
Zusammenfassung	I
1.0 Einleitung	
1.1 Neue Wirkstