x für Immunzytochemie)	3 M NaCl 1,25 M $K_2HPO_4 \times 3 H_2O$ 0,3 M $NaH_2PO_4 \times H_2O$

Bakterienmedien

LB Medium (1 Liter)	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl pH 7.0, autoklavieren
LB Agar (1 Liter)	LB Medium mit 20 g/l Agar versetzen, autoklavieren
LB Ampicillin Medium	1 ml Ampicillin (100 mg/ml) in 1 Liter LB-Medium
LB Chloramphenicol Medium	1 ml Chloramphenicol (34 mg/ml) in 1 Liter LB Medium

SOB-Medium (1 Liter)	0,5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 20 g Trypton 10 ml 250 mM KCl pH 7.0, autoklavieren
SOC-Medium (1 Liter)	1 Liter SOB-Medium 10 ml 1 M MgCl ₂ (steril) 20 ml 1 M Glucose (sterilfiltriert)

Hefemedien

YPD Medium (Vollmedium)	1% Bacto Yeast Extrakt 1% Bacto Pepton 2% Glukose oder Galaktose
YPD Agar	YPD Medium 2% Bacto Agar
SD Medium (Minimalmedium)	0,67% yeast nitrogen base w/o aminoacids 1 x Aminosäuremix 2% Glukose oder Galaktose
SD Agar	SD Medium 1 x Aminosäuremix 2% Bacto Agar

Der Hefestamm EGY48 ist defizient für die Aminosäuren Uracil, Histidin und Tryptophan. Die Hefezellen können auf Vollmedium wachsen, da dieses alle Aminosäuren, also auch Uracil, Histidin und Tryptophan, enthält. Minimalmedium muss ein Aminosäuremix zugegeben werden, damit die Hefezellen darauf wachsen können. Auf Minimalmedium, dem diese drei Aminosäuren fehlen, können sie nur wachsen, wenn sie mit Plasmiden transformiert werden, die die Gene für die Synthese der entsprechenden Aminosäure enthalten. Das Plasmid pEG202 trägt das HIS3 Gen, pJG4-5 das TRP1 Gen und pSH18-34 das URA3 Gen. Soll auf erfolgreiche Transformation eines oder mehrerer dieser Plasmide hin selektiert werden, wird SD Medium verwendet, dem die entsprechenden Aminosäuren fehlen. Dem SD Medium wird ein Aminosäuremix zugesetzt, der die Aminosäuren in den angegebenen Konzentrationen enthält:

Adenin	27 µg/ml	L-Lysin	110 µg/ml
L-Alanin	110 µg/ml	L-Methionin	110 µg/ml
L-Arginin	110 µg/ml	L-Phenylalanin	110 µg/ml
L-Asparagin	110 µg/ml	L-Prolin	110 µg/ml
L-Aspartat	110 µg/ml	L-Serin	110 µg/ml
L-Cystein	110 µg/ml	L-Threonin	110 µg/ml
L-Glutamin	110 µg/ml	L-Tyrosin	110 µg/ml
L-Glutamat	110 µg/ml	L-Valin	110 µg/ml
L-Isoleucin	110 µg/ml		

Als Selektionsmarker verwendete Aminosäuren:

L-Histidin	20 µg/ml
L-Tryptophan	40 µg/ml
Uracil	20 µg/ml

Hydramedium

Hydramedium	0,1 mM KCl
	1 mM NaCl
	0,1 mM MgSO ₄
	1 mM Tris
	1 mM CaCl ₂

Gele

Gel

Agarosegel (1%)

Zusammensetzung

1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer

SDS-Sammelgel

300 µl Acrylamid/Bis (30 % Stock)
 205 µl 1,5 M Tris-HCl, pH 6.8
 50 µl 10 % (w/v) SDS
 1,95 ml H₂O bidest
 25 µl 10 % APS
 2,5 µl Temed

SDS-Trenngel (12 %)

1,5 ml Acrylamid/Bis (30 % Stock)
 1,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8
 50 µl 10 % (w/v) SDS
 1,95 ml H₂O bidest
 18 µl 10 % APS
 7,5 µl Temed

Verwendte Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Plasmid Maxiprep Kit	Qiagen
QuickPrep Micro mRNA Purification Kit	Amersham Biosciences
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Biosciences
Quick Change Site-directed mutagenesis Kit	Stratagene
Immunoprecipitation Starter Pack	Amersham Biosciences

Sonstige Materialien

dNTP Mix	Peqlab
Hyperfilm™ ECL™	Amersham Biosciences
ECL™ Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell
Hybond™ ECL™ Nitrocellulose Membran	Amersham Biosciences
Sterilfilter (0,22 µm)	Schleicher & Schuell

Verwendete Geräte

DNA Messgerät	Pharmacia Gene Quant RNA/DNA Calculator
PDS-1000/He Particle Delivery System	Biorad
Robocycler gradient 96	Stratagene
Peqlab Cyclone Gradient	Peqlab
Konfokales Mikroskop	Leica TCS SP konfokales Laser Scan ning Mikroskop mit Ölimmersions Plan-Apochromat 100/1.4 NA Objektiv

Methoden

Erstellung eines phylogenetischen Stammbaums

Die 14-3-3 Sequenzen wurden mit dem Programm Clustal W verglichen. Folgende 14-3-3 Proteine wurden in die Stammbaumberechnung mit aufgenommen (mit Gene Bank Zugangsnummern):

Entamoeba 1, P42649; Entamoeba 2 AAA80186; Entamoeba 3 P42648; Dictyostelium P 54632; Chlamydomonas P 52908; Arabidopsis: NP 565977, NM 102411.1, NP 564167.1, NM 103213.1, NM 106479.1, NM 116969.1, NM 121610.1, NM 111119.1, NM 123209.1, NP 568229.1, NM 125941.1; Homo NP 006752; Xenopus AAC 41251.1; Drosophila P 92177; BMH 1 NP 011104.1, BMH 2, NP 010384.1; rad 24 NP 594167; rad 25 NP 594247; Homo NP 006133.1, Mus NP 061224.1, Homo XP 050409, Homo S 38532, Mus BAA 13422, Homo NP 006817.1, Mus NM 011739.1, Homo NP 003395.1, Rattus NP 062250.1, Homo XP 088665, Mus JC 5384, Xenopus AAC 41252.1, Drosophila NP 476884.1, Caenorhabditis fft 1 NP 502235, fft 2 NP 509939, Schistosoma Q 26540, Hydra 14-3-3 HyA AY162284, Hydra 14-3-3 HyB AY162284, Hydra 14-3-3 HyC.

Der Stammbaum wurde unter Verwendung des Tree-view Programmes erstellt.

Methoden für Bakterienzellen

Kultivierung und Lagerung

E.coli Zellen wurden als Flüssigkulturen bei 37°C und 200 rpm geschüttelt oder auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten bei 37°C kultiviert.

Herstellung von E.coli Glycerinkulturen

Eine Bakterienkolonie wurde von einer Transformationsplatte gepickt, in 4 ml LB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von dieser Übernachtskultur wurden 50 µl in 1 ml frisches LB-Medium (mit Antibiotikum) gegeben und 5 Stunden weitergeschüttelt. Zu der Kultur wurde anschließend 500 µl 45 % (v/v) Glycerin in LB Medium gegeben und gemischt. Die Glycerinkulturen wurden bei -80°C gelagert.

Herstellung elektrokompeter Bakterienzellen

Aus einer Einzelkolonie des jeweiligen Bakterienstammes wurde ein Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Am folgenden Tag wurde die Übernachtskultur 1:125 in frischem LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,6 weiter geschüttelt. Die Flüssigkultur wurde 20 min bei 4°C abzentrifugiert und das Pellet in kaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Bakterienpellet in 2 ml 10% Glycerol aufgenommen, in 50 µl Volumina aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

Elektrotransformation von DNA in Bakterienzellen

Die elektrokompeteren Zellen wurden auf Eis aufgetaut, die DNA (10-100 ng) zugegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Ω, 25 µF und 2,5 kV in 0,2 cm Küvetten. Nach der Transformation wurde 1 ml SOC Medium zugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterienzellen auf Antibiotika-haltige LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Methoden für Hefezellen

Klonierung von 14-3-3 HyA und HyB in die Hefevektoren pEG202 und pJG4-5

Um die Gene 14-3-3 HyA und HyB in die Vektoren pEG202 und pJG4-5 zu klonieren, wurden per PCR am 5' Ende Restriktionsschnittstellen für EcoR1 sowie am 3' Ende Restriktionsschnittstellen für Xho1 angefügt. Nach der PCR Reaktion wurden die PCR Produkte mit den entsprechenden Enzymen verdaut und in die mit denselben Enzymen geschnittenen und dephosphorylierten Vektoren kloniert.

Kultivierung von Hefen

Hefezellen wurden als Flüssigkulturen in Vollmedium oder Minimalmedium bei 30°C und 200-250 rpm geschüttelt bzw. bei Wachstum auf Agarplatten in einem 30°C Inkubator inkubiert.

Transformation kompetenter Hefezellen

Plasmide wurden per sequentieller Transformation in kompetente Hefezellen eingebracht (Gietz and Woods, 2002).

Nachweis von Proteininteraktionen im Yeast Two Hybrid System

Die beiden Hefevektoren pEG202 und pJG4-5, die die beiden 14-3-3 Isoformen enthielten, sowie das Markerplasmid pSH18-34 wurden nacheinander in Hefezellen eingebracht und auf SD Medium mit Glukose ausplattiert. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte durch Umplattieren auf Galaktose-haltiges Medium. Die Dokumentation blauer Hefekolonien erfolgte photographisch nach Auftropfen von Hefezellen auf Galaktose-haltiges Medium, dem X-Gal mit einer Konzentration von 40 µg/ml zugesetzt wurde.

Methoden für Hydra

Haltung der Versuchstiere

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden Tiere der Art *Hydra vulgaris* verwendet. Sie wurden in Hydramedium bei 18°C gehalten und dreimal pro Woche mit frisch geschlüpften Salinenkrebse (Artemia salina) gefüttert. Der Wechsel des Mediums erfolgte 6-8 h nach dem Füttern.

Herstellung von Hydralysaten

100 Tiere wurden mit einer abgeschnittenen gelben Pipettenspitze in 400 µl Hydra Lysispuffer zerspritzt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Lysate aufgetaut und auf Eis dreimal 10 sec auf höchster Stufe sonifiziert. Anschließend wurden sie 10 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 2 x SDS Ladepuffer versetzt, 5 min gekocht und für SDS PAGE verwendet.

Alternativ dazu wurden 100 Tiere in 400 µl Zytoplasmapuffer zerspritzt und wie bei Verwendung von Hydra Lysispuffer weiterbehandelt.

Trennung von Hydrazellen durch Elutriation (Greber et al., 1992)

2000 Tiere wurden drei Stunden mit 8 mg/ml Pronase E in Dissoziationsmedium inkubiert. Anschließend wurden sie für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann noch einmal 5 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Beide Pellets wurden vereinigt, in Dissoziationsmedium aufgenommen, durch Gaze gefiltert und in die Elutriationskammer gefüllt. Die Zellsuspension wurde mit Geschwindigkeiten zwischen 3800 rpm (F1) und 1100 rpm (F8) zentrifugiert. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 15 ml/min (F1-F7) bzw. 30 ml/min (F8) wurden 100 ml-Fractionen gesammelt. Diese Fractionen wurden daraufhin erneut zentrifugiert: F1 und F2 für 10 min bei 1500 rpm und F3-F8 für 10 min bei 800 rpm und 4°C. Die Zellpellets wurden mikroskopisch auf ihren Inhalt hin untersucht und dann in 2 x SDS Probenpuffer aufgenommen, 5 min gekocht und per SDS Gelelektrophorese aufgetrennt.

Subzelluläre Fraktionierung (Alberts, 1994)

1000 Tiere wurden in 2 ml Puffer M aufgenommen und mit 70-100 Stößen Dounce homogenisiert. Der Zellaufschluss wurde mikroskopisch untersucht. Das Lysat wurde 15 min bei 800 g zentrifugiert, um die Kerne und nicht-aufgeschlossene Zellen abzutrennen. Der Überstand wurde anschließend 30 min bei 17000 g zentrifugiert und ergab das low speed Pellet. Der Überstand wurde für 1 h bei 100.000 g zentrifugiert und ergab das high speed Pellet und den Zytoplasma Überstand. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Pellets wurden entweder in Puffer M aufgenommen und für weitere Versuche verwendet oder sofort in 2 x SDS Ladepuffer resuspendiert. Dem Zytoplasma Überstand wurde 4 x SDS Ladepuffer zugegeben. Von allen Fraktionen wurde der Proteingehalt bestimmt bevor sie im SDS Gel aufgetrennt wurden.

Klonierung von 14-3-3 HyA und HyB in den Vektor HotG

Um GFP Fusionsproteine in Hydrazellen zu exprimieren, wurde der Vektor HotG verwendet (Bottger et al., 2002). 14-3-3 HyA und HyB wurden N-terminal zu dem GFP-Gen in die Schnittstellen Nhe1 und Sma1 kloniert.

Transformation von Hydrazellen mit Particle Gun (PDS-1000/He Particle Delivery System)

Als Trägermaterial für die DNA wurden Goldkugeln mit einem Durchmesser von 1 µm verwendet. Die Goldkugeln wurden in 70% Ethanol aufgenommen, gevortext, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen wurden sie zu einer Endkonzentration von 60 mg/ml in 50% Glycerol aufgenommen. Im Anschluss daran wurde 20 µg Plasmid-DNA auf 3 mg Goldpartikel gefällt und die Gold-DNA Mischung in 100% Ethanol aufgenommen. Die DNA wurde auf Träger Membranen (macrocarrier) aufgetropft und die Tiere zwei bis dreimal damit beschossen. Die beschossenen Tiere wurden unter dem Fluoreszenz Binokular auf die Anwesenheit grüner Zellen hin untersucht.

Immunfärbungen ganzer Hydren

Die Tiere wurden in 2% Urethan relaxiert und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur (bzw. -20°C bei Methanol) fixiert. Die Fixierung erfolgte je nach zu verwendendem Antikörper entweder in 2%-4% Paraformaldehyd/Hydramedium, Lavdovsky oder in 100% Methanol. Nach der Fixierung wurden die Tiere 3 x 15 min in PBS gewaschen, 15 min permeabilisiert, 15 min blockiert und anschließend mit dem ersten Antikörper in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Tiere 3 x 15 min in PBS gewaschen und dann für 2 h bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Kerne mit DAPI oder TO-PRO-3 gegengefärbt und mit Vectashield eingebettet.

Mazeration und anschließende Immunfärbung von Hydra Zellen (David, 1973)

10 Tiere wurden mit 10 Tropfen Mazerierungsflüssigkeit versetzt und 30 min bei 32°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Tiere durch Aufklopfen des Bechers in Einzelzellen zerlegt und 10 Tropfen 8% Formaldehyd zugegeben. 25 µl dieser Suspension wurden zusammen mit einem Tropfen 0,1% Tween auf einem mit Gelatine beschichteten Objektträger ausgestrichen und getrocknet. Die Objektträger wurden anschließend 10 min mit 70% Ethanol und dann 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper in Blockierungslösung erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am folgenden Tag wurden die Präparate 3 x 10 min gewaschen und danach 1 h bei Raumtemperatur mit dem zweiten Antikörper in Blockierungslösung inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Mazerate mit DAPI und/oder TO-PRO-3 gegengefärbt und mit Vectashield eingebettet.

Konfokale Mikroskopie

Optische Schnitte von Präparaten wurden mit einem Leica TCS SP Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Leica Microsystems) und einem Ölimmersions Plan-Apochromat 100/1.4 NA Objektiv generiert. Fluorochrome wurden mit einem Argon Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionsfilter von 520-540 nm (für FITC) bzw. einem Helium-Neon Laser mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm und einem Emissionsfilter von 660-760 nm (für TO-PRO-3 bzw. Cy5) visualisiert. Für Cy3 wurde ein Krypton-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 568 nm und einem Emissionsfilter von 575-585 nm verwendet. Zwei bzw. drei Fluorochrome und das Phasenkontrastbild (Transmissionsfilter) wurden nacheinander gescannt. Die Auflösung der Bilder betrug 512 x 512 pixel mit einer pixel Größe von 195 bis 49 nm, abhängig vom Zoom Faktor. Der axiale Abstand zwischen einzelnen optischen Schnitten betrug 300 bis 500 nm für Zoom Faktor 4 und 0,5 - 1 µm für Zoom Faktor 1. Um das signal-to-noise Verhältnis zu verbessern, wurde jeder Einzelschnitt aus dem Durchschnitt von vier aufeinanderfolgenden scans gebildet. Die 8-bit schwarz-weiss Einzelkanalbilder wurden in einem RGB Bild übereinander gelagert, indem jedem Kanal eine Falschfarbe zugeordnet und anschließend mit Adobe Photoshop CS und ImageJ 1.32j software assembliert wurde.

Molekularbiologische Methoden

DNA Techniken

Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen durch Alkalische Lyse (Birnboim and Doly, 1979; Ish-Horowicz and Burke, 1981)

4 ml einer Übernachtskultur von E.coli wurden abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl kalter Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl frischer hergestellter Lösung II wurde das Gefäß invertiert und auf Eis gekühlt. Die Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von 150 µl Lösung III und anschließender Inkubation auf Eis für 5 min. Nach Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 16.000 g wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und die DNA mit 2 Volumen 100% Ethanol präzipitiert. Die

Lösung wurde bei 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA Pellet mit 1 ml kaltem, 70% Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 50 µl EB Puffer, dem 20 µg/ml RNase zugegeben wurde, gelöst. Diese Methode resultierte in einer DNA Ausbeute von 1-5 µg/µl. Die DNA war rein genug für nachfolgende Analyse per Restriktionsverdau oder Sequenzierung.

Für die Transformation von Hydran mit der Particle Gun wurden Maxipreps mit einem Kit der Firma Qiagen hergestellt.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der Konzentration einer DNA Lösung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Für einen typischen DNA Verdau wurde 1-2 µg DNA eingesetzt und mit dem entsprechenden Restriktionsenzym in 1 x Reaktionspuffer für 1-2 h bei 37°C oder in Einzelfällen bei 25°C inkubiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in einem Agarosegel.

Agarose Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten in Agarosegelen diente zum einem der Analyse von Restriktionsverdauen sowie zur präparativen Isolierung von DNA Fragmenten für nachfolgende Klonierungen. In der Regel wurden Agarosekonzentrationen von 1-1,5% (w/v) in 1 x TAE Puffer verwendet. Zu 100 ml der geschmolzenen Agaroselösung wurde 1 µl Ethidiumbromid (100 mg/ml) gegeben. Die DNA Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA Auftragspuffer versetzt und zusammen mit einem Größenstandard in 1 x TAE Puffer bei 100 Volt etwa eine Stunde aufgetrennt. Die Visualisierung der Fragmente erfolgte unter UV Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm.

Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Die zu isolierende Gelbande wurde mit einem scharfen Skalpell unter UV Licht ausgeschnitten, in ein Eppendorf Gefäß überführt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus dem Gel gereinigt. Die DNA wurde in 30 µl EB Puffer eluiert.

Ligationen

Bei einer Ligation wurde das mit Restriktionsenzymen geschnittene Insert in 10-15 fachen molaren Überschuss verwendet. Der ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittene Vektor wurde vorher mit shrimp alkaline Phosphatase (SAP) dephosphoryliert. Die Ligation mit T4 Ligase fand über Nacht bei 16°C statt. Am folgenden Tag wurde der Ansatz 10 min bei 65°C inaktiviert und 3-4 µl zur Transformation in elektrokompente Bakterienzellen eingesetzt.

Amplifizierung von DNA mittels Polymeraseketten Reaktion (PCR)

Standard PCR Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Als Matrize diente etwa 100 ng Plasmid DNA oder Hydra cDNA. Die Amplifizierung wurde in 10 mM Tris/Cl pH 8,8, 50 mM KCl, 0,01% Tween 20 und 1,5 mM MgCl₂ (Puffer Blau) oder 20 mM Tris/Cl pH 8,55, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20 und 2 mM MgCl₂ (Puffer Rot) durchgeführt. Zusätzlich zu dem Puffer wurden je 0,5 mM dNTPs, 0,5 µM von jedem Primer sowie 1 U Taq-Polymerase zugegeben. Standard PCR Reaktionen wurden 5 min bei 95°C denaturiert (erster Zyklus). Daran anschließend wurden 25-30 Zyklen mit folgenden Bedingungen durchlaufen: 30 sec 94°C, 1 min 45-55°C, 1 min/kb Plasmid 72°C. Der letzte Zyklus bestand aus 30 sec 94°C, 1 min 45-55°C, 7 min 72°C. Wenn mit den PCR Primern Restriktionsschnittstellen eingefügt werden sollten, wurden nach dem ersten Zyklus noch 5-7 Zyklen mit einer etwa 5°C niedrigeren Annealing Temperatur durchgeführt, bevor die 25-30 Zyklen bei der höheren Annealing Temperatur stattfanden. Die PCR Produkte wurden durch Agarose Gel Elektrophorese analysiert.

Isolierung von Hydra mRNA und Synthese von cDNA

Die Isolierung von Gesamt-mRNA aus Hydra erfolgte mit einem Kit der Firma Amersham Biosciences. 100 Hydren wurden in 400 µl Extraktionspuffer mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze zerspritzt. Nach Zugabe von 600 µl Elutionspuffer wurde die Probe abzentrifugiert, der Überstand mit Oligo-dT-Cellulose gemischt und 5 x mit Hochsalz und 2 x mit Niedrigsalzpuffer gewaschen. Das Gemisch wurde auf eine Säule pipettiert und die mRNA mit warmem Elutionspuffer eluiert. Anschließend wurde die mRNA mit Ethanol gefällt und nach zweimaligem Waschen mit 75% Ethanol in 20 µl Elutionspuffer aufgenommen. Die Konzentration der mRNA wurde photometrisch bestimmt bevor sie zur cDNA Synthese verwendet wurde.

Für die Synthese von Hydra cDNA wurde ein Kit der Firma Amersham Biosciences verwendet und die Reaktion den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt. Zur Amplifikation der cDNA wurde 1 µg Hydra mRNA mit einem Not I-(dT)₁₈ primer eingesetzt. Vor der Amplifikation wurde die mRNA 10 min bei 65°C denaturiert. Die Reaktion wurde 1h bei 37°C inkubiert und anschließend für PCR Experimente verwendet.

Proteinen Techniken

Proteinbestimmung mit Amidoschwarz

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinproben wurde 10 µl der unverdünnten Probe sowie 10 µl einer 1:5 Verdünnung mit 500 µl Amidoschwarz gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit Waschlösung gewaschen und danach in 1 ml 0,1 M NaOH gelöst. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 630 nm. Als Eichlösung wurde bei jeder Proteinbestimmung eine BSA-Standard Lösung mit Konzentrationen von 0,25-10 µg/µl gemessen.

Polyacrylamid Gelelektrophorese

Proteine wurden ihrem Molekulargewicht nach durch SDS-PAGE aufgetrennt. Zuerst wurde das Trenngel gegossen. Nachdem es polymerisiert war, wurde es mit dem Sammelgel überschichtet. Die Proteinproben für die SDS-PAGE wurden je nach Konzentration mit 2 x oder 4 x mit Proteinauftragspuffer gemischt, 5 min bei 98°C gekocht und bis auf das Gel geladen. Zusätzlich wurde 5 µl Protein-Marker aufgetragen. Der Lauf erfolgte in 1 x SDS-PAGE-Laufpuffer die ersten 15 min bei 80 V bis die Proben in das Trenngel eingetreten waren. Danach lief das Gel mit 160 V für etwa 1 Stunde. Für einige Anwendungen wurden NuPAGE® Novex Bis-Tris Gele (4-12% Polyacrylamid Gradient) von Invitrogen verwendet.

Nachweis von Proteinen im Western Blot

Proteinproben wurden, soweit nicht anders angegeben, in einem 12% SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend wurden sie in 1 x Wet Blot Puffer bei 40 mA über Nacht auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 5% Magermilch/TBST blockiert. Die Bindung des ersten Antikörpers (in 5% Magermilch/TBST) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Membranen 3 x 15 min mit TBST gewaschen und dann mit dem zweiten Antikörper (in 5% Magermilch/TBST) ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte der Nachweis der gebundenen Proteine mit ECL-Lösung.

Coomassie-Färbung von Proteingelen

Nach Auftrennen der Proteine in einem SDS-Gel wurde das Gel 30 min in Coomassiefärbelösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte zunächst 10 min mit Schnellentfärber und anschließend mit Entfärber bis der Hintergrund klar war.

Klonierung, Expression und Reinigung von Proteinen in Bakterien

14-3-3 HyA und HyB wurden in den Vektor pRSET A kloniert (Zoubek, 2001). Dafür wurde per PCR am 5' Ende der Gene eine BamH1 und am 3' Ende eine EcoR1 Schnittstelle eingeführt. In dem Vektor erhalten die Proteine einen N-terminalen Histidin-Tag. Ppod4 (ohne die ersten 20 Aminosäuren) wurde ebenfalls zwischen die BamH1 und die EcoR1 Schnittstelle in den Vektor pRSET A kloniert. HyBax wurde mit den Schnittstellen BamH1 und Not1 in den Vektor pGex4T-1 kloniert (Popp, 2004). Die Plasmide wurden per Hitzschock Transformation in E.coli Zellen des Stammes BL21 (bei Verwendung des Vektors pRSET A) bzw. per Elektrotransformation in Zellen des Stammes XL1-Blue MRF' (bei Verwendung des Vektors pGex4T-1) eingebracht. Die Expression der Proteine in Flüssigkultur wurde bei einer OD_{600} von 0,6 mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression fand in der Regel bei 37°C für 4-5 h statt. Wenn das zu exprimierende Protein schlecht löslich war (z.B. ppod4) erfolgte die Expression bei 18°C für 24 h. Nach Beendigung der Expression wurden die Bakterien abzentrifugiert, per french press (bei größeren Volumina) oder per Sonifizierung (bei kleineren Volumina) aufgeschlossen und im Falle eines vorhandenen His-Tags in nativem Bindepuffer über eine Nickelsäule gereinigt und anschließend gegen Entsalzungspuffer entsalzt. Die Ankonzentrierung der Proteine erfolgte in einem Dialyseschlauch bei 4°C gegen Saccharose (kristallin).

Herstellung von Bakterienlysaten mittels Sonifizierung

4-5 h nach Induktion der Expression mit IPTG wurde von der 10 ml- Bakteriensuspension 1 ml abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl Osmotic Shock Buffer aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Sonifizierung (3 x 10 Sekunden bei maximaler Stufe, dazwischen in flüssigem Stickstoff eingefroren). Anschließend wurden die Lysate 10 min bei 16.000 g und 4°C zentrifugiert und die Überstände in einem SDS-Gel aufgetrennt.

Ko-Immunpräzipitationen

Hydralysate wurden in Hydra Lysispuffer hergestellt. In Proben mit Peptid C wurden die Lysate 2 h lang bei 4°C mit 1 mM Peptid C vorinkubiert. In Proben, die dephosphoryliert werden sollten, wurde 200 U λ -Phosphatase zugegeben und alle Proben (auch die ohne Phosphatase Behandlung) 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 5 μ g des 14-3-3 Antikörpers K19 zugegeben und die Proben 1 h bei 4°C auf einem Drehrad gemischt. Daraufhin wurden je 50 μ l Protein A zugegeben und eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Proben abzentrifugiert, die Pellets dreimal mit Hydralysispuffer und einmal mit 50 mM Tris pH 8,0 gewaschen, mit SDS Ladepuffer aufgekocht und anschließend in einem SDS Gel aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte in einem Western Blot.

GST pulldown Experimente

Für Bindungsstudien wurden GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert. Das Bakterienlysate wurde anschließend mit Glutathion-Sepharose beads inkubiert. Nachdem das GST-Fusionsprotein an die beads gebunden hatte, wurden die beads abzentrifugiert und gewaschen. Die gewaschenen beads wurden dann mit rekombinantem Protein inkubiert. Das Gemisch wurde daraufhin abzentrifugiert, die Pellets dreimal mit Puffer gewaschen und schließlich die gebundenen Proteine mit reduziertem Glutathion von den beads eluiert. Nach Auftrennung der Proben im SDS-Gel wurde im Western Blot untersucht, ob das rekombinante Protein an GST-HyBax gebunden hatte.

DIG-Markierung von 14-3-3 Proteinen

100 μ g gereinigtes, rekombinantes 14-3-3 aus Hydra (HyA und HyB) bzw. Hefe (Bmh1 und Bmh2) wurde mit Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-e-aminocapronsäure-N-hydroxysuccinimidester (2 mg/ml Stocklösung in DMSO) bei pH 9,7 für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Bei HyA und HyB war das Verhältnis Protein:DIG 1:70. Bei Bmh1 und Bmh2 betrug das Verhältnis 1:3. Nach der Markierungsreaktion wurden die Proteine über Nacht gegen 1 x PBS pH 7,4 und 1 mM DTT dialysiert. Die Proben wurden auf eine Endkonzentration von 1 μ g/ml in DIG-Puffer (mit 2 mg/ml BSA und 0,05% Natrium Azid) verdünnt und bei 4°C aufbewahrt. Um Hintergrundfärbung zu reduzieren, wurden die Sonden vor der ersten Benutzung mit blockierter Nitrozellulose Membran vorinkubiert.

Far Western Overlay (Moorhead et al., 1999)

Nach Auftrennen der Proteine im SDS Gel und Übertragung auf eine Nitrozellulose Membran wurde die Membran in 5% Milch/DIG Puffer blockiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit der DIG-Sonde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in DIG Puffer wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit einem anti-DIG Antikörper inkubiert, wieder dreimal gewaschen und die gebundenen Proteine mit ECL Lösung detektiert.

14-3-3 Affinitätssäule

Vorbereitung der Sepharose-14-3-3 Mischung

1,4 g aktivierte CH Sepharose wurde mit 8 mg rekombinatem, gereinigtem Bmh1/2 (jeweils 4 mg von jedem Protein) in Coupling Puffer für 4 h bei Raumtemperatur gemischt und danach kurz abzentrifugiert. Nicht-reagierte, aktive Gruppen der Sepharose wurden für 1 h in 0,1 M Tris/Cl pH 8,0 blockiert. Das Gemisch wurde anschließend zunächst mit Coupling Puffer und dann abwechselnd je sechsmal mit Hoch- und Niedrig pH Puffer gewaschen. Im Anschluss daran wurde die Sepharose-14-3-3 Mischung einmal in 100 mM Tris pH 7,5 gewaschen, abzentrifugiert und am Schluss in 150 mM Tris pH 7,5/0,05% Azid aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

14-3-3 Affinitätssäule

Ein Zellysats aus circa 100.000 Tieren (in Hydralysispuffer) wurde 1 h bei 150.000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand 1 h bei 4°C mit der vorbereiteten Sepharose-14-3-3 Mischung auf einem Rollrad inkubiert. Nachdem das Gemisch in eine Plastiksäule (Biorad) gefüllt wurde, wurde die Säule mit 50 mM HEPES, pH 7.5/ 0.5 M NaCl/ 1 mM DTT gewaschen. Im nächsten Schritt wurde mit einem nicht-verwandten Kontrollpeptid (-WFYpSFLE-) geprüft, ob Proteine unspezifisch von der Säule eluiert werden. Nach nochmaligem Waschen mit HEPES Puffer wurden die 14-3-3 Bindeproteine mit 1 mM des Kompetitorpeptides Peptid C (-ARAApSAPA-) eluiert. Abschließend wurde noch einmal mit HEPES Puffer gewaschen. Von allen Waschschritten sowie von dem Eluat des Kontrollpeptides wurden Proben gesammelt. Der Proteingehalt jeder Probe wurde bestimmt und 2,5 µg jeder Fraktion auf ein SDS Gel aufgetragen und im Far Western Overlay mit Dig-markiertem 14-3-3 auf die Anwesenheit von Bindeproteinen getestet.

