



Dissertation der Fakultät für Biologie  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Eingereicht am 17. August 2005

---

Molekulare Analyse von Caspasen, AIF und PSR  
in Hydra zur Untersuchung der Evolution  
des programmierten Zelltods

---

**Mihai Cikala**

Department Biologie II  
Abt. Zell- und Entwicklungsbiologie



1. Berichterstatter: □ Prof. Dr. Charles N. David

2. Berichterstatter: □ Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: □ 3.10.2005

**Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:**

**Mihai Cikala**, Bettina Wilm, Engelbert Hobmayer, Angelika Böttger and Charles N. David

Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra  
Current Biology 1999, Sep 9;9(17):959-62

Susanne Szczepanek, **Mihai Cikala** and Charles N. David

Poly- $\gamma$ -glutamate synthesis during formation of nematocyst capsules in Hydra  
Journal of Cell Science 2002, Feb 15;115:745-51

Michaela Herold, **Mihai Cikala**, Harry MacWilliams, Charles N. David and Angelika Böttger

Cloning and characterisation of PKB and PRK homologs from Hydra and the evolution of the protein kinase family  
Development, Genes and Evolution 2002, 212:513-519

Angelika Böttger, Olga Alexandrova, **Mihai Cikala**, Marsha Schade, Michaela Herold and Charles N. David

GFP Expression in Hydra: Lessons from the particle gun  
Development, Genes and Evolution 2002, 212:302-305

**Mihai Cikala**, Olga Alexandrova, Charles N. David, Matthias Pröschel, Beate Stiening, Patrick Cramer and Angelika Böttger

The phosphatidylserine receptor from Hydra is a nuclear protein with potential Fe(II) dependent oxygenase activity  
BMC Cell Biology 2004, 5 <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/5/26>



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>12</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>13</b>
1.1. Apoptose in <i>C.elegans</i>	14
1.2. Apoptose bei Säugetieren	15
1.2.1 Caspasen	15
1.2.2. "Mitochondrialer Pathway"	18
1.2.3. Death-Rezeptor vermittelter Pathway	23
1.3. Gibt es Caspase unabhängige Apoptose ?	25
1.4. Phagozytose der Apoptotischen Zellen	26
1.5. Hydra als Modellorganismus	28
1.5.1. Apoptose in <i>Hydra</i>	30
1.6. Zielsetzung der Arbeit	30
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>31</b>
2.1. Etablierung von Methoden zur transienten Expression von EGFP Fusionsproteinen in Hydra	31
2.1.1. Konstruktion des Vektors HyEGFP	31
2.1.2. Zwei verschiedene Transformationssysteme	32
2.2. Isolierung und Charakterisierung von HyCasp A, HyCasp 3B und HyCasp 3C, dreier Caspasen in Hydra	35
2.2.1. Isolierung zweier Caspase Genfragmente aus <i>Hydra vulgaris</i> cDNA	35
2.2.2. Isolierung von HyCasp A und HyCasp 3B aus einer cDNA Bank	38
2.2.3. Nachweis der Transkription von HyCasp A und HyCasp 3B	40
2.2.4. Die dritte Caspase HyCasp 3C	40
2.2.5. Analyse der Caspasen HyCasp A, HyCasp 3B und HyCasp 3C	43
2.2.5.1. Stammbaumanalyse der Caspasen HyCasp A, HyCasp 3B und HyCasp 3C	43
2.2.5.2. Expression von HyCasp A und HyCasp 3B in <i>E.coli</i>	45
2.3. Isolierung und Charakterisierung des Apoptose Inducing Factor AIF in <i>Hydra</i>	47
2.3.1. Isolierung von AIF aus <i>Hydra vulgaris</i> cDNA	47

2.3.2. Bioinformatische Analyse und transiente Expression von AIF-EGFP Fusionsproteinen in <i>Hydra</i>	49
2.4. Isolierung und Charakterisierung von PSR, einem Phosphatidylserin Rezeptor in <i>Hydra</i>	51
2.4.1. Nachweis von Phosphatidylserin in apoptotischen Hydrazellen	51
2.4.2. Isolierung eines PSR Genfragmentes aus <i>Hydra vulgaris</i> cDNA	52
2.4.3. Isolierung von PSR aus einer cDNA-Bank	54
2.4.4. Bioinformatische Analyse des PSR	55
2.4.5. Nachweis der Transkription von PSR	57
2.4.6. Transiente Expression von PSR Fusionsproteinen mit EGFP in <i>Hydra vulgaris</i>	57
<b>3. Diskussion</b>	<b>61</b>
3.1. Apoptose Maschinerie in Hydra	61
3.1.1. Identifizierung dreier Caspasen in <i>Hydra vulgaris</i>	61
3.1.2. Besitzt <i>Hydra</i> eine Caspase-Kaskade?	62
3.1.3. Das Team ist komplett – Apoptose Maschinerie in <i>Hydra</i>	63
3.1.4. Ursprung der Apoptose – sine qua non eines multizellulären Organismus?	64
3.2. Transgene Hydren	66
3.3. PSR - Kernprotein oder Membranrezeptor?	69
<b>4. Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>73</b>
5.1. Material	73
5.1.1. Bakterien- und Phagenstämme	73
5.1.2. Plasmide	73
5.1.3. Antikörper	73
5.1.4. Enzyme	74
5.1.5. Kits	74
5.1.6. Radiochemikalien	74
5.1.7. Marker	74
5.1.8. Primer	75
5.1.9. nicht-radioktive Nukleotide	78

5.1.10. Fluorochrome	78
5.1.11. Medien	78
5.1.12. Chemikalien	79
5.1.13. Software	80
5.1.14. Geräte und sonstige Materialien	81
5.1.15. Lösungen und Puffer	82
5.2. DNA Methoden	84
5.2.1. Präparation von Plamid DNA	84
5.2.2. DNA und RNA Konzentrationsbestimmung	85
5.2.3. Restriktionsverdau von DNA	85
5.2.4. Agarose Gelelektrophorese	85
5.2.5. Reinigung von DNA Fragmenten	85
5.2.6. Ligation von DNA	86
5.2.7. Transformation von DNA in <i>E.coli</i>	86
5.2.8. PCR	87
5.2.9. Mutagenese	89
5.2.10. Sequenzanalyse	89
5.2.11. Screenen einer $\lambda$ -cDNA-Bibliothek von <i>Hydra vulgaris</i>	90
5.2.12. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	93
5.3. RNA Methoden	93
5.3.1. RNA Isolierung	93
5.3.2. Reverse Transkription	93
5.3.3. Northern-Blot	93
5.4. Protein Methoden	95
5.4.1. Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	95
5.4.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	95
5.4.3. Coomassie-Färbung	95
5.4.4. Western-Blot	96
5.5. Zellbiologische Methoden	96
5.5.1. Hydrakultur	96
5.5.2. Annexin-V-FITC Färbung dissoziierter Zellen	97
5.5.3. Konfokale Mikroskopie	97
5.5.4. Transformation von DNA in <i>Hydra</i>	97
5.6. Phylogenetische Rekonstruktion	98



**6. Literaturverzeichnis 101**

Danksagung

Lebenslauf

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
cpm	count per minute
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
GFP	green fluorescent protein
int.	interne
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid Hydrat
NLS	N-Laurylsarcosin
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	plaque forming unit
rpm	round per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulphat
TEMED	Tetramethylenethylendiamin
ÜN	Über Nacht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

## 1. Einleitung

Apoptose ist ein zellautonomes "Selbstmordprogramm", das aktiviert wird, um geschädigte oder überzählige Zellen schnell und effizient zu beseitigen. In den letzten 10 Jahren wurde immer deutlicher, welche wichtige Rolle Apoptose in der Biologie einnimmt. Diese Erkenntnis spiegelt sich nicht zuletzt in den über 12.000 Veröffentlichungen zu diesem Thema alleine im Jahre 2002 wider. Apoptose spielt im Tierreich nicht nur bei der Entwicklung des Nervensystems, des Immunsystems und der Morphogenese der Gliedmaßen, sondern auch beim Erhalt der Gewebhomeostase und der Eliminierung abnormaler oder geschädigter Zellen eine Schlüsselrolle (Baehrecke, 2002). Im Körper eines erwachsenen Menschen begehen in jeder Minute mehrere Millionen Zellen Apoptose (Raff, 1998). Gerät dabei die Balance zwischen neugebildeten und sterbenden Zellen außer Kontrolle, hat dies für den Organismus fatale Konsequenzen. Wenn zuwenig Zellen sterben, kann Krebs die Folge sein. Degenerative Krankheiten, wie Alzheimer, sind hingegen mit einem zuviel an Apoptose verbunden (Lawen, 2003).

Obwohl Zellen in so großer Anzahl kontrolliert sterben, wurde Apoptose erst 1972 von Kerr, Wyllie und Currie beschrieben (Kerr et al., 1972). Während nekrotische Zellen anschwellen, platzen, dabei ihren Zellinhalt freisetzen und somit eine Entzündungsreaktion hervorrufen, weisen apoptotische Zellen andere morphologische Merkmale auf: Die Zellen schrumpfen, das Chromatin kondensiert, die DNA wird zu Oligonucleosom großen Fragmenten degradiert (*DNA-Laddering*), es kommt zu einer Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran (Martin et al., 1995; Zwaal and Schroit, 1997) und die Zellen werden von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert. Nach einer Stunde sind meist schon alle Überreste der apoptotischen Zelle beseitigt (Jacobson et al., 1997). Weil apoptotische Zellen so schnell beseitigt werden, sind, auch wenn sehr viele Zellen sterben, nur wenig sterbende Zellen zu beobachten. Dies war einer der Gründe, warum Apoptose solange vernachlässigt und das Ausmaß der Apoptose lange unterschätzt wurde (Raff, 1998).

## 1.1. Apoptose in *C.elegans*

Erst 20 Jahre nachdem das Konzept der Apoptose zum erstenmal vorgeschlagen wurde, setzte sich die Vorstellung durch, dass alle tierischen Zellen ein eingebautes Selbstmordprogramm besitzen. Dies war vor allem den genetischen Studien von Horvitz und Ellis an dem Nematoden *C. elegans* zu verdanken (Ellis and Horvitz, 1986). In der Entwicklung von *C.elegans* werden insgesamt 1090 somatische Zellen gebildet, 131 von ihnen sterben durch Apoptose, so dass ein adultes Tier aus genau 959 somatischen Zellen besteht (Sulston and Horvitz, 1977). Horvitz und Ellis identifizierten zwei Gene, *ced-3* und *ced-4* (*ced* steht für **cell death abnormal**) die notwendig sind, damit diese 131 Zellen sterben. Mutanten in diesen Genen enthielten 131 zusätzliche Zellen, waren lebensfähig und hatten eine normale Lebensspanne. Inzwischen wurden weitere, an der Apoptose und deren Regulation beteiligte Gene in *C.elegans* gefunden. Die zentrale, für die Ausführung der Apoptose verantwortliche Maschinerie besteht aus vier Komponenten: *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* und *egl-1* (**egg laying defective**) (Abb. 1).

### *C.elegans*

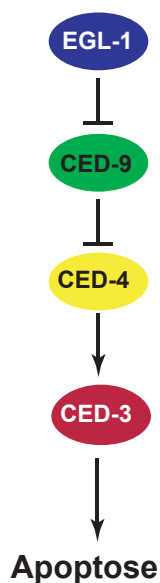


Abb. 1: Apoptose Pathway in *C.elegans*;

Das von *ced-3* codierte Protein ähnelte dem aus dem Menschen bekannten Protein ICE (Yuan et al., 1993). ICE steht für Interleukin-1-converting enzyme und ist eine Protease, die Interleukin-1, ein Entzündung auslösendes Signalprotein, aus einem Vorläuferprotein „ausschneidet“ (Thornberry et al., 1992). Die Ähnlichkeit von CED-3 und ICE war ein erster Hinweis darauf, dass Proteolyse bei der Apoptose eine Rolle spielt. CED-3, CED-4 und CED-9 sind während der Embryonalentwicklung in allen Zellen vorhanden. CED-3 liegt als unprozessiertes Proenzym vor und bleibt in den meisten Zellen inaktiv. Dies wird durch das antiapoptotisch wirkende Protein CED-9 erreicht, das mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist und mit CED-4 interagiert und so eine Aktivierung von CED-3 durch das proapoptotische CED-4 verhindert. In Zellen, die Apoptose einleiten, wird EGL-1 exprimiert, das an CED-9 bindet und damit CED-4 freisetzt. CED-4 wiederum aktiviert CED-3 und leitet somit Apoptose ein.

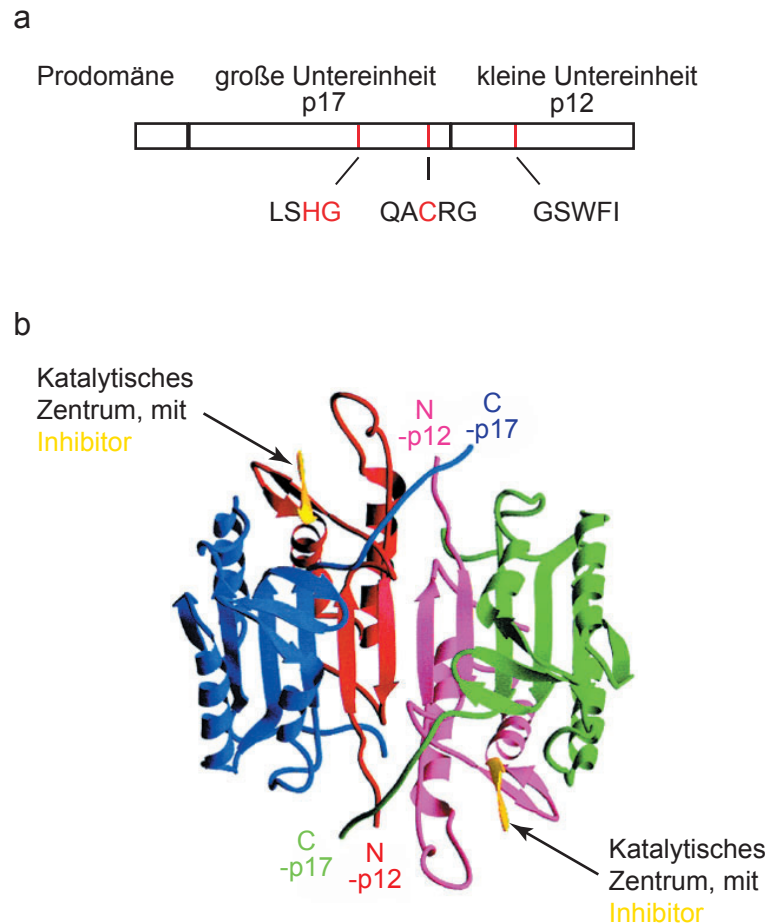
## 1.2. Apoptose bei Säugetieren

### 1.2.1 Caspasen

Nachdem die Schlüsselkomponenten der Apoptose in *C.elegans* bekannt waren, wurden in Säugetieren weitere homologe Proteine gefunden. Zu CED-3 sind im Menschen inzwischen 11 homologe Proteine bekannt (Alnemri et al., 1996; Pistritto et al., 2002). Es sind Cystein Proteasen, die alle ein Cystein im aktiven Zentrum haben und Substrate spezifisch nach einem bestimmten Aspartat schneiden. Sie werden daher Caspasen (**C**ysteiny **A**spartat **P**roteinase) genannt. Eine weitere Gemeinsamkeit aller Caspasen ist, dass sie als inaktive Proenzyme (Zymogen) exprimiert werden. Sie bestehen aus einer Prodomäne, einer großen (17-22 kDa) und einer kleinen Untereinheit (10-12 kDa) (Abb. 2a).

Bei ihrer Aktivierung werden sie zwischen den Domänen proteolytisch gespalten und die große und kleine Untereinheit bilden ein Heterodimer (Ramage et al., 1995). An der Bildung des katalytischen Zentrums und der Substratbindungstasche sind Aminosäuren beider Untereinheiten beteiligt (Shi, 2002a). In den bisher bekannten Kristallstrukturen von aktiven Caspasen (Caspase-1, -3, -8, und -9) bilden zwei Heterodimere ein Tetramer mit zwei unabhängigen katalytischen Zentren (Abb. 2b). Die Prozessierung des Zymogens erfolgt durch andere Caspasen oder

Autoprozessierung. Caspasen sind hochspezifische Proteasen, die eine vier Aminosäure lange Erkennungssequenz N-terminal der Schnittstelle benötigen (Margolin et al., 1997). Die Unterschiede in der Erkennungssequenz ist eine Erklärung für ihre unterschiedlichen biologischen Funktionen.



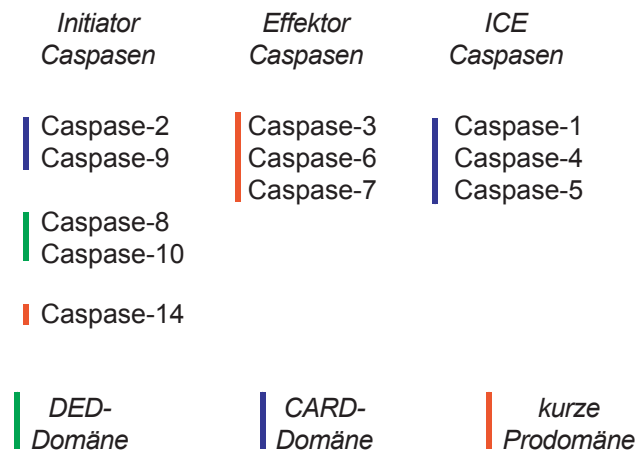
**Abb.2:** a) Schematische Darstellung der Caspase-3; Aminosäuren die in dem aktiven Enzym das katalytische Zentrum bilden sind rot dargestellt.

b) 3-D Struktur des Caspase-3 Tetramers im Komplex mit dem Inhibitor Ac-DEVD-CHO. Die großen Untereinheiten sind blau und grün, die kleinen Untereinheiten rot und pink, der Inhibitor gelb gefärbt. (Nach Rotonda et al., 1996)

An der Apoptose sind die Caspasen-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10 und -14 beteiligt. Dabei ist die Rolle von Caspase-14 noch nicht gesichert, sie scheint vor allem bei der terminalen Differenzierung von Keratinozyten eine Rolle zu spielen (Eckhart et al., 2000) und wird als einzige Caspase nicht ubiquitär, sondern nur in Epithelien exprimiert (Ahmad et al., 1998).

Die Caspasen-1, -4, und -5 sind an der Prozessierung von Zytokinen beteiligt.

Caspase-11 ist bisher nur in der Maus und der Ratte identifiziert worden und scheint zu Caspase-4 homolog zu sein (Van de Craen et al., 1997). Das Gen für Caspase-12 beim Menschen enthält im Vergleich zu diesem Gen in Nagetieren so viele Mutationen, dass keine aktive Caspase-12 im Menschen exprimiert werden kann (Fischer et al., 2002). Bei der humanen Caspase-13 hat sich herausgestellt, dass es das Rinder Homolog zur humanen Caspase-4 ist (Koenig et al., 2001). Die Caspasen lassen sich nach ihrer Struktur und Funktion in drei Gruppen einteilen (Abb. 3).



**Abb. 3:** Klassifizierung der humanen Caspasen nach ihrer physiologischen Funktion und Struktur der Prodomäne.

Initiator-Caspasen besitzen eine lange Prodomäne mit einer CARD (**caspase recruitment domain**) oder einer DED (**death effector domain**) Sequenz, die mit anderen CARD oder DED Domänen interagieren kann (Kumar and Colussi, 1999). Procaspase-2 und -9 haben eine CARD Domäne, Procaspase-8 und -10 eine DED Domäne. Caspase-14 besitzt als einzige Initiator-Caspase nur eine kurze Prodomäne, ohne ein erkennbares Sequenz-Motiv (Van de Craen et al., 1998). Initiator-Caspasen sind in der Lage sich selbst zu aktivieren und können anschließend eine so genannte Caspasekaskade initiieren und andere Caspasen aktivieren (Slee et al., 1999).

Effektor-Caspasen besitzen hingegen im allgemeinen nur eine kurze Prodomäne, haben keine intrinsische Enzymaktivität und müssen erst durch andere Caspasen proteolytisch aktiviert werden. Zu ihnen gehören die Caspasen-3, -6 und -7.

Wird in der Zelle eine der Initiator-Caspasen aktiviert, werden kaskadent weitere Caspasen aktiviert. Übereinstimmend mit der Beobachtung, dass Apoptose nicht mit einer allgemeinen und ungerichteten Proteolyse von Proteinen einhergeht, werden nur spezifische, etwa 100, Zielproteine (Earnshaw et al., 1999; Hengartner, 2002) meist an nur einer Stelle gespalten, so dass sie ihre Funktion verlieren oder ändern. Zu diesen Zielproteinen gehören Proteine, die eine Funktion bei der Apoptose einnehmen wie Procaspasen oder Bid und IAPs (inhibitor of **ap**optosis), Cytoskelett Proteine wie Lamin und Aktin, Proteine, die an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, zum Beispiel Cyclin A und Cdc27, Proteine des DNA und RNA Metabolismus, unter anderen ICAD (inhibitor of **cas**pase **act**ivated **DN**ase) und PARP (**poly(ADP) ribose polymerase**), sowie Proteine, die bei der Signaltransduktion eine Rolle spielen, PKB und MEKK1 sind hierfür zwei Beispiele (Chang and Yang, 2000).

Initiator-Caspasen, die am Beginn der Caspasekaskade stehen, können in Säugern auf zwei verschiedenen Wegen aktiviert werden. Caspase-9 wird über den Stress induzierten mitochondrialen *Pathway*, Caspase-8 und Caspase-10 über die „*Death Receptor*“ vermittelte Apoptose aktiviert.

### 1.2.2. „Mitochondrialer Pathway“

#### Bcl-2

Ced-9 und auch Egl-1 gehören zu einer Genfamilie, die nach dem Onkogen Bcl-2 (**B-Cell Lymphoma 2**) benannt wurde (Igaki and Miura, 2004). In Säugern sind mehr als 20 Mitglieder der Bcl-2 Familie bekannt, die alle mindestens eine konservierte BH-Domäne (**Bcl-2 homology**) haben (Cory and Adams, 2002). Sie lassen sich in drei Subfamilien gliedern.

Man kennt Proteine der eigentlichen Bcl-2 Gruppe, die antiapoptotisch wirken und vier BH-Domänen (BH1 bis BH4) besitzen, und zwei weitere Gruppen Bax und BH3-only, die proapoptotisch wirken. Alle Proteine der Bax Gruppe besitzen drei BH-Domänen (BH1 bis BH3), wohingegen Proteine der BH3-only Gruppe nur die BH3-Domäne enthalten. Proteine der antiapoptotisch wirkenden Bcl-2 Gruppe sind mit der äußeren mitochondrialen Membran und der ER/Kernmembran assoziiert. Mitglieder der BH3-only Gruppe sind in Zellen auf verschiedene Weisen inaktiviert. Bim und Bmf sind zum Beispiel an das Cytoskelett gebunden (Puthalakath et al., 1999; Puthalakath et al., 2001), phosphoryliertes Bad wird von 14-3-3 gebunden



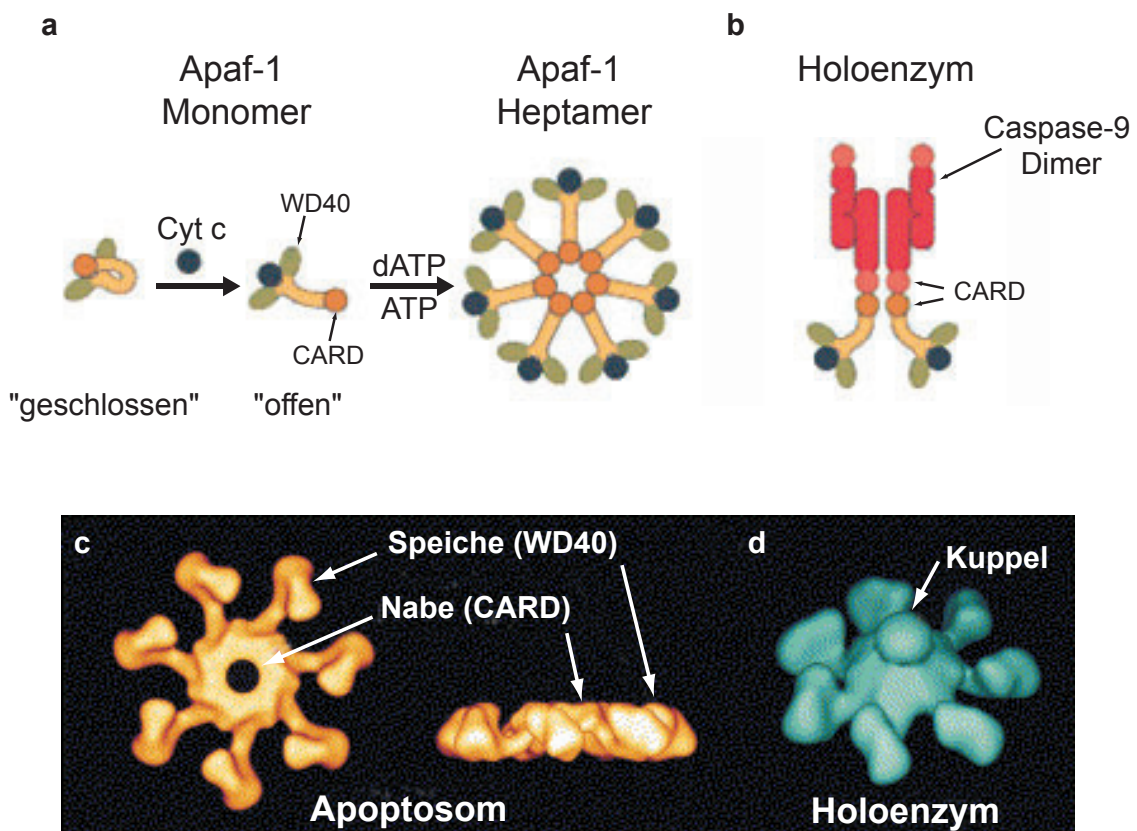
(Zha et al., 1996) und Bid wird als Vorläuferprotein synthetisiert, das zur Aktivierung erst von einer Caspase proteolytisch gespalten werden muss (Li et al.; 1998; Luo et al., 1998). Sobald Zellen apoptotische Signale erhalten und BH3-only Proteine aktiviert werden, interagieren diese mittels ihrer BH3 Domäne mit den Bcl-2 Proteinen und schalten deren antiapoptotische Wirkung aus. Bax und Bak, ein weiteres Protein der Bax-Gruppe, können dann ihre proapoptotische Wirkung entfalten und eine Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran einleiten (Gross et al., 1999). Der genaue Wirkungsmechanismus und die Interaktionen mit den Bcl-2 Proteinen sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt (Zamzami and Kroemer, 2001).

Bei der Apoptose werden verschiedene Proteine aus den Mitochondrien in das Cytoplasma freigesetzt, die alle Apoptose fördern. Das wichtigste unter ihnen ist Cytochrom c, das als APAF-2 isoliert wurde (APAF-3 wurde als Caspase-9 identifiziert, Li et al., 1997). Cytochrom c wird im Nukleus codiert, als inaktives Apo-Cytochrom c an freien Ribosomen im Cytoplasma translatiert und in die Mitochondrien importiert. Dort bekommt es seine aktive Form, indem es zu einem globulären Protein "umgefaltet" und eine Häm-Gruppe angehängt wird. Nur Holo-Cytochrom c, nicht aber Apo-Cytochrom c, kann im Cytoplasma Apoptose auslösen (Liu et al., 1996). Die Fähigkeit zum Elektronentransport ist hierfür allerdings nicht erforderlich (Kluck et al., 1997). Die Vorstellung von den Bcl-2 Proteinen ist heute die, dass sie als Wächter über die Integrität des Mitochondriums agieren, in dem eine Vielzahl „tödlicher“ Proteine, wie in einer Pandora-Büchse, weggeschlossen sind. Zu ihnen gehören außer Cytochrom c auch Smac/Diablo (**S**econd **M**itochondria-derived **A**ctivator of **C**aspase/ **D**irect **I**AP **B**inding protein with **L**ow pI; Diablo ist das homologe Protein in der Maus), ein Inhibitor von IAP, und Omi/HtrA2, eine Serin Protease, die antagonistisch zu IAP (Inhibitor of **A**poptosis **P**roteins) wirkt, indem sie IAP-Caspase Interaktionen zerstört, und AIF (**A**poptosis **I**nducing **F**actor) (Saelens et al., 2004).

#### Apoptosom

Cytochrom c bindet nach Freisetzung ins Cytoplasma an APAF-1 (**a**poptotic **p**rotease-**a**ctivating-**f**actor 1), einem zu Ced-4 homologen Protein ( Zou et al., 1997). Beide gehören zur Gruppe der AP-ATPasen (**A**poptotic-ATPase). Im Unterschied zu Ced-4, interagiert APAF-1 nicht mit einem Protein der Bcl-2 Familie und ist auch nicht

am Mitochondrium, sondern im Cytoplasma lokalisiert (Conradt and Horvitz, 1998; Hausmann et al., 2000). APAF-1 hat drei getrennte Domänen: 1. Eine N-terminale CARD-Domäne, die mit der CARD-Domäne in der Prodomäne von Caspase-9 interagieren kann; 2. Eine Domäne, die eine Nukleotid-Bindestelle mit einer hohen Homologie zur Nukleotid-Bindestelle in Ced-4 enthält, und für die Oligomerisierung von APAF-1 in Gegenwart von dATP und Cytochrom c verantwortlich ist; 3. Eine C-terminale Domäne mit 12 bis 13 Wiederholungen eines WD40 genannten Motivs, das an der Interaktion mit Cytochrom c beteiligt ist und bei Ced-4 fehlt (Cain et al., 2002; Shi, 2002b).



**Abb. 4:** **a) und b)** Modell zur Aktivierung von Apaf-1 und Caspase-9 (verändert nach Adams and Cory, 2002) **a)** Bildung des Apaf-1 Heptamers; **b)** Aktivierung von Procaspase-9 an Apaf-1; **c) und d)** Struktur des Apoptosoms (Cryo-EM Bilder aus Shi, 2002b) **c)** Zwei Ansichten des heptameren Apoptosoms. Die CARD-Domänen befinden sich im Zentrum (Nabe), die WD40 Repeats an der Peripherie (Speiche). **d)** Struktur des Apoptosoms mit gebundener Caspase-9 (Holoenzym).

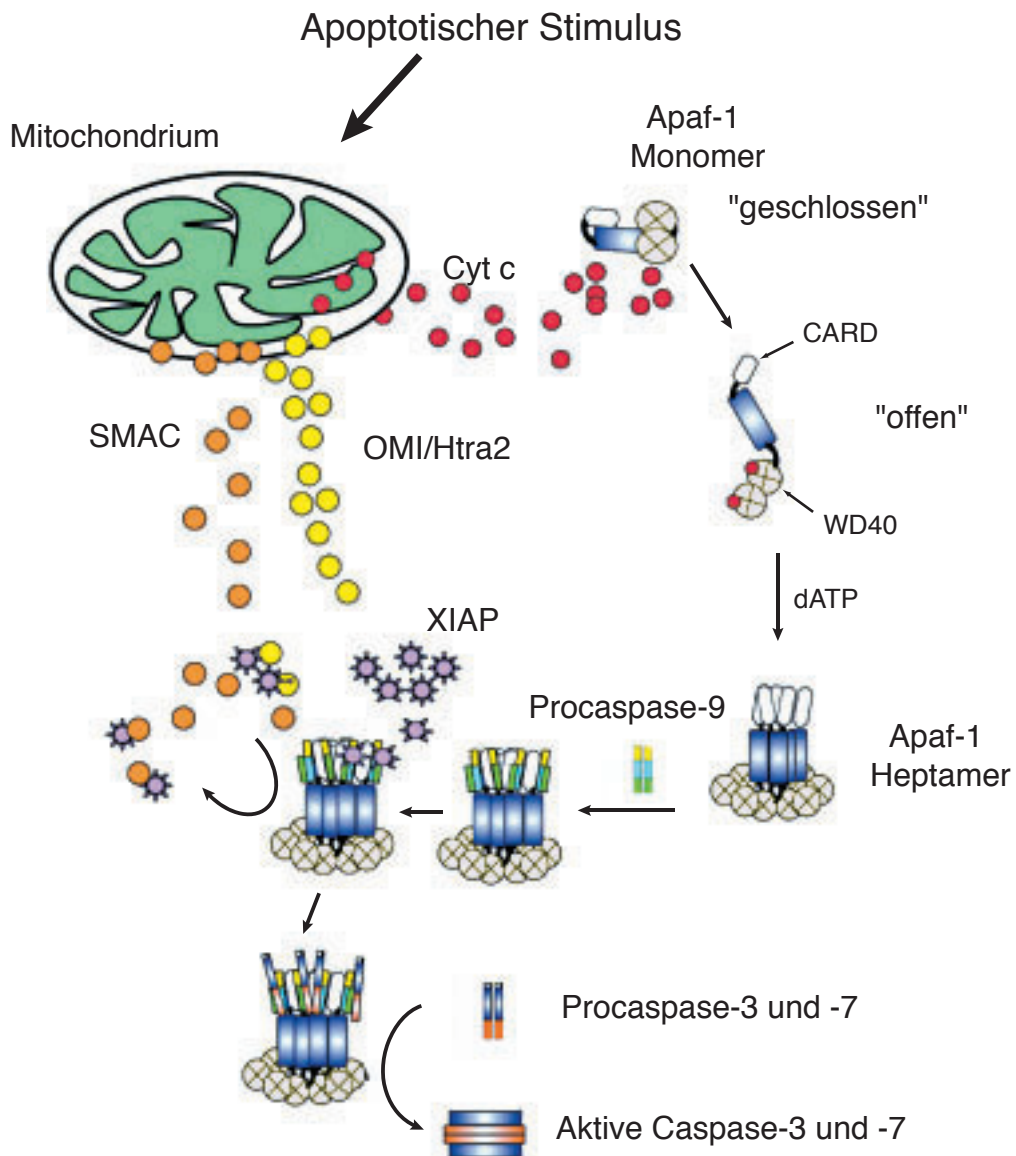
Nach der Bindung von Cytochrom c ändert APAF-1 seine Konformation von der geschlossenen in die offene Form (Abb. 4a). Unter Beteiligung von dATP bildet sich

aus sieben Cytochrom c/APAF-1 Heterodimeren ein 1,4 MDa großer Komplex mit einer ringförmigen Propellerstruktur, der Apoptosom genannt wird (Abb. 4c).

Die Aktivierung der Initiator-Caspase-9 erfolgt an dem Apoptosom Komplex. Das Verhältnis der Enzymaktivität von prozessierter Caspase-9 zu unprozessierter Procaspase-9 (Zymogenizität) hat etwa den Wert 10. Bei Caspase-3, einer Effektor-Caspase, hingegen liegt die Zymogenizität bei über 10.000, d.h. Caspase-9 muss nicht prozessiert werden, um aktiv zu sein (Stennicke et al., 1999). Der Grund hierfür dürfte ein 15 Aminosäuren langer Linker zwischen großer und kleiner Untereinheit sein, der lang und flexibel genug ist, um die Bildung des katalytischen Zentrums zu ermöglichen. Um die hierfür notwendigen allosterischen Veränderungen zu induzieren, ist die Interaktion mit dem Apoptosom erforderlich (Stennicke et al. 1999).

Eine Procaspase-9 bindet an die CARD-Domäne jedes APAF-1 (Abb. 4b und 4d), wird dort aktiviert und prozessiert eine benachbarte Procaspase-9 an Asp315, so dass daraus eine p35 große Untereinheit und eine p12 kleine Untereinheit resultieren. Von Caspase-9 werden Caspase-3 und Caspase-7 aktiviert. Caspase-3 erhöht in einer positiven Rückkopplungsschleife die Aktivität des Apoptosoms, indem es Caspase-9 in der kleinen Untereinheit an Asp330 schneidet. Die resultierende Caspase-9 p35/p10 hat eine um den Faktor 8 erhöhte Aktivität im Vergleich zur Caspase-9 p35/p12 (Zou et al., 2003). Abbildung 5 zeigt eine schematische Übersicht des mitochondrialen *Pathways* der Apoptose (Abb. 5).

Auch die Aktivierung von Caspase-2, die wie Caspase-9 eine CARD Domäne besitzt, scheint von einem großen Proteinkomplex vermittelt zu werden, an dem APAF-1 aber nicht beteiligt ist (Read et al., 2002). Der genaue Mechanismus und die beteiligten Proteine sowie die Frage, ob bei der stress-induzierten Apoptose Caspase-2 oder Caspase-9 die Initiator Caspase ist, bleibt noch offen. Es gibt allerdings Hinweise, dass cytotoxischer Stress Caspase-2 aktiviert und diese Caspase dann für die Permeabilisierung der Mitochondrien verantwortlich ist (Lassus et al., 2002).

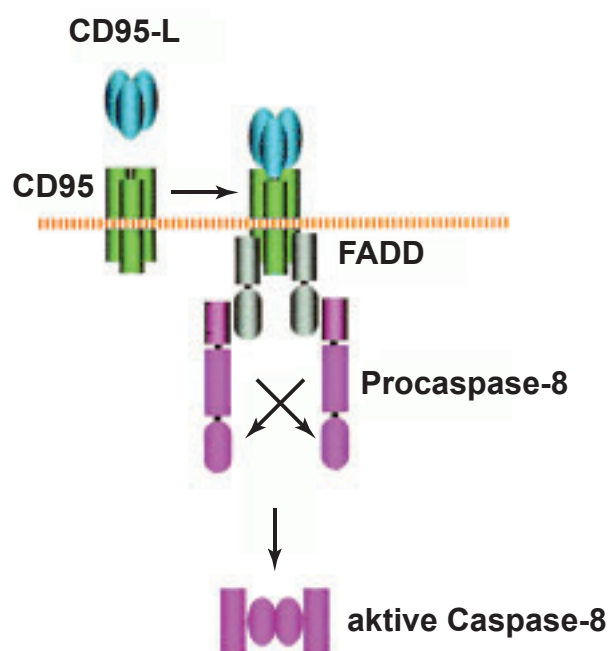


**Abb. 5:** Mitochondrialer Pathway der Apoptose. Cytochrom c wird aus dem Mitochondrium freigesetzt und bindet an die WD40 Motive von Apaf-1 und führt zu deren „Entfaltung“. An die „offene“ Form von Apaf-1 kann dATP binden. Dies führt zu weiteren Konformationsänderungen und ermöglicht die Bildung des Apaf-1 Heptamers, der Procaspase-9 rekrutieren kann. Procaspase-9 wird am Apoptosom aktiviert und kann sich autokatalytisch spalten. Die so entstandene aktive Caspase-9 bleibt an das Apoptosom gebunden. XIAP ein IAP kann an Caspase-9 binden und deren Aktivität inhibieren. SMAC und OMI/Htra2, die auch aus dem Mitochondrium freigesetzt werden, binden wiederum an XIAP und können diese Inhibition aufheben. Nicht inhibierte Caspase-9 kann Effektor-Caspasen aktivieren und die Caspase-Kaskade initiieren. (Nach Cain et al., 2001)

### 1.2.3. Death-Rezeptor vermittelter Pathway

Auch bei der *Death*-Rezeptor vermittelter Apoptose spielen die Mitochondrien eine Rolle, allerdings nur bei der sekundären Amplifikation der Caspasekaskade. Ausgelöst wird die Apoptose durch die Bindung von Liganden an sogenannte *Death*-Rezeptoren. Diese *Death*-Rezeptoren gehören zur Familie der Tumor-Necrosis-Factor (TNF)-/ Nerve-Growth-Factor (NGF)-Rezeptoren. Bisher sind im Menschen sechs *Death*-Rezeptoren bekannt, TRAIL-R1 ( TRAIL=TNF Related Apoptosis Inducing Ligand), TRAIL-R2, TNF-R1, CD95, DR3 (**D**eath **R**eceptor) und DR6, wobei einige unter unterschiedlichen Namen publiziert wurden (Sartorius et al., 2001). Aktiviert werden sie von Liganden der TNF Familie. Diese Liganden sind Transmembranproteine, die von Metalloproteasen zu einer löslichen Form prozessiert werden können. Ob die lösliche oder die membrangebundene Form des Liganden Apoptose induziert, war lange unklar. Eine Studie (Hohlbaum et al., 2000) hat jedoch gezeigt, dass an die Membran gebundener CD95L Apoptose induziert, wohingegen löslicher CD95L Apoptose hemmt.

#### CD95 vermittelte Apoptose



**Abb. 6:** CD95 vermittelte Apoptose. Bindung von CD95-L führt zur Trimerisierung und Aktivierung von CD95. Über das Adaptorprotein FADD kann Procaspase-8 an den „Death Inducing Signaling Complex“ (DISC) binden und sich autokatalytisch aktivieren. (Nach Chang and Yang, 2000)

Am genauesten ist die Death-Rezeptor induzierte Apoptose am Beispiel von CD95 (auch Fas oder APO-1 genannt) charakterisiert. Durch Bindung des als Trimer vorliegenden Liganden CD95L erfolgt eine Trimerisierung des CD95-Rezeptors. Dies ist für die Weiterleitung des Signals erforderlich, weil CD95 weder als Monomer noch als Dimer Apoptose induzieren kann (Dhein et al., 1992). Die intrazelluläre Seite des Rezeptors enthält eine etwa 80 Aminosäuren lange Death Domäne (DD), die über homophile Interaktionen an andere Proteine wie FADD (**F**as-**a**ssociated Protein with **D**eath **D**omain) und RIP mit ihrer DD binden kann (Cinnaiyan et al., 1995; Lin et al., 1999). FADD besitzt zusätzlich zur DD eine DED (**D**eath **E**ffector **D**omain), mittels derer Procaspase-8 und Procaspase-10, die ebenfalls eine DED in ihrer Prodomäne besitzen, an den DISC (**D**eath **I**nducing **S**ignaling **C**omplex) genannten Rezeptorkomplex binden können (Sprick et al., 2002) (Abb. 6). Die Aktivierung der an DISC gebundenen Procaspasen wird ähnlich wie bei der am Apoptosom aktivierten Caspase-9 mit dem „induced-proximity“-Modell erklärt (Salvesen and Dixit, 1999). Dieses Modell setzt voraus, dass Procaspasen eine niedrige basale Enzymaktivität haben. Sobald zwei oder mehr Procaspasen eng zusammen gebracht werden, aktivieren sie sich gegenseitig in *trans*. Diese Vorstellung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Dimerisierung von Procaspase-10 die Aktivierung von Caspase-10 induziert (Wang et al., 2001a). Ein Unterschied zu Caspase-9 besteht darin, dass Caspase-8 und -10, wie bei den meisten Caspasen, nicht nur zwischen großer und kleiner Untereinheit, sondern auch zwischen Prodomäne und großer Untereinheit gespalten werden (Krueger et al., 2001). Nach der Abtrennung der Prodomäne bildet sich aus je zwei großen und kleinen Untereinheiten am DISC die aktive Caspase und wird in das Cytoplasma freigesetzt (Lavrik et al., 2003). Hier aktiviert Caspase-8 die Effektor-Caspase-3. Zusätzlich wird auch noch der mitochondriale *Pathway* induziert und somit eine Signalverstärkung erreicht, indem Caspase-8 Bid prozessiert und damit aktiviert (Li et al., 1998; Luo et al., 1998)



### 1.3. Gibt es Caspase unabhängige Apoptose ?

Lange Zeit war Apoptose untrennbar mit massiver Caspase Aktivierung verbunden (Martin and Green, 1995; Horvitz, 1999), so dass die Identifizierung von AIF als einem Caspase unabhängigen apoptotischen „*Executor*“ durch die Gruppe um Guido Kroemer (Susin et al., 1999) anfangs auf Skepsis stieß. Der Apoptose induzierende Faktor AIF ist ein mitochondrial lokalisiertes, im Nukleus codiertes Flavoprotein mit NADH Oxidase Aktivität. Sowohl die NADH Oxidase Aktivität als auch die Bindung von FAD sind für die apoptotische Aktivität von AIF nicht erforderlich (Susin et al., 1999; Miramar et al., 2001). Die Redox-Partner von AIF unter physiologischen Bedingungen sind noch nicht bekannt. Nach Induktion von Apoptose wird AIF aus den Mitochondrien ins Cytoplasma freigesetzt und transloziert in den Zellkern (Daugas et al., 2000; Susin et al., 1999).

Versuche mit rekombinantem Mäuse AIF und gereinigten Zellkernen zeigen, dass AIF die Kondensation von Chromatin und Fragmentation von DNA in etwa 50 kBp große Bruchstücke induzieren kann. Anders als bei der durch Caspasen ausgelösten DNA Fragmentierung mittels CAD (Caspase Activated DNase) und lysosomaler DNase II zeigt sich kein *DNA-Laddering*. Da AIF auf "nackte" DNA oder Hitze inaktivierte Zellkerne keine Wirkung hat, ist vermutlich die Interaktion von AIF mit anderen Proteinen erforderlich, um DNA Degradation zu verursachen (Susin et al., 1999).

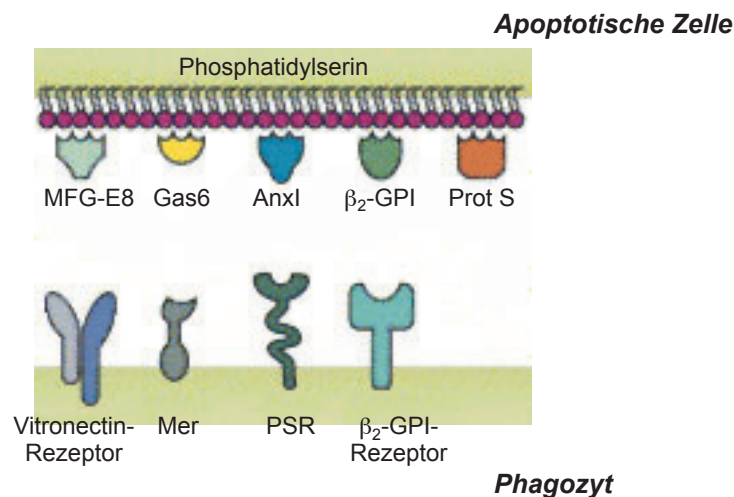
*In vitro* Experimente belegen, dass AIF in *C. elegans* mit Endonuclease G synergistisch DNA Degradation fördert (Wang et al., 2002). In Säugetieren gibt es Hinweise auf einen synergistischen Effekt von AIF mit Cyclophilin A (Cande et al., 2004).

Caspasen können sicherlich die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran verursachen, und damit die Freisetzung von AIF bewirken. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass AIF auch nach Inhibierung der Aktivierung von Caspasen (zum Beispiel in einem Apaf-1 *knock-out* Hintergrund) oder der Aktivität von Caspasen (durch Zugabe von Caspase Hemmern wie z-VAD-fmk) aus den Mitochondrien freigesetzt werden kann und Apoptose auslöst (Daugas et al., 2000; Loeffler et al., 2001; Susin et al., 2000). Eine umfangreiche Übersicht und Bewertung dieser Arbeiten bieten Cande et al. (Cande et al., 2004). Dass AIF unabhängig von Caspasen Apoptose induzieren kann, zeigt der Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*.

In diesem Organismus, der keine Caspasen besitzt, transloziert AIF nach Induktion des programmierten Zelltods aus den Mitochondrien in den Zellkern (Arnoult et al., 2001). Es scheint, dass AIF bereits vor Erfindung der Caspasen durch die Evolution eine wichtige Komponente der Zelltod Maschinerie war (Lorenzo et al., 1999).

### 1.4. Phagozytose der Apoptotischen Zellen

Martin Raff wird mit dem Satz zitiert: „Compared with the life of the organism, cells are apparently cheap“ (Raff, 1998). Ein Grund weshalb für einen Organismus Zellen so „billig“ sind, ist, dass unabhängig davon, ob Apoptose Caspase abhängig oder unabhängig induziert wird, die „Zelleichen“ im Organismus sehr schnell und effektiv entsorgt werden, indem sie von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert und somit recycelt werden. Hierfür ist es notwendig, dass sich eine apoptotische Zelle ihrer Umgebung eindeutig als eine solche zu erkennen gibt und Nachbarzellen diese Signale detektieren. Für diesen Erkennungsmechanismus werden Rezeptoren auf der phagozytierenden Zelle benötigt, die spezifische Veränderungen auf der Oberfläche apoptotischer Zellen erkennen. Die am besten charakterisierte Zellmembranveränderung ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Seite der Zellmembran (Martin et al., 1995; Zwaal and Schroit, 1997).



**Abb. 7:** Phosphatidylserin erkennende Proteine. MFG-E8, milk-fat-globule-EGF-Factor8; Gas6 growth arrest specific 6; Anxl, Annexin I;  $\beta_2$ -GPI,  $\beta_2$ -glycoprotein-I; Prot S, Protein S; Mer, receptor-tyrosin-kinase (exprimiert in Monocyten und Gewebe Epithelialen Ursprungs); PSR, phosphatidylserine receptor; (verändert nach Lauber et al., 2004)



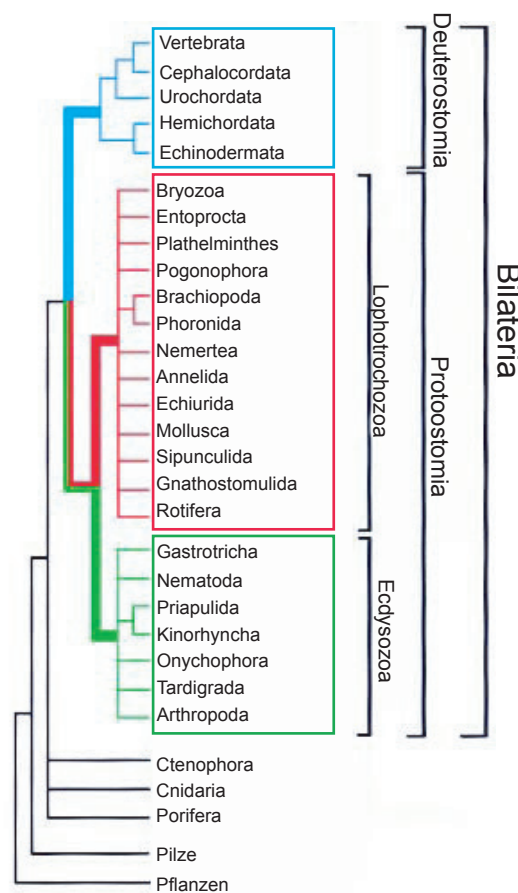
Diese Veränderung kann *in vivo* mit Hilfe von Annexin V detektiert werden (Blankenberg et al., 1998). Phospholipid Scramblase induziert diese Translokation von PS. Direkte Phosphorylierung von Phospholipid Scramblase bei Apoptose durch Proteinkinase C $\delta$  führt zu einer erhöhten Scramblase Aktivität und somit zu vermehrter Exposition von PS auf der äußeren Seite der Zellmembran (Frasch et al., 2000). Dort kann PS von verschiedenen Proteinen erkannt werden. Zu diesen gehören MFG-E8 (Hanayama et al., 2002), die Serum Proteine  $\beta$ 2-Glycoprotein 1 und Protein S (Balasubramanian and Schroit, 1998; Anderson et al., 2003), Annexin-I (Arur et al., 2003) und Gas6 (Nakano et al., 1997) (Abb. 7).

Im Jahre 2000 wurde von der Gruppe um Valerie Fadok ein Rezeptor aus humanen Makrophagen kloniert, der eine Schlüsselstellung bei der Phagozytose apoptotischer Zellen einnehmen könnte (Fadok et al., 2000). Dieser PSR genannte Rezeptor wurde mittels *Phage Display* einer Makrophagen cDNA Bibliothek als Antigen zu einem Antikörper, mAb 217, identifiziert, der gegen stimulierte humane Makrophagen generiert wurde. Dieser Antikörper inhibiert die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen. Werden Zellen mit PSR transfiziert, die diesen Rezeptor nicht exprimieren und keine apoptotischen Zellen phagozytieren können (z.B. Jurkat T), so erwerben sie die Fähigkeit, apoptotische Zellen auf eine Phosphatidylserin spezifische Weise zu phagozytieren. Zusätzlich konnte noch gezeigt werden, dass phagozytierende Makrophagen in Abhängigkeit von ihrer Interaktion mit Phosphatidylserin Cytokine freisetzen und eine inflammatorische Reaktion unterdrücken.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Interaktion von Phosphatidylserin mit PSR weniger bei der Anheftung der apoptotischen Zelle an die phagozytierende Zelle eine Rolle spielt, sondern vielmehr für die Phagozytose notwendig ist (Hoffmann et al., 2001). Dies führte zu dem „*tether and tickle*“ genannten Modell, nach dem die Phagozytose apoptotischer Zellen in zwei Schritten abläuft: Zuerst erfolgt über bisher noch nicht identifizierte Rezeptoren die Anheftung (*tether*) und anschließend wird in einem zweiten Schritt die Internalisierung ausgelöst (*tickle*) (Zullig and Hengartner, 2004).

## 1.5. *Hydra* als Modellorganismus

Vieles von dem, was wir heute über die Mechanismen der Apoptose wissen, verdanken wir Untersuchungen in *C. elegans*. Dabei zeigt sich allerdings, dass es signifikante Unterschiede zur wesentlich komplexeren Apoptosemaschinerie in Vertebraten und Arthropoden gibt (Igaki and Miura, 2004). Beim Vergleich der Apoptosemaschinerie dieser drei Modellorganismen wäre es hilfreich zu wissen, aus welchen Komponenten sich die „Ur-Apoptosemaschinerie“ zusammensetzte. Dazu muss man an die Basis der Evolution der tierischen Metazoa gehen und findet dort den Stamm der Cnidaria als ersten Stamm von Vielzellern mit einer definierten Körperachse (Abb. 8).



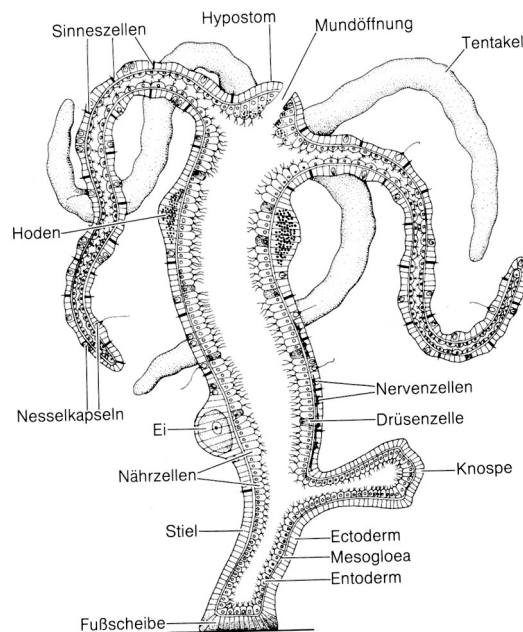
**Abb. 8:** Auf rRNA Daten beruhender Stammbaum der Metazoa. (Nach Adoutte et al., 2000)

Cnidaria gehören zu den ältesten rezenten Tieren. Fossilien lassen sich noch für die Zeit vor der Cambrischen Radiation vor etwa 540 Millionen Jahren nachweisen (Chen et al., 2002). Weil zu dieser Zeit die drei basalen Tiergruppen, Cnidaria,

Ctenophora und Porifera schon vorhanden waren, muss deren Trennung schon wesentlich früher erfolgt sein. Berechnungen mit Hilfe der molekularen Uhr ergeben hierfür einen Zeitpunkt von etwa 1200-1500 Millionen Jahren (Wang et al., 1999).

Cnidaria faszinieren schon lange die Wissenschaft. RB Williams merkte an: „it is impossible to separate aesthetic and scientific interests in these animals. They are among the most beautiful of any, rivalling all others in their graceful forms and often vivid colours.“ (Williams et al., 1991)

Insbesondere *Hydra* aus der Klasse der Hydrozoa hat das Interesse von Forschern wie Abraham Trembly bereits im 18. Jahrhundert geweckt. Ihre Faszination galt allerdings weniger der äußeren Erscheinung, sondern dem außergewöhnlichen Regenerationsvermögen der Tiere, welches es ihnen ermöglicht, sich sogar aus einzelnen Zellen zu regenerieren (Gierer et al., 1972). *Hydra* ist ein solitär lebender Süßwasserpolymp mit einem sehr einfachen, radiärsymmetrischen Körperbauplan und einer basal-apikalen Körperachse.



**Abb. 9:** Adulter Hydra Polyp. (Nach Renner, 1984)

Der Körper setzt sich aus zwei Epithelschichten, Ekto- und Endoderm, mit einer dazwischen liegenden azellulären Mesogloä zusammen (Abb. 9). Zu den Ekto- und Endodermzellen kommen die interstitiellen Zellen als dritte Zelllinie hinzu. Aus ihnen gehen die für Cnidaria charakteristischen Nesselzellen, sowie Drüsen-, Nerven- und

Geschlechtszellen hervor. Ein adulter *Hydra vulgaris* Polyp hat eine Größe von etwa 1 cm und besteht aus etwa 100.000 Zellen.

### **1.5.1. Apoptose in *Hydra***

Unabhängig von der Nahrungsversorgung bleibt die Zellzykluszeit der Epithelzellen mit etwa drei Tagen konstant (David and Campbell, 1972). Weil die Gesamtzellzahl in hungernden Tieren jedoch nicht steigt, muss ein anderer Mechanismus das Wachstum regulieren. Bosch und David konnten 1984 zeigen, dass bei hungernden Tieren die Zellzahl nicht über die Proliferationsrate, sondern durch vermehrten Zelltod, kontrolliert wird (Bosch and David, 1984). Die Bestätigung, dass es sich bei diesem Zelltod um Apoptose handelt, konnte durch Nachweis des DNA-*Laddering*, der Chromatinkondensation und durch Acridinorange-Färbung erbracht werden (Cikala et al., 1999).

## **1.6. Zielsetzung der Arbeit**

Ein Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob bereits die frühesten vielzelligen tierischen Metazoa über die Schlüsselenzyme der Apoptose, die Caspasen verfügen. Auch AIF als Caspase-unabhängiger „Executer“ der Apoptose sollte in *Hydra* identifiziert werden.

Ein weiterer Schwerpunkt galt der Phagozytose apoptotischer Zellen. Besitzt auch *Hydra* den PSR-Rezeptor, der in Vertebraten für die Erkennung und Phagozytose apoptotischer Zellen erforderlich ist, und ist er an der Phagozytose beteiligt? Um diese Fragen zu klären, sollte PSR aus *Hydra* isoliert und seine Lokalisation analysiert werden.

Hierfür war es erforderlich ein Transformations-System zu etablieren, um transgene Hydren zu erzeugen und mittels Expression von GFP-Fusionsproteinen die Lokalisation von Proteinen in *Hydra in vivo* zu beobachten.

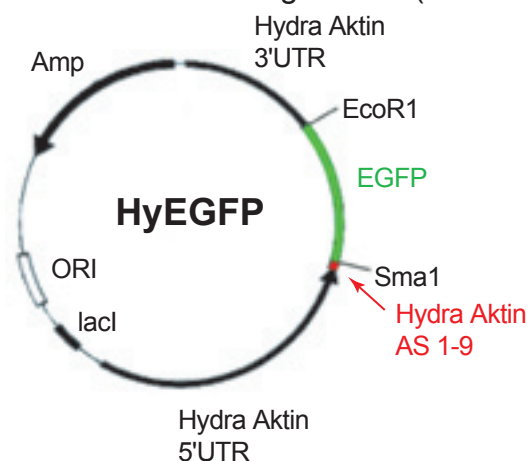
## 2. Ergebnisse

### 2.1. Etablierung von Methoden zur transienten Expression von EGFP Fusionsproteinen in *Hydra*

So viele Vorteile *Hydra* als Modellorganismus auch bietet, hat es doch seit einigen Jahren zunehmend an Attraktivität verloren. Ein Hauptgrund hierfür liegt darin, dass man *Hydra*-Zellen bisher nicht transformieren konnte. Bis zum Beginn dieser Arbeit war es nicht möglich, Fremd-DNA in *Hydra* zu exprimieren. Somit waren alle auf einem funktionierenden Transformationssystem aufbauenden Methoden wie „*Knockout*“ Mutationen oder Expression von Fusionsproteinen in *Hydra* nicht möglich. Funktionelle Analysen konnten nur in sehr reduziertem Umfang stattfinden. Um diese Einschränkungen zu durchbrechen wurde in dieser Arbeit ein neuer Anlauf gemacht, ein funktionierendes Transformationssystem in *Hydra* zu etablieren.

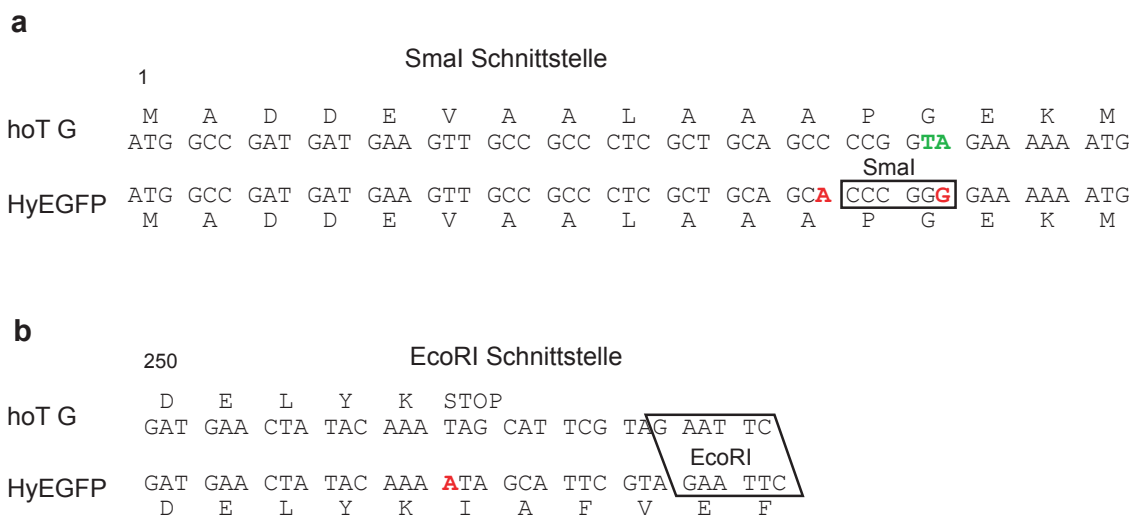
#### 2.1.1. Konstruktion des Vektors HyEGFP

Ein Expressionsvektor wurde auf der Basis des von Jan Lohman (Lohman, 1999) geschaffenen Expressionsvektors hoT G konstruiert. Dieses Plasmid enthält den *Hydra*-Aktin-Promotor und einen offenen Leserahmen aus den ersten neun Aminosäuren von *Hydra* Aktin, einen sieben Aminosäuren langen Linker und das Green Fluorescent Protein (GFP) (Shimomura et al., 1962) als Reporter gen. Auf diesen ORF folgt die 3' UTR des *Hydra* Aktin Gens. In das Plasmid wurden mittels PCR-Mutagenese drei Modifikationen eingebracht (Abb. 10).



**Abb. 10:** Plasmidkarte des EGFP exprimierenden Vektors HyEGFP

Zum ersten wurde in dem Wildtyp GFP das Serin an Position 65 (in dem Vektor hoT G an Position 81) zu Cystein umgewandelt. Diese EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) genannte Variante des GFP weist eine um den Faktor 25 erhöhte Fluoreszenz gegenüber dem Wildtyp GFP auf (Cormack et al., 1996). Zum anderen wurden am 5' und am 3' Ende des EGFP Restriktionsschnittstellen für die Enzyme SmaI und EcoRI geschaffen, so dass andere Proteine in den Vektor HyEGFP kloniert und als EGFP Fusionsproteine exprimiert werden konnten (Abb. 11). Entsprechend der eingefügten Restriktionsschnittstellen wurden die Plasmide HyEGFPSmaI bzw HyEGFPEcoRI benannt.



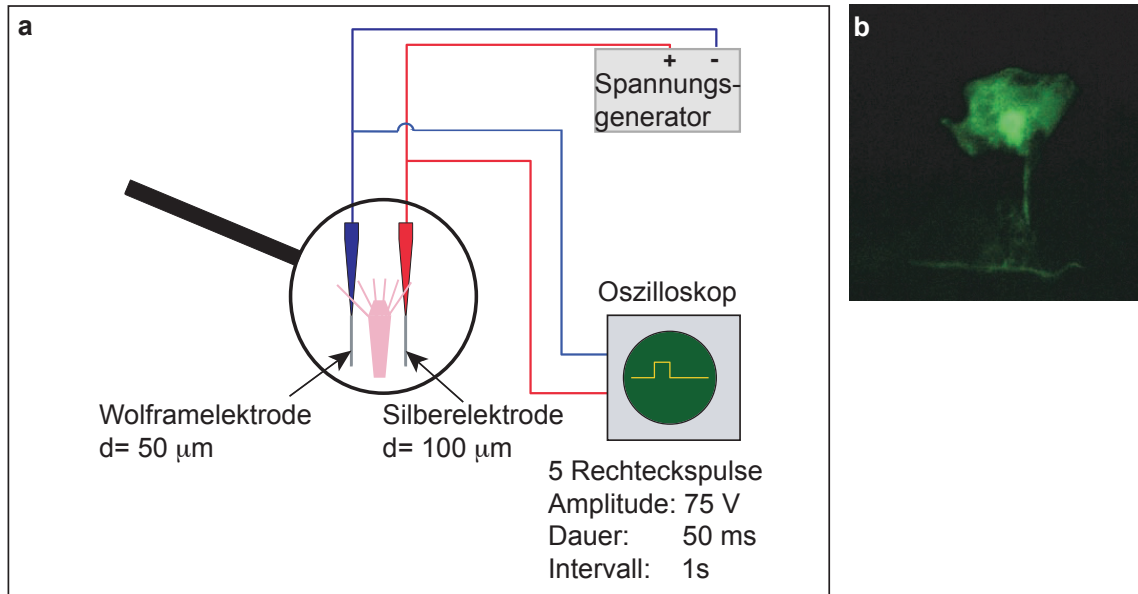
**Abb. 11:** Modifikation des Vectors hoT G zu HyEGFP. **a)** Zur Generierung der SmaI Schnittstelle wurden zwei Nukleotide inseriert (rot) und zwei deletiert (grün). **b)** Um die EcoRI Schnittstelle für die Klonierung eines EGFP-Fusionsproteins verwenden zu können, musste das Stopcodon beseitigt werden und der Leserahmen korrigiert werden. Dies wurde durch die Insertion eines Nukleotids (rot) erreicht.

### 2.1.2. Zwei verschiedene Transformationssysteme

Mit dem Vektor HyEGFP wurden zwei unterschiedliche Transformationssysteme etabliert. Eins beruht auf der von Tsuyoshi Momose (Momose et al., 1999) beschriebenen Mikroelektroporations Technik. Das andere System verwendet eine selbst gebaute Partikelkanone (Wetterauer et al., 2000) oder die Helios GeneGun der Firma Bio-Rad zur ballistischen Transformation.

### Mikroelektroporation

Der Versuchsaufbau für die Mikroelektroporation ist in Abbildung 12a dargestellt. Jede Hydra wurde einzeln transformiert. Dazu wurde sie auf eine Petrischale gelegt und das gesamte Medium abgenommen. Das Tier wurde dann in einem Tropfen DNA-Lösung (2 mg/ml DNA in 25  $\mu$ l TE) aufgenommen. Die Elektroden wurden manuell, parallel zum Tier gehalten und 5 Rechteckspulse von 50 ms Dauer im Intervall von 1s appliziert.



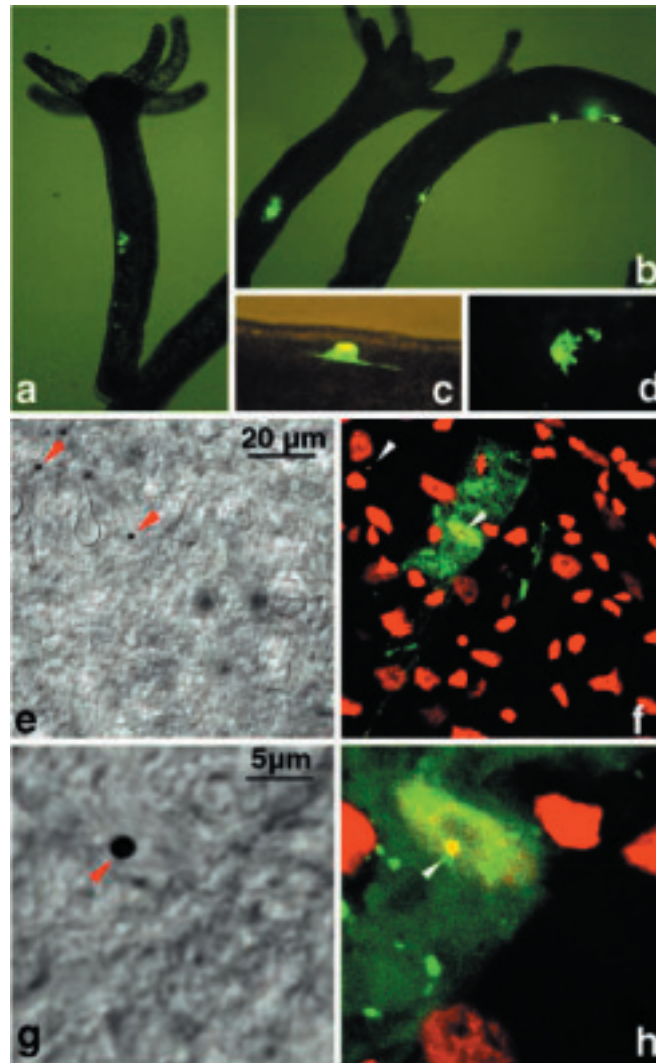
**Abb. 12:** **a)** Versuchsaufbau für die Mikroelektroporation von Hydra. **b)** Fluoreszenzmikroskopfoto (FITC-Filter) einer EGFP exprimierenden Muskelzelle in einem lebenden Tier.

48 Stunden nach der Elektroporation der Hydren waren in etwa jedem vierten Tier grün leuchtende, EGFP exprimierende Zellen im Fluoreszenzmikroskop zu beobachten. Es handelte sich dabei fast ausschließlich um ektodermale Epithelzellen. Abbildung 12b zeigt eine transformierte Zelle, bei der deutlich die Muskelfasern zu erkennen sind. EGFP war im Cytoplasma und im Nukleus lokalisiert. Die Zahl der grün leuchtenden Zellen pro Tier schwankte stark von Versuch zu Versuch. Es wurden aber wiederholt 30-40 EGFP exprimierende Zellen pro Tier beobachtet. Nach ein bis zwei Wochen war das EGFP Signal nicht mehr sichtbar. Bei zwei Tieren waren jedoch nach fast vier Wochen noch EGFP exprimierende Zellen zu beobachten. Dabei hatte sich aus ursprünglich einer Epithelzelle eine Gruppe von 4-8 Zellen gebildet, wobei die Intensität der EGFP Expression nicht abgenommen hatte. Daher lag die Vermutung nahe, dass eine Integration des Vektors ins Genom stattgefunden hatte.



### Ballistische Transformation

Einen Tag nach Beschuss der Tiere mit DNA beschichteten Goldkugeln konnten in den meisten Tieren grün leuchtende, EGFP exprimierende Zellen beobachtet werden. Es handelte sich dabei fast ausnahmslos um ektodermale Epithelzellen, in denen EGFP im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert war.



**Abb. 13: a-d)** Lebende Hydra 24 h nach der Transfection mit dem Vector HyEGFP mittels der Helios GeneGun. Fluoreszenzmikroskopbilder (FITC-Fillter). **e-h)** Konfokale Bilder einer EGFP exprimierenden Epithelzelle die mit TO-PRO3 gegengefärbt wurde. Der selbe Bereich des fixierten Tieres wurde im Phasenkontrast (**e** und **g**) und im Fluoreszenzkanal (**f** und **h**) eingescannt. Die Bilder sind Projektionen serieller optischer Schnitte. Rote und weiße Pfeilspitzen markieren Goldkugelnchen.

In Abbildung 13a und b, sowie in höherer Vergrößerung 13c sind solche Tiere zu erkennen. Abbildung 13d zeigt eine Ektodermzelle sowie ein Paar i-Zellen.



Im Vergleich zur Mikroelektroporationsmethode war die Anzahl der Tiere, die mindestens eine EGFP exprimierende Zelle aufwiesen, bei der ballistischen Transformation deutlich höher, es wurden aber selten mehr als drei Zellen pro Tier gefunden. Nach etwa einer Woche waren die meisten, nach zwei Wochen alle EGFP exprimierenden Zellen verschwunden.

Die Analyse fixierter Hydren mittels konfokaler Mikroskopie ergab, dass alle Zellen, die EGFP exprimierten, eine Goldkugel im Zellkern trugen. Weil die Goldkugeln im Phasenkontrast besser als im Fluoreszenzkanal zu erkennen sind, wurden beide miteinander verglichen, um die Goldkugeln zweifelsfrei zu identifizieren (Abb. 13e und f sowie in höherer Vergrößerung g und h). Bei Lokalisation der Goldkugeln im Cytoplasma wurde keine EGFP Expression beobachtet. Abbildung 13e und f verdeutlichen dies. Im Phasenkontrast sind deutlich zwei Goldkugeln zu erkennen (Abb. 13e und g rote Pfeilspitzen), von denen nur die rechte innerhalb eines Zellkerns einer EGFP exprimierenden Zelle liegt (Abb. 13f und h weiße Pfeilspitzen).

## **2.2. Isolierung und Charakterisierung von HyCasp A, HyCasp 3B und HyCasp 3C, dreier Caspasen in *Hydra***

Die Sequenz von Caspasen verschiedener Organismen war zu Beginn dieser Arbeit schon bekannt. Durch eine vergleichende Analyse ihrer Proteinsequenzen konnten drei hoch konservierte Regionen identifiziert werden. Zwei davon (LSHG und QACRG) befinden sich in der großen Untereinheit und enthalten die Aminosäuren, die das aktive Zentrum der Caspase bilden, die dritte Region (GSWFI) liegt in der kleinen Untereinheit und ist ein Teil der Substratbindetasche. Für alle drei Regionen (Abb.14) wurden degenerierte Primer entworfen, um mittels PCR den dazwischen liegenden Bereich des Gens zu amplifizieren.

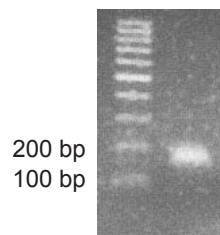
### **2.2.1. Isolierung zweier Caspase Genfragmente aus *Hydra vulgaris* cDNA**

In einem ersten Schritt wurde *H. vulgaris* cDNA mittels PCR und den Primerpaaren CP1/CP3 bzw. CP2/CP4 amplifiziert. Die PCR Reaktion wurde anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Obwohl auf dem Gel kein PCR Produkt zu erkennen war, wurde jeweils der Bereich des Gels ausgestochen, in dem das zu erwartende DNA Fragment vermutet wurde. Ausgehend von bereits bekannten Caspase Sequenzen wurde für das Primerpaar CP1/CP3 ein Fragment von ca. 150bp, für CP2/CP4 ein Fragment von ca. 180 bis 210 bp Länge erwartet.



des P1 Aspartats des Substrats. Die Prozessierungsstellen des Proenzym sind grün markiert. In den Hydra-Caspasen sind die Schnittstellen nur postuliert (mit Ausnahme von IRKD, der Prozessierungsstelle in HyCasp A zwischen der großen und kleinen Untereinheit, die von N. Schmidt verifiziert werden konnte (Schmidt, 2003).

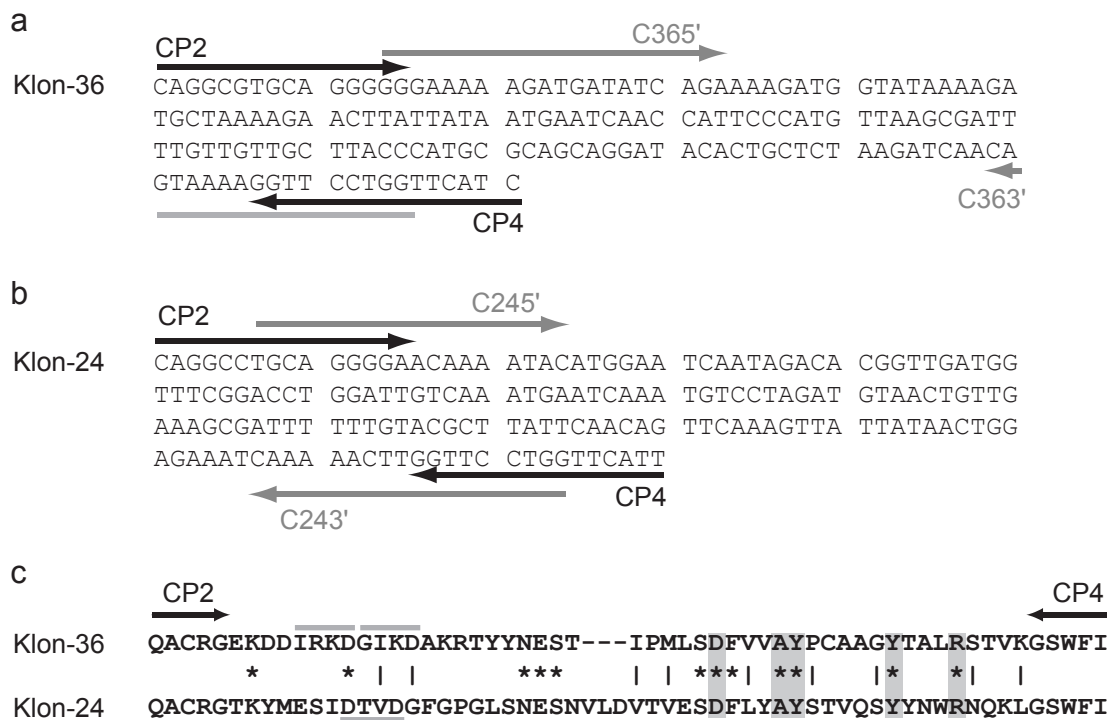
Aus der Agarose wurde DNA eluiert und in einem zweiten Schritt 2 µl des Eluats als Template für eine erneute PCR mit den gleichen Primerpaaren eingesetzt. Nach dieser zweiten Amplifikationsrunde war auf dem Agarose-Gel für das Primerpaar CP2/CP4 eine DNA Bande von ca. 180 bp zu erkennen (Abb. 15).



**Abb. 15:** Mit dem Primerpaar CP2/4 amplifizierte cDNA auf einem Agarosegel.

Dieses Fragment wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert. Nach Transformation des Vektors in *E.coli* wurden 30 Klone sequenziert. Dabei wurden zwei sich voneinander deutlich unterscheidende Caspasen identifiziert (Abb. 16a und b). Nach der Nummerierung der Klone wurden die beiden gefundenen Caspasefragmente Klon-24 und Klon-36 benannt. Klon-36 war unter den 30 Klonen einmal und Klon-24 zweimal vertreten. Beide Sequenzen besitzen potentielle Caspase Prozessierungsstellen und auch die bei anderen bekannten Caspasen konservierten Aminosäuren D192, A196, Y197, Y203 und R207<sup>1</sup> konnten identifiziert werden (Abb. 16c).

<sup>1</sup> Die Nummerierung der AS bezieht sich auf humane Caspase-3



**Abb. 16:** **a und b)** DNA Sequenzen der isolierten Klone 36 und 24. Primer sind mit Pfeilen markiert; **c)** Vergleich der Aminosäuresequenz von Klon-36 und Klon-24. Identische AS sind mit Asterisken, ähnliche mit Strichen markiert. Potentielle Prozessierungsstellen sind mit grauen Balken, die in Caspasen konservierten AS D192, A196, Y197, Y203 und R207 sind mit grauen Boxen unterlegt.

### 2.2.2. Isolierung von HyCasp A und HyCasp 3B aus einer cDNA Bank

Um die vollständige Sequenz der Caspasen Klon-24 und Klon-36 zu erhalten, wurde eine cDNA Bank durchsucht. Ausgehend von den gefundenen Sequenzen wurden mittels PCR DIG-markierte Sonden erzeugt. Für Klon-36 wurde die Sonde mit dem Primerpaar C365'/C363', für Klon-24 mit dem Primerpaar C245'/C243' hergestellt (Abb. 16). Mit diesen Sonden gelang es, 5 Klone für Klon-36 und 4 Klone für Klon-24 aus der cDNA-Bank zu isolieren.

Je ein Klon wurde vollständig, alle anderen nur partiell sequenziert. Beide vollständig sequenzierten Klone enthielten einen durchgehenden ORF. Die mit der Klon-36-Sonde gefundenen Klone wurden HyCasp A, die mit der Klon24-Sonde HyCasp 3B benannt.

Die Sequenzen aller HyCasp A Klone aus der Genbank waren identisch, und es gab auf DNA Ebene keinen Unterschied zu dem mittels PCR amplifizierten Fragment Klon-36.



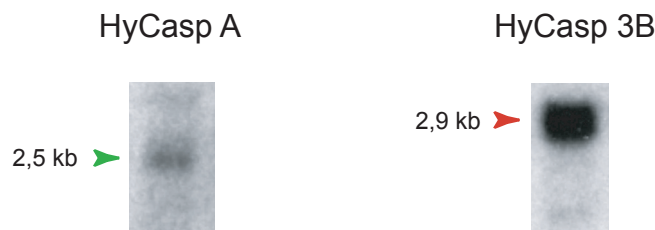
### **2.2.3. Nachweis der Transkription von HyCasp A und HyCasp 3B**

Die Bestätigung, dass beide gefundenen Caspase Gene in *Hydra* aktiv sind und transkribiert werden, erfolgte durch einen Northern-Blot.

Je 10 µg Gesamt-RNA wurden für den Northern-Blot eingesetzt. Für die Herstellung der <sup>32</sup>P markierten Sonde wurde ein mit dem Primerpaar C365'/C363' (HyCasp A) bzw. mit dem Primerpaar C245'/C243' (HyCasp B) mittels PCR amplifiziertes DNA Fragment eingesetzt. Die Länge der Sonden betrug jeweils ca. 170 Nukleotide. Die Größe der HyCasp A und HyCasp B mRNA kann anhand der zwei im Agarosegel sichtbaren rRNA Banden, deren Größe bekannt ist (1,8 kb und 3,3 kb), abgeschätzt werden.

Mit der HyCasp A-Sonde ist nur eine Bande (Abb.18, grüne Pfeilspitze) zu erkennen. Für HyCasp A mRNA lässt sich eine Größe von ca. 2.5 kb ableiten.

Bei der Hybridisierung mit der HyCasp B-Sonde ist es nicht eindeutig, ob die Bande von ca. 2,9 kb (Abb.18, rote Pfeilspitze) eine sehr intensive Einzelbande oder eine Doppelbande ist.

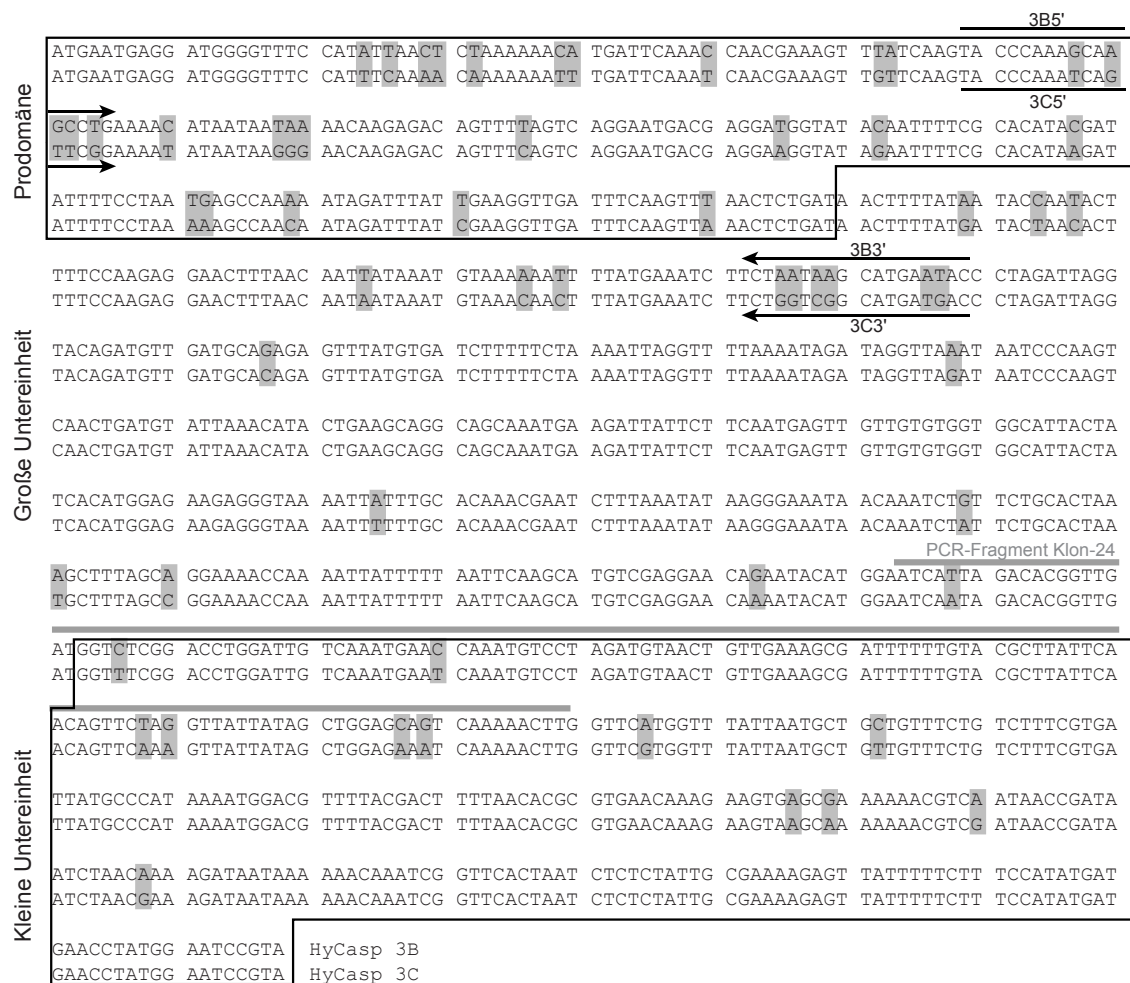


**Abb. 18:** Northern-Blot von 10 µg Gesamt-RNA, hybridisiert mit einer HyCasp A bzw. HyCasp 3B DNA-Sonde.

### **2.2.4. Die dritte Caspase HyCasp 3C**

Wird dieses Ergebnis zusammen mit der Tatsache betrachtet, dass zwischen dem Klon-24 Fragment und HyCasp 3B größere Sequenzunterschiede bestehen, stellt sich die Frage, ob Klon-24 ein Fragment von HyCasp 3B ist, oder ob es noch eine dritte, zu HyCasp 3B sehr homologe Caspase HyCasp 3C gibt, die nicht aus der cDNA Bank isoliert werden konnte.

Mit den Primern Casp3B5' und Casp3B3', die dem 5' und 3' Ende von HyCasp 3B entsprechen, konnte mittels PCR aus cDNA eine Caspase amplifiziert werden, die mit dem ursprünglichen Casp24 Fragment (Abb. 16b) identisch ist und sich von HyCasp 3B signifikant unterscheidet (Abb.19).

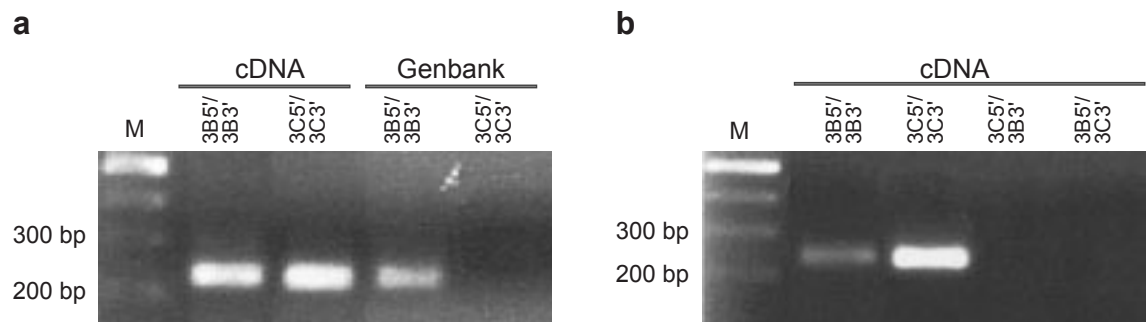


**Abb. 19:** Vergleich von HyCasp 3B und HyCasp 3C. Unterschiede in der DNA-Sequenz sind mit grauen Boxen markiert. Mit einem grauen Balken ist das PCR-Fragment Klon-24 markiert. Die Primer die entworfen wurden um mittels PCR zwischen HyCasp 3B und HyCasp 3C differenzieren zu können sind mit Pfeilen markiert.

Diese Caspase wurde HyCasp 3C genannt. Die Isolierung von HyCasp 3B aus cDNA war mit diesen Primern nicht erfolgreich. HyCasp 3B und HyCasp 3C unterscheiden sich voneinander um 6% auf DNA und um 12% auf Proteinebene. Vergleicht man nur die Prodomänen, die dem geringsten Selektionsdruck unterworfen sind, ergeben sich 13% bzw. 26% Unterschied. In der großen Untereinheit betragen die Unterschiede 5% bzw 9%, in der kleinen Untereinheit 4% bzw. 7%.

Dass aus frisch präparierter cDNA nur HyCasp 3C und aus der Genbank nur HyCasp 3B isoliert werden konnte, war verwirrend. Es stellte sich die Frage, ob beide Caspasen, HyCasp 3B und HyCasp 3C in *Hydra vulgaris* exprimiert werden?

Um diese Frage zu klären wurden neue Primer entworfen, die spezifisch für HyCasp 3B (Primer B5' und B3') bzw. HyCasp 3C (Primer C5' und C3') waren (Abb. 19). Aus cDNA konnte mittels PCR mit beiden Primerpaaren eine Bande der erwarteten Größe von 240bp amplifiziert werden (Abb. 20a). Setzte man hingegen  $\lambda$ -DNA der



**Abb. 20:** Isolierung von HyCasp 3B und HyCasp 3C aus cDNA und Genbank. a) PCR mit einem für HyCasp 3B (3B5'/3B3') bzw. HyCasp 3C (3C5'/3C3') spezifischen Primerpaar mit cDNA oder  $\lambda$ -DNA (Genbank). 40 Zyklen. b) PCR mit einem für HyCasp 3B (3B5'/3B3') bzw. HyCasp 3C (3C5'/3C3') spezifischen Primerpaar sowie zur Kontrolle der Primerspezifität mit der Primerkombination (3C5'/3B3') und (3B5'/3C3'). Semiquantitative PCR, 25 Zyklen.

Genbank als Template für eine PCR ein, konnte nur mit dem Primerpaar B5'/B3' ein Fragment amplifiziert werden. Die Spezifität der Primer wurde mit einer zweiten PCR überprüft. Hier wurde cDNA als Template für die PCR eingesetzt und folgende Primerkombination getestet: B5'/B3', C5'/C3', C5'/B3' und B5'/C3'. Nur mit den Primerkombinationen B5'/B3' und C5'/C3' konnte ein Produkt amplifiziert werden (Abb. 20b). Diese Fragmente wurden in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert. Die Sequenzierung dieser Klone ergab, dass mit dem Primerpaar B5'/B3' ein Fragment von HyCasp 3B und mit den Primern C5'/C3' ein Fragment von HyCasp 3C amplifiziert worden war. Damit war bewiesen, dass in *Hydra vulgaris* mindestens drei verschiedene Caspasen existieren, von denen sich zwei, HyCasp 3B und HyCasp 3C sehr ähneln (Abb. 19). Da von HyCasp 3C bei ansonsten gleichen PCR Parametern mit spezifischen Primern mehr DNA amplifiziert werden konnte als von HyCasp 3B, liegt die Vermutung nahe, dass die relative Menge von HyCasp 3C cDNA größer ist als die von HyCasp 3B cDNA (Abb. 20b). Warum HyCasp 3C Transkripte nicht in der Genbank zu finden waren bleibt ein Rätsel.

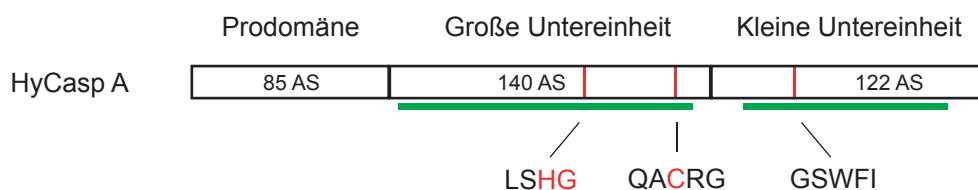


### 2.2.5. Analyse der Caspasen HyCasp A, HyCasp 3B und HyCasp 3C

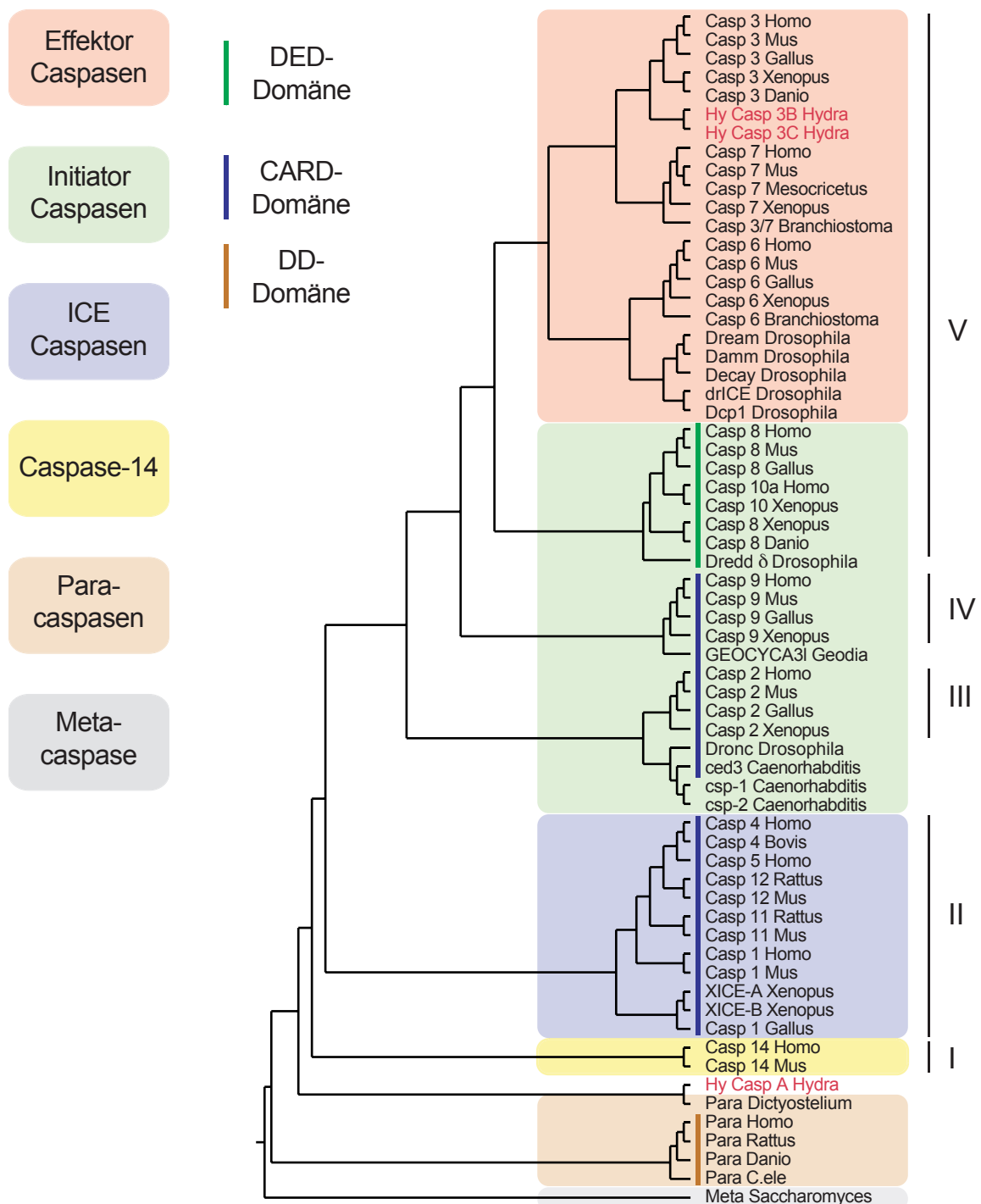
Nachdem drei Caspasen in *Hydra* identifiziert worden waren, stellte sich die Frage, ob sie zu den Initiator- oder Effektor-Caspasen oder zur ICE-Familie gehören. Keine der drei *Hydra* Caspasen besitzt eine CARD- oder DED-Domäne. Weil jedoch auch Caspase-14 keine dieser Sequenzen in der Prodomäne enthält und sie dennoch eine Initiator-Caspase darstellt, konnte alleine aus dem Fehlen einer CARD- oder DED-Domäne noch keine weitere Aussage über ihre Stellung in der Caspase Hierarchie getroffen werden.

#### 2.2.5.1. Stammbaumanalyse der Caspasen HyCasp A, HyCasp 3B und HyCasp 3C

Um weitere Informationen über die Stellung der *Hydra*-Caspasen zu gewinnen wurde eine phylogenetische Untersuchung durchgeführt. Hierzu wurden alle zu diesem Zeitpunkt bekannten Caspase Proteinsequenzen von Mensch, Maus, Huhn, Krallenfrosch, Zebrafisch, Lanzettfischchen, *Drosophila* und *C.elegans*, sowie eine aus dem Schwamm und eine aus dem Hamster verwendet. Zusätzlich wurden noch die Sequenzen für Caspase-4 aus Rind und Caspase-11 und-12 aus der Ratte verwendet um mehr Vertreter der ICE-Familie einzuschließen. Außerdem wurden noch die Paracaspasen folgender Organismen berücksichtigt: Menschen, Ratte, Zebrafisch, *C.elegans* und *Dictyostelium discoideum*. Als Außengruppe für die Stammbaumberechnung wurde die Metacaspase aus *Saccharomyces cerevisiae* benutzt. Zunächst wurde ein *Proteinalignment* aller Sequenzen erstellt. In die Berechnung des Stammbaums gingen anschließend nur Positionen des *Alignments* ein, die in keiner Sequenz eine Lücke enthalten. Somit wurden ausschließlich Sequenzen der großen und kleinen Untereinheit im Bereich der drei konservierten Regionen (Abb. 21) für die Stammbaumberechnung berücksichtigt.



**Abb. 21:** Schema der Caspase HyCasp A. Aminosäuren die in dem aktiven Enzym das katalytische Zentrum bilden sind rot dargestellt. Grüne Balken skizzieren die Sequenzbereiche der Caspase, die in die Stammbaumberechnung eingehen.



**Abb. 22:** Mit TREE-PUZZLE berechneter phylogenetischer Stammbaum. Effektor-Caspasen sind rosa, Initiator-Caspasen hellgrün, ICE-Caspasen blau, Caspase-14 gelb, Paracaspasen beige und die Metacaspase grau unterlegt. DED-Domänen sind mit einem grünen Balken, CARD-Domänen mit einem blauen und DD-Domänen mit einem braunen Balken gekennzeichnet. Die drei Hydra-Caspasen sind in roter Schrift dargestellt. Die „accession numbers“ aller Sequenzen sind unter Punkt 5.6. zu finden.

Aus dem Stammbaum ergibt sich, dass nur die Gruppen der ICE- und Effektor-Caspasen monophyletisch sind (Abb. 22). HyCasp 3B und HyCasp 3C gehören eindeutig zu den Effektor-Caspasen. Für HyCasp A ist das Bild nicht so klar. In diesem Stammbaum wird nicht deutlich, ob HyCasp A eine echte Caspase oder eine Paracaspase ist, da sie mit der Paracaspase aus *Dictyostelium discoideum* zusammenfällt. Die Tatsache, dass HyCasp A eine kleine Untereinheit mit dem konservierten GSWFI Motiv (Abb.14) besitzt, die nur in Caspasen, nicht aber in Paracaspasen vorkommt, kennzeichnet sie als eine echte Caspase. Sie lässt sich unabhängig davon weder zu den Effektor-, den Initiator- noch ICE-Caspasen zuordnen, sondern steht an der Basis der Caspasen<sup>2</sup>.

Diese phylogenetische Analyse ergänzt und erweitert den von Wang und Gu (Wang and Gu, 2001) ausgearbeiteten Stammbaum. Wang und Gu verwendeten für ihre Berechnungen ausschließlich Vertebraten Caspasen, mit Ausnahme von CED-3 aus *C.elegans* und zweier Arthropoden Caspasen. In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich zu den Vertebraten Caspasen alle sieben *Drosophila* Caspasen, die Caspase aus *Porifera*, sowie die drei neuen *Hydra* Caspasen berücksichtigt. Auch wurden erstmals Vertreter der Paracaspasen mit einbezogen.

Wang und Gu schließen aus ihren Daten, dass an der Basis der Caspasen mindestens vier frühe Duplikationsereignisse stattfanden, die zu fünf Caspase Hauptgruppen führten: I. Caspase-14; II. Die ICE-Gruppe mit den Caspasen-1, -4, -5 und -11; III. Caspase-2; IV. Caspase-9 und V. der gemeinsame Vorfahre der Caspasen-8,-10 und der Caspasen-3, -6 und -7. In dem hier erweiterten Stammbaum lassen sich an der Basis der Caspasen nur zwei frühe Duplikationsereignisse finden, die zur Trennung der Gruppen I (Caspase-14) und II (ICE-Caspasen) von den übrigen Caspasen führten.

#### 2.2.5.2. Expression von HyCasp A und HyCasp 3B in *E.coli*

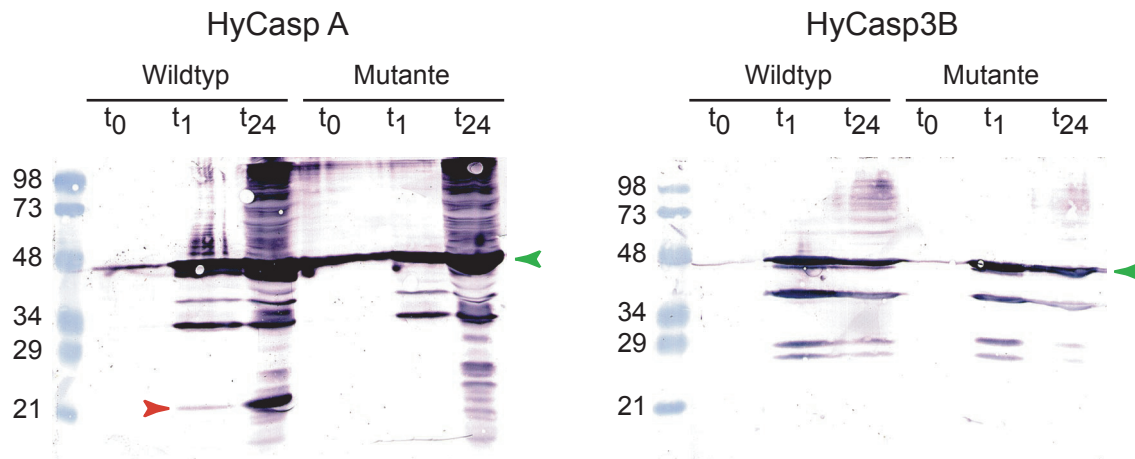
Initiator-Caspasen sind in der Lage, sich durch Autoprozessierung zu aktivieren. Ob auch HyCasp A und HyCasp 3B dazu in der Lage sind, sollte durch ihre Expression in *E.coli* untersucht werden. Horvitz konnte mit einem solchem Experiment die Fähigkeit von CED-3 zur Autoprozessierung nachweisen (Xue et al., 1996).

HyCasp A und HyCasp 3B wurden in den Vektor pTrcHis2-C kloniert und C-terminal mit einem myc-Epitop fusioniert. Dieses Epitop ermöglicht es die exprimierten Caspasen mit einem kommerziell erhältlichen myc-Antikörper zu detektieren. Zusätzlich wurde von beiden Caspasen eine Punktmutante generiert, in der das

---

<sup>2</sup> Dies war der Grund den ursprünglichen Namen dieser Caspase von Casp3A (Cikala et al., 1999) in HyCasp A zu ändern.

aktive Cystein gegen ein Serin ausgetauscht und somit das katalytische Zentrum der Caspase inaktiviert worden war (HyCasp A-C211S und HyCasp 3B-C201S). Alle vier Konstrukte wurden in *E.coli* transformiert und die Expression der Caspasen induziert. Das Ergebnis wurde in einem Western-Blot analysiert (Abb. 23).



**Abb. 23:** Expression von HyCasp A Wildtyp und HyCasp A(C211S) sowie HyCasp 3B und HyCasp 3B(C201S) in *E.coli*. Western-Blot des Bakterienlysats.

HyCasp A war in der Lage sich selber zu prozessieren, da nur im Zellysats des Expressionsansatz von HyCasp A Wildtyp, nicht aber in dem der Mutante HyCasp A-C211S eine Bande, die der Größe der kleinen Untereinheit entspricht (rote Pfeilspitze), detektiert wurde. HyCasp 3B hingegen hat, zumindest unter diesen Bedingungen, nicht die Fähigkeit zur Autoproteolyse, da kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante beobachtet werden konnte<sup>3</sup>.

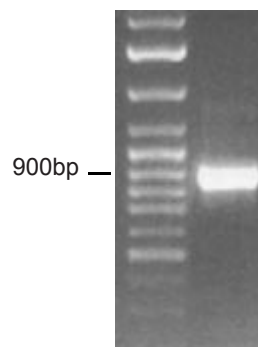
Diese Ergebnisse zusammen mit den Resultaten der Stammbaumanalyse ermöglichen es, HyCasp 3B und die sehr homologe HyCasp 3C zu der Gruppe der Effektor-Caspasen, HyCasp A hingegen zu den Initiator-Caspasen zu zuordnen.

<sup>3</sup> N.Schmidt konnte zeigen, dass sich auch HyCasp 3C nicht autoprozessieren kann. (Schmidt, 2003)

## 2.3. Isolierung und Charakterisierung des Apoptose Inducing Factor AIF in *Hydra*

### 2.3.1. Isolierung von AIF aus *Hydra vulgaris* cDNA

Die Isolierung von AIF aus *Hydra vulgaris* erfolgte ähnlich, wie die der Caspasen. Mit den bekannten AIF Proteinsequenzen aus *Dictyostelium*, *C.elegans*, *Drosophila*, Maus und dem Menschen wurde ein Sequenzalignment erstellt und nach konservierten Bereichen gesucht, für die degenerierte Primer entworfen wurden (Abb. 25). Mit dem Primerpaar aif1.2for und aif4rev konnte aus *Hydra vulgaris* cDNA eine spezifische Bande mit der erwarteten Größe von etwa 900 bp Länge amplifiziert werden (Abb. 24).



**Abb.24:** Mit dem Primerpaar aif1.2for/aif4rev amplifizierte cDNA auf einem Agarosegel.

Das PCR Produkt wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert (Klon AIF2-3) und dann sequenziert. Der Klon enthielt einen offenen Leserahmen mit deutlicher Homologie zu den bekannten AIF-Sequenzen (Abb. 25).

Um die vollständige Sequenz des *Hydra* AIF zu erhalten, wurde in der Datenbank des *Hydra* EST-Projekts nach AIF homologen Sequenzen gesucht. Es wurden zwei nicht überlappende Klone, taa31d04.y1 und taa31d04.x1, identifiziert die den N- bzw. C-Terminus von AIF enthalten (Abb. 25).

Mit dem Klon AIF2-3 überlappte nur taa31d04.x1. Um die letzte Lücke zu schließen, wurde mit den spezifischen Primern aif1-20 und aif1768-1791rev das Volllänge AIF aus cDNA amplifiziert.

Die *Hydra* AIF Sequenz ist in Abbildung 25 dargestellt. AIF besitzt eine zweigeteilte FAD-Bindungsdomäne (AS 122-262 und AS 400-477, blaue Box), eine NADH-Bindungsdomäne (AS 263-399, gelbe Box) und eine C-Terminale Domäne (AS 478-610) (Mate et al., 2002)<sup>4</sup>. Die C-terminale Domäne von Säuger und *Drosophila*

<sup>4</sup> Die Nummerierung der AS bezieht sich auf Maus AIF

	aif1 -20	
H.vul	<u>MIRLWKSCS-LIRQNGNFIKSIHKLPTLIV</u> ---SG---CRYSSVTGNNDKIYIGTV-----GILTVSGALVYSLFTSPLFQSN-----VOYKTEVA 84	
D.dis	-MIRN-----LTKLTKFTIIGNRFYQSSSKGRFSKNGNNAFKSIVGVSYG-----VSALFAGCVFDOEPEPESTPS-----IDVKEKKS 74	
C.ele	MLLRVGRQMTSIVFRQATVRSIAMSRYALGGGHHHEFTPIYPFPGSLDWTFFSRHSHSAHEFFEPYKEIG-AFLGAVAFILGTLIAVVIDKDFKEDSHGHGHAHKKHEEK 120	
D.mel	-MVKRITLEARTKLOANKYPNQVCVTKPSTTPVEVEYETAVAGAGYAVANAQFSAHSQSEPLFKVGFADVKVCSAKDLKSDSAKPLSTQFVDSKTRACESCEE-----FKRKRKET 114	
M.mus	<u>MFRCGGLAG-AFKQKIVPLVTVVQREPKQR</u> NRLFGNLFQQWRVPLELQWARQWASGSS-----CGMDNSVVLVILVGLSTIGAGA-----YAYKTIIR 89	
H.sap	<u>MFRCGGLAAGALKOKLVLPLVTVVQREPKQR</u> NRLFGNLFQQRHVPLELQMTROMASGAS-----CGKIDNSVVLVILVGLSTIGAGA-----YAYKTMKE 90	
	<b>MLS</b>	
H.vul	EPEVISKNEIET-----IVDTEEIKEI IQDSEVEGHEKVEEPEQIILKDLKLPSEVPIIIGAGTAAHSHACRAIQKRENAKILI 165	
D.dis	QPP-----KTKEDYQKKMDEYD-----IQFKYVIIGGTAAYAHAIKILENDKEATILL 125	
C.ele	HEQKHEEKEHAEPEKKEEAKP-----EKPAEPEPEPAQKQAEQPEQEEKQETKDAEPEKQVDQRTBEAVHARRAPAAAEPPAPSTSKADAVEEK 215	
D.mel	TCQPCDEDTAPGGDGGDECECRMKDLRLKOLLGALALLAGGFIAWFMTRTDISEAKKAAEAEERKRIIVAGLATSPSSDLPKHVYLIIGGTAAFSAFRAIKSNDATAKVLIM 235	
M.mus	DQKRYNERVMGLG-----LSPEEKORRAIATASATEGGSVPOI-----RAPSHVPELLIGGCTAAFAAARSIRARDPGARVLI 160	
H.sap	DEKRYNERISGLG-----LTPEQKQKKAALASASEGEVPOD-----KAPSHVPELLIGGCTAAFAAARSIRARDPGARVLI 161	
	<b>aif1.2 for</b>	
	.....	
	<b>FAD-Bindungsdomäne</b>	
H.vul	IGNEDVLYMRPPLSKELWFPDDN---SESLSYKAWNGKERSVFFPDDSSYTSLDDLE---SKGGVSVVTGNVTISI DALGHSVTTENGQKVKYAKLLIATGGFFQHPAPFNKENE-H 280	
D.dis	ISKEYEYQRPPLTKSLWATKDDNV--VNTLNFSDWGGKQNLLEYQESAYG-----NEILQFIRTKKVIDLHDEKLVLLNDGKLIIRYDKCLLIATGGFFQHPAPFNKENE-H 281	
C.ele	IGEEPFLYMRPPLSKELWYGDETS--ATKLAITPLSGKKRDI FVEVDGFFVPELDPKAVHGGVALLRGRKAVKICEDKVKIILEDGTTI GYDKLLIATGVRPKKEQVFEAESEAKQK 331	
D.mel	ISNEFKPYMRPPLSKELWYTPNEDPIKDYRFKQWGTGSESLFFBPDEFIDPEDDDNANGGIAVAQFSVKKVDAQKRI VTLNDGVEI SYDECLLIATGCAFKNLPMDRAPPVLEK 356	
M.mus	VSEDELPYMRPPLSKELWFSDDPNV--TKTLQFRQWNGKERSIYFQPPSVSAQDLPTNENGGVAVLTGKVVHL DVRGNNVKLNDGSOITFEKCLLIATGGTPELSALDRAGAEVKS 279	
H.sap	VSEDELPYMRPPLSKELWFSDDPNV--TKTLRFQWNGKERSIYFQPPSVSAQDLPHLENGGAVLTGKVVHL DVRDNMVKLNDGSOIYFEKCLLIATGGTPELSALDRAGAEVHSR 280	
	<b>Leucine-Zipper</b>	
	.....	
	<b>NADH-Bindungsdomäne</b>	
H.vul	ITMPFRVNDLKKLKR-LLRHQ-KDILIVGGGFLGSELACALSTYKQS-GINVTQI VNEGDNMAKVLPKYLSQWTKVKNKGVLTPNRSIQSVNGC---EKVEVIIDNKEKLIADHVIV 395	
D.dis	ISTYVTEDFRKLIE-VVKDGGKVVTVGGGFLGSELTCAINSFQDK-NIKIDQI PFSGVLSTLFDYLSKYATEEIIKSGVNHVTGTLIKDVDNSENGRITVILNNGKTFETDHWV 350	
C.ele	ITYPHYADFRKVERGLADSKVQVTVIIGNGLIASELSYIKRKYGEN--VEVHQVFEKYPAEDILPEHIAQKSTEARKGGVDVRAQKQVGVKRCCK---KNVVLKSDGSELTDLVVV 448	
D.mel	VMVYTPDDFRLRK-LAAEK-RSITIVNGFTGSELACSLAHYSRENNGKVVQVQENANMSKVLNYSLSRWTAKMAQGVCI PNASISARVDE--TNLKLBNNGMTLMSDVVVV 473	
M.mus	TTLFRKIGDFRALEK-I SREV-KSITIVGGGFLGSELACALGRKSQAS-GIEVIQLPFEKGNMGRILFQYLSNWTMEKYRREGVKYMPNA IVQSVGVSS--GRLLIKIKDGRKVTDHIVT 395	
H.sap	TTLFRKIGDFRSLEK-I SREV-KSITIVGGGFLGSELACALGRKARAL-GTEVIQLPFEKGNMGRILBEYLSNWTMEKYRREGVKYMPNA IVQSVGVSS--GKLLIKIKDGRKVTDHIVA 396	
	<b>aif4 rev</b>	
	.....	
	<b>FAD-Bindungsdomäne</b>	
H.vul	CVGLPSTELASAGLEVDKDHGGFRVNSELEARSDIWVAGDAACFYDINLGRRR--VEHHDHVVVSGLAGENMTG-----AKKSYHHQSMFMSDLGPEVGEAIGI VDSSTPTVGWA 508	
D.dis	AAGILPNTNVKSTTLEIDP INGGYVNPPELQARTDIYVAGDYASYDFSLGVRRYVEHHDHARATGEMAGSNMSTK-----DTPAPYI OPTFWSDLTEGVEAYGNTSJKLTFVWE 466	
C.ele	ATGHEPNSIEIFASGLKIDEKLGVRADKCLKYGENVWMAAGATATFEDVILGARR--VSWENAIQSLGLAGENMTAADAADGSEKAFWQP EFFTAKFAPHLHINAIKGDSSLETVSVHA 568	
D.mel	CVGCTPNTLAGPSRLEVDRSILGGFVVAELFARRNLYVAGDASCFFDPLIGRRR--VEHHDHVVVSGLAGENMTG-----AKRKYOHQSMFMSDLGPEIGEIGI GLYDSSPTVGVA 586	
M.mus	AVGLPEPNVELAKTGLEIDSDFGGFRVNAELQARSNIWVAGDAACFYDINLGRRR--VEHHDHVVVSGLAGENMTG-----AAKPYWHQSMFMSDLGPDVGEAIGI VDSSTPTVGVA 508	
H.sap	AVGLPEPNVELAKTGLEIDSDFGGFRVNAELQARSNIWVAGDAACFYDINLGRRR--VEHHDHVVVSGLAGENMTG-----AAKPYWHQSMFMSDLGPDVGEAIGI VDSSTPTVGVA 509	
	<b>NLS</b>	
	.....	
	<b>aif1768-179 rev</b>	
	.....	
H.vul	<u>IKATLKDNI-FVVAESEGENIRS</u> ----DAQSPDVTVEAET---VSQQ---TGDDFRQGVVFMMEKK---IVGILLNLI FG-HMPYARKLISDSHDEDLNAVAKLFLHHPNS 605 AS	
D.dis	<u>KPSSDET</u> -----KQSYTKGNTYILNDDNN--VVGVLICYNGY-KMDTARDLILKRTTEDLNQLOHAI DFDEHH 532 AS	
C.ele	<u>EPDKDTP</u> -----IJKAVVFKYKEDGSI VGVLLNVPGLDVARRI IDDRKKVDEYKEIAKFLFYDPVKSDEDDAKSA 643 AS	
D.mel	<u>ILPSESATRVQDLSSESDSDVPTSTSSOSSKSDAGASQDVCVTPDEAGNYKGVIFYLKNDK--IVGILLNLI FN-RIGLARTI INONKDYDLNNEVAKLFIHA 690 AS</u>	
M.mus	<u>KATAQDN-FKSAEQSGTIRSESETESEASELTI PPSAPAVQVQEGEDYKGVIFYLKDKV--VVGIVLWNVFN-RMPTARKI IKDGEQHDLDNEVAKLFIHED 612 AS</u>	
H.sap	<u>KATAQDN-EKSAEQSGTIRSESETESEASELTI PPSAPAVQVQEGEDYKGVIFYLKDKV--VVGIVLWNI FN-RMPTARKI IKDGEQHDLDNEVAKLFIHED 613 AS</u>	
	<b>C-terminal Insertion</b>	
	K510 K518	



**Abb. 25:** Sequenzvergleich von AIF aus Hydra (H.vul, accession number AAX13996), Dictyostelium (D.dis, CAC14872), C.elegans (C.ele, CAB60511), Drosophila (D.mel, Q9VQ79), Maus (M.mus, Q9Z0X1) und Mensch (H.sap, NP\_004199). Striche über den Sequenzen markieren ähnliche AS, Punkte und graue Boxen identische AS. Die zweigeteilte FAD-Bindungsdomäne ist mit hellblauen Boxen, die NADH-Bindungsdomäne mit einer gelben und die C-terminale Insertion mit einer rot gestrichelten Box markiert. Mit roten Balken sind die von den Klonen taa31d04.y1 und taa31d04x1 abgedeckten Sequenzbereiche eingezeichnet. Die in Susin et al., 1999 identifizierten MLS in murinem und humanem AIF sowie die MLS in Hydra sind dunkelblau markiert. In allen 6 Sequenzen wurde eine NLS (hellgrüne Box) identifiziert. Die AS K255, R265, K510 und K518 sind in braunen Boxen eingerahmt. In Hydra AIF wurde ein Leucine-Zipper identifiziert (dunkelgrün). Die degenerierten Primer aif1.2for und aif4rev sowie die Primer aif1-20 und aif1768-1791rev sind als schwarze Pfeile eingezeichnet.

AIF enthält eine C-Terminale Insertion (AS 509-559, rote Box), deren Funktion noch unklar ist. In *C.elegans* und *Dictyostelium* AIF fehlt diese Insertion. In *Hydra* hingegen ist sie, um acht Aminosäuren verkürzt, vorhanden. Mate et al. identifizierten an murinen AIF die mit FAD und NADH interagierenden Aminosäuren, diese sind auch in *Hydra* AIF konserviert (Abb. 25, rosa Box) (Mate et al., 2002).

Von Ye et al. wurden zwei Mutationen (K255A / R265A und K510A / K518A)<sup>5</sup> generiert, die die Fähigkeit von AIF DNA zu binden und Chromatinkondensation zu induzieren aufhoben, ohne die NADH Oxidase Aktivität zu vermindern (Ye et al., 2002). Diese Aminosäuren sind auch in *Hydra* AIF konserviert (Humanes AIF K255 – *Hydra* AIF K256, bzw. R265- K266, K510-K509 und K518-K517) (Abb. 25, braune Box)

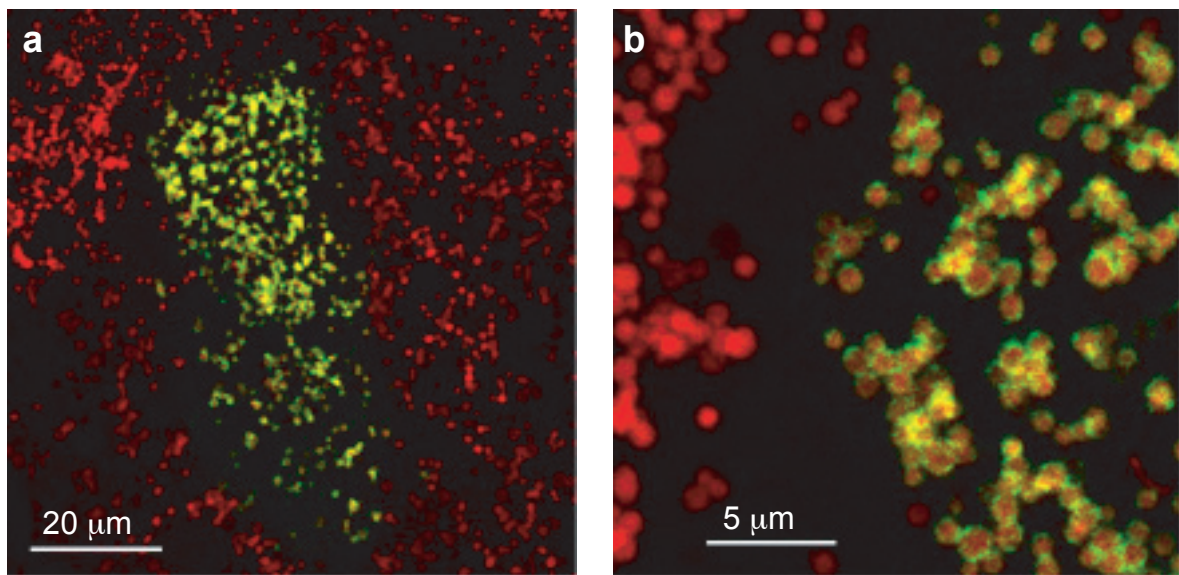
### **2.3.2. Bioinformatische Analyse und transiente Expression von AIF-EGFP Fusionsproteinen in Hydra**

Eine bioinformatische Analyse nach N-terminalen Sortierungssignalen mit dem Programm iPSORT ergab auch für *Hydra* AIF eine mitochondriale Lokalisation. Eine Suche nach NLS mit den Programmen PredictNLS und PSORT II fand keine bekannten NLS in *Hydra* AIF. Es wurde jedoch mit PSORT II ein Leucine-Zipper Motiv (AS 290-311) detektiert (Abb. 25). Susin et al identifizierten ursprünglich zwei potentielle NLS in Säuger AIF (Susin et al., 1999), Gurbuxani et al. demonstrierten später, dass nur das C-terminale NLS KLGRRR (AS 445-451) für den Kernimport von AIF erforderlich ist (Gurbuxani et al., 2003). Diese Sequenz ist auch in *Hydra* bis auf die erste Aminosäure (Arginin statt Lysin) konserviert.

Um die mitochondriale Lokalisation zu verifizieren, wurde *Hydra* AIF in den Vektor HyEGFP<sub>EcoRI</sub> kloniert. Dies ermöglichte die Expression von AIF mit einem C-terminalen fusioniertem EGFP. Hydren wurden mit diesem Vektor transformiert und

<sup>5</sup> Diese Versuche erfolgten mit humanem AIF und daher bezieht sich die Nummerierung dieser AS auf humanes AIF.

nach einem Tag mit dem Mitochondrium Marker Mitotracker gefärbt. Nach Fixierung der Tiere konnte im konfokalen Mikroskop eine Colokalisation von Mitotracker und EGFP beobachtet werden (Abb. 26). In Abbildung 26a ist der Umriss der transformierten Zelle zu erkennen. Abbildung 26b zeigt einen vergrößerten Ausschnitt auf dem die Colokalisation deutlich zu erkennen ist. Aufgrund der geringen Transformationsrate gelang es leider nicht, eine apoptotische, mit AIF-EGFP transformierte Zelle zu beobachten, für die eine Kernlokalisierung des Fusionsproteins erwartet wurde.



**Abb. 26:** **a)** Lokalisation von AIF in fixierten Tieren. Überlagerung von MitoTracker- und GFP-Färbung. Bildstapel aus einer Reihe optischer Schnitte (stepsize 1  $\mu\text{m}$ ) **b)** vergrößerter Ausschnitt. (stepsize 250 nm)



## **2.4. Isolierung und Charakterisierung von PSR, einem Phosphatidylserin Rezeptor in *Hydra***

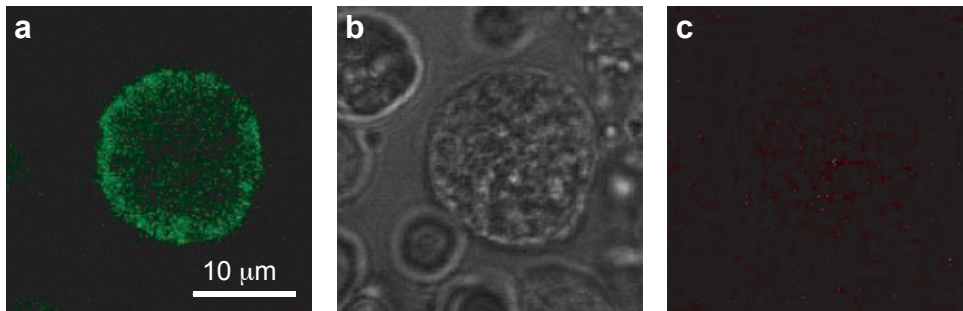
Mit den Caspasen und AIF waren in *Hydra* Schlüsselproteine für den Vollzug des programmierten Zelltodes identifiziert worden. Kennzeichnend für Apoptose ist eine schnelle und effektive Entsorgung der „Zelleichen“ im Organismus, indem sie von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert werden. Hierfür ist es notwendig, dass sich eine apoptotische Zelle ihrer Umgebung eindeutig als eine solche zu erkennen gibt und Nachbarzellen diese Signale detektieren. Für diesen Erkennungsmechanismus war von Fadok (Fadok et al., 2000) Phosphatidylserin als „eat me“ Signal der apoptotischen Zelle und der von ihr klonierte Phosphatidylserin Rezeptor (PSR) als Detektor auf der phagozytierenden Zelle postuliert worden. Bevor in *Hydra* nach dem Phosphatidylserin Rezeptor gesucht wurde, sollte zuerst geklärt werden, ob auch in *Hydra* der Verlust der Phospholipidasymmetrie mit Apoptose einhergeht.

### **2.4.1. Nachweis von Phosphatidylserin in apoptotischen Hydrazellen**

Wenn Zellen programmierten Zelltod begehen, unterlaufen sie verschiedene, charakteristische morphologische Veränderungen. Eine davon ist der Verlust der Phospholipidasymmetrie ihrer Plasmamembran. Dies führt zu einer Exposition von Phosphatidylserin an der äußeren Zellmembran. Ob dies auch in *Hydra* der Fall ist, sollte mittels Annexin-V Färbung geklärt werden.

Hierzu wurden Hydren zur Induktion von Apoptose mit Colchizin behandelt und danach mechanisch in Einzelzellen zerlegt. Anschließend erfolgte eine Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC zur Detektion von PS und Propidiumiodid zur Detektion von Zellen mit geschädigter Zellmembran.

Zellen, die eine Annexin-V-FITC markierte Plasmamembran, jedoch keine Propidiumiodid Färbung aufweisen, sind ein Nachweis für den Verlust der Phospholipidasymmetrie. Abbildung 27 zeigt einen optischen Schnitt durch eine lebende Zelle, die eine ringförmige Annexin-V-FITC, aber keine Propidiumiodid Färbung aufweist (Abb. 27).



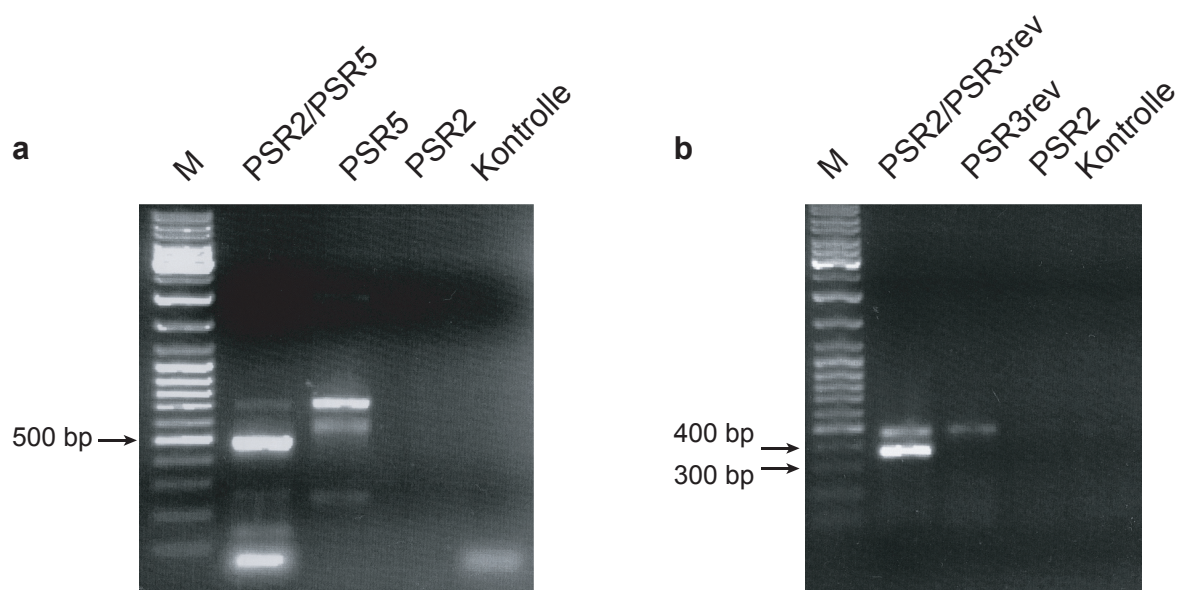
**Abb. 27:** Phosphatidylserin auf der extrazellulären Seite einer apoptotischen Hydrazelle. **a)** Annexin-V-FITC Färbung einer Hydrazelle nach der Induktion von Apoptose mittels Colchizin. **b)** Phasenkontrast Bild der Zelle. **c)** Abwesenheit von Propidium Iodid (PI) Färbung: PI kann nur dann in eine Zelle eindringen, wenn die Integrität der Zellmembran verloren wurde. Die Abwesenheit von PI-Färbung zeigt, dass Annexin-V-FITC an die extrazelluläre Seite der Zellmembran bindet.

#### **2.4.2. Isolierung eines PSR Genfragmentes aus *Hydra vulgaris* cDNA**

Ausgehend von den vom Menschen, der Maus, *C.elegans* und *Drosophila* bekannten PSR Proteinsequenzen, wurden für mehrere konservierte Regionen degenerierte Primer entworfen (Abb. 28). Mit dem Primerpaar PSR2/PSR5rev war es möglich, aus *Hydra* cDNA mittels PCR ein etwa 0,5 kbp großes Fragment zu amplifizieren (Abb. 29a). Dies entsprach der erwarteten Größe für diese Primerkombination. Um zu verifizieren, dass es sich bei dem erhaltenem Fragment auch um PSR handelt, erfolgte mit einem Aliquot dieser PCR eine zweite, „Nested- PCR“ mit dem Primerpaar PSR2/PSR3Arev. Auch diese ergab ein Amplifikationsprodukt der erwarteten Größe, von etwa 380 bp (Abb. 29b).

Das 500 bp große Fragment wurde in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert. Nach Transformation des Vektors in *E.coli* wurden zwei Klone sequenziert. Aufgrund der Homologie mit den bekannten PSR-Proteinen wurde das Fragment eindeutig als Teil des PSR identifiziert.





**Abb. 29:** Amplifikation von PSR aus cDNA mittels degenerierter Primer. a) Mit dem Primerpaar PSR2/ PSR5rev, b) „Nested-PCR“ mit dem Primerpaar PSR2/PSR3Arev. „Einzelprimer“- und „Wasser-Kontrolle“ wurden jeweils mit auf das Agarosegel aufgetragen.

### 2.4.3. Isolierung von PSR aus einer cDNA-Bank

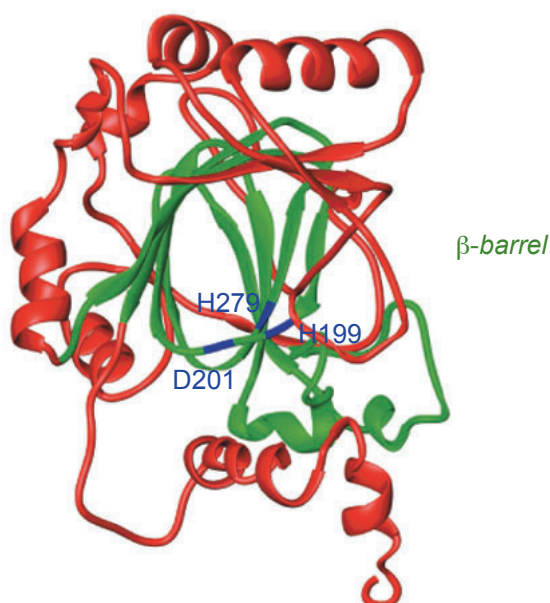
Mit der gefundenen Sequenz konnten mittels PCR DIG-markierte DNA-Sonden hergestellt werden, um aus einer *Hydra vulgaris* cDNA-Bank das vollständige PSR Gen zu isolieren. Es wurden 4 Klone gefunden und sequenziert. Drei Klone enthielten das vollständige PSR Gen und wiesen keinen Sequenzunterschied zu dem durch PCR isolierten Klon auf. PSR in *Hydra* hat eine Größe von 385 AS und liegt damit zwischen den 349 AS von *C.elegans* und den ca. 410 AS von *Drosophila*, Mensch und Maus (Abb. 28). Strukturell weist es eine größere Ähnlichkeit zu letzt genannten auf. In *C.elegans* fehlt im Vergleich zu allen andern PSR eine Region von 51 Aminosäuren.

#### 2.4.4. Bioinformatische Analyse des PSR

PSR aus *Hydra* und Mensch sind auf Proteinebene zu ca. 60% identisch. Aufgrund dieser großen Sequenzhomologie wurde auch eine Konservierung der Funktion des PSR zwischen *Hydra* und Mensch erwartet.

Mit Hilfe des Programms PSORT II sollte die Lokalisation des *Hydra* PSR vorhergesagt werden. Es wurden drei NLS identifiziert, die in allen bisher bekannten PSR-Proteinen konserviert sind (Abb. 28) und als wahrscheinlichste Lokalisation des PSR den Zellkern mit 69,9% angegeben. In PSR konnte außerdem eine JmjC-Domäne (sprich: „Jumanji“) identifiziert werden, die sich mit der von Fadok postulierten Transmembrandomäne überschneidet. Diese beiden Funktionen schließen sich gegenseitig aus.

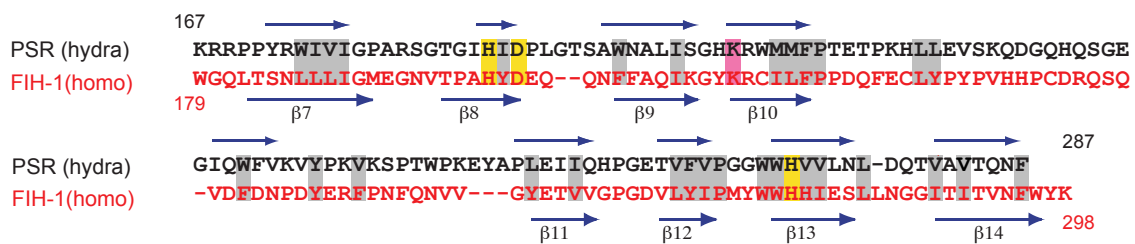
JmjC gehört zur Cupin-Familie (cupa: lateinisch Fass), einer Gruppe von Proteindomänen, die eine fassartige Struktur,  $\beta$ -*barrel*, aus  $\beta$ -Faltblättern besitzen. Zu den verschiedenen Proteinen mit einer JmjC-Domäne gehören die Transkriptionsfaktoren der Jmj-Familie und auch FIH-1 (**F**actor **I**nhibiting **H**IF (HIF: **H**ypoxia **I**nducing **F**actor)) ein Protein mit einer 2-Oxoglutarat (2OG) und Fe(II)-abhängigen Dioxygenase Aktivität. Zwischen FIH-1 und PSR besteht eine Ähnlichkeit in der Gesamtdomänenstruktur des Proteins. Beide sind von ähnlicher Länge (PSR 385AS, FIH-1 349AS) und besitzen jeweils eine JmjC-Domäne, die in der Mitte des Proteins liegt. Die Kristallstruktur von humanem FIH-1 ist aufgeklärt. Der Kern von FIH-1 bildet ein  $\beta$ -*barrel* das auch die H-X-D/E Sequenz (AS199-201) und ein weiteres Histidin (AS279) enthält (Abb. 30).



**Abb.30:** „Ribbon diagram“ der FIH-1 Struktur (aus (Lee et al., 2003) using RIBBON (Carson, 1997)). Die konservierte Kernstruktur ( $\beta$ -*barrel*) ist grün markiert. Die, das aktive Zentrum bildenden, AS H187, D 189 und H 272 sind blau hervorgehoben.

Diese Aminosäuren bilden das aktive Zentrum des Proteins. FIH-1 kann sein Substratprotein HIF an einem spezifischen Asparagin in der Transaktivierungsdomäne hydroxylieren. Dies ermöglicht die Sauerstoff-abhängige Regulation der HIF Aktivität.

Ein Vergleich der Sekundärstruktur von FIH-1 mit der, mittels des Programms PredictProtein für *Hydra* PSR vorhergesagten Sekundärstruktur, offenbart eine große Ähnlichkeit der Anordnung der  $\beta$ -Faltblätter in der JmjC-Domäne (Abb. 31).



**Abb.31:** Alignment des konservierten Kerns ( $\beta$ -barrel) von humaner FIH-1 (accession number AAL27308) mit der homologen Region von Hydra-PSR.  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen sind mit blauen Pfeilen oberhalb (für Hydra-PSR) bzw. unterhalb (für FIH-1) der Sequenzen angezeigt und in Übereinstimmung mit der veröffentlichten Kristallstruktur (Lee et al., 2003) nummeriert. Gelbe Boxen markieren die AS die für die Komplexierung des Fe<sup>2+</sup>-Ions im Aktiven Zentrum erforderlich sind, die violette Box das an der Bindung von 2-Oxoglutarat beteiligte Lysin. Die hydrophoben AS die die  $\beta$ -barrel Struktur stabilisieren sind mit grauen Boxen unterlegt.

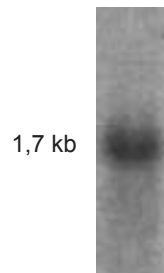
Betrachtet man die Aminosäuresequenz in diesem Bereich, so fällt auf, dass die für die Stabilisierung des  $\beta$ -barrel notwendigen hydrophoben Reste konserviert sind. Die für die Koordinierung des Fe(II) (FIH-1: H199, D201 und H279; PSR: H187, D189 und H272) und die Bindung von 2OG (FIH-1: K214; PSR: K204) notwendigen Aminosäuren sind zwischen FIH-1 und PSR konserviert.

Direkt auf die vorhergesagte JmjC-Domäne folgt ein so genannter AT-Hook, ein 9-14 Aminosäuren langes DNA-Bindemotiv mit einem zentralen GRP-Motiv (Glycin-Arginin-Prolin) das in die kleine Furche AT-reicher DNA binden kann. Der AT-Hook ist in allen PSR Sequenzen konserviert. Das Vorkommen des AT-Hooks, der in vielen eukaryontischen Kernproteinen identifiziert wurde, und der JmjC-Domäne, veranlasste Clissold und Mitarbeiter das humane PSR als Kernprotein zu bezeichnen (Clissold and Ponting, 2001). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der von Fadok postulierten Funktion des PSR, und dieses Problem sollte in weiteren Versuchen geklärt werden.



#### **2.4.5. Nachweis der Transkription von PSR**

Die Bestätigung der Transkription von PSR erfolgte durch Northern-Blot. Hierfür wurden 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Für die Herstellung der <sup>32</sup>P-markierten Sonde wurden 25 ng DNA eingesetzt. Die Länge der Sonde betrug ca. 1,2 kb. Die Größe der PSR mRNA kann anhand eines im Agarosegel mitgelaufenen RNA-Längenstandard ermittelt werden. Sie beträgt ca. 1,7 kb (Abb. 32).

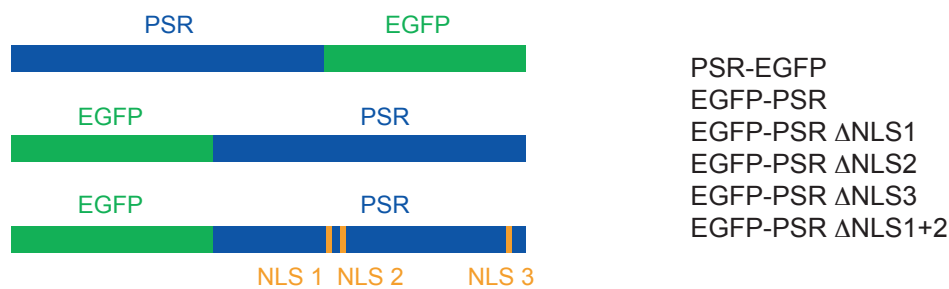


**Abb. 32:** Northern-Blot von 10 µg Gesamt-RNA, hybridisiert mit einer PSR DNA-Sonde.

#### **2.4.6. Transiente Expression von PSR Fusionsproteinen mit EGFP in *Hydra vulgaris***

Die Homologie zu FIH-1, und das Vorhandensein der JmjC-Domäne, des AT-Hooks und der drei NLS weckten Zweifel an der von Fadok postulierten Membranlokalisation des PSR. Mit Hilfe der in *Hydra* neu etablierten Transformationsmethode wurde für *Hydra* PSR die Lokalisation von PSR-EGFP-Fusionsproteinen untersucht.

Hierfür wurde PSR in die Vektoren HyEGFP<sub>Smal</sub> und HyEGFP<sub>EcoRI</sub> kloniert. Dies ermöglichte die Expression eines Fusionsproteins bestehend aus PSR und einem N- oder C-terminal angehängten EGFP. Diese Plasmide wurden EGFP-PSR bzw. PSR-EGFP genannt. Von dem Plasmid EGFP-PSR wurden zusätzlich noch vier Deletionsmutanten (EGFP-PSR $\Delta$ NLS1, EGFP-PSR $\Delta$ NLS2, EGFP-PSR $\Delta$ NLS1+2 und EGFP-PSR $\Delta$ NLS3) erzeugt, in denen jeweils eine der drei putativen NLS einzeln deletiert war, sowie eine Doppelmutante, in der NLS1 und NLS2 deletiert waren (Abb.33).

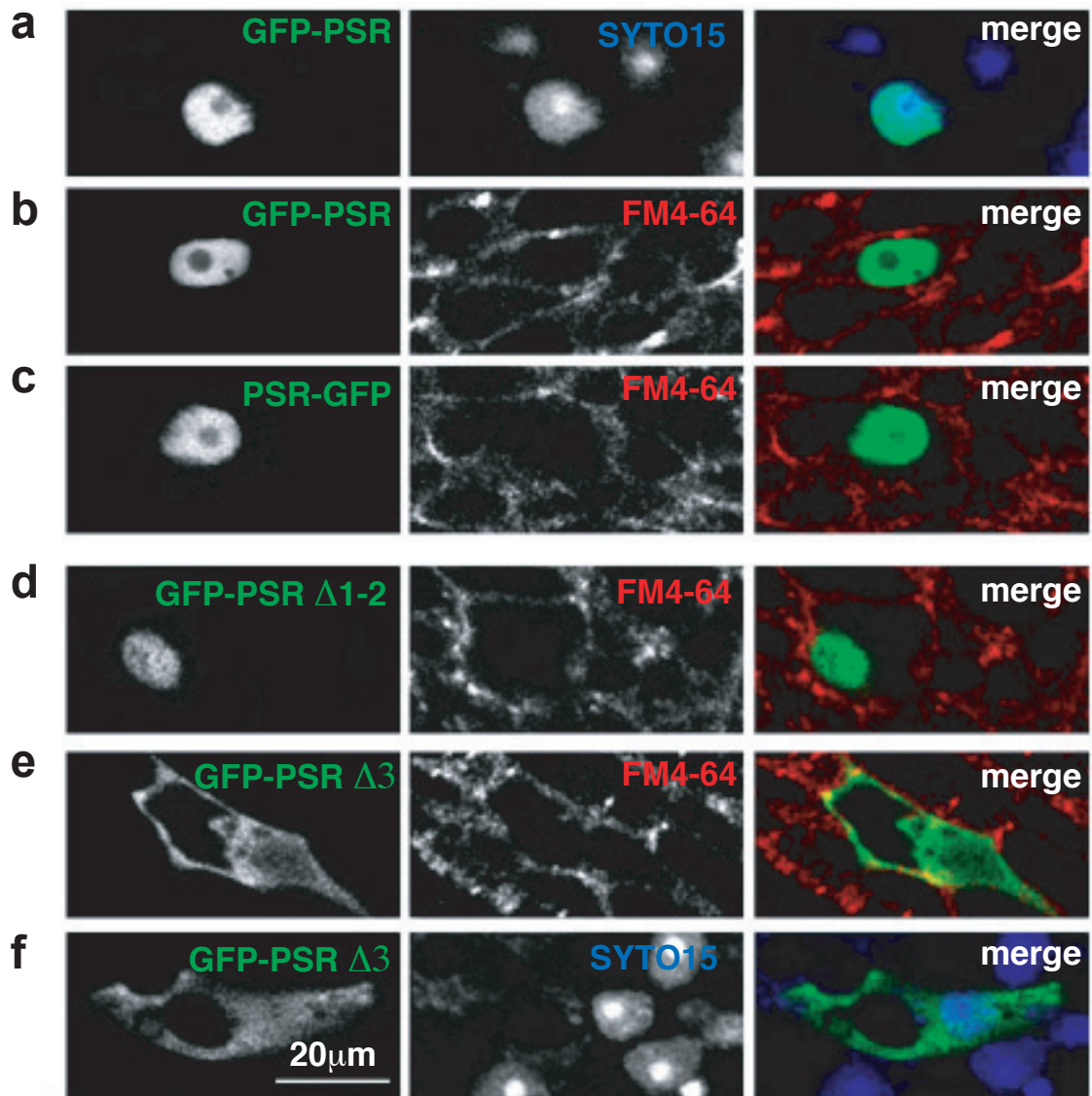


**Abb. 33:** Schema der sechs Fusionsproteine.

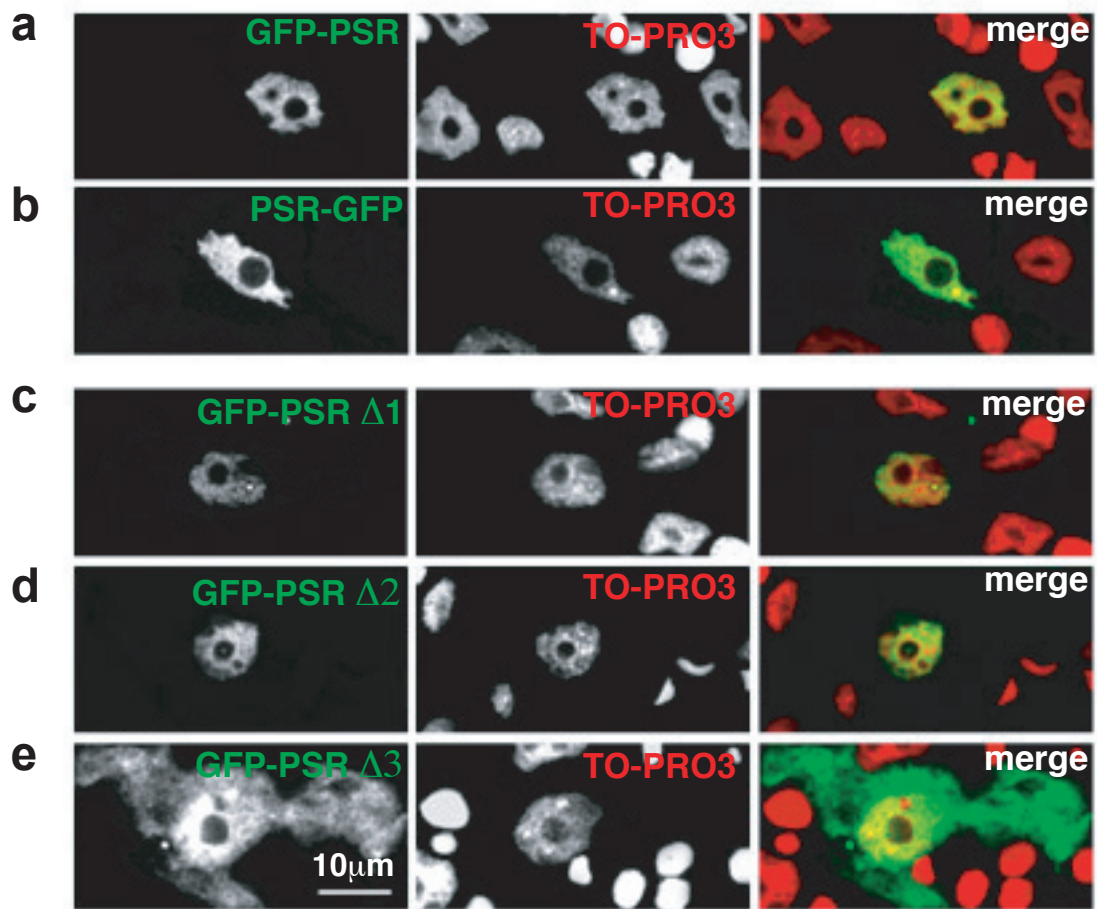
Zur Transformation dieser sechs Plasmide in *Hydra* wurde die ballistische Transformation angewendet und das Ergebnis in lebenden (Abb. 34) und fixierten Zellen (Abb. 35) analysiert. Zum Vergleich erfolgte parallel auch eine Kernfärbung mittels SYTO-15 bzw. TO-PRO-3. Zur Untersuchung einer eventuellen Membranlokalisierung wurden lebende Tiere mit dem Vitalfarbstoff FM-464 gefärbt. Sowohl bei der Transformation mit dem Plasmid EGFP-PSR (Abb. 34a+b und 35a) als auch mit PSR-EGFP (Abb. 34c und 35b) war das Fusionsprotein im Zellkern von Epithelzellen lokalisiert. Ob PSR N- oder C-terminal mit EGFP fusioniert war, hatte also keinen Einfluss auf die Lokalisation des Fusionsproteins.

Auch die Transformation mit den Plasmiden EGFP-PSRΔNLS1, EGFP-PSRΔNLS2 und EGFP-PSRΔNLS1+2 führte zu einer Kernlokalisierung der Fusionsproteine (Abb. 34d und 35c+d). NLS1 und NLS2 sind daher nicht für die Kernlokalisierung verantwortlich. Die Expression des Fusionsproteins EGFP-PSRΔNLS3 jedoch ergab ein anderes Bild. Wurde NLS3 deletiert, konnte das Fusionsprotein nur noch im Cytoplasma und nicht mehr im Zellkern beobachtet werden (Abb. 34e+f und 35e). NLS3 mit der Sequenz KRRK ist für die Kernlokalisierung von *Hydra* PSR verantwortlich. Diese Ergebnisse unterstützen an Hand von *Hydra* PSR die von Clissold geäußerte Vermutung, dass PSR ein Kernprotein sei (Clissold and Ponting, 2001). Berücksichtigt man die große Homologie zwischen den bekannten PSR-Proteinsequenzen sowie die Tatsache, dass sowohl die dritte NLS, als auch die JmjC-Domäne und ebenso der AT-Hook in allen PSR hoch konserviert sind, liegt die Vermutung nahe, dass die Ergebnisse für *Hydra* PSR sich auf die anderen PSR-Proteine übertragen lassen.





**Abb. 34:** Lokalisation des PSR in lebenden Tieren. Einzelne optische Schnitte GFP exprimierender Zellen nach der Transfektion mit GFP-PSR (**a und b**), PSR-GFP (**c**), NLS-Mutanten  $\Delta$ NLS1-2 (**d**) und  $\Delta$ NLS3 (**e und f**). Die linke Bildreihe zeigt GFP-Färbung, die Mittlere SYTO15 bzw FM4-64 Färbung und die Rechte die Überlagerung der zwei Färbungen.



**Abb. 35:** Lokalisation des PSR in fixierten Tieren. Einzelne optische Schnitte fixierter GFP exprimierender Zellen nach der Transfektion mit GFP-PSR (a), PSR-GFP (b) und den NLS-Mutatanten  $\Delta$ NLS1,  $\Delta$ NLS2 und  $\Delta$ NLS3 (c bis e). Die linke Bildreihe zeigt GFP-Färbung, die Mittlere DNA-Färbung mit TO-PRO3 und die Rechte die Überlagerung der zwei Färbungen. Es fällt auf, dass die Nucleoli nicht mit TO-PRO3 angefärbt werden (mittlere Bildreihe) und auch frei von GFP (linke Bildreihe) sind.

## 3. Diskussion

### 3.1. Apoptose Maschinerie in *Hydra*

#### 3.1.1. Identifizierung dreier Caspasen in *Hydra vulgaris*

In dieser Doktorarbeit wurden drei Caspasen, HyCasp A, HyCasp 3B und HyCasp 3C, aus *Hydra* isoliert. Zwei von ihnen, HyCasp 3B und HyCasp 3C, sind einander sehr ähnlich, auf DNA Ebene sind sie zu 94% identisch. Auch andere Gene kommen in *Hydra vulgaris* in mehreren sehr ähnlichen Varianten vor, so zum Beispiel PDGF und PPOD.

Alle drei Caspasen werden in adulten Tieren transkribiert. Sie besitzen eine Prodomäne von 85 (HyCasp A) bzw. 73 AS (HyCasp 3B und 3C) Länge, die keine bekannten Sequenzmotive, insbesondere keine DED oder CARD Domänen enthalten. Damit gehören sie nicht zu der Gruppe der Initiator-Caspasen. Trotz der fehlenden CARD oder DED Domäne ist HyCasp A in der Lage, sich bei Expression in *E.coli* durch Prozessierung zwischen großer und kleiner Untereinheit selbst zu aktivieren.

Von N. Schmidt konnte nachgewiesen werden, dass für diese Autoprozessierung die Prodomäne notwendig ist (Schmidt, 2003). Die Vermutung liegt nahe, dass die Prodomäne von HyCasp A ein bisher nicht erkanntes Motiv für Protein–Protein Interaktionen besitzt. N. Schmidt konnte auch zeigen, dass HyCasp A in den Mitochondrien lokalisiert ist und dort konstitutiv aktiv ist. Bei HyCasp 3B und HyCasp 3C hingegen kann erst nach Translokation aus den Mitochondrien ins Cytoplasma eine Aktivität nachgewiesen werden. Weder HyCasp 3B noch HyCasp 3C vermögen sich selbst zu aktivieren, sind aber beide in apoptotischen Zellen aktiv. Sie gehören damit zur Gruppe der Effektor-Caspasen. Es bleibt die Frage, wie sie aktiviert werden. Gegen HyCasp A als Initiator-Caspase sprechen vier Gründe: Zum einen aktiviert sich in allen bisher untersuchten Organismen die Initiator-Caspase erst nach einem bestimmten Signal und ist nicht ständig konstitutiv aktiv. Zum zweiten gelang es bisher nicht, rekombinante HyCasp 3B oder HyCasp 3C durch aktivierte HyCasp A zu prozessieren. Drittens stimmt die Substratspezifität von HyCasp A, die sich bei der Sequenz IRKD prozessiert, nicht mit der putativen

Schnittstelle DTVD von HyCasp 3B und HyCasp 3C überein. Schließlich spricht auch die Stammbaumanalyse gegen eine Rolle von HyCasp A als Initiator-Caspase. Sie stellt HyCasp A vielmehr an die Basis der Caspasen an den Übergang zu den Paracaspasen (siehe Abb. 22).

### **3.1.2. Besitzt *Hydra* eine Caspase-Kaskade?**

Anders als bei *C. elegans*, wo Ced-3 als einzige Caspase für die Apoptose benötigt wird, kann in *Hydra* keine der bisher bekannten Caspasen alle Funktionen erfüllen. Es sollte in *Hydra* also noch mindestens eine weitere Caspase, eine Initiator-Caspase geben. Tatsächlich konnte von R. Knapp neben einer Paracaspase eine weitere Caspase isoliert werden (Knapp, 2004). Diese Caspase besitzt eine DED-Domäne und gehört aufgrund ihrer Sequenzhomologie zur Gruppe der Caspase-8/10 und wurde daher HyCasp 8 genannt. Sie ist damit ein Kandidat für die fehlende Initiator-Caspase. Ob HyCasp 8 an der Apoptose beteiligt ist, ist noch völlig unklar. In *Drosophila* spielt Dredd, die zu Caspase-8 homologe Caspase, bei der Apoptose nur eine geringe Rolle. Sie nimmt vielmehr bei der Signaltransduktion für die Immunabwehr eine wichtige Position ein (Salvesen and Abrams, 2004).

HyCasp 8 muss aber nicht die letzte Caspase sein, die in *Hydra* gefunden wird. In den vorhandenen Sequenz Daten aus dem *Hydra* EST-Projekt wurde das Fragment einer weiteren Caspase (S BP 507635) gefunden, deren genaue Zuordnung aber noch nicht möglich ist.

*Hydra* besitzt damit wie Vertebraten und *Drosophila* genügend Caspasen, um eine Caspase-Kaskade zu ermöglichen. *C. elegans* besitzt zwar auch mehrere (vier) Caspasen, allerdings weisen nur zwei, CED-3 und CSP-1 eine Enzymaktivität auf, und nur CED-3 ist für Apoptose nötig (Shaham, 1998). Im Schwamm wurde ein Caspase Gen gefunden, das in zwei *Splice*-Varianten exprimiert werden kann, eine lange Form, die eine Prodomäne mit einer CARD Domäne besitzt und eine kurze Form ohne Prodomäne (Wiens et al., 2003).

Welchen Vorteil hat *Hydra* davon, ein ganzes Arsenal an Caspasen und damit das Potential für eine Caspase-Kaskade zu unterhalten, wenn *C. elegans* es vorlebt wie man, zumindest als einfacher Organismus, auch mit Weniger gut durchs Leben oder besser Sterben kommt? Eine Hypothese ist, dass Protease-Kaskaden es erlauben

ein binäres Signal (aktiv / nicht aktiv) in ein analoges Signal umzuwandeln, indem tiefer stehende Effektor-Proteasen durch Inhibitoren und Aktivatoren feinreguliert werden. Übereinstimmend mit dieser Hypothese besitzt *Hydra* mindestens je zwei pro- und zwei antiapoptotische Bcl-2 Proteine (Popp, 2004), *Drosophila* und *C. elegans* zwei, Vertebraten mindestens 20, Bcl-2 homologe Proteine (Ameisen, 2004). Ähnliches trifft auf die IAPs zu. Vertebraten besitzen acht, *Drosophila* vier und *C. elegans* nur zwei (Koonin and Aravind, 2002). In *Hydra* wurde bisher Survivin gefunden, ausgehend von obiger Hypothese würden aber noch weitere IAPs erwartet werden.

### **3.1.3. Das Team ist komplett – Apoptose Maschinerie in *Hydra***

In *Hydra* findet man mit den Caspasen und AIF beide „Executer-Proteine“ die auch in höheren Tieren Apoptose vollstrecken. Daneben konnten inzwischen auch Apoptose regulierende Proteine isoliert werden (Bcl-2 Homologe) oder als Fragmente in der EST-Datenbank gefunden werden (TNF-Rezeptor, BIR). Damit steht fest, dass schon bei den frühesten vielzelligen Tieren die Basismaschinerie der Apoptose vorhanden war. Diese wurde im Laufe der Evolution in verschiedenen Tierstämmen immer mehr verfeinert (Vertebraten), oder auf ein einfaches Grundgerüst reduziert (*C. elegans*).

Eine wichtige Frage ist die Rolle der Mitochondrien, insbesondere die von Cytochrom c, bei der Apoptose in *Hydra*. Bei Säugetieren interagiert Cytochrom c nach der Freisetzung aus den Mitochondrien mit dem WD-40 Sequenzmotiv von APAF-1 und ist an der Aktivierung der Caspasen über den „mitochondrialen Pathway“ beteiligt. Bei *C. elegans* scheint Cytochrom c an der Regulation der Apoptose nicht beteiligt zu sein. Ced-4 besitzt kein WD40 Sequenzmotiv und kann Cytochrom c nicht binden.