In-Gel Trypsin Verdau der isolierten 14-3-3 Bindeproteine

20 µg Gesamtprotein der von der Säule eluierten 14-3-3 Bindeproteine wurden mit 50 mM Iodacetamid alkyliert und anschließend in einem 4-12% SDS-Gel aufgetrennt. Die darin enthaltenen Proteine wurden dann mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Nach Entfärben des Geles in Wasser wurden einzelne Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und mit einer Mischung aus Acetonitril und Wasser (50:50) sowie anschließend mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat versetzt. Diese Lösung wurde danach durch 100% Acetonitril ersetzt, die Gelstückchen 10 min darin dehydriert und schließlich in einer speed vac getrocknet. Die Gelstückchen wurden dann mit 10 µg/ml Trypsin in 20 mM Ammoniumhydrogencarbonat/0,1% N-Octyl Glucosid (NOG) über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 Volumen Acetonitril/0,1% Trifluoressigsäure zugegeben, 30 min bei 30°C geschüttelt und die Proben bis zur Verwendung in der Massenspektroskopie bei -20°C aufbewahrt.

F-Aktin Ko-Sedimentations Versuch (M. Schleicher, München)

G-Aktin aus Hühnchen sowie rekombinantes ppod4 (ohne Aminosäuren 1-20) wurden 10 min bei 50000 g und 4°C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile bzw. Proteinaggregate abzutrennen. Anschließend wurden 5 µM G-Aktin und 3 µM ppod4 unter polymerisierenden Bedingungen (10 mM Mops, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 7,0) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben 30 min bei 50.000 g bzw. 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Pellet und Überstand wurden getrennt, mit SDS Ladepuffer versetzt und äquivalente Mengen in einem SDS Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Quervernetzen von Vesikel-assoziierten Proteinen mit Crosslinker

Um Proteine auf der Oberfläche von Vesikeln zu vernetzen, wurden Vesikel durch subzelluläre Fraktionierung isoliert. Die Vesikel wurden in Puffer M resuspendiert und BS³ in einer Endkonzentration von 5 mM zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für unterschiedliche Zeiten. Die Reaktionen wurden mit 20 mM Tris abgestoppt und die Ansätze in 12%-igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Detektion der quervernetzten Proteine erfolgte im Coomassiegel oder im Western Blot mit Antikörpern.

In-Gel Peroxidase Assay (Dutta and Henry, 1990; Hoffmeister-Ullerich et al., 2002)

Die isolierten Vesikel wurden in Puffer M aufgenommen und je 10 µl der Vesikelfraktion in einem 12%-igen LDS-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde rekombinantes ppod4 (ohne die ersten 20 aa) geladen. Nach dem Gellauf wurde das Gel über Nacht in 0,06% (w/v) Diaminobenzidin inkubiert. Am folgenden Morgen wurde 0,03% (v/v) H₂O₂ in 100 mM Citrat pH 5,0 zugegeben und die Farbreaktion nach 30 min durch mehrmaliges Waschen in H₂O gestoppt.

Endosomen Markierung mit FM 4-64

Zur Markierung der Endosomen wurden Hydren 60 min in 500 µM FM 4-64 (in Hydramedium) inkubiert. Danach wurde der überschüssige Farbstoff durch Waschen der Tiere in Hydramedium entfernt. Nachdem die Tiere kurz in 2% Urethan relaxiert wurden, wurden sie unter einem Deckglas mit Wachsfüsschen lebend im konfokalen Mikroskop untersucht.

6. Literaturverzeichnis

- Adams, J.C.** (2004). Roles of fascin in cell adhesion and motility. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 590-596.
- Adams, J.M., and Cory, S.** (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.
- Aitken, A.** (1995). 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem Sci* **20**, 95-97.
- Aitken, A., Collinge, D.B., van Heusden, B.P., Isobe, T., Roseboom, P.H., Rosenfeld, G., and Soll, J.** (1992). 14-3-3 proteins: a highly conserved, widespread family of eukaryotic proteins. *Trends Biochem Sci* **17**, 498-501.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D.** (1994). *Molecular biology of the cell.* (Garland Publishing, Inc.).
- Andrews, R.K., Harris, S.J., McNally, T., and Berndt, M.C.** (1998). Binding of purified 14-3-3 zeta signaling protein to discrete amino acid sequences within the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex. *Biochemistry* **37**, 638-647.
- Ayscough K.R., Stryker J., Pokala N., Sanders M., Crews P., and Drubin D.G.** (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol* **137**(2), 399-416.
- Bihn, E.A., Paul, A.L., Wang, S.W., Erdos, G.W., and Ferl, R.J.** (1997). Localization of 14-3-3 proteins in the nuclei of arabidopsis and maize. *Plant J* **12**, 1439-1445.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513-1523.
- Bosch, T.C., and David, C.N.** (1984). Growth regulation in Hydra: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Dev Biol* **104**, 161-171.
- Bottger, A., Alexandrova, O., Cikala, M., Schade, M., Herold, M., and David, C.N.** (2002). GFP expression in Hydra: lessons from the particle gun. *Dev Genes Evol* **212**, 302-305.
- Braselmann, S., and McCormick, F.** (1995). Bcr and Raf form a complex in vivo via 14-3-3 proteins. *Embo J* **14**, 4839-4848.
- Brent, R., and Ptashne, M.** (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**, 729-736.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E.** (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.
- Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J.V., Dalal, S.N., DeCaprio, J.A., Greenberg, M.E., and Yaffe, M.B.** (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* **156**, 817-828.

Bryan, J., and Kane, R.E. (1978). Separation and interaction of the major components of sea urchin actin gel. *J Mol Biol* **125**, 207-224.

Bunney, T.D., van Walraven, H.S., and de Boer, A.H. (2001). 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4249-4254.

Bustos, D.M., and Iglesias, A.A. (2003). Phosphorylated non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from heterotrophic cells of wheat interacts with 14-3-3 proteins. *Plant Physiol* **133**, 2081-2088.

Chen, X.Q., and Yu, A.C. (2002). The association of 14-3-3gamma and actin plays a role in cell division and apoptosis in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **296**, 657-663.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* **81**, 505-512.

Chow, C.W., and Davis, R.J. (2000). Integration of calcium and cyclic AMP signaling pathways by 14-3-3. *Mol Cell Biol* **20**, 702-712.

Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A., and David, C.N. (1999). Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* **9**, 959-962.

Cotelle, V., Meek, S.E., Provan, F., Milne, F.C., Morrice, N., and MacKintosh, C. (2000). 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *Embo J* **19**, 2869-2876.

Davare, M.A., Saneyoshi, T., Guire, E.S., Nygaard, S.C., and Soderling, T.R. (2004). Inhibition of calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase by protein 14-3-3. *J Biol Chem* **279**, 52191-52199.

David, C.N. (1973). A quantitative method for maceration of Hydra tissue. *Wilhelm Roux' Archiv* **171**, 259-268.

Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252.

Dorner, C., Ullrich, A., Haring, H.U., and Lammers, R. (1999). The kinesin-like motor protein KIF1C occurs in intact cells as a dimer and associates with proteins of the 14-3-3 family. *J Biol Chem* **274**, 33654-33660.

Dutta, C., and Henry, H.L. (1990). Detection of hemoprotein peroxidase activity on polyvinylidene difluoride membrane. *Anal Biochem* **184**, 96-99.

Finger F.P., and Novick P. (1998). Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast. *J Cell Biol.* **142(3)**, 609-12.

Fisher, D.A., and Bode, H.R. (1989). Nucleotide sequence of an actin-encoding gene from *Hydra attenuata*: structural characteristics and evolutionary implications. *Gene* **84**, 55-64.

Fu, H., Subramanian, R.R., and Masters, S.C. (2000). 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 617-647.

Fuglsang, A.T., Visconti, S., Drumm, K., Jahn, T., Stensballe, A., Mattei, B., Jensen, O.N., Aducci, P., and Palmgren, M.G. (1999). Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H(+)-ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr(947). *J Biol Chem* **274**, 36774-36780.

Gierer, A. (1974). *Hydra* as a model for the development of biological form. *Sci Am* **231**, 44-54.

Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**, 87-96.

Gohla, A., and Bokoch, G.M. (2002). 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Curr Biol* **12**, 1704-1710.

Greber M.J., David, C.N., and Holstein T.W. (1992). A quantitative method for separation of living hydra cells. *Roux Archives Dev Biol* **201**, 296-300.

Habazettl, J., Gondol, D., Wiltscheck, R., Otlewski, J., Schleicher, M., and Holak, T.A. (1992). Structure of hisactophilin is similar to interleukin-1 beta and fibroblast growth factor. *Nature* **359**, 855-858.

Hermeking, H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* **3**, 931-943.

Hoffmeister-Ullerich, S.A., Herrmann, D., Kielholz, J., Schweizer, M., and Schaller, H.C. (2002). Isolation of a putative peroxidase, a target for factors controlling foot-formation in the coelenterate hydra. *Eur J Biochem* **269**, 4597-4606.

Holstein, T.W., Mala, C., Kurz, E., Bauer, K., Greber, M., and David, C.N. (1992). The primitive metazoan *Hydra* expresses antistasin, a serine protease inhibitor of vertebrate blood coagulation: cDNA cloning, cellular localisation and developmental regulation. *FEBS Lett* **309**, 288-292.

Huber, S.C., MacKintosh, C., and Kaiser, W.M. (2002). Metabolic enzymes as targets for 14-3-3 proteins. *Plant Mol Biol* **50**, 1053-1063.

Ichimura, T., Isobe, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Araki, K., Kuwano, R., and Takahashi, Y. (1988). Molecular cloning of cDNA coding for brain-specific 14-3-3 protein, a protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7084-7088.

Ichimura, T., Wakamiya-Tsuruta, A., Itagaki, C., Taoka, M., Hayano, T., Natsume, T., and Isobe, T. (2002). Phosphorylation-dependent interaction of kinesin light chain 2 and the 14-3-3 protein. *Biochemistry* **41**, 5566-5572.

Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K., and Yonehara, S. (1999). The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* **398**, 777-785.

Imhof, A., and Wolffe, A.P. (1999). Purification and properties of the *Xenopus* Hat1 acetyltransferase: association with the 14-3-3 proteins in the oocyte nucleus. *Biochemistry* **38**, 13085-13093.

Ish-Horowicz, D., and Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9**, 2989-2998.

Isobe, T., Ichimura, T., Sunaya, T., Okuyama, T., Takahashi, N., Kuwano, R., and Takahashi, Y. (1991). Distinct forms of the protein kinase-dependent activator of tyrosine and tryptophan hydroxylases. *J Mol Biol* **217**, 125-132.

Jacobson, M.D., Weil, M., and Raff, M.C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* **88**, 347-354.

Jarvis, P., and Soll, J. (2002). Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* **1590**, 177-189.

Jaspert, N., and Oecking, C. (2002). Regulatory 14-3-3 proteins bind the atypical motif within the C terminus of the plant plasma membrane H(+)-ATPase via their typical amphipathic groove. *Planta* **216**, 136-139.

Jin, J., Smith, F.D., Stark, C., Wells, C.D., Fawcett, J.P., Kulkarni, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Taylor, P., Taylor, L., Zougman, A., Woodgett, J.R., Langeberg, L.K., Scott, J.D., and Pawson, T. (2004). Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* **14**, 1436-1450.

Jones, D.H., Martin, H., Madrazo, J., Robinson, K.A., Nielsen, P., Roseboom, P.H., Patel, Y., Howell, S.A., and Aitken, A. (1995). Expression and structural analysis of 14-3-3 proteins. *J Mol Biol* **245**, 375-384.

Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D., and Reed, J.C. (1998). Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4997-5002.

Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.

Kureishy, N., Sapountzi, V., Prag, S., Anilkumar, N., and Adams, J.C. (2002). Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays* **24**, 350-361.

Lasi, M. (2005). Die Evolution von Mechanismen der Apoptose: Caspasen und Proteine der Bcl-2 Familie in Hydra. (Diplomarbeit, LMU München).

Lentz, T.L. (1966). The cell biology of Hydra. (Amsterdam: North-Holland Publishing Company).

Li, X., Song, S., Liu, Y., Ko, S.H., and Kao, H.Y. (2004). Phosphorylation of the histone deacetylase 7 modulates its stability and association with 14-3-3 proteins. *J Biol Chem* **279**, 34201-34208.

Lim, M.L., Lum, M.G., Hansen, T.M., Roucou, X., and Nagley, P. (2002). On the Release of Cytochrome c from Mitochondria during Cell Death Signaling. *J Biomed Sci.* **9**:488-506. Review.

Liu, Y.C., Liu, Y., Elly, C., Yoshida, H., Lipkowitz, S., and Altman, A. (1997). Serine phosphorylation of Cbl induced by phorbol ester enhances its association with 14-3-3 proteins in T cells via a novel serine-rich 14-3-3-binding motif. *J Biol Chem* **272**, 9979-9985.

Luk, S.C., Ngai, S.M., Tsui, S.K., Fung, K.P., Lee, C.Y., and Waye, M.M. (1999). In vivo and in vitro association of 14-3-3 epsilon isoform with calmodulin: implication for signal transduction and cell proliferation. *J Cell Biochem* **73**, 31-35.

Ma, J., and Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* **51**, 113-119.

MacKintosh, C. (1998). Regulation of cytosolic enzymes in primary metabolism by reversible protein phosphorylation. *Curr Opin Plant Biol* **1**, 224-229.

Mangin, P., David, T., Lavaud, V., Cranmer, S.L., Pikovski, I., Jackson, S.P., Berndt, M.C., Cazenave, J.P., Gachet, C., and Lanza, F. (2004). Identification of a novel 14-3-3zeta binding site within the cytoplasmic tail of platelet glycoprotein Ibalpha. *Blood* **104**, 420-427.

Masters, S.C., Pederson, K.J., Zhang, L., Barbieri, J.T., and Fu, H. (1999). Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **38**, 5216-5221.

Masters, S.C., Yang, H., Datta, S.R., Greenberg, M.E., and Fu, H. (2001). 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol* **60**, 1325-1331.

May, T., and Soll, J. (2000). 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* **12**, 53-64.

Mehmet, H. (2000). Caspases find a new place to hide. *Nature* **403**, 29-30.

Moorhead, G., Douglas, P., Morrice, N., Scarabel, M., Aitken, A., and MacKintosh, C. (1996). Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Curr Biol* **6**, 1104-1113.

Moorhead, G., Douglas, P., Cotelle, V., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A., and MacKintosh, C. (1999). Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J* **18**, 1-12.

Morgan, A., and Burgoyne, R.D. (1992). Exo1 and Exo2 proteins stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *Nature* **355**, 833-836.

Murzin, A.G. (1992). Structural principles for the propeller assembly of beta-sheets: the preference for seven-fold symmetry. *Proteins* **14**, 191-201.

Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889-897.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**, 98-103.

Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**, 299-306.

Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H., and Tsujimoto, Y. (2003). 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J Biol Chem* **278**, 2058-2065.

Otto, J.J., Kane, R.E., and Bryan, J. (1979). Formation of filopodia in coelomocytes: localization of fascin, a 58,000 dalton actin cross-linking protein. *Cell* **17**, 285-293.

Paul, A.L., Sehnke, P.C., and Ferl, R.J. (2005). Isoform-specific subcellular localization among 14-3-3 proteins in Arabidopsis seems to be driven by client interactions. *Mol Biol Cell* **16**, 1735-1743.

Pauly, B., Stiening, B., Schade, M., Alexandrova, O., Zoubek, R., David, C.N., and Bottger, A. (2003). Molecular cloning and cellular distribution of two 14-3-3 isoforms from Hydra: 14-3-3 proteins respond to starvation and bind to phosphorylated targets. *Exp Cell Res* **285**, 15-26.

Petosa, C., Masters, S.C., Bankston, L.A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H., and Liddington, R.C. (1998). 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J Biol Chem* **273**, 16305-16310.

Ponting, C.P., and Russell, R.B. (2000). Identification of distant homologues of fibroblast growth factors suggests a common ancestor for all beta-trefoil proteins. *J Mol Biol* **302**, 1041-1047.

- Popp, T.** (2004). Die Bcl-2 Proteinfamilie in Hydra. (Diplomarbeit, LMU München).
- Rost, B., and Sander, C.** (1993). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* **232**, 584-599.
- Roth, D., and Burgoyne, R.D.** (1995). Stimulation of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by 14-3-3 proteins is due to reorganisation of the cortical actin network. *FEBS Lett* **374**, 77-81.
- Roth, D., Birkenfeld, J., and Betz, H.** (1999). Dominant-negative alleles of 14-3-3 proteins cause defects in actin organization and vesicle targeting in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **460**, 411-416.
- Rubio, M.P., Geraghty, K.M., Wong, B.H., Wood, N.T., Campbell, D.G., Morrice, N., and Mackintosh, C.** (2004). 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J* **379**, 395-408.
- Rudd, S., Mewes, H.W., and Mayer, K.F.** (2003). Sputnik: a database platform for comparative plant genomics. *Nucleic Acids Res* **31**, 128-132.
- Ruden, D.M.** (1992). Activating regions of yeast transcription factors must have both acidic and hydrophobic amino acids. *Chromosoma* **101**, 342-348.
- Samuel, T., Weber, H.O., Rauch, P., Verdoodt, B., Eppel, J.T., McShea, A., Herme-king, H., and Funk, J.O.** (2001). The G2/M regulator 14-3-3sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax. *J Biol Chem* **276**, 45201-45206.
- Schmidt, N.** (2003). Evolution des programmierten Zelltods: Biochemische und immunhistochemische Untersuchungen an Caspasen in Hydra. (Dissertation, LMU München).
- Sehnke, P.C., Chung, H.J., Wu, K., and Ferl, R.J.** (2001). Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 765-770.
- Shen, Y.H., Godlewski, J., Bronisz, A., Zhu, J., Comb, M.J., Avruch, J., and Tzivi-on, G.** (2003). Significance of 14-3-3 self-dimerization for phosphorylation-dependent target binding. *Mol Biol Cell* **14**, 4721-4733.
- Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N., and Gotoh, Y.** (2005). JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol* **170**, 295-304.
- Swindells, M.B., and Thornton, J.M.** (1993). A study of structural determinants in the interleukin-1 fold. *Protein Eng* **6**, 711-715.
- Thulin, C.D., Savage, J.R., McLaughlin, J.N., Truscott, S.M., Old, W.M., Ahn, N.G., Resing, K.A., Hamm, H.E., Bitensky, M.W., and Willardson, B.M.** (2001). Modulation of the G protein regulator phospho-ducin by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation and 14-3-3 protein binding. *J Biol Chem* **276**, 23805-23815.

Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2000). Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* **466**, 6-10.

Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshio-ka, K., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2004). JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *Embo J* **23**, 1889-1899.

Tzivion, G., and Avruch, J. (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* **277**, 3061-3064.

van Hemert, M.J., Steensma, H.Y., and van Heusden, G.P. (2001). 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23**, 936-946.

Vincenz, C., and Dixit, V.M. (1996). 14-3-3 proteins associate with A20 in an isoform-specific manner and function both as chaperone and adapter molecules. *J Biol Chem* **271**, 20029-20034.

Wolf, B.B., and Green, D.R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by cas-pase family proteinases. *J Biol Chem* **274**, 20049-20052.

Wu, K., Lu, G., Sehnke, P., and Ferl, R.J. (1997). The heterologous interactions among plant 14-3-3 proteins and identification of regions that are important for dimerization. *Arch Biochem Biophys* **339**, 2-8.

Xiao, B., Smerdon, S.J., Jones, D.H., Dodson, G.G., Soneji, Y., Aitken, A., and Gamblin, S.J. (1995). Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**, 188-191.

Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., and Cantley, L.C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phos-phopeptide binding specificity. *Cell* **91**, 961-971.

Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phos-phorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-628.

Zhai, J., Lin, H., Shamim, M., Schlaepfer, W.W., and Canete-Soler, R. (2001). Iden-tification of a novel interaction of 14-3-3 with p190RhoGEF. *J Biol Chem* **276**, 41318-41324.

Zhang, L., Chen, J., and Fu, H. (1999). Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8511-8515.