In *Drosophila* ist die Rolle von Cytochrom c umstritten. Dark, das zu APAF-1 homologe Protein, besitzt am C-Terminus WD40 Sequenzmotive. Mittels Co-Immunopräzipitations Experimenten in *Drosophila* Gewebekulturzellen konnte gezeigt werden, dass Dark Cytochrom c bindet (Kanuka et al., 1999; Rodriguez et al., 1999). Die meisten Studien in *Drosophila* finden allerdings keinen Hinweis, dass Cytochrom c während der Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzt wird (Varkey et al., 1999; Dorstyn et al., 2002). In RNAi Versuche konnte mit dsRNA gegen Dark, nicht jedoch mit dsRNA gegen Cytochrom c Apoptose unterdrückt werden



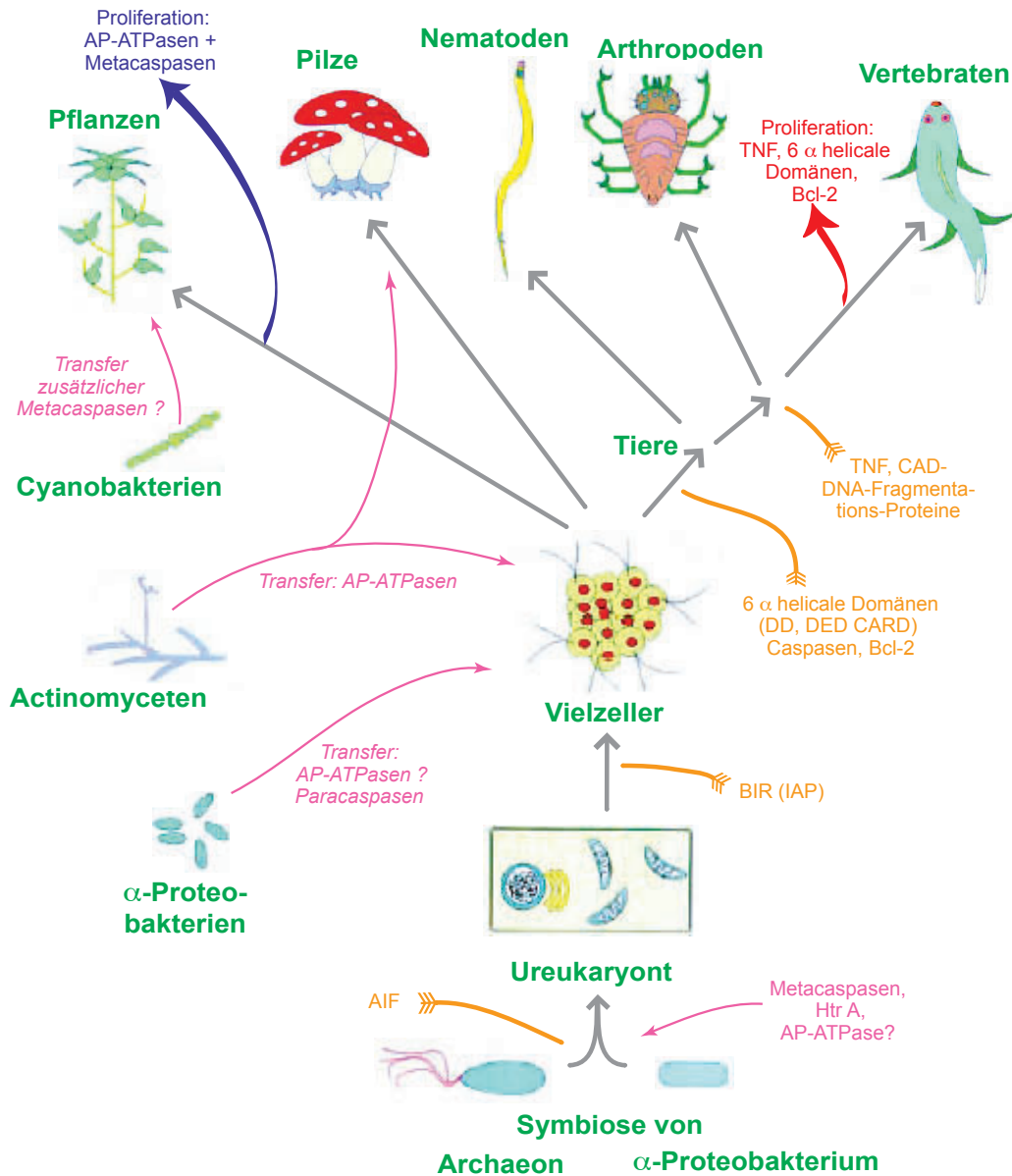
(Zimmermann et al., 2002). In *Hydra* ist bisher noch kein zu APAF-1 homologes Protein isoliert oder in der EST Datenbank gefunden worden.

Die Regulation der Caspasen in *Drosophila* und Säugetieren scheint auf gegensätzliche Weise zu erfolgen. In *Drosophila* ist die Aktivierung der Caspasen konstitutiv und wird durch IAPs gehemmt. Apoptose wird durch die Inhibierung der IAPs („Lösen der Bremse“; Salvesen and Abrams, 2004) eingeleitet. In Säugetieren ist der „Aktivierungs-Pathway“ der Caspasen hingegen inaktiv und muss erst induziert werden („Tritt aufs Gas“; Salvesen and Abrams, 2004). Eine Untersuchung des Aktivierungssystems in *Hydra* könnte dazu beitragen zu entscheiden, welches der beiden Regulationssysteme das Ursprünglichere ist.

#### **3.1.4. Ursprung der Apoptose – sine qua non eines multizellulären Organismus?**

Wie Koonin und Aravind schreiben, scheint Apoptose für die Existenz eines multizellulären Organismus genauso notwendig zu sein wie eine Polizeitruppe in einem Staat (Koonin and Aravind, 2002). Sie schützt den Organismus vor Zellen, deren Zellteilungsregulation gestört ist und auch vor Eindringlingen von außen. Apoptose reguliert aber auch die normale Entwicklung und trägt zur Erhaltung der Gewebhomeostase bei. Der Schutz erfolgt durch Aktivierung eines jeder Zelle zu eigenen „Selbstmord“-Programms, als Antwort auf das Fehlen von „Survival-Signalen“ oder den Empfang von „pro-death-Signalen“. Die Phagozytose der sterbenden Zelle durch benachbarte Zellen erfolgt nach einem genetisch kontrollierten Mechanismus (Horvitz, 1999). Lange Zeit war man der Ansicht, dass die Phagozytose der sterbenden Zelle keinen Einfluss auf den Ablauf des „Selbstmord“-Programms hat. Neuere Untersuchungen haben jedoch diese Auffassung widerlegt (Hoepfner et al., 2001; Reddien et al., 2001). Inzwischen hat man erkannt, dass zusätzlich zu der intrinsischen Kontrolle eine „Soziale Kontrolle“ durch benachbarte, konkurrierende Zellen kommt. Damit wird das Räuber-Beute Konzept zu der bisher vorherrschenden altruistischen Sichtweise auf die Regulation des programmierten Zelltodes hinzu gefügt (Ameisen, 2004).

Die Frage nach dem Ursprung der Apoptose bei multizellulären Organismen lautet weniger warum, sondern wie sie erfunden wurde, insbesondere, woher die beteiligten Komponenten stammen. Koonin und Aravind spekulieren, dass von Eukaryonten aufgenommene bakterielle Gene den Kern der Apoptose-Maschinerie bilden (Abb. 36).



**Abb. 36:** Vereinfachtes Schema des Ursprungs und der Evolution des eukaryontischen Systems des programmierten Zelltods. Graue Pfeile deuten vertikale Evolution, rosa Pfeile horizontalen Gentransfer an. Orange Pfeile zeigen den Erwerb oder Ursprung eukaryonten-spezifischer Proteine und Protein-Domänen. (verändert nach Koonin and Aravind, 2002)

Diese Aufnahme erfolgte ihrer Hypothese nach in zwei Stufen. Mit der „Domestizierung“ des pro-mitochondrialen Endosymbionten kamen Metacaspasen, HtrA und AP-ATPasen zu AIF hinzu. Auf der Stufe eines frühen eukaryontischen Vielzellers erfolgte ein zweiter Einstrom bakterieller Gene: Paracaspasen und AP-ATPasen (Abb. 36, rosa Pfeile).

Zu späteren Zeitpunkten der Evolution kam es zu dem Transfer von AP-ATPasen zu den Pilzen und weiterer Metacaspasen zu den Pflanzen.

Diese Kernkomponenten entwickelten sich im Laufe der Evolution in den verschiedenen Reichen und Tierstämmen unterschiedlich weiter (Abb. 37, blauer Pfeil). So kam es bei den Pflanzen zu einer Expansion der Metacaspasen und AP-ATPasen. In Pflanzen gibt es etwa 190 AP-ATPasen, in Tieren hingegen nur eine einzige.

Um diesen Kern gruppierten sich weitere Komponenten. Diese übernahmen entweder Domänen anderer Proteine, (AIF, Cytochrom c und BIR), oder entwickelten neue Domänen (6- $\alpha$ -helikale-Domänen, CAD-Domäne-DNA-Fragmentierungsproteine, TNF, Bcl2 und Caspasen) (Abb. 36 orange Pfeile). Bei Vertebraten erfolgte laut Koonin und Aravind eine Expansion von TNF, 6- $\alpha$ -helikale-Domänen (die sich zu den DED-, DD-, Pyrin- und CARD-Domänen aufspalteten) und Bcl2 (Abb. 36, roter Pfeil).

Eine zuerst von Frade und Michaelidis vorgeschlagene Hypothese verbindet den Ursprung des eukaryontischen programmierten Zelltod (PCD) mit der Endosymbionten Hypothese. Das ursprüngliche  $\alpha$ -Proteobakterium könnte sezernierte Proteasen, etwa Metacaspasen, in Zeiten von Nahrungsmangel eingesetzt haben, um seinen Wirt zu töten, sich damit Nahrungsressourcen zu erschließen und sich einen neuen Wirt zu suchen (Frade and Michaelidis, 1997). Im Laufe der Evolution entstand daraus nach Hinzufügen regulatorischer Komponenten die Apoptosemaschinerie, wie wir sie heute kennen.



### 3.2. Transgene Hydren

Im Laufe dieser Doktorarbeit wurde erstmals ektopische DNA in Hydrazellen exprimiert. Dabei kamen zwei unterschiedliche Methoden zur Anwendung, mit denen DNA in die Zellen transfiziert wurde. Mit der Mikroelektroporationsmethode gelang es, transient GFP-Fusionsproteine in bis zu 40 Zellen pro Tier zu exprimieren. Sie hatte jedoch den Nachteil, schwer reproduzierbar zu sein, was unter anderem an der manuellen Handhabung der Elektroden liegen könnte. Mit der ballistischen Transformation erzielte man zuverlässigere Erfolge. Die meisten transformierten Tiere enthielten GFP exprimierende Zellen, allerdings deutlich weniger, wenn auch stärker leuchtende, als mit der anderen Methode. Es stellt sich die Frage, wie sehr der Beschuss durch die Goldpartikel die Zellen schädigt und so eine geringere Transformations-Effizienz verursacht. Unabhängig von der angewendeten Methode, konnten fast nur ektodermale Epithelzellen transformiert werden. Die Goldkugeln werden im Ektoderm oder der Mesogläa vermutlich zu stark abgebremst, um noch endodermale Zellen zu durchdringen. I-Zellen sind wegen ihrer geringeren Größe schwerer zu treffen oder werden, da sie nicht so exponiert wie die ektodermalen Epithelzellen liegen, weniger gut erreicht.

Ein Manko beider Methoden ist ihre niedrige Transformationseffizienz. Selbst im besten Fall mit etwa 40 transfizierten Zellen, entspricht dies bei einem Tier, das aus etwa 100.000 Zellen besteht, nur einer Transformationseffizienz von 1:2500. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Fusionsproteine meist nur wenige Tage zu detektieren waren. Trotzdem ermöglicht es diese Technik Einzelzellen *in vivo* über einen längeren Zeitraum zu beobachten sowie zum ersten Mal in *Hydra*, die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen *in vivo* zu bestimmen. Für andere Zwecke, insbesondere zur Überexpression von Proteinen, die zum Beispiel die Achsenbildung in *Hydra* steuern, ist die limitierte Anzahl der transformierten Zellen und ihr transients Charakter ein ernsthaftes Hindernis.

Das Ziel weiterer Versuche muss es sein, eine stabile Integration des Aktin-Promotor/GFP-Reportergen in das *Hydra* Genom zu erzielen. Dabei kann auf die im Labor von Hans Bode gemachten Versuche mit Transposons (mobile DNA Elemente deren Länge einige hundert bis zu mehreren zehntausend Basenpaaren betragen können) zurückgegriffen werden.

Bode und Mitarbeiter haben deutliche Hinweise darauf, dass im Falle einer Injektion des transponierbaren Elements TC3 aus *C.elegans* (Raz et al., 1998), das zusätzlich das GFP-Reportergen unter der Kontrolle des *Xenopus laevis* EF1a Promotors enthält, zusammen mit der mRNA für die TC3 Transposase in *Hydra* Embryonen, man eine Integration des GFP-Gens in das *Hydra* Genom erhält (Hans Bode, persönliche Mitteilung). Es konnte allerdings keine GFP Expression in den transformierten Tieren festgestellt werden.

Da, wie in dieser Doktorarbeit gezeigt werden konnte, GFP unter der Kontrolle des *Hydra* Aktin Promotors zu einer sichtbaren GFP Expression führt, scheint dieser Fehlschlag auf die Ineffektivität des Frosch EF1a Promotor in *Hydra* zu beruhen. Ein viel versprechender und nahe liegender Ansatz ist daher ein Austausch des EF1a gegen den Aktin-Promotor in dem von der Arbeitsgruppe Bode verwendetem Konstrukt. Das TC3 transponierbare Element mit dem *Hydra* Aktin-Promotor/GFP Reportergen und der Transposase mRNA kann anschließend auf zwei verschiedenen Wegen in *Hydra* transfiziert werden: Zum einen durch Injektion in Embryonen im 1-4 Zellstadium, zum anderen durch Mikroelektroporation in den Rumpf adulter Tiere. In beiden Fällen sollte das Aktin-Promotor/GFP Reportergen in das Genom mehrerer Zellen integriert werden.

Bei Injektion in frühe Embryonen sollten, im sich entwickelnden Tier, viele Zellen das Reportergen stabil exprimieren.

Wird das transponierbare Element in den Rumpf adulter Tiere transfiziert, werden zu Beginn nur einige wenige Epithelzellen das Konstrukt enthalten. Da sich die Epithelzellen im Rumpf einer *Hydra* kontinuierlich in Mitose befinden, wird eine einzelne Zelle, die das GFP-Reportergen exprimiert sich auch teilen und mit der Zeit einen „Flecken“ GFP markierter Zellen bilden. Sobald dieser „Zellfleck“ in etwa 1/20 der Größe des Tieres erreicht hat, kann dieser Bereich aus dem Tier herausgeschnitten werden und sich zu einem vollständigem Tier regenerieren. Wiederholt man diesen Vorgang einige Male, wird man ein Tier erhalten, in dem alle Epithelzellen, entweder des Ecto- oder Endoderms (je nachdem in welcher Epithelschicht die „Urzelle“ gelegen war) GFP markiert sind, und man hat somit eine transgene Hydra mit einem transgenen Ectoderm oder Endoderm erhalten.

### 3.3. PSR - Kernprotein oder Membranrezeptor?

In dieser Arbeit wurde der Phosphatidylserin Rezeptor in *Hydra vulgaris* isoliert. Eine bioinformatische Untersuchung des *Hydra* PSR zeigt drei NLS Sequenzen und deutet daraufhin, dass er, anders als erwartet, nicht in der Zellmembran, sondern im Nukleus lokalisiert ist. Mit Hilfe der neu etablierten Transformationsmethode wurde die Kernlokalisation nachgewiesen. NLS3 wurde als die, für den Import in den Zellkern, nötige Signalsequenz identifiziert. Die von Fadok et al. postulierte Transmembrandomäne konnte von M. Pröschel in *Hydra* PSR nicht gefunden werden (Pröschel, 2003).

Die große Homologie zu den bekannten Säuger PSR gibt Grund zu der Annahme, dass sich diese Ergebnisse auch auf das humane PSR übertragen ließen. In der Tat kamen Cui et al., die die Lokalisation von humanem PSR mit Hilfe von GFP-Fusionsproteinen und anti-PSR Antikörpern untersuchten, für den humanen PSR zu den gleichen Ergebnissen (Cui et al., 2004). Damit ergibt sich ein Widerspruch zu der von Fadok veröffentlichten Funktion von PSR als membranintegriertem Rezeptor für Phosphatidylserin.

PSR Knockout Experimente, die in *C.elegans* durchgeführt wurden, bestätigten allerdings zunächst Fadoks Hypothese. Wang et al. beobachteten, dass in *psr-1* Embryonen die Phagozytose von „Zelleichen“ verzögert ist (Wang et al., 2003). Auch die ersten Mäuse PSR-Knockouts die von der Gruppe um Flavell (Li et al., 2003) und von Kunisaki et al. (Kunisaki et al., 2004) generiert wurden wiesen neben schweren Entwicklungsschäden eine erhöhte Anzahl nicht phagozytierter, apoptotischer Zellen auf. Eine dritte sorgfältigere Studie, die jüngst von Böse et al. publiziert wurde, kam zu anderen Ergebnissen (Böse et al., 2004). Sie fanden heraus, dass PSR-Knockout Mäuse zwar eine Vielzahl von schweren Defekten während der Embryogenese aufweisen, es aber keinen Unterschied bei der Phagozytose apoptotischer Zellen gibt. Anders als ihre beiden Vorgängergruppen untersuchten sie PSR auch Immunhistochemisch mit dem Antikörper mAB 217 in PSR-Knockout und Wildtyp Mäusen. Dieser Antikörper war von Fadok et al. benutzt worden um PSR im *Phage Display* zu identifizieren (Fadok et al., 2000). mAB 217 färbte die Membran von Makrophagen. Es gab keinen Unterschied in der Färbung von PSR Wildtyp und PSR-Knockout Tieren.

Wie kann man diese Ergebnisse interpretieren? Die naheliegendste Erklärung ist, dass das *psr* Gen keinen Phosphatidylserin Rezeptor, sondern eine im Zellkern

lokalisierte Dioxygenase codiert, die bei der Embryogenese eine essentielle Funktion hat. Welches Protein ist aber dann der Phosphatidylserin Rezeptor? Ein guter Kandidat hierfür ist das Antigen zu dem Antikörper mAb 217. Ein nochmaliges *Phage Display* mit diesem Antikörper erscheint viel versprechend, insbesondere wenn man das Ergebnis der Immunhistochemie und Plasmamembranfärbung bei Makrophagen bedenkt. Eine andere Möglichkeit ist, dass es gar keinen direkten Phosphatidylserin Rezeptor gibt, sondern die Interaktion zwischen Phosphatidylserin auf der apoptotischen Zelle und einem Rezeptor auf dem Phagozyten über Brückenmoleküle vermittelt wird, zum Beispiel MFG-E8 und dem Vitronectin Rezeptor (Lauber et al., 2004). Das PSR Protein jedenfalls wird zwar weiterhin diesen Namen tragen, aber die Funktion als Phosphatidylserin Rezeptor nicht erfüllen können.

## 4. Zusammenfassung

Das Arbeiten mit *Hydra* als Modellorganismus wurde durch das Fehlen einer funktionierenden Transformationsmethode sehr behindert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit gelang es erstmals, EGFP und EGFP-Fusionsproteine transient in *Hydra* zu exprimieren. Hierfür wurden zwei Transformationssysteme etabliert, die auf dem Prinzip der Mikroelektroporation und der ballistischen Transformation beruhen.

Mit diesen neuen Möglichkeiten wurde das PSR Protein in *Hydra* untersucht. PSR ist ursprünglich als Membranrezeptor für Phosphatidylserin publiziert worden. Expression von PSR-EGFP Fusionsproteinen und verschiedener Deletionsmutanten ergab für *Hydra* PSR eine Kernlokalisierung des Proteins, für das eine C-Terminale NLS verantwortlich ist. Bioinformatische Analysen der *Hydra* PSR Proteinstruktur bestätigten die NLS und deckten ein AT-hook ähnliches DNA-Bindemotiv sowie eine Cupin Domäne und große Strukturhomologie zu FIH-1 auf. Von humanen PSR bis hin zu *Hydra* PSR sind diese Eigenschaften konserviert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PSR eine im Zellkern lokalisierte 2-Oxoglutarat und Fe(II) abhängige Oxygenase und kein Zelloberflächenrezeptor ist.

AIF ist ein hoch konserviertes mitochondriales Protein das auch unabhängig von Caspasen Apoptose induzieren kann. In dieser Arbeit wurde AIF aus *Hydra* isoliert und bioinformatisch analysiert. Ein N-terminales mitochondriales Sortierungssignal wurde identifiziert. AIF-EGFP Fusionsproteine wurden in *Hydra* exprimiert. Transformierte Zellen zeigten eine Colokalisation des Fusionsproteins mit einem mitochondrialen Marker.

Aus *Hydra* konnten drei Caspasen HyCasp A, HyCasp 3B und HyCasp 3C isoliert werden. Alle drei Gene werden in *Hydra vulgaris* exprimiert. HyCasp 3B und HyCasp 3C sind auf Proteinebene zu 88 % und auf DNA zu 94 % identisch, unterscheiden sich aber stark von HyCasp A.

Keine der drei Caspasen enthält in der Prodomäne eine erkennbare DED- oder CARD-Domäne, was auf Effektor-Caspasen hindeutet.

Dennoch besitzt HyCasp A bei Expression in *E.coli* die Fähigkeit zur Autoproteolyse wie sie für Initiator-Caspasen kennzeichnend ist. HyCasp 3B

und HyCasp 3C können sich, wie es für Effektor-Caspasen charakteristisch ist, nicht autoprozessieren

Eine detaillierte Stammbaumanalyse bestätigt die Zugehörigkeit von HyCasp 3B und HyCasp 3C zu den Effektor-Caspasen. HyCasp A lässt sich in keine der Caspase Gruppen einordnen und scheint vielmehr eine evolutionär sehr alte Caspase zu sein. Der Stammbaum zeigt auch, dass nur die Effektor-Caspasen und ICE-Caspasen monophyletischen Ursprungs sind.

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Bakterien- und Phagenstämme

##### E.coli:

SOLR	Stratagene
Top 10	Invitrogen
XL-1 Blue	Stratagene
XL-1 Blue MRF'	Stratagene

##### Phagen:

ExAssist Helferphage	Stratagene
cDNA Bank: Hydra cDNA in $\lambda$ ZAP II	Stratagene

#### 5.1.2. Plasmide

Name:	Herkunft:
hoT G	Jan Lohman (Lohman, 1999)
pBlueskript II SK (-)	Stratagene
PCR2.1TOPO	Invitrogene
pTrcHis 2C	Invitrogene

#### 5.1.3. Antikörper

Anti-DIG-AP	monoklonaler Anti-DIG Antikörper konjugiert mit alkalischer Phosphatase (Roche); eingesetzte Verdünnung: 1:5000;
Anti-Maus	polyklonaler Ziege Antikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Amersham); eingesetzte Verdünnung: 1:3000;
Anti-myc	monoklonaler Maus Antikörper (Invitrogene); eingesetzte Verdünnung: 1:5000;

#### **5.1.4. Enzyme**

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs bezogen.

Klenow DNA-Polymerase	Pharmacia
Lysozym	Sigma
RNase A	Sigma
Shrimp Alkaline Phosphatase	USB
Taq DNA-Polymerase	Peqlab
T4 DNA-Ligase	Gibco BRL

#### **5.1.5. Kits**

TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen
Plasmid Miniprep Kit	Peqlab
First-Strand cDNA Synthesis Kit	Pharmacia
T7-Sequencing Kit	Pharmacia
QIAGEN Plasmid Maxi, Mega und Giga Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick-PCR-Purification Kit	Qiagen
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNase-Free DNase Set	Qiagen
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche
DIG-DNA Labelling and Detection Kit	Roche
Quick Change Site directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Prime-It II Random Primer Labeling Kit	Stratagene

#### **5.1.6. Radiochemikalien**

$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-dATP	Amersham
$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]-dATP	Amersham

#### **5.1.7. Marker**

DNA-Marker	LadderMix	MBI-Fermentas
RNA-Marker	0,24–9,5 kb RNA Ladder	Invitrogene
Protein-Marker	Broad Range	Bio-Rad



### 5.1.8. Primer

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert.

Name	<i>int. Laborbezeichnung</i>	Sequenz
aif1-20		ATGATTCGACTTTGGAAATC
aif1768-1791rev		AGAGTTCGGATGCAAATGAAAAAG
C245'	<i>Casp245'</i>	TGCAGGGGAACAAAATAC
C243'	<i>Casp243'</i>	CCAGGAACCAAGTTTTTG
C365'	<i>Casp365'</i>	GGAAAAAGATGATATCAG
C363'	<i>Casp363'</i>	CCAGGAACCTTTTACTG
Casp3B5'	<i>24-5' Anfang</i>	ATGAATGAGGATGGGGTTTC
Casp3B3'	<i>24-3' Ende</i>	CGGATTCCATAGGTTTCATCATAT
B5'	<i>Mihai-24-5'</i>	TACCCAAAGCAAGCCTG
B3'	<i>Mihai-24-3'</i>	GTATTCATGCTTATTAG
C5'	<i>Bea-24-5'</i>	TACCCAAATCAGTTTCG
C3'	<i>Bea-24-3'</i>	GTCATCATGCCGACC

#### Primer für das Anfügen von Restriktionsschnittstellen:

Name	<i>int. Laborbezeichnung</i>	Sequenz
HyCasp A NcoI 5'	<i>Exp36 5'</i>	GTAATACCATGGCAATGTCTAA TGTTAATATTTATG
HyCasp A NcoI 3'	<i>Exp36 3'</i>	CATAGAATTCAAATCACCTTT AATTAGTAAC
HyCasp 3B NcoI 5'	<i>Exp24 5'</i>	GTAATACCATGGCAATGAAT GAGGATGGGGTTTC
HyCasp 3B NcoI 3'	<i>Exp24 3'</i>	CATAGAATTCTACGGATTCC ATAGGTTTCATC

*Anfügen von NcoI Schnittstellen für die Klonierung der Caspasen in den Expressionsvektor pTrcHis2-C.*

AIFSmaI5'		CTACCCGGGATGATTGAC TTTGGAAATC
AIFSmaI3'		TATCCCGGGAGAGTTTCGGA TGCAAATGAAAAAG

*Anfügen von SmaI Schnittstellen für die Klonierung von AIF in den Vektor*

*HyEGFP.*

PSR <i>Sma</i> I 5'	<i>RPS Sma</i> I 5'	GTACCCGGGATGGATAAACG AACAGATGATGC
PSR <i>Sma</i> I 3'	<i>RPS Sma</i> I 3'	GATCCCGGGTTCAACTGCAT CAACTTTGCG
PSR <i>Eco</i> RI 5'	<i>RPS Eco</i> RI 5'	GTCGAATTCATGGATAAACG AACAGATGATGC
PSR <i>Eco</i> RI 3'	<i>RPS Eco</i> RI 3'	GATGAATTCTCATTCAACTG CATCAACTTT GCG

*Anfügen von SmaI bzw. EcoRI Schnittstellen für die Klonierung von PSR in den Vektor HyEGFP.*

Degenerierte Primer:

Name	<i>int. Laborbezeichnung</i>	Sequenz
CP1		TNYTNWSNCAYGGNGA
CP2		RTNCARGCNTGYMRNGG
CP3		CCNYKRCANGCYTGNA
CP4		TGNATRWACCANSWNCC
Aif1.2for		CCWTAYATGAGRCCWCC
Aif4rev		GTCATRTTYTCWCCWGC
PSR2	<i>RPSC2</i>	AARATGAARATGAARTAYTA
PSR3Arev	<i>RPSC 3Arev</i>	RAACCANGTDATNCCYTCRTC
PSR5rev	<i>RPSC 5rev</i>	NACNACRTGCCACCANCC

Mutagenese Primer:

Name	Sequenz
36 mut sense	CCTAAAGTTTTTATTGTACAGGCATCCAGAGG GGAAAAAGATG
36 mut antisense	CATCTTTTTCCCCTCTGGATGCCTGTACAATA AAACTTTAGG

*Primer für die Mutation des aktiven Zentrums der Caspase: HyCasp A-C211S.*

24 mut sense CCAAATTATTTTAAATTCAAGCATCTCGAGG  
AACAGAATACATGG

24mut antisense CCATGTATTCTGTTCCCTCGAGATGCTTGAATT  
AAAAATAATTTTGG

*Primer für die Mutation des aktiven Zentrums der Casapse: HyCasp 3B-C201S.*

HotGFP mut sense GGCCAACACTTGTCACTACTTTCTGTTATGGT  
GTTCAATGC

HotGFP mut antisense GCATTGAACACCATAACAGAAAGTAGTGACA  
AGTGTTGGCC

*Primer für die Modifikation des Plasmid hoT G: GFP-S65C; Mutagenese von GFP zu EGFP.*

HotEcoRI sense GGCATGGATGAACTATACAAATAGCATTTCGT  
AGAATTC

HotEcoRI antisense GAATTCTACGAATGCTATTTTGTATAGTTCATC  
CATGCC

*Primer für die Modifikation des Plasmid hoT G: Generierung der EcoRI Schnittstelle.*

HotSmaI sense GTTGCCGCCCTCGCTGCAGCACCCGGGGAA  
AAATGAGTAAAGGAGAAG

HotSmaI antisense CTTCTCCTTTACTCATTTTTTCCCCGGGTGC  
TGCAGCGAGGGCGGCAAC

*Primer für die Modifikation des Plasmid hoT G: Generierung der SmaI Schnittstelle.*

PSR  $\Delta$ NLS1 sense GGATCCTATG GGGAGCATCC ACTCCTTGAT  
GATTATCATC CTCC

PSR  $\Delta$ NLS1 antisense GGAGGATGAT AATCATCAAG GAGTGGATGC  
TCCCCATAGG ATCC

PSR  $\Delta$ NLS2 sense CTCTTTAAAT ATGCGGGTGA ACCGCCATAC  
AGATGGATTG TTATTG

PSR  $\Delta$ NLS2 antisense CAATAACAAT CCATCTGTAT GGCGGTTCCAC

	CCGCATATTT AAAGAG
PSR ΔNLS3 sense	CCAGAGCAAA GTGAATCCGT TGATGCAGTT GAATG
PSR ΔNLS3 antisense	CATTCAACTG CATCAACGGA TTCACTTTGC TCTGG

*Primer für die Generierung der NLS-Deletionsmutanten von PSR.*

### **5.1.9. nicht-radioktive Nukleotide**

DIG-DNA–Labeling-Mix	Roche
dNTP-Mix	Peqlab

### **5.1.10. Fluorochrome**

Name	Markierung von:	Hersteller:
FM4-64	Plasmamembran	Molecular Probes
MitoTracker Red580	Mitochondrien	Molecular Probes
SYTO15	Zellkern	Molecular Probes
TO-PRO3	Zellkern	Molecular Probes

### **5.1.11. Medien**

Dissoziationsmedium	3,6 mM KCl; 6 mM CaCl <sub>2</sub> ; 1,1 mM MgSO <sub>4</sub> ; 6 mM Natriumcitrat; 6 mM Natriumpyrovat; 6 mM Glucose; 12,5 mM TES; 50 mg/ml Rifampicin pH 6,9;
Hydramedium	1 mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 mM KCl; 1 mM NaH <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ; pH 7,6;
LB-Medium	10 g NaCl; 5 g Hefeextrakt; 10 g Bacto-Trypton; ad 1l mit ddH <sub>2</sub> O; pH 7 mit 5N NaOH einstellen;
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin;
LB-MgM-Medium	LB-Medium mit 10 mM MgSO <sub>4</sub> und 0,2% Maltose
LB-Agar	LB-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar;
NZY-Medium	5 g NaCl, 2 g MgSO <sub>4</sub> ·x7H <sub>2</sub> O; 5 g Hefeextrakt; 10 g Casein-Hydrolysat; ad 1l mit ddH <sub>2</sub> O; pH 7 mit 5N NaOH einstellen;
NZY-Agar	NZY-Medium mit 1,5 % Bacto-Agar
NZY-Topagar	NZY-Medium mit 0,7 % Bacto-Agar
SOC-Medium	10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 2 % Bacto-Trypton; 0,5 %

Hefeextrakt; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM  
Glucose;

### **5.1.12. Chemikalien**

Acrylamid-Bisacrylamid (19:1)	Bio-Rad
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	Bio-Rad
Agarose	Peqlab
Ammoniumacetat	Sigma
Ampicillin	Roth
APS	Merck
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Trypton	Roth
Blockreagenz	Roche
β-Mercaptoethanol	Roth
BCIP	Sigma
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Merck
BSA	Sigma
Calciumchlorid	Roth
Casein-Hydrolysat	Roth
CHAPS	Sigma
Colchizin	Merck
Coomassie-Blau	Merck
Dimethylformamid	Sigma
Dimethylsulfoxid	Sigma
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
EDTA	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Gelatine	Sigma
Glucose	Roth
Glycerin	Serva
Harnstoff	Roth
Hefeextract	Difco
Hepes	Sigma
IPTG	Sigma
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Sigma
Kaliumacetat	Sigma
Kaliumchlorid	Merck
LMP-Agarose	Bio-Rad
Magnesiumacetat	Sigma
Magnesiumchlorid	Fluka
Magnesiumsulfat	Roth
Manganchlorid	Roth
Mannitol	Sigma

Methanol	Roth
MOPS	Fluka
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
Natriumdihydrogencarbonat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck
Natriumpyrovat	Sigma
NBT	Sigma
NLS	Sigma
NZY-broth	Gibco BRL
Paraformaldehyd	Merck
Pronase	Sigma
Rubidiumchlorid	Fluka
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Sodiumdodecylsulphat	Roth
Succinat	Sigma
TEMED	Merck
TES	Sigma
Tetrazyclin	Roth
Tris-Base	Sigma
Tween 20	Merck
X-Gal	Roth

### **5.1.13. Software**

- iPSORT zur Detektion N-terminaler Signalsequenzen in Proteinen und PSORTII zur Bestimmung der Lokalisation von Proteinen in einer Zelle.  
(<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>)
- PredictProtein: Sequenzanalyse und Strukturanalyse von Proteinen.  
(<http://www.cbi.pku.edu.cn/mirror/predictprotein>)
- NCBI-Blast: Identifizierung von Proteindomänen und Homologierecherche.  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast>)
- Codon Usage: Analyse des Codon-Gebrauchs.  
(<http://www.gcu.de/>)
- GeneJockeyII: Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen.
- SeqPub: Bearbeitung von DNA- und Proteinsequenzen
- CLUSTALX: Erstellen von Sequenzalignments.
- Consense (Bestandteil des phylip 3.6 Programmpaket): Berechnung eines Consensus-Stammbaum

- TreeEdit: Editieren von Stammbäumen
- TREE-PUZZLE 5.0: Programm zur Rekonstruktion von Stammbäumen.
- BBEEdit Lite 6.1: Texteditor zur Bearbeitung der TREE-PUZZLE outfiles

#### **5.1.14. Geräte und sonstige Materialien**

##### Membranen

Bodyne B 0,45 µm	Pall
Hybon N <sup>+</sup> -Nylonmembran	Amersham
Protran Nitrocellulose Membran	Schleicher&Schuell

##### Geräte

F2000 Fluoreszenz Spectrophotometer	Hitachi
GeneQuant	Pharmacia
Helios Gene Gun System	Bio-Rad
„home-made“ Partikel-Gun	Botanisches Institut, LMU
Mini-PROTEAN II Cell	Bio-Rad
Oscilloscope HM312	Hameg
Spannungsgenerator	Hugo Sachs Electronics
Szintillationszähler	Beckmann
Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
UV-Crosslinker	Stratagene

##### Mikroskope

Fluoreszenzmikroskop Dialux 20 EB	Leitz
TCS SP confocal laser scanning mikroskope	Leica

##### PCR-Maschinen

Cyclon Gradient	Peqlab
Robocycler Gradient 96 Temperature Cycler	Stratagene

##### Sonstige Materialien

BioMax MS-Filme	Kodak
BlueSlick	Serva
Parafilm M	American National Can
Vectashield	Alexis Biochemicals



**5.1.15. Lösungen und Puffer**

Blockpuffer (Westernblot)	5% BSA in TBS-T
Coomasie-Entfärber	10% Essigsäure; 40% Methanol
Coomassie-Färbelösung	0,25% Comassi; 10% Essigsäure; 40% Methanol
Coomassie-Gelfixierer	10% Methanol; 3% Glycerin
5xDNA-Auftragspuffer	10 mM EDTA pH 8,0; 50% Glycerin; 0,1% SDS; 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol
Ethidiumbromidlösung	1µg/ml in TAE
Färbelösung	3,5 µl BCIP und 4,5 µl NBT/ml Reaktionspuffer
Lysispuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA; 15% Saccharose; 2 mg/ml Lysozym; 0,2 mg/ml RNase A; 0,1 mg/ml BSA
2xProtein-Auftragspuffer	40 µl 500 mM EDTA; 1 ml β-Mercaptoethanol; 2 ml Glycerin; 4 ml 10% SDS; 1,25 ml 1M Tris-HCl pH 6,8; ad 10 ml mit H <sub>2</sub> O
Reaktionspuffer	0,1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 M Tris-HCl pH 9,5
RNA-Auftragspuffer	3 g Glycerin; 1,2 ml 10% SDS; 330 µl 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 270µl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 25 µl 10mg/ml Ethidiumbromid; ad 10 ml mit H <sub>2</sub> O
RNA-Laufpuffer	10 mM NaPO <sub>4</sub> pH 6,8
RNA-Transferpuffer	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 9,3
SDS-PAGE Laufpuffer	250 mM Tris/HCl pH 8,3; 1,9 M Glycin; 1% (w/v) SDS
SDS-Sammelgel (4%)	3,17 ml H <sub>2</sub> O; 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 50 µl 10%SDS; 0,5 ml Acrylamid/Bis (40% Stock); 25 µl 10% APS; 5 µl TEMED; ergibt 5 ml Sammelgel, ausreichend für 2 Gele.
SDS-Trenngel (12%)	4,35 ml H <sub>2</sub> O; 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 100 µl 10%SDS; 3 ml Acrylamid/Bis (40% Stock); 50 µl 10% APS; 5 µl TEMED; ergibt 10 ml Trenngel, ausreichend für 2 Gele.
Sequenz-Ladepuffer	98% Formamid; 10mM EDTA ph 8,0; 0,025% Bromphenolblau; 0,025% Xylencyanol
TAE	40 mM Tris/Acetat pH 8,3; 1 mM EDTA
TBE	89 mM Borsäure; 10 mM EDTA; 0,1 M Tris-HCl pH 8,3
TBS	150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0
TBS-T	0,05% Tween 20 in TBS

TE	10mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM EDTA
Tfbl	30 mM Kaliumacetat; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% Glycerin; 50 mM MnCl <sub>2</sub> ; pH mit 0,2 M Essigsäure auf 5,8 eingestellt.
TfbII	10 mM MOPS; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10 mM RbCl; 15% Glycerin; pH mit KOH auf 6,5 eingestellt.
Transferpuffer (Western)	150 mM Glycin; 25 mM Tris; 20 % Methanol

Lösungen für das Screenen einer Genbank

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl; 1 M Tris-HCl pH 7,5
20x SSC	3 M NaCl; 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
Hochsalz-Waschlösung	2x SSC; 0,1 % SDS
Niedrigsalz-Waschlösung	0,1x SSC; 0,1 % SDS
BlockpufferA	5x SSC; 0,1% NLS; 0,02 % SDS; 1 % Blockreagenz
Hybridisierungslösung	Blockpuffer mit ca. 50 ng/ml DIG-markierter Sonde. Der Agaroseblock mit der aus dem LMP-Gel ausgestochenen Sonde wurde bei 60°C geschmolzen und dann zum BlockpufferA gegeben.
TBS	150 mM NaCl; 100 mM Tris/HCl pH 7,5
BlockpufferB	TBS mit 1 % Blockreagenz
Antikörperlösung	Antikörper 1:5000 in BlockpufferB verdünnt
BCIP	50 mg/ml in 100% DMF
NBT	75 mg/ml in 70 % DMF
Reaktionspuffer	0,1 M NaCl; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1 M Tris-HCl pH 9,5
Färbelösung	3,5 µl BCIP und 4,5 µl NBT/ml Reaktionspuffer
TE	1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8,0
SM-Puffer	0,01% Gelatine; 100 mM NaCl; 8 mM MgSO <sub>4</sub> ; 50 mM Tris-HCl pH 7,5

## 5.2. DNA Methoden

### 5.2.1. Präparation von Plamid DNA

#### Präparation von Plamid DNA im kleinen Maßstab (Miniprep-Kit und Easyprep)

Für die Isolierung kleiner Mengen Plamid DNA wurde ein Bakterienklon gepickt und in 3 ml LB-Medium mit geeignetem Antibiotikum ÜN bei 37°C inkubiert. Die Präparation erfolgte aus 1,5 ml der Kultur entweder mit dem Plamid Miniprep Kit der Firma Peqlab wenn, etwa für eine Sequenzierung, sehr saubere Plamid DNA benötigt wurde, oder es kam die von Berghammer beschriebene "Easyprep"-Methode (Berghammer and Auer, 1993) zur Anwendung, die schneller und einfacher durchzuführen ist, dafür aber nicht so saubere Plamid-DNA liefert.

1,5 ml einer stationären Bakterienkultur wurde in einer Tischzentrifuge 1 min bei 14000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 40 µl Lysispuffer resuspendiert und 3 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Suspension 60 s gekocht und sofort für weitere 60 s auf Eis gestellt. Nach 10 min zentrifugieren bei 14000 g bildeten Zelldebris und genomische DNA zusammen mit dem präzipitiertem BSA ein stabiles Pellet. Die Plasmide befanden sich im Überstand. Ohne weitere Aufreinigung konnten 2-5 µl des Überstands für eine Restriktionsspaltung oder 1 µl einer 1:100 Verdünnung für eine PCR eingesetzt werden. Die Ausbeute betrug ca. 2 µg DNA/ml Bakterien Kultur.

#### Präparation von Plamid DNA im großen Maßstab (Maxi- Mega- und Giga-Kit)

Wurden größere Mengen an Plamid DNA benötigt, kamen die Qiagen Plamid Maxi- Mega- oder Giga-Kit zum Einsatz. Ebenso wie der Miniprep Kit beruhen sie auf einer alkalischen Lyse von Bakterienzellen bei der die lineare chromosomale DNA irreversibel denaturiert und zusammen mit Proteinen präzipitiert. Die Plamid DNA renaturiert bei neutralen pH und wird unter Hochsalzbedingungen an eine Silikagel-Membran gebunden, mehrmals gewaschen und zum Schluß unter Niedrigsalzbedingungen eluiert. Die drei Kits unterscheiden sich nur in der maximalen Kapazität und wurden nach Protokoll des Herstellers verwendet.

Kit	Kulturvolumen	Elutionsvolumen	Ausbeute Plamid DNA
Maxi	100 ml	100 µl	200 – 400 µg
Mega	500 ml	500 µl	1,5 –2,5 mg
Giga	2,5 l	2 ml	7,5 –10 mg

### **5.2.2. DNA und RNA Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA Lösungen erfolgte im GeneQuant Photometer bei 260 nm und 280 nm. Eine Extinction  $OD_{260}$  von 1,0 entspricht dabei 50 µg/ml DNA oder 40 µg/ml RNA. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  ist ein Mass für die Reinheit der Probe und sollte für DNA und RNA einen Wert um 1,8 haben.

### **5.2.3. Restriktionsverdau von DNA**

Der Restriktionsverdau von DNA erfolgte mit 3 U Enzym /µg DNA bei den von dem Hersteller angegebenen Bedingungen für 2 h. Die Fragmente wurden anschließend über ein Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel mittels des QIAquick-Gel-Extraction Kit isoliert.

### **5.2.4. Agarose Gelelektrophorese**

Mittels Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aufgetrennt. Auf je 5 µl Proben-Volumen wurde 1 µl DNA Auftragspuffer zugegeben und die Probe auf ein Agarosegel aufgetragen. Je nach Größe der DNA Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 0,5 % bis 2,0 % verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 5 V/cm in TAE. DNA Banden wurden durch Färben mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Größe der DNA-Banden wurden unter UV-Licht anhand eines mitaufgetrennten DNA-Längenstandard bestimmt und das Agarosegel fotografiert.

### **5.2.5. Reinigung von DNA Fragmenten**

Für die Reinigung von DNA aus Reaktionsgemischen kamen zwei Methoden zur Anwendung.

#### **Isolierung aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung über ein Agarosegel liefert sehr saubere DNA. Nach der Größenauftrennung der DNA mittels Agarosegelelektrophorese wurde die gewünschte DNA Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA sollte dabei möglichst kurz dem UV-Licht ausgesetzt werden, da ansonsten die DNA geschädigt werden kann. Die Isolierung aus dem Gelstückchen erfolgte mittels des „QIAquick Gel Extraction Kit“ genau nach Angaben des Herstellers.

### Direkte Reinigung der DNA

Zur schnellen Reinigung von DNA nach PCR oder Restriktionsreaktionen sowie zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide bei einer radioaktiven Markierung, kamen der „QIAquick PCR Purifikation Kit“ oder der „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ zum Einsatz. Beide von Qiagen hergestellten Kits unterscheiden sich nur in ihrer unteren Ausschlußgrenze. Der „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ trennt Oligonukleotide die kürzer als 17 Basen sind ab, für den „QIAquick PCR Purifikation Kit“ liegt diese Grenze bei 40 Basen. Beide Kits wurden nach den vom Hersteller angegebenen Protokoll eingesetzt

### **5.2.6. Ligation von DNA**

#### „Klassische Ligation“

Für die Ligation von DNA Fragmenten wurden linearisierte Plasmid DNA und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 3:1 bis 9:1 eingesetzt. 50 ng Plasmid-DNA und die entsprechende Menge Insert-DNA wurden mit 1 U T4-Ligase und dem entsprechenden Ligationspuffer in einem möglichst kleinem Gesamtvolumen bei 16°C über Nacht inkubiert. Um eine Rezirkularisierung des linearisierten Plasmids zu verhindern wurde das Plasmid, wenn es die Klonierungsstrategie ermöglichte, mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen, die inkompatible Überhänge erzeugten, geschnitten. Wurde das Plasmid nur mit einem Restriktionsenzymen linearisiert, erfolgte eine Dephosphorylierung der 5'-Enden. Dazu wurden 50 ng Plasmid-DNA mit 1U „Shrimps Alkalischer Phosphatase“ im dazugehörigem Puffer 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 65°C für 15 min inaktiviert.

#### Ligation mit dem „TOPO TA Cloning Kit“

Für die Klonierung von, mittels Taq Polymerase amplifizierter, PCR-Produkten wurde der „TOPO TA Cloning Kit“ eingesetzt. Je 2 µl PCR Produkt wurden nach Protokoll des Herstellers in den Vektor pCR2.1-TOPO kloniert.

### **5.2.7. Transformation von DNA in *E.coli***

#### Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden Zellen des *E.coli* Stammes Top 10 verwendet. Ein Einzelklon wurde in 2 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurden

anschließend in 400 ml Medium verdünnt und weiter inkubiert, bis sich eine  $OD_{550}$  von ca. 0,5 ergibt, was der exponentiellen Wachstumsphase der Kultur entspricht. Nach 5 min auf Eis wurden die Bakterien für 5 min mit 6000 rpm bei 4°C pelletiert, in 40 ml gekühltem TFB I-Puffer resuspendiert und für 5 min wieder auf Eis inkubiert. Dann wurden die Bakterien erneut pelletiert und in 4 ml TFB II-Puffer aufgenommen. Nach weiteren 15 min auf Eis konnten die Bakterien in 100 µl Aliquots in vorgekühlte sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

### Transformation

Transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und je 100 µl der Bakteriensuspension mit 5 µl Ligationsansatz versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis erfolgte für genau 90 s ein Hitzeschock bei 42 °C und anschließend eine erneute Inkubation auf Eis von 1 min. Dann wurden die Bakterien in 800 µl LB-Medium für 60 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 10 µl und 100 µl der Kultur auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **5.2.8. PCR**

Mit Hilfe der Polymerasen-Kettenreaktion ist, von zwei Oligonukleotidprimern ausgehend, die spezifische enzymatische Amplifikation von DNA möglich (Saiki et al., 1985; Mullis and Fallona, 1987).

### Standard-PCR

Eine Standard-PCR hatte folgenden Ansatz:

1-10 ng Template-DNA, 5 µl 10xPCR Puffer (komplett), 1 µl Nukleotid-Mix (je 10 µM), je 5 µl Primer (5 µM), 0,1 µl Taq-Polymerase (5U/µl) auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Die Standard-PCR wurden in dem Stratagene Robocycler mit folgenden Parametern durchgeführt:

Vollständige Denaturierung der Template-DNA für 3 min bei 95°C. Danach 25 bis 30 Zyklen mit folgenden Schritten: Denaturierung für 30 s bei 95°C, Hybridisierung der Primer bei einer Temperatur von 3-5°C unterhalb der niedrigsten theoretischen „Schmelztemperatur“ der verwendeten Primer (meist 50°C–60°C) und Elongation bei 72°C für 1 bis 3 min je nach Länge des zu amplifizierenden Fragmentes (als Faustregel galt 1 min/1kb). Als letzter Schritt erfolgte eine Elongation für 5min bei 72°C, um alle DNA Stränge fertigzustellen.

Diese Standard –PCR wurde für folgende drei Fälle modifiziert:

1. Wenn  $\lambda$ -DNA als Template in einer PCR eingesetzt wurde, verlängerte sich die erste Denaturierung auf 10 min.
2. Sollte eine DIG-markiert DNA-Sonde erzeugt werden, wurde der Nukleotid-Mix durch 5  $\mu$ l DIG-NTP-Mix aus dem DIG-DNA-Labeling Kit ersetzt und die eingesetzte Menge an Taq-Polymerase verdoppelt. Nach der PCR wurde die Reaktion über ein LMP-Agarosegel aufgereinigt.
3. Wenn mit den verwendeten Primern neue Schnittstellen an den Enden des amplifizierten DNA-Fragments generiert werden sollten, gab es nach der ersten Denaturierung folgende Änderung: Für fünf Zyklen wurde zunächst eine Annealingtemperatur 10°C unterhalb der niedrigsten theoretischen „Schmelztemperatur“ der zwei Primer verwendet. Für die letzten 20 bis 25 Zyklen wurde diese Annealingtemperatur dann um 5°C erhöht.

#### „Touchdown“ PCR

„Touchdown“ PCR (Don et al., 1991) ist eine PCR Methode mit der das Risiko minimiert wird, dass degenerierte Primer unspezifische Sequenzen amplifizieren. Die „Touchdown“ PCR beginnt in den ersten Zyklen mit hohen Annealingtemperaturen. In jedem weiteren Zyklus wird die Annealingtemperatur schrittweise gesenkt. Da die Primer zum erstenmal bei der höchsten Temperatur, bei denen sie überhaupt an die Template-DNA binden können, binden werden, ist die erste Sequenz die amplifiziert wird, die mit der höchsten Primerspezifität. Diese wird höchstwahrscheinlich die gesuchte Sequenz sein. Dieses Fragment wird auch während der folgenden Zyklen mit niedrigerer Annealingtemperaturen amplifiziert werden und unspezifische Fragment die bei diesen niedrigeren Temperaturen auch gebunden werden können verdrängen.

Die „Touchdown“ PCR wurde bei der Amplifikation von AIF und PSR mittels degenerierter aus cDNA eingesetzt.

Der PCR Ansatz entsprach der Standard-PCR, nur die Menge an Taq-Polymerase wurde verdoppelt und cDNA wurde als Template-DNA eingesetzt. Die „Touchdown“ PCR wurden in dem Cyclon Gradient Cycler der Firma Peqlab mit folgenden Parametern durchgeführt:

Vollständige Denaturierung der Template-DNA für 3 min bei 95°C. Danach 20 Zyklen mit folgenden Schritten: Denaturierung für 30 s bei 94°C, Hybridisierung bei einer



Annealingtemperatur von 64°C für 1 min und Elongation bei 72°C für 70 s. Nach jedem Zyklus wurde die Annealingtemperatur um 1°C gesenkt.

Nach diesen 20 Zyklen erfolgten weitere 30 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 45°C. Während dieser Zyklen wurden alle Parameter bis auf die Dauer des Elongationsschrittes konstant gehalten. Die Elongationszeit wurde in jedem Zyklus um 2 s verlängert, um der mit zunehmender Zykluszahl abnehmenden Aktivität der Taq-Polymerase Rechnung zu tragen (Aus diesem Grund wurde auch die Denaturierungstemperatur um 1°C gesenkt).

Als letzter Schritt erfolgte eine Elongation für 5min bei 72°C, um alle DNA Stränge fertigzustellen.

### **5.2.9. Mutagenese**

Die Mutationen in dem Plasmid hoT G, die Deletionen der verschiedenen NLS in PSR und die Mutationen von HyCasp A und HyCasp 3B wurden mit dem „Quick Change Site directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene generiert.

### **5.2.10. Sequenzanalyse**

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA, insbesondere aller publizierten DNA-Sequenzen, erfolgte durch die Firma TopLab in Martinsried.

Vereinzelt wurde auch noch nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977) unter Verwendung des „T7 Sequencing Kit“ sequenziert:

Zur Vorbereitung der Primer Hybridisierung wurde 2 µg Plasmid-DNA in 32 µl TE-Puffer aufgenommen und durch Zugabe von 8µl 2M NaOH für 10 min bei RT denaturiert. Nach Zugabe von 7 µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 4 µl H<sub>2</sub>O wurde die DNA mit 120 µl Ethanol gefällt. Die präzipitierte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 10 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von 2 µl Hybridisierungspuffer und 10 pmol Sequenzierprimer wurde die DNA für 10 min bei 37°C und danach weitere 10 min bei RT inkubiert. Die Markierungs- und Terminationsreaktion wurde unter Verwendung des „T7 Sequencing Kit“ nach Angaben des Herstellers und unter Verwendung von α-[<sup>33</sup>P]-dATP durchgeführt. Nach Zugabe von Sequenzladepuffer wurden die Reaktionen für 5 min auf 95°C erhitzt und auf ein 4% denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Hierfür kamen 0,4 mm dicken, 25x20 cm große Gele in vertikalen Gelapparaturen zum Einsatz. Um das Anheften des Gels an die Glasplatten zu verhindern wurde eine Platte alle vier Gelläufe mit BlueSlick behandelt. Die Gelmatrix bestand aus 4%

Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) und 8 M Harnstoff in TBE. Ein halbstündiger Vorlauf bei 1500 V in TBE diente der Entfernung von APS und TEMED aus der Gelmatrix. Der eigentliche Gellauf erfolgte bei 60 W Die Gele wurden nach ihrem Transfer auf Whatman-Papier für 2h bei 80°C getrocknet und auf BioMax MS Filme exponiert.

### **5.2.11. Screenen einer $\lambda$ -cDNA-Bibliothek von *Hydra vulgaris***

Wird ein dichter Bakterienrasen mit  $\lambda$  Phagen infiziert, erzeugt jeder Phage, wenn er den lytischen Vermehrungszyklus einschlägt, ein "Loch" im Bakterienrasen (=Plaque) das ausschließlich Klone eines einzelnen Phagen enthält. Die Phagenkonzentration wird als Menge an "Plaque erzeugenden Einheiten" pro  $\mu$ l (pfu/ $\mu$ l) angegeben. Jedes Phagenplaque enthält genügend, nicht in Phagenpartikel verpackte  $\lambda$ -DNA, die auf eine Membran transferiert (= Plaquelifting) (Benton et al., 1977) und mittels einer Dig-markierten Sonde nachgewiesen werden kann. Das Durchmustern der  $\lambda$ -DNA-Bank erfolgte in 4 Schritten:

#### **1. Plaquelifting**

NZY-Top-Agar wurde in der Mikrowelle aufgeschmolzen und je 9 ml in 15 ml Falconröhrchen aliquotiert, die bis zum Gebrauch, aber mindestens 15 min, in ein 50°C warmes Wasserbad gestellt wurden.

0,6 ml präparierter Bakteriensuspension wurden mit der gewünschten Phagenmenge infiziert und zur Adsorption der Phagen an die *E.colis* 15 min bei 37°C auf einem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Für eine konfluente Lyse des Bakterienrasen wurden 50.000-100.000 pfU/Platte benötigt.

Die mit den Phagen infizierten Bakterien wurden zu dem NZY-Top-Agar gegeben, gut gemischt und auf vorgetrocknete (ca. 2h bei 37°C) NZY-Platten gegossen. Diese Platten wurden bei 37°C ÜN inkubiert.

Für die erste Durchmusterung wurde eine Phagenmenge der  $\lambda$ -DNA-Bank eingesetzt, mit der eine konfluente Lyse des Bakterienrasens erreicht werden konnte. Die Platten wurden auf 4°C abgekühlt und dann eine Nylonmembran für 1 min aufgelegt. Die Orientierung der Membran zur Platte wurde markiert. Die Membran wurde abgezogen, für 5 min auf ein mit Denaturierungslösung, dann weitere 5 min auf ein mit Neutralisierungslösung und zum Schluß 2 min auf ein mit 2xSSC getränktes 3MM Whatmanpapier gelegt (Plaquesseite nach oben).

Nach dem Trocknen der Membran wurde die DNA in einem Transilluminator durch UV Bestrahlung an die Nylonmembran fixiert.

## II. Hybridisierung mit einer Dig-markierten DNA Sonde

Prähybridisierung: Je zwei Membranen wurden mit der "DNA-Seite" nach außen in einem Beutel eingeschweißt und mit 20 ml BlockpufferA 1h bei 56°C im Wasserbadschüttler inkubiert, so daß eine unspezifische Bindung der Sonde an die Membran verhindert wurde.

Hybridisierung: Je 5 ml Hybridisierungslösung wurde 5 min gekocht und schnell gegen den BlockpufferA ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 56°C.

Am nächsten Tag wurden die Membranen zweimal 10 min mit Hochsalz-Waschlösung bei RT und danach zweimal 30 min mit Niedrigsalz-Waschlösung bei 56°C gewaschen.

## III. NBT/BCIP Detektion

Der Nachweis der Dig-markierten Sonde erfolgte mittels der an einen Anti-Digoxigenin Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase. BCIP dient als Substrat der alkalischen Phosphatase und wird von ihr dephosphoryliert und oxidiert. Dies führt zur Reduktion von NBT und zusammen bildet sich ein violettes Präzipitat.

Die Membranen wurden kurz in TBS gewaschen und dann 1 h im BlockpufferB bei RT auf einem Taumelgerät inkubiert. Danach wurden die Membranen zu zweit, mit der DNA-Seite nach außen, mit 20 ml Antikörperlösung in einem Beutel eingeschweißt und 1 h wie oben inkubiert. Anschließend wurden die Membranen einmal kurz und zweimal 15 min in TBS gewaschen. 2 min lang wurden die Membranen dann in Reaktionspuffer äquilibriert, bevor die Farbreaktion in einem Beutel mit 10 ml Färbelösung erfolgte. Die Farbreaktion war nach etwa 3h deutlich sichtbar und wurde durch 5 min Waschen mit TE beendet.

## IV. Ausstechen der Phagenklone

Plaques die ein Hybridisierungssignal lieferten wurden mit sterilen Spitzen ausgestochen, in 0,5 ml SM Puffer aufgenommen und ÜN bei RT auf einem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl Chloroform wurde weitere 10 min geschüttelt, danach 2 min bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand mit den Phagen wurde abgenommen.

Da in der ersten Screen-Runde aufgrund der konfluenten Lyse noch keine Einzelklone ausgestochen werden konnten, wurden die Schritte I-IV noch ein bis zweimal wiederholt, bis Einzelklone ausgestochen werden konnten. Die Bakterien

wurden allerdings diesmal mit einem niedrigerem Phagentiter infiziert.

### Excision

In diesem Schritt erfolgt die *in vivo* Excision des pBlueskript-Phagmids inklusive Insert aus dem  $\lambda$ -ZAP II-Vektor aus Einzelklonen mittels ExAssist Helferphagen und die anschließende Transformation in den *E. coli* Stamm SOLR.

200  $\mu$ l XL-1-Blue MRF' in 10 mM MgSO<sub>4</sub> wurden 250  $\mu$ l der in SM-Puffer extrahierten Phagen und 1  $\mu$ l Helferphagen pipettiert. Die Bakterien wurden unter gelegentlichem schütteln im Wasserbad für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml LB-Medium erfolgte eine Inkubation für 3 h bei 37°C auf einem Schüttler bei 200 rpm. Anschließend wurden die Bakterien 15 min bei RT mit 2000g abzentrifugiert. Der Überstand mit den Phagen wurde in ein neues steriles Falcon überführt. Danach wurden die Phagen durch Erhitzen auf 70°C 15 min denaturiert. Nach 10 min Zentrifugation bei RT mit 4000g wurden 50 und 100 $\mu$ l des Überstands in ein steriles Eppendorftube zu 200  $\mu$ l SOLR-Bakteriensuspension gegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Davon wurden 100  $\mu$ l auf LB-Amp-Platten ausplattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

### Präparation der Wirtszellen für die Phagenkultur

5 ml LB-MgM-Medium wurden mit *E.coli* XL-1-Blue MRF'-Zellen angeimpft und ÜN bei 37°C geschüttelt. 50 ml LB-MgM-Medium wurden mit 100  $\mu$ l der ÜN-Kultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min bei 4°C mit 1500g zentrifugiert und in 10 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

### Präparation der SOLR Bakteriensuspension

Von einem Glycerolstock wurde SOLR auf eine LB-Kanamycin-Platte ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und ÜN bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert.

50 ml LB wurde mit 500  $\mu$ l der Übernachtskultur infiziert und auf dem Schüttler bei 37 °C bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5 - 1,0 inkubiert.

### **5.2.12. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden**

Der für die radioaktive Markierung von DNA-Sonden verwendete Kit „Prime-It II“ beruht auf dem Prinzip der Bindung von zufälligen Oligonukleotiden an mehrere Stellen innerhalb einer DNA-Matrize (Feinberg et al., 1983). 25 ng der zu markierenden DNA wurden in Anwesenheit von 9mer-Oligonukleotiden für 5 min bei 100°C denaturiert, wodurch eine Bindung der Primer an die DNA-Matrize ermöglicht wird. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf Zimmertemperatur und der Zugabe der nicht-markierten Nukleotide dCTP, dGTP, dTTP sowie 50 µCi  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dATP fand für 5-10 min bei 37°C die Elongationsreaktion mit 5 U Klenow-Enzym statt, die durch Zugabe 2 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 gestoppt wurde. Eine Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte wie unter 5.2.5. beschrieben mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“. Danach wurde die Einbaurrate des radioaktiven Nukleotids durch Messen der Tscherenkow-Strahlung im Szintillationszähler bestimmt.

## **5.3. RNA Methoden**

### **5.3.1. RNA Isolierung**

Die Isolierung von Gesamt RNA aus *Hydra vulgaris* erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ und dem „RNase-Free DNase Set“ der Firma Qiagen nach dem „RNase-Free DNase Set Protokoll“. Je 30 Tiere wurden für die Isolierung eingesetzt und die RNA in 40 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Aus 30 Hydren konnte 16 µg Gesamt RNA isoliert werden.

### **5.3.2. Reverse Transkription**

Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem „First-Strand cDNA Synthesis Kit“ nach Protokoll des Herstellers. Als Primer wurde das im Kit enthaltene Not1 dT 18 Oligonukleotid verwendet. Für die Reverse Transkription wurden 3 µg Gesamt RNA eingesetzt.

### **5.3.3. Northern-Blot**

#### **Gelelektrophorese von RNA**

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in Agarosegelen (1,5% Agarose in RNA-Laufpuffer) mit einer Feldstärke von 3 V/cm in RNA-Laufpuffer. Um die Ausbildung eines pH-Gradienten und eine daraus resultierende Degradierung

der RNA zu vermeiden wurde der Laufpuffer während des Gellaufs kontinuierlich mit einer Pumpe umgewälzt. 10 µg Gesamt RNA wurden mit 2 µl RNA-Ladepuffer versetzt und auf 20 µl Endvolumen mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Proben wurden für 10 min bei 75°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt bis sie auf das Gel aufgetragen wurden. Zur Größenabschätzung bei der Auftrennung von Gesamt-RNA-Präparationen dienten die im UV-Licht sichtbaren rRNA Banden mit Größen von etwa 3,3 kb und 1,8 kb oder ein mitaufgetragener RNA-Längenstandard.

### Kapillartransfer

Nach der Elektrophorese wurde das Gel kurz in Wasser gespült und die RNA danach mittels Kapillartransfer über Nacht aus dem Gel auf eine Nylonmembran „geblottet“. Als Transferpuffer diente 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 9. Die Membran wurde dann getrocknet und danach die RNA im UV-Crosslinker mit 1200 µJ irreversibel an die Membran fixiert.