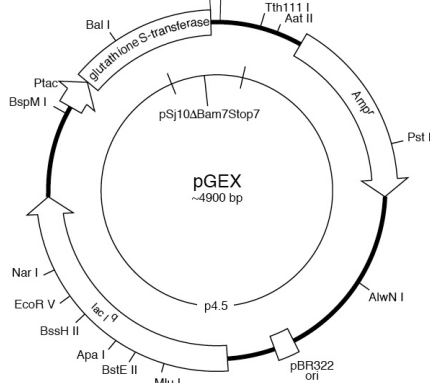
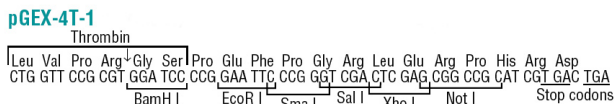
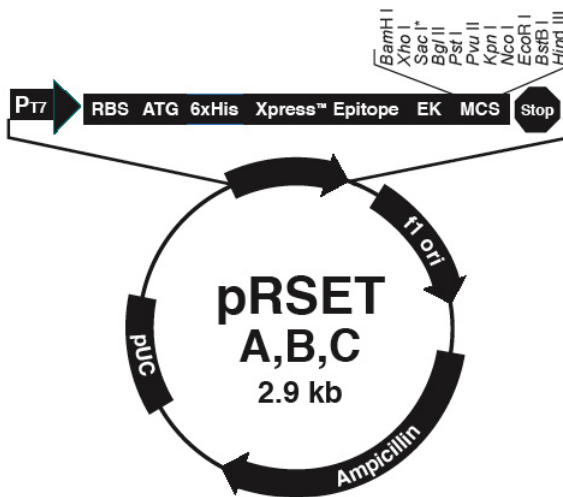
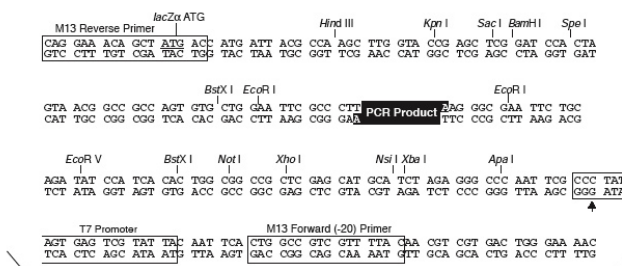
Zoubek, R. (2001). Apoptose in *Hydra vulgaris*, Caspaseaktivierung und die Rolle von 14-3-3 Proteinen. (Diplomarbeit, LMU München).

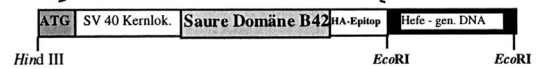
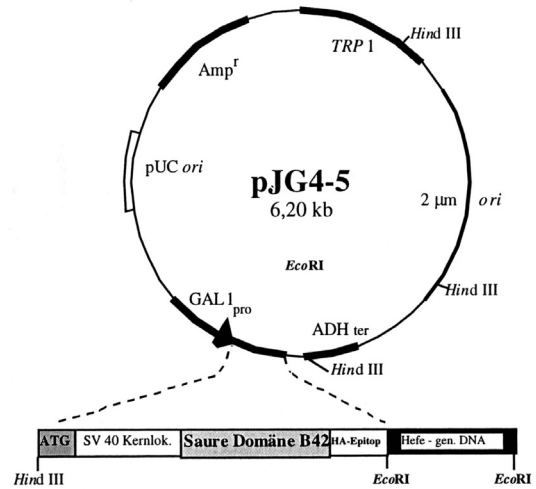
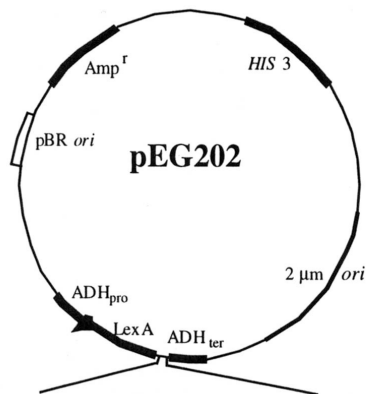
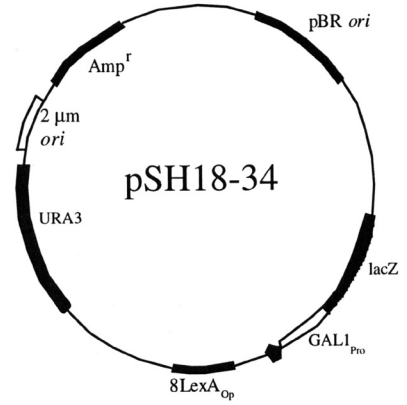
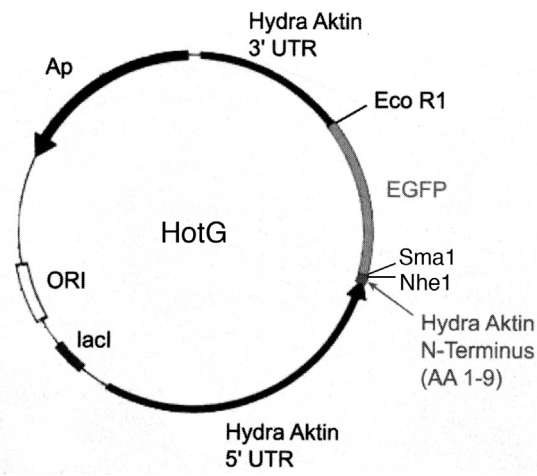
7. Abkürzungen

λ-PPA	λ-Phosphatase
aa	Aminosäure
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	complementary DNA
Chaps	3-[(3-chloramidopropyl) dimethylammonio]-1-propansulfonat
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4'6'-Diamino-2-phenylindol
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosid-Triphosphat
dr	Danio rerio
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat Dinatriumsalz
EF1-alpha	Elongationsfaktor1-alpha
EF-2	Elongationsfaktor-2
EGTA	Ethylen-Glycol-Tetraessigsäure
eIF-3 beta	eukaryontischer Initiationsfaktor-3 beta
EST	expressed sequence tag
FITC	Fluorescein-5-isothiocyant
g	Zentrifugalkraft
GFP	green fluorescent protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
His	Histidin
hs	Human
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktopyranosid
Kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
LC-MS	liquid chromatography mass spectrometry
LDS	Lithium Dodecylsulfat
mA	Miliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
nm	Nanometer

NOG	N-Octyl Glucosid
nt	Nukleotide
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame / offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxy Kinase
PFA	Paraformaldehyd
PLCβH1	Phospholipase C beta H1
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
Temed	Tetramethylenethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin Isothiocyanat
U	Unit
UAS	upstream activating sequence
UTR	untranslated region / untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
WB	Western Blot
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

Vektorkarten





Sequenzen der identifizierten 14-3-3 Bindeproteine

Die LC-MS Peptide sind in rot und blau dargestellt. 14-3-3 Bindemotive sind unterstrichen

Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase

LPKAKKKNAM AYL TSEQKAE LKR **IAESIVA** **PGKGILAADE** STDTIGKRLT
 SIKVENTEAN RRAYRNLLFT ADESIANYLG GVILYHETLY **QKNDGTLVV**
DPLKKLGINI **GIKVDKGLVP** LPGTQNETTT QGIDGLAERV QQYKKEGCSF
 AKFRCVIKID **KQLGLPTDIA** **IQENAQVLAR** YAVICQSNGL VPIVEPEILI
 DGSHNLEVAS RVTERVLACV YKTLVDHHCY LEGSLLKPNM VTPGVLCENK
VSAEEVGLAT **VTTLR**RTVPA AVPGITFLSG GQSECEATLH LNAINAVQLL
 KPWALTFSG RALQASVLKV WGGKSENLA AQA

Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)

MVK**VGINGFG** RIGRLVCRAA FEHPDIEIVH INDPFIDLEY MVYMFHYDST
 HGKFKGEVKH ADGKLVINGK **IISVSMIRNP** **KEIPWG TAGA** **DYVVESG VF**
TTL EKAGEHI HGGAKKVVIS APSPDAQMFV MGVNEDSYDP KVHHIVSNAS
 CTTNCLAPLA KIIHDNFGIE EGLMTTIHAT TATQKTVDGP SMKEWRDGRG
ASQNI I PAAT **GA**KAVGKVI PELNGKLTGM AFR**VPVADVS** **VVDLTVRLKT**
PTS YDQIKAK VKAASECPTL **SRYIGYTEDE** **VVSTDFIGDT** **RSTIFDAKAG**
ISLNPQFVKL **VS**WYDNEYGY **SHR**VCDLIKH MASKE

Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) (partieller Klon)

CSPSRNCPMM DPNWEDPKG V PISAIMFGGR RPEGVPLIYE ALSWQHGVFI
 ASSMCSEATS AAEHSGKTVM RDPFAMRPF GYNAGHYFKH WLSMNKEGRK
 LPKIFHVNW F RKNAEGR**FLW** **PGFGENIRVL** SWICDRVDNK **DVAVESPVGL**
IPKEGSIDIS GLGDIDMAEL MSTPK**AYWLE** **QLNDLQKYYE** DEFLNDL

ATP-Synthase β

SSTKSSLIKE TQKRLLPACI SNSQRFVSTE VSKNQAAPAV AAKNAPAKQE
 VAGGSIGKVV AVIGAVVDVQ FESNLPSILN ALEVQGRESR **LVLEVAQHLG**
ENIVRTIAMD **GTEGLVRGNL** VVDSGSPICI PVGPETLGRI **MNVIGEPIDE**
RGPIITKTKA PIHAEAPAFV EMSVQQEILI TGIKVVDLLA **PYAKGGKIGL**
FGGAGVGKTV LIMELINNIA KAHGGYSVFA GVGERTREGN **DLYHEFMETG**
VINLKDKSSK **VALVYGMNE** **PPGARARVAL** **TGLTVAEYFR** **DVEGQDVLLF**
IDNIFRFTQA **GSEVSALLGR** IPSAVGYQPT LATDMGMTQE RITTRKGS I
 TSVQAIYVPA DDLTDPAPAT TFAHLDANTV LSR**GIAELGI** **YPAVDPLDSN**
SRILDPNIVG **QKHYDVARSV** QKILQDYKSL QDIIAILGMD ELSEEDKNIV
 ARARKIQKFL SQPFQVAEIF TGHAGK**LVQL** **EENIAGFEKI** LKGEMDHLPE
 VAFYMGVGNLN DVIEKAERLA KETXN

Elongations Faktor-2 (EF-2)