### Filter-Hybridisierung

Für die Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (siehe 5.2.12.) wurden die Filter für 1,5 h bei 42°C mit Hybridisierungspuffer im Rotationsofen prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 2x10<sup>5</sup> cpm der radioaktiv markierten Sonde in Hybridisierungspuffer für 16 h ebenfalls bei 42°C. Unmittelbar vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung wurde die Sonde für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach der Hybridisierung wurde die nicht gebundene Sonde durch dreimal 15 min Waschen mit 2x SSC + 0,1 % SDS bei 42°C entfernt. Danach wurde die feuchte Membran in eine Plastikfolie gewickelt mit einem BioMax MS-Röntgenfilm und den entsprechenden Intensifying-Screens bei -80 °C für 24 h exponiert. Sollte der Blot für weitere Hybridisierungen verwendet werden, wurde die gebundene Sonde durch zweimaliges Abkochen mit 0,1 % SDS entfernt. Anschließend konnte die Membran in einer Plastikfolie bei -20°C gelagert werden.

## 5.4. Protein Methoden

### **5.4.1. Expression rekombinanter Proteine in E.coli**

Ein einzelner Klon einer Top 10 *E. coli* Kolonie die den pTrcHis 2C Expressionsvektor mit dem jeweiligem Insert enthält, wurde in 3 ml LB-Amp-Medium angeimpft und ÜN bei 37°C und auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden 0,2 ml der Kultur mit 10 ml frischem LB-Amp-Medium verdünnt. Diese Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 37°C auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. 1 ml der Kultur wurde als t<sub>0</sub>-Wert abgenommen, abzentrifugiert (14000g, 30sec) der Überstand verworfen und das Pellet bei -80°C eingefroren. In der restlichen Kultur wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1mM IPTG) induziert. Nach einer und nach 24 h wurden jeweils 1 ml Probe entnommen (t<sub>1</sub>- und t<sub>24</sub>-Wert) und wie der t<sub>0</sub>-Wert behandelt.

### **5.4.2. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Diese von Lämmli entwickelte Methode (Lämmli, 1970) ermöglicht es Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Die SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese erfolgte nach Standardmethoden in Bio-Rad Gelelektrophorese-Apparaturen (Mini-PROTEAN II Cell). Es wurden Sammelgele mit 4 % und Trenngele mit 12 % Polyacrylamid verwendet.

Die Bakterienpellets wurden in 100 µl 2xAuftragspuffer resuspendiert und 5 min bei 100°C aufgeköcht. Pro Spur wurden 20 µl Protein in SDS-Probenpuffer aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 200 V in SDS-Laufpuffer. Eine Größenbestimmung erfolgte durch mitaufgetrennte Größenstandards.

### **5.4.3. Coomassie-Färbung**

Für eine Coomassie-Färbung wurde das Gel nach der Gelelektrophorese zunächst 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und danach für 30 min in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Um die einzelnen Proteinbanden sichtbar zu machen wurde anschließend mehrmals mit dem Coomassie-Entfärber entfärbt. Zum Schluß wurde das Gel 2 h in Coomassie-Gelfixerer gelegt und dann in Einmachfolie eingespannt und ÜN bei RT getrocknet.



#### **5.4.4. Western-Blot**

Um Proteinbanden einer SDS-PAGE spezifisch anzufärben, wurden die Proteine aus dem Gel „semi-dry“ auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Auf der Membran konnten die Proteine mit einem Antikörper detektiert werden.

#### **„Semi-dry“-Blot**

Der Transfer erfolgte in einer „Semi-Dry-Transfer-Cell“ von Bio-Rad mit einem kontinuierlichen Puffersystem. Dazu wurden in dieser Reihenfolge: 3 Whatman-Papiere (in Transferpuffer getränkt), Nitrocellulose-Membran (in H<sub>2</sub>O getränkt), SDS-Gel (15 min in Transferpuffer äquilibriert) und 3 Whatman-Papiere (in Transferpuffer getränkt) luftblasenfrei auf die Plattenanode (Boden der Apparatur) geschichtet. Nach dem Auflegen der Plattenkathode erfolgte 40 min lang der Transfer mit einer Spannung von 15 V.

#### **Antikörper-Färbung**

Nach dem Blotten wurde die Membran 1 h im Blockpuffer geschüttelt und danach 1 h mit dem Anti-Myc-Antikörper (1:5000 in Blockpuffer) inkubiert. Darauf folgten drei Waschschriffe für je 10 min in TBS-T. Danach wurde die Membran mit dem 2. Antikörper (Anti-Maus; 1:3000 in TBS-T) 1 h inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit TBS-T (3X10 min) und abschließend einer mit TBS (10 min). Danach wurde die Membran 1 min im Reaktions-Puffer äquilibriert. Anschließend erfolgte die Detektion mit der Färbelösung. Die Färbereaktion wurde durch das Spülen mit H<sub>2</sub>O und eine anschließende Inkubation mit TE gestoppt.

### **5.5. Zellbiologische Methoden**

#### **5.5.1. Hydrakultur**

*Hydra vulgaris* wurden bei 18°C in Hydramedium gezüchtet. Die Tiere wurden fünfmal die Woche mit frisch geschlüpften Artemia Larven gefüttert (Lenhoff et al., 1970; Bosch et al., 1984).

### **5.5.2. Annexin-V-FITC Färbung dissoziierter Zellen**

Die Analyse apoptotischer Hydra Zellen auf Exposition von Phosphatidylserin erfolgte mit Hilfe des „Annexin-V-FLUOS Staining Kit“. Annexin V ist ein Protein das in Abhängigkeit von  $Ca^{2+}$  mit hoher Affinität Phosphatidylserin bindet (Vermees et al., 1995). Es kann daher als eine sensitive Probe für die Exposition von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Zellmembran und damit zur Detektion apoptotischer Zellen, verwendet werden. Da es auch in nekrotischen Zellen aufgrund des Verlustes der Membranintegrität zur Exposition von Phosphatidylserin kommt, müssen diese von apoptotischen Zellen unterschieden werden. Dies geschieht durch Cofärbung mit Propidium Iodid, welches nur die DNA nekrotischer Zellen färbt.

Als erstes wurden je 10 Hydren zur Induktion von Apoptose 4 h in Hydramedium mit 0,4% Colchizin behandelt. Danach wurden die Tiere dreimal sorgfältig in Dissoziationsmedium gewaschen und in 200  $\mu$ l Dissoziationsmedium mit Pronase in Einzelzellen dissoziiert. Die Zellen wurden mit 200g pelletiert und zweimal mit Dissoziationsmedium gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 50  $\mu$ l Färbelösung (48  $\mu$ l Inkubationspuffer mit 1 $\mu$ l Annexin-V-FLUOS und 1 $\mu$ l Propidium Iodid) resuspendiert und im Dunklen 20 min bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des konfokalen Laser Mikroskop.

### **5.5.3. Konfokale Mikroskopie**

Die Färbung GFP-transformierter Tiere mit FM4-64, MitoTracker Red580, SYTO15 und TO-PRO3 und die anschließende Aufnahme von Einzelzellen im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop erfolgte wie in Cikala et al. 2004 beschrieben.

### **5.5.4. Transformation von DNA in *Hydra***

Für die Transformation von Plasmid DNA in *Hydra* wurden zwei Methoden neu etabliert:

#### **Ballistische Transformation**

Bei der Ballistischen Transformation kamen entweder die Helios GeneGun der Firma Bio-Rad oder eine, am Botanischen Institut der LMU gebaute, Partikel-Kanone (Wetterauer et al. 2000) zum Einsatz. Die genauen Bedingungen sind der, im Rahmen dieser Doktorarbeit entstandenen, Publikation Böttger et al. 2002 zu entnehmen.

### Mikroelektroporation

Die von Tsuyoshi Momose verbesserte Mikroelektroporationsmethode (Momose et al., 1999) wurde für die Anwendung in *Hydra* modifiziert. Je ein einzelnes, knospenloses Tier wurde auf eine Petrischale gelegt. Das gesamte Hydramedium wurde abgenommen und das Tier in einem 25 µl großen Tropfen DNA-Lösung (2 mg/ml DNA in TE) eingeschlossen. Dann wurden die zwei, je 1,5 cm langen Elektroden (Anode: Silberdraht, 100 µm Durchmesser; Kathode: Wolframdraht, 50 µm Durchmesser) manuell parallel der Längsachse an das Tier angelegt. Es wurden 5 Rechteckspulse mit einer Amplitude von 75 V und einer Dauer von 50 ms in einem Abstand von je 1 s appliziert. Dabei wurde darauf geachtet mit den Elektroden die Tiere nicht zu berühren.

Die Spannungspulse wurden an einem Oszilloskop kontrolliert. Nach der Mikroelektroporation wurden die Tier wieder in Hydramedium gelegt und nach 48 h ausgewertet.

## 5.6. Phylogenetische Rekonstruktion

Für die Berechnung eines Stammbaums der Caspasen wurden zunächst mittels Pubmed und NCBI-Blast Caspasesequenzen aus verschiedenen Organismen gesammelt. Für die Phylogenetische Analyse wurden die Sequenzen von 58 Caspasen benützt. Dazu kamen die Sequenzen von 5 Paracaspasen und einer Metacaspase. Die „accession numbers“ der Sequenzen lauten:

1. Metacaspase: NP014840 [*Saccharomyces cerevisiae*].
2. Paracaspase: XP225927 [*Rattus norvegicus*], AAG38589 [*Homo sapiens*], AAG38590 [*Danio rerio*], AAG38592 [*Dictyostelium discoideum*], NP495424 [*Caenorhabditis elegans*].
3. Caspase-1: L28095 [*Mus musculus*], X65019 [*Homo sapiens*], AAC69917 [*Gallus gallus*], D89783 [XICE-a, *Xenopus laevis*], D89785 [XICE-b, *Xenopus laevis*].
4. Caspase-2: Y13085 [*Mus musculus*], U13021 [*Homo sapiens*], Q98943 [*Gallus gallus*], AB038168 [*Xenopus laevis*].
5. Caspase-3: AF412335 [*Branchiostoma floridae*], Y13086 [*Mus musculus*], U13737 [*Homo sapiens*], AF083029 [*Gallus gallus*], D89784 [*Xenopus laevis*], NP571952 [*Danio rerio*].
6. Caspase-4: Z48810 [*Homo sapiens*], NP788811 [*Bos taurus*].

7. Caspase-5: X94993 [*Homo sapiens*],
8. Caspase-6: Y13087 [*Mus musculus*], U20536 [*Homo sapiens*], AF082329 [*Gallus gallus*], AB038169 [*Xenopus laevis*], AAN45850 [*Branchiostoma floridae*],
9. Caspase-7: Y13088 [*Mus musculus*], U47332 [*Mesocricetus auratus*], U37448 [*Homo sapiens*], AB038170 [*Xenopus laevis*].
10. Caspase-8: AF067841 [*Mus musculus*], AF102146 [*Homo sapiens*], AAL23700 [*Gallus gallus*], BAA94749 [*Xenopus laevis*], NP571585 [*Danio rerio*].
11. Caspase-9: NP056548 [*Mus musculus*], U60521 [*Homo sapiens*], AAL23701 [*Gallus gallus*], BAA94750 [*Xenopus laevis*].
12. Caspase-10: U60519 [*Homo sapiens*], BAA94751 [*Xenopus laevis*].
13. Caspase-11: Y13089 [*Mus musculus*], AAK38735 [*Rattus norvegicus*].
14. Caspase-12: Y13090 [*Mus musculus*], AAL26897 [*Rattus norvegicus*].
15. Caspase-14: AJ007750 [*Mus musculus*], AF097874 [*Homo sapiens*].
16. Porifera-Caspasen: CAC83013 [*Geodia cydonium*]
17. Arthropoda-Caspasen: CAB53565 [DRONC, *Drosophila melanogaster*], Y12261 [drICE, *Drosophila melanogaster*], AAC33117 [DREDD, *Drosophila melanogaster*], AAF78092 [DREAM, *Drosophila melanogaster*], AAD54071 [DECAY, *Drosophila melanogaster*], AAB58237 [dcp1, *Drosophila melanogaster*], AAF82437 [DAMM, *Drosophila melanogaster*].
18. Nematoda-Caspasen: P42573 [CED3 *Caenorhabditis elegans*], NP741055 [csp1-, *Caenorhabditis elegans*], NP741419 [csp2-*Caenorhabditis elegans*].

Zunächst wurde mit dem Programm CLUSTALX ein multiples „Alignment“ der 64 Sequenzen berechnet. Dieses Alignment wurde in dem Format „Nexus“ abgespeichert und so in das Programm Seqpub importiert. Hier wurden alle Positionen in dem „Alignment“ deletiert, die in mindestens einer Sequenz eine Lücke enthielten. Das so bearbeitete Alignment wurde in das Format „Phylip“ konvertiert. Mit diesem Alignment wurde durch das Programm TREE-PUZZLE 5.0 in einem ersten Schritt ein quartet-puzzling Baum berechnet. Die eingestellten Parameter lauten:

Type of analysis?	Tree reconstruction
Tree search procedure?	Quartet puzzling
Approximate quartet likelihood?	Yes
List unresolved quartets?	No
Number of puzzling steps?	25000
List puzzling step trees?	Unique topologies
Display as outgroup?	Metacaspase

Compute clocklike branch lengths?	No
Parameter estimates?	Approximate (faster)
Parameter estimation uses?	Neighbor-joining tree
SUBSTITUTION PROCESS	
Type of sequence input data?	Auto: Amino acids
Model of substitution?	Auto: VT (Mueller-Vingron 2000)
Amino acid frequencies?	Estimate from data set
RATE HETEROGENEITY	
Model of rate heterogeneity?	Uniform rate

In einem zweiten Schritt wurden die Wahrscheinlichkeiten der einzelnen „puzzling step trees“ für jeden einzelnen Baum berechnet. Die eingestellten Parameter lauten:

Type of analysis?	Tree reconstruction
Tree search procedure?	User defined trees
Compute clocklike branch lengths?	No
Parameter estimates?	Approximate (faster)
Parameter estimation uses?	1st input tree
SUBSTITUTION PROCESS	
Type of sequence input data?	Auto: Amino acids
Model of substitution?	Auto: VT (Mueller-Vingron 2000)
Amino acid frequencies?	Estimate from data set
RATE HETEROGENEITY	
Model of rate heterogeneity?	Gamma distributed rates
Gamma distribution parameter alpha?	Estimate from data set
Number of Gamma rate categories?	8

Aus dem besten Baum, und allen nicht signifikant schlechteren Bäumen, wurde mit dem Programm Consensus der Endgültige Stammbaum berechnet.

## 6. Literaturverzeichnis

Adams JM and Cory S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(6):715-20.

Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N, Lespinet O, Prud'homme B and de Rosa R. The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(9):4453-6.

Ahmad M, Srinivasula SM, Hegde R, Mukattash R, Fernandes-Alnemri T and Alnemri ES. Identification and characterization of murine caspase-14, a new member of the caspase family. *Cancer Res* 1998;58(22):5201-5.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87(2):171.

Ameisen JC. Looking for death at the core of life in the light of evolution. *Cell Death Differ* 2004;11(1):4-10.

Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H and Shacter E. Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* 2003;4(1):87-91. Epub 2002 Nov 25.

Arnoult D, Tatischeff I, Estaquier J, Girard M, Sureau F, Tissier JP, et al. On the evolutionary conservation of the cell death pathway: mitochondrial release of an apoptosis-inducing factor during *Dictyostelium discoideum* cell death. *Mol Biol Cell* 2001;12(10):3016-30.

Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, et al. Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* 2003;4(4):587-98.

Baehrecke EH. How death shapes life during development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(10):779-87.

Balasubramanian K and Schroit AJ. Characterization of phosphatidylserine-dependent beta2-glycoprotein I macrophage interactions. Implications for apoptotic cell clearance by phagocytes. *J Biol Chem* 1998;273(44):29272-7.

Benton WD and Davis RW. Screening lambda<sub>gt</sub> recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 1977;196(4286):180-2.

Berghammer H and Auer B. „Easypreps“: fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *E. coli*. *Biotechniques* 1993;14(4):524, 528.

- Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, et al. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(11):6349-54.
- Bosch TC and David CN. Growth regulation in Hydra: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Dev Biol* 1984;104(1):161-71.
- Bose J, Gruber AD, Helming L, Schiebe S, Wegener I, Hafner M, et al. The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J Biol* 2004;3(4):15. Epub 2004 Aug 23.
- Bottger A, Alexandrova O, Cikala M, Schade M, Herold M and David CN. GFP expression in Hydra: lessons from the particle gun. *Dev Genes Evol* 2002;212(6):302-5.
- Cain K, Bratton SB and Cohen GM. The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 2002;84(2-3):203-14.
- Cande C, Vahsen N, Kouranti I, Schmitt E, Daugas E, Spahr C, et al. AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene* 2004;23(8):1514-21.
- Carson M. Ribbons: Academic Press; 1997.
- Chang HY and Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64(4):821-46.
- Chen JY, Oliveri P, Gao F, Dornbos SQ, Li CW, Bottjer DJ, et al. Precambrian animal life: probable developmental and adult cnidarian forms from Southwest China. *Dev Biol* 2002;248(1):182-96.
- Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M and Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81(4):505-12.
- Cikala M, Wilm B, Hobmayer E, Bottger A and David CN. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan hydra [In Process Citation]. *Curr Biol* 1999;9(17):959-62.
- Cikala M, Alexandrova O, David CN, Proschel M, Stiening B, Cramer P, et al. The phosphatidylserine receptor from Hydra is a nuclear protein with potential Fe(II) dependent oxygenase activity. *BMC Cell Biol* 2004;5(1):26.
- Clissold PM and Ponting CP. JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta. *Trends Biochem Sci* 2001;26(1):7-9.



- Conradt B and Horvitz HR. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 1998;93(4):519-29.
- Cormack BP, Valdivia RH and Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 1996;173(1 Spec No):33-8.
- Cory S and Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2(9):647-56.
- Cui P, Qin B, Liu N, Pan G and Pei D. Nuclear localization of the phosphatidylserine receptor protein via multiple nuclear localization signals. *Exp Cell Res* 2004;293(1):154-63.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J* 2000;14(5):729-39.
- David CN and Campbell RD. Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. I. Epithelial cells. *J Cell Sci* 1972;11(2):557-68.
- Dhein J, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Moller P and Krammer PH. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J Immunol* 1992;149(10):3166-73.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K and Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991;19(14):4008.
- Dorstyn L, Read S, Cakouros D, Huh JR, Hay BA and Kumar S. The role of cytochrome c in caspase activation in *Drosophila melanogaster* cells. *J Cell Biol* 2002;156(6):1089-98. Epub 2002 Mar 18.
- Earnshaw WC, Martins LM and Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
- Eckhart L, Ban J, Fischer H and Tschachler E. Caspase-14: analysis of gene structure and mRNA expression during keratinocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277(3):655-9.
- Ellis HM and Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986;44(6):817-29.
- Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA and Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000;405(6782):85-90.

Feinberg AP and Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983;132(1):6-13.

Fischer H, Koenig U, Eckhart L and Tschachler E. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293(2):722-6.

Frade JM and Michaelidis TM. Origin of eukaryotic programmed cell death: a consequence of aerobic metabolism? *Bioessays* 1997;19(9):827-32.

Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, et al. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 2000;275(30):23065-73.

Gierer A, Berking S, Bode H, David CN, Flick K, Hansmann G, et al. Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nat New Biol* 1972;239(91):98-101.

Gross A, McDonnell JM and Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999;13(15):1899-911.

Gurbuxani S, Schmitt E, Cande C, Parcellier A, Hammann A, Daugas E, et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 2003;22(43):6669-78.

Hanayama R, Tanaka M, Miyasaka K, Aozasa K, Koike M, Uchiyama Y, et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 2004;304(5674):1147-50.

Hausmann G, O'Reilly LA, van Driel R, Beaumont JG, Strasser A, Adams JM, et al. Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol* 2000;149(3):623-34.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):770-6.

Hoeppner DJ, Hengartner MO and Schnabel R. Engulfment genes cooperate with ced-3 to promote cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2001;412(6843):202-6.

Hoffmann PR, deCathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, et al. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* 2001;155(4):649-59. Epub 2001 Nov 12.

Hohlbaum AM, Moe S and Marshak-Rothstein A. Opposing effects of transmembrane and soluble Fas ligand expression on inflammation and tumor cell survival. *J Exp Med* 2000;191(7):1209-20.

Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 1999;59(7 Suppl):1701s-1706s.

Igaki T and Miura M. Role of Bcl-2 family members in invertebrates. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(2-3):73-81.

Jacobson MD, Weil M and Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997;88(3):347-54.

Kanuka H, Sawamoto K, Inohara N, Matsuno K, Okano H and Miura M. Control of the cell death pathway by Dapaf-1, a *Drosophila* Apaf-1/CED-4-related caspase activator. *Mol Cell* 1999;4(5):757-69.

Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.

Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR and Newmeyer DD. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *Embo J* 1997;16(15):4639-49.

Knapp R. München: LMU; Department Biologie II, Diplomarbeit, 2004.

Koenig U, Eckhart L and Tschachler E. Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285(5):1150-4.

Koonin EV and Aravind L. Origin and evolution of eukaryotic apoptosis: the bacterial connection. *Cell Death Differ* 2002;9(4):394-404.

Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH and Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2001;276(23):20633-40. Epub 2001 Mar 5.

Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1995;267(5206):2000-3.

Kumar S and Colussi PA. Prodomains--adaptors--oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 1999;24(1):1-4.

Kunisaki Y, Masuko S, Noda M, Inayoshi A, Sanui T, Harada M, et al. Defective fetal liver erythropoiesis and T lymphopoiesis in mice lacking the phosphatidylserine receptor. *Blood* 2004;103(9):3362-4. Epub 2004 Jan 8.

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680-5.
- Lassus P, Opitz-Araya X and Lazebnik Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 2002;297(5585):1352-4.
- Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M and Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004;14(3):277-87.
- Lavrik I, Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Weyd H, Krammer PH, et al. The active caspase-8 heterotetramer is formed at the CD95 DISC. *Cell Death Differ* 2003;10(1):144-5.
- Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 2003;25(9):888-96.
- Lee C, Kim SJ, Jeong DG, Lee SM and Ryu SE. Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J Biol Chem* 2003;278(9):7558-63. Epub 2002 Dec 12.
- Lenhoff HM and Brown RD. Mass culture of hydra: an improved method and its application to other aquatic invertebrates. *Lab Anim* 1970;4(1):139-54.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91(4):479-89.
- Li H, Zhu H, Xu CJ and Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94(4):491-501.
- Li MO, Sarkisian MR, Mehal WZ, Rakic P and Flavell RA. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* 2003;302(5650):1560-3.
- Lin Y, Devin A, Rodriguez Y and Liu ZG. Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes Dev* 1999;13(19):2514-26.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R and Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86(1):147-57.
- Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen AL, et al. Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *Faseb J* 2001;15(3):758-67.
- Lohmann J. München: LMU; Zoologisches Institut, Dissertation, 1999.

- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J and Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 1999;6(6):516-24.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998;94(4):481-90.
- Margolin N, Raybuck SA, Wilson KP, Chen W, Fox T, Gu Y, et al. Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzyme and related caspases. *J Biol Chem* 1997;272(11):7223-8.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182(5):1545-56.
- Martin SJ and Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 1995;82(3):349-52.
- Mate MJ, Ortiz-Lombardia M, Boitel B, Haouz A, Tello D, Susin SA, et al. The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol* 2002;9(6):442-6.
- Miramar MD, Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM, Haouzi D, Brothers G, et al. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* 2001;276(19):16391-8. Epub 2001 Feb 13.
- Momose T, Tonegawa A, Takeuchi J, Ogawa H, Umesono K and Yasuda K. Efficient targeting of gene expression in chick embryos by microelectroporation. *Dev Growth Differ* 1999;41(3):335-44.
- Mullis KB and Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
- Nakano T, Ishimoto Y, Kishino J, Umeda M, Inoue K, Nagata K, et al. Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 1997;272(47):29411-4.
- Pistritto G, Jost M, Srinivasula SM, Baffa R, Poyet JL, Kari C, et al. Expression and transcriptional regulation of caspase-14 in simple and complex epithelia. *Cell Death Differ* 2002;9(9):995-1006.
- Popp T. München: LMU;Department Biologie II, Diplomarbeit, 2004.

Pröschel M. München: LMU; Department Biologie II, Diplomarbeit 2003.

Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM and Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 1999;3(3):287-96.

Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, et al. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 2001;293(5536):1829-32.

Raff M. Cell suicide for beginners. *Nature* 1998;396(6707):119-22.

Ramage P, Cheneval D, Chvei M, Graff P, Hemmig R, Heng R, et al. Expression, refolding, and autocatalytic proteolytic processing of the interleukin-1 beta-converting enzyme precursor. *J Biol Chem* 1995;270(16):9378-83.

Raz E, van Luenen HG, Schaerringer B, Plasterk RH and Driever W. Transposition of the nematode *Caenorhabditis elegans* Tc3 element in the zebrafish *Danio rerio*. *Curr Biol* 1998;8(2):82-8.

Read SH, Baliga BC, Ekert PG, Vaux DL and Kumar S. A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J Cell Biol* 2002;159(5):739-45. Epub 2002 Dec 2.

Reddien PW, Cameron S and Horvitz HR. Phagocytosis promotes programmed cell death in *C. elegans*. *Nature* 2001;412(6843):198-202.

Renner M. In Kückenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum. Stuttgart: Fischer Verlag; 1984.

Rodriguez A, Oliver H, Zou H, Chen P, Wang X and Abrams JM. Dark is a *Drosophila* homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway. *Nat Cell Biol* 1999;1(5):272-9.

Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, et al. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 1996;3(7):619-25.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G and Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 2004;23(16):2861-74.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology* 1992;24:476-80.

- Salvesen GS and Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(20):10964-7.
- Salvesen GS and Abrams JM. Caspase activation - stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene* 2004;23(16):2774-84.
- Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.
- Sartorius U, Schmitz I and Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem* 2001;2(1):20-9.
- Schmidt N. München: LMU; Department Biologie II, Dissertation, 2003.
- Shaham S. Identification of multiple *Caenorhabditis elegans* caspases and their potential roles in proteolytic cascades. *J Biol Chem* 1998;273(52):35109-17.
- Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9(3):459-70.
- Shi Y. Apoptosome: the cellular engine for the activation of caspase-9. *Structure (Camb)* 2002;10(3):285-8.
- Shimomura O, Johnson FH and Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 1962;59:223-39.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999;144(2):281-92.
- Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA and Walczak H. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J* 2002;21(17):4520-30.
- Stennicke HR and Salvesen GS. Catalytic properties of the caspases. *Cell Death Differ* 1999;6(11):1054-9.
- Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM and Salvesen GS. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 1999;274(13):8359-62.
- Sulston JE and Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 1977;56(1):110-56.



Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397(6718):441-6.

Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* 2000;192(4):571-80.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992;356(6372):768-74.

Van de Craen M, Vandenabeele P, Declercq W, Van den Brande I, Van Loo G, Molemans F, et al. Characterization of seven murine caspase family members. *FEBS Lett* 1997;403(1):61-9.

Van de Craen M, Van Loo G, Pype S, Van Criekinge W, Van den brande I, Molemans F, et al. Identification of a new caspase homologue: caspase-14. *Cell Death Differ* 1998;5(10):838-46.

Varkey J, Chen P, Jemmerson R and Abrams JM. Altered cytochrome c display precedes apoptotic cell death in *Drosophila*. *J Cell Biol* 1999;144(4):701-10.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184(1):39-51.

Wang DY, Kumar S and Hedges SB. Divergence time estimates for the early history of animal phyla and the origin of plants, animals and fungi. *Proc Biol Sci* 1999;266(1415):163-71.

Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM and Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(24):13884-8.

Wang Y and Gu X. Functional divergence in the caspase gene family and altered functional constraints: statistical analysis and prediction. *Genetics* 2001;158(3):1311-20.

Wang X, Yang C, Chai J, Shi Y and Xue D. Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2002;298(5598):1587-92.

Wang X, Wu YC, Fadok VA, Lee MC, Gengyo-Ando K, Cheng LC, et al. Cell corpse engulfment mediated by *C. elegans* phosphatidylserine receptor through CED-5 and CED-12. *Science* 2003;302(5650):1563-6.

Wetterauer B, Salger K, Demel P and Koop H. Efficient transformation of *Dictyostelium discoideum* with a particle inflow gun. *Biochim Biophys Acta* 2000;1499(1-2):139-143.



- Wiens M, Krasko A, Perovic S and Muller WE. Caspase-mediated apoptosis in sponges: cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from Metazoa. *Biochim Biophys Acta* 2003;1593(2-3):179-89.
- Williams RB, Cornelius, P.F.S., Hughes, R.G., and Robson, E.A. *Coelenterate biology: recent research on Cnidaria and Ctenophora*. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 1991.
- Xue D, Shaham S and Horvitz HR. The *Caenorhabditis elegans* cell-death protein CED-3 is a cysteine protease with substrate specificities similar to those of the human CPP32 protease. *Genes Dev* 1996;10(9):1073-83.
- Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, et al. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 2002;9(9):680-4.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM and Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993;75(4):641-52.
- Zamzami N and Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(1):67-71.
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J and Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 1996;87(4):619-28.
- Zimmermann KC, Ricci JE, Droin NM and Green DR. The role of ARK in stress-induced apoptosis in *Drosophila* cells. *J Cell Biol* 2002;156(6):1077-87. Epub 2002 Mar 18.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A and Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90(3):405-13.
- Zou H, Yang R, Hao J, Wang J, Sun C, Fesik SW, et al. Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J Biol Chem* 2003;278(10):8091-8. Epub 2002 Dec 27.
- Zullig S and Hengartner MO. Cell biology. Tickling macrophages, a serious business. *Science* 2004;304(5674):1123-4.
- Zwaal RF and Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997;89(4):1121-32.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Charles David bedanken. Er hat mich für Hydra und die Zellbiologie begeistert. Jederzeit konnte man mit Fragen oder neuen Ideen zu ihm kommen. Die Arbeit in seiner Gruppe war ein großer Gewinn für mich.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Angelika Böttger. Mit ihr zusammen konnte man immer neue Versuche oder auch alte Probleme besprechen. Es war sehr schön mit dir zusammengearbeitet zu haben!

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Olga Alexandrova für ihre Hilfe am Konfokalen Mikroskop bedanken!

Für die Überlassung des Spannungsgenerators und des Oszilloskops schulde ich Herrn Prof. Roth meinen Dank. Herrn Prof. Koop möchte ich für die Überlassung der Partikelkanone danken.

Gaby Kumpfmüller hat mir den Einstieg in das Labor sehr erleichtert. Tatjana Freudenreich war eine Quelle neuer Methoden und Ideen. Dafür möchte ich mich bei euch beiden bedanken.

Für fachliche Unterstützung möchte ich mich auch bei den anderen Arbeitsgruppen und besonders bei Dr. Birgit Wetterauer und Prof. Harry McWilliams bedanken.

Herrn Dr. Korbinian Strimmer danke ich für die Einführung in die Kunst der Stammbaumberechnung. Mit Alexandra Kolbinger habe ich Freud und Leid im Isotopenlabor geteilt. Danke für alles!

Ich möchte mich auch bei all meinen Kollegen für das tolle Arbeitsklima bedanken, insbesondere bei Bea, Barbara, Tina und Micha. Mein Dank gilt aber auch Despina, Karin, Susanne, Nikola, Robert, Gerd, Marsha, Matthias, Bettina, Tanja, Christian, Dominik, Axel, Alex und allen anderen. Ein solcher, freundschaftlicher Zusammenhalt auch außerhalb des Labors ist etwas ganz Besonderes!

Auch den Nicht-Biologen Flo, Isabelle und Stefan danke für ihre Hilfe!

Von ganzem Herzen möchte ich Regina für ihre Unterstützung und Geduld, für Korrekturlesen, Zucchini mit Garnelen und vieles andere danken!

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Ihrer Unterstützung verdanke ich unendlich viel!

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Mihai Andrei Cikala  
Geburtsdatum: 3.6.1971  
Geburtsort: München

### Schulbildung:

1977-1981 Grundschole in München  
1981-1990 Heinrich-Heine-Gymnasium München  
(Abitur mit Gesamtnote 1,7)

1990-1991 Wehrdienst

### Studium:

11/1991-4/1997 Studium der Biologie,  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Hauptfach: Genetik;  
Nebenfächer: Humangenetik, Zoologie und Biochemie;  
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. H. Wiczorek:  
"Analyse V-ATPase codierender Gene von *Manduca sexta*"  
Diplomgesamtnote: 1,3

### Promotion:

12/1997 – 8/2005 Promotion am Department Biologie II,  
Abteilung für Zell- und Entwicklungsbologie,  
Prof. Charles N. David:  
Ludwig-Maximilians-Universität, München

## **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

Mihai Andrei Cikala