SFLGEGSQEP NCEVREFQTD IPTILHKNGE LHNRPDPEIM DKKHNIRNMS
 VIAHVDHGKS TLTDSLVTKA GI IAQAKAGE MRFTDTRKDE QERCITIKST
 AVSMYYELTD ADMAFLVDKN IDGKAFLINL IDSPGHVDFS SEVTAALRVT
 DGALVVVDCI SGVCVQTETV LRQAIAERIK PVLFMNKMDR ALLELQLEQE
DLYQTFQRII ESINVIIATY STEDGPMGNI MVDPCIGTVG FGSGLHGWAF
 SLKQFSEIYA SKFKIPPIKL MKRLWGDQYF NPAAKDKKWN KTGEGGYTRG
 FNMVFLDPIF KMFDSVMNFK KDQYEKLI EK LEIKLTLEER ELEGKPLIKR
 IMQKWL P AGD TMLQLIT I HL PSPVVAQKYR AELLYEGPHD DEAF LGIKNC
 DPNGPLMMYV SKMVPSSDKG RFYAFGRVFS GKCATGQKVR IMGPNYVPGK
 KEDLYNKTIQ RTILMMGRYT EPIEDVPSGN ICGLVGV DQY LVKTGTLTTF
 EEAHNMKQMK FSVSPVVRVA VEPKDPQHLP KLVEGLKRLA KSDPMGLVIT
 EESGEHIVAG AGELHLEICL KDLEEDHAGI PLKSDPVVS YRETVSEVSS
 MTCLSKSPNK HNRLEFMTAIN MPDGLAEDID SGEVAPRQDF KIRARYLVEK
 YEYDATEARK IWCFGPEGTG PNL MIDVSKG VQYLNEIKDS VGGGFQWATK
 EGVMCDENVR GVRFNLHDVT LHADAIHRGA GQIMPTTRRC LYACMLTAKP
 RLLEPIYLVE IQCPQDATGG IYSCLNKRRG HIFEENQVVG TPMVQVKAYL
PVNESFGFTA DLRSKTQGOA FPQCVDHWQ LLAEDPLDPV TKAAAI VAET
 RKRKGLSEGV PPLDKYYDKL

Elongation factor1-alpha (EF1- α)

MSNKVKPHIN IVVIGHVDSG KSTSTGHMIY KCGGIDKRQI EKFEKEAQEM
 GKGSFKYAWV LDKLKAERER GITIDIALWK FETTKYVVTI IDAPGHRDFI
 KNMITGTSQA DCAVLIVASS TGEFEAGISK NGQTREHALL AFTLGVKQMI
 VAVNKIDNTE PPYSEARFNE IKKEISAYVK KVGYPKTVP VLPVSGWHGD
 NMIEPSPNMS WYKGWEVEYK DTGKHTGKTL LEALDNIPLP ARPSSKPLRL
PLQDVYKIGG IGTVPVGRVE TGILKPGMVV TFSPANLSTE VKSVEMHHES
LPEALPGDNV GFNVKNVSIK DIRRGMVASD SKNDPAIEAA SFKAQVIILN
 HPGEIHAGYQ PVLDCHTAHI ACKFAELLEK IDRRSGKVIE TEPKMKVSGD
 AAIIINLIPSK PMCVESFAQY PPLGRFAVRD MRQTVAVGVI KEVDKTAAVA
 GKVTKSAQKA GVAAGKKK

eIF-3 beta

EKSHRINKMK PLLLHGHERS ITQIKYNREG DLLFSSAKDK RPTVWFSING
 ERLGTYDGHG VVVYCLDPSW DSKYLITGSG DNSARIWDIE TGKELVIYDT
GSAVRACGFS YSGKKVFYST DKTMGQTSEI KLYDVRDYIS QRTPTPYLVI
 PVPHSKV TSA AWGPLEEFII TGHENGTGSK WCAQTGDLIK SMRAHIVKVS
 DLQKSSNEMM FITASTDNHL SYFDAEAMLL LLTSYTAGPL ISSAISPID
 QQILGGGQEA MEVTTTSSRI GKFDARFFHM IFEEEEIVRVK GHLGPIISLA
 SHPNGKSYSS GGEDGYVRSQ VFDKSYEFE

Hsp70

MSK**APAIGID** **LGTTYSCVGV** **FQHGKVEIIA** **NEQGNRTTPS** **YVAFTDTERL**
 IGDAAKNQVA MNPSNTVFDA KRLIGRKFND PSVTSRKHWH PFNVIDDGSR
 PKIQVEFKGE TKSFYPEEIS SMVLLKMEEI ADAYLGKKVT **DVVITVPAYF**
NDSQRQATKD **AGVIAGLNVL** **RIINEPTAAA** IAYGLDKKVG TEKNVLIFDL
 GGGTFDVSIL AIEDGIFEIK **STAGDTHLGG** **EDFDNRLVNH** **FVDEFKRKHK**
 KDISSNKRAL RRLRTACERA KRTLSASTQA SVEIDSLFDG IDFYTSITRA
 RFEELCIDLF **RGTLGPVADA** **IRGAGKNSSG** QNFSK**SDIHE** **VVLVGGSTRI**
 PKVQSLLOEF FNGKELNCSI NPDEAVAYGA AVQAAILAGD KHEAVQDLLL
 LDVAPLSLGI ETAGGVFTPL **IKRNTTVPTK** YSQVFTTYSYD NQPGVLIQVF
 EGERSMTAHN NLLGKFELSG **IPLAPRGVPQ** IEVTFDVDAN GILNVSALDK
 STGKENKITI TNDKGRLSKE DIERMVQEA E KYKADDELQR DKVQAKNSLE
 SYCYNMKQTV EDEKVKGKIS EEDKKTIIKK CNETVEWVDK NQTAEKDQYE
 HKQKELEKVC NPIITKLYQA GGGMPGGMPG GMPGGMPGSG SKASSGGPTI
 EEVD

Proteindisulfidomerase-ähnliches Protein (partieller Klon)

VPLQNKERKM FKYLGVGLAI IYVVALYEK **SDDVVELTGG** **NFDHLVKYSD**
 EIWLVEFYAP WCGHCKNNAP DWKKAATALK GIVKVGAVDM **DVHGSVGGPY**
NVRGFPTIKI FSGDKSKPQD YNGAR**SAQAI** **VDEALKVASA** LARERLNGGS
KRSSSGSGKS GNAK**DVITLT** **DDNFEKEVID** TKDIVFVEFF APWCGHCQRL
 EPEWAKAATE LKGKVK**LAAL** **DATQYPNTAG** **RFNVQGYPTI** **K**

Calmodulin

MGETLTEEQI AEFK**EAFSLF** **DKDGDGTITT** **KELGTVMRSL** GQNPTEAELQ
 DMINEVDADG NGTIDFPEFL TMMARKMKDT **DSEEEIKEAF** **RVFDKDGNGF**
ISAAELRHVM TNLGEK**LTDE** **EVDEMIREAD** **VDGDGQVNYD** **EFVKMMMSK**

Calcium Bindeprotein

MPEINWADIN AKLPHGRSDE EKAKRKALFD SFDNGNGMLS LAEIDKGIRD
VLHLDAVFDA **KPAIMRAFQI** AKSVVKSNNK **SGDDFIEWKE** FR**FFLLSLRQ**
 YFEYYEAFTR IDDNSDHR**IT** **LQEFIAAKSK** **IEQWVGPIKP** **EAEFKAIDKN**
 HGGFILFDEF CDWAIKKNLD LEDDID

Calcium Adaptor

MSKTQQYQGG KAFGALK**KQQ** **ELALDEINKQ** **YLGDDDYQDK** **EEFPDLKGTI**
 EAYKKQFMEF DLDNSGDIDL MELKMMMEKL DQAKTHLELK KMIAEVDREN
 RGSISYNDFL FMMLGKKSSV LKLILKFEAA MKDKERP**KG**V **APKRDFASLP**

Tubulin alpha

LEITSSRCFA KLTS DIXLAN SNLFINCKTS IKFKMRECIS IHLGQAGCQI
GNACWELYCL EHQIQPDGQM PSDKSIGGGD DSFN TFFSET GGGKH XAEAV
FVDLEPTVVD EIR TGT YRQL FHPEQLVTGK EDAANNYARG HYTVGKELID
QVLDRIRKLA DQCTGLQGFL IFHSFGGGTG SGFTSLLMER LSVDYGK KSK
LEFAVYPAPQ VSTAVVEPYN SVLTTHTTLE HSDCAF MVDN EALYDICRRN
LDIERPTYTN LNRLIGQIVS SITASLRFDG ALNVDLTEFQ TNLVPYPRIH
FPLATYSPVI SAEKAYHEQL TVSEITNACF EPANQMVKCD PRHGKYMACC
LLYRGDVVPK DVNSAIXNQ DETHYSVRDW CPTGFKVGIN YQPPTVVPGG
DLAKVQRAVC MLSNTTAAIAE AWARLDHKFD LMYAKRA FVH WYVGE GMEEG
EFSEAREDMA ALEKDYEEVG VDSVDEEAAG EGDE

Tubulin beta

MREIVHLQAG QCGNQIGAKF WEVISDEHGI DPTGTYHGDS DLQLERINVY
YNEATGGKYV PRAVLVDLEP GTMDSVRS GP FGQIFRPDNF VFGQSGAGNN
WAKGHYTEGA ELVDSVLDVV RKEAESCDCL QGFQLTHSLG GGTGSGMGTL
LISKIREEYP DRIMNTFSV PSPKVS DTVV EPYNATLSVH QLVENTDET F
CIDNEALYDI CFRTLKLTTP TYGDLNHLVS ATMSGVTTCL RFPGQLNADL
RKLAVNMVVF PRLHFFMPGF APLTSRGSQQ YRALTVPELT QQMFD AKNMM
AACDPRHGRY LTVAAMFRGR MSMKEVDEQM LNVQNKNSY FVEWI PNNVK
TAVCDIPPRG LKMSATFIGN STAIQELFKR ISEQFTAMFR RKAFLHWYTG
EGMDEMEFTE AESNMNDLVS EYQQYQDATA EEEGEFDEEE GEEEEAA

Aktin

MADDEVAALV VDNGSGMCKA GFAGDDAPRA VFPSIVGRPR HQGVMVGMGQ
KDSYVGDEAQ SKRGILTLYK PIEHGIVTNW DDMEKIWHHT FYNELRVAPE
EHPVLLTEAP LNPKANREKM TQIMFETFNS PAMYVAIQAV LSLYASGRTT
GIVLDSDGDV SHTVPIYEGY ALPHAIIRLD LAGRDLTDYL MKILTERGYS
FTTTAEREIV RDIKEKLSYV ALDFEQEMQT AASSSSLEKS YELPDGQVIT
IGNERFRCPE TLFQPSFIGM ESAGIHETTY NSIMKCDVDI RKDLYANTVL
SGGTTMFPGI ADRMQKEISA LAPPTMKIKI IAPPERKYSV WIGGSILASL
STFQQMWISK QEYDESGPSI VHRKCF

Tropomyosin

MATLKAKLEE AEKAAFDAEE ELKATNEKAD QAEERVTELT KELNDLEDQL
DASESKMTSL QEKLAEAEKL HEEHDQARRI LENRGRSDGG RISRLQDELD
ELTNLNNKVV ETFNELTQIL AEADEKLDQE EERRDIADAK VKLLEVEVTQ
VGNTLRSM EI NEGQASVRTE CGDTKISEME AKYQEMEARA AEFEEKAKRL
ERRQEELDEE LQLEKDKFNQ TKTEFDALCA HINEM

ppod3

MKLCITVFMM VICVIAKEKR DTPAWTKAYT VALKSFTNGK FVCAENVGSQ
 PLIANRDAIG LWETF~~EIRFT~~ NAQTFALKSH ANGKFVSASN GGNNLLIANK
 DQAAVWETFT LVPNYGTFGF KSNNGNAKFVA AEEAGSKSLA ANRNALDVWE
 MFSLVYVWPS VHKVAIKALV NGLYVCAENA GKQSLIANRG QIGPWETFEI
 RFTDHQFTTL KSLANGKLVC AENNGQSPLI ANRDQIGPWE TFTLVQNKEG
 VAFKSHANGK LVTAENAGHD NLIANRDNPD IWERFVFIYL

ppod4

MKLCIMFMMV ICMFAKEKRA TLEWKKVYTV AIKSFTNGKF VCAENNGNEP
 LIANRDSIGL WETF~~EIRFTD~~ AQTFVLKSHA NEKFVTEVNS ENNLLIANKD
 QATVFETFTL VPRFGTGF~~FK~~ SNDNKKLVTA EEAGKKPLAA NRKVLVDVWEM
 FNLVYVWPSV HKVAIKALVN GLFVCAENAG KQSLIANRGQ IGPWETFVIS
 FTDLQFTTLK SFANGKLVCA ENSGQFPLIA NRDQAGPWET FTIVPNKEGV
 ALKSHANGKF VTAENAGNGN LIANRDKADI WERFVIVYL

Phospholipase beta H1 (PLCBH1)

MAGAGPISET LPVISVPPML VNGGRFLKWD DQDLTCAIYI LEVDKLGHV
 SWKPKDFSKD TEVLELVLVR DVRTGQYAKI PKAQDTRARD AIKMYSAVEL
 ESNLMQERTI TIVYGSNFVD LTFIN~~FVASS~~ VSEAQEWTEA LFKCTNNLLE
 FHSSPLKCLE RFYTRICVQK NQNGEIPVKI LVKAFVNHKE DIKRAYGTLQ
 SLGIAHGK~~KD~~ MIVLKDFSFE TFFTFYNRLI SRHDFDNVFT ELGAKNKPYL
 TTDQLVEFLN NRQRD~~PRLNE~~ ILFPYYNINA ADAIVNTYEP NKSFADKGLI
 SIDGLMKFLM SNDANVLLPG KLN~~IHQDLSF~~ PIAHYFINSS HNTYLQGHQL
 TGKSSVEIYR QVLLAGCRCI ELDCWDGKTE EQEPVITHGM TLCTEVLFKD
 VIEAIKESAF KTSEYPVILS FENHCSAKQQ MKMANYCLQI FGDLLL~~NKEL~~
 DEYPLLPGTL LPSPKVLK~~RK~~ ILIKNKKREI KDTKNANIST QSV~~DLN~~SSGR
 FEPEVLNIEE IPEDAEDLSK SEEEEAPEVE AQQELSELVN YFQPVHFRGF
 EKA~~EKR~~KCYE EMSSFGENTA TNLLKEQPVE FVNYNKFQNS RIYPKGSRVS
 SDNYIPQLFW NAGCQMVALN FQTL~~DVPMQL~~ NLGKFEINGR CGYLLKPEHM
 RRHDLTFDPF VDSTVDGIIA GTVQVKVISG QCLLERRSGT YVEVEMYGLP
 ADTVRRKYRT KVVSNGLNP VYDEDPFKFK VILPHLAELR IAVYEENGKM
 IGHRI~~LPVDG~~ LLPGFRHIKL RNESYQPLCL PTLFVDIVTK DYVPESFSDF
 ADALS~~NPMKY~~ LSEKEKRTQQ LEAFEFEEED STALQVPTTN KNILKVTVQE
 PQNLVKHGSK ISLQADSYQG QKDKYVAEPM KQTKR~~KRSQS~~ QSLGRLESPK
 QPIRRTFSTP KLLGEDTSSD YLKISGLSIN TLKEHKLYKK WKLKFDSDFL
 NLMQKQAKGR IQCRKEIEAK TKKLT~~LNLEK~~ KNQLYKRIKT NFLKQQKLME
 IIMKYTITVQ LK

14-3-3 HyA

MSHLSEQELV DMAKLAEQAE RYDDMVKFMK ELTVKSKKLS DEHRNLLSVA
 FKNVVGARRS AWRIISSIES KQEEKGDSTE LTTKYKKEIE HELQERCREV
 LDLLDNHLLV EVDSGCNGEN GNYEGKVFYQ KMKGDYRYL VEVSSSEKRN
 ELAAKSQQAY DEATKTAEKL PNTHPISLGL ALNFSVFHYE IMNDSPKACA
 LAKKAFDGAI AELDSLKEES YKDSTLIMQL LRDNLTLWTS ETEQDEQNE

14-3-3 HyB

MASTDSKEIL IQRAKLAEQA ERYDDMAAAM KQVTKMTDEP LTGEERNLLS
 VAYKNIVGAK RSSWRVITSI EQKANDKQAL AAQYRSNIEK ELKGVCEEVL
 ELLAKYLVNK SIERVDPANK KTLESVAVFYL KMKGDYRYL AEVAVDEERK
 RVIFEADAAY KQASEISENL ISTDPIRLGL ALNYSVFHYE IRNKPSEACT
 LAKKAFDDAI VELDSLAEES YKDSTLIMQL LRDNLTLWTA DADATTEE

Unbekanntes Protein

KKLLKIAKNE IIFLFFSNGG NNFQSGGGF QKCITKMTNG CSIPLNLPFP
 YKDI FL PACE RHDICYECGK MYNWSTRNQCD VSFQKNMLTL CQLKEDFKNG
 KQNXYNVSIW EKLKSVFYIA SQLFKWISIK SGTLDHCNHG AKVYYSSVDK
 FAHPNYGSGD PILCQ

Hypothetisches Protein

MSPKYVLNYF NIQKGGEVAR LLFHFKGVEF TDNQINFQDW PSQKSDQSRF
 PLGQMPTLEI DGHTVCQSAA INSYLAETFG LNGANASERL VINQVCETLN
 DFWNDYIEVW KNKTLSDQK NAAFAELLVK ETTKLKLSFL ESKLRNHDG
 HGYFVGDSIT LGDLVFFHTT GMVDKSLND FPLLTELNNR VRHSAELKSY
 LDNRTHPPMP

Nachtrag

Während diese Dissertation geschrieben wurde, tauchte in den genomischen Sequenzen von Hydra eine vierte 14-3-3 Isoform auf, die HyD genannt wurde. Die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz von HyD ist im Folgenden angegeben.

Nukleotidsequenz von 14-3-3 HyD

```
ATGACTGATA AGGATGAGTA CCTCTACTTA GCTCGTTTGG CTGAACAAGC
AGAACGATAC GAAGAAATGG TTCAAAATAT GAAAAGCATT GTTGTAATGG
GAAATGGACT TTCACAAGAA GAGCGCAATT TACTTTCAGT TGCCTATAAA
AATGTTATTG GCATGCGAAG AGTATCCTGG CGTGTTATAT CCAATATTCA
GAGTAAAGGA AATGATTTTT CTCCAAAGGT TGTTGCAAGT TATCAGGCAG
AAATAGAAAA AGAACTAAAA GATATATGTA ATGACATTCT TGATCTTCTA
GATACCTATC TTATTAATCA TTCAAAATCT AATGAAAATG AAAATTCAGA
TGCTTTGGTT TTCTACTATA AAATGAAAGG TGATTATTTG ACATATTTAC
CAGAGTTTTC CACAGGAATT GATCGTAAAG ATTATGCTCA AAGTTCCTTG
GTTGCCTATA AACTTGCCTC AGATACTGCT GTTGAGCAGT TAGAAGCTAC
ACATCCAATT CGTTTAGGCT TGGCCCTTAA TTTTTCAGTA TTTTATTTTG
AAATTTTGGA TTTGCCTGAG CGAGCTTGTA GCGTTGCAA AAAAGCTTTT
GAAGATGCTG TAGAAAATTT AGATAAATTA AGTGGTGATA ATTATAAAGA
CAGCACTCTA ATTATGCAGT TGCTTAGAGA TAATTTGACA TTATGGACAG
CAGAACCAAC AGAGCAGCTT CCA
```

Aminosäuresequenz von 14-3-3 HyD

```
MTDKDEYLYL ARLAEQAERY EEMVQNMKSI VVMGNGLSQE ERNLLSVAYK
NVIGMRRVSW RVISNIQSKG NDFSPKVVAS YQAEIEKELK DICNDILDLL
DTYLINHSKS NENENS DALV FYYKMKGDYL TYLPEFSTGI DRKDYAQSSL
VAYKLASDTA VEQLEATHPI RLGLALNFSV FYFEILDLP E RACNIAKKAF
EDAVENLDKL SGDNYKDSTL IMQLLRDNLT LWTAEPTEQL P
```

Lebenslauf

Name: Barbara Sabine Pauly
Geburtsdatum: 17.5.1976
Geburtsort: München

Schulbildung

1982 – 1986 Grundschule Aufkirchen
1986 – 1995 Gymnasium Starnberg
1995 Abitur

Universität

1995 – 2000 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Genetik, Biochemie, Humangenetik, physiol. Botanik)
1998 – 1999 University of Edinburgh und Edinburgh Western General Hospital, United Kingdom
2000 Diplomprüfung im Fach Biologie
2000 – 2001 Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie (Prof. Charles N. David)
2001 – 2005 Doktorarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie (PD Dr. Angelika Böttger/Prof. Charles N. David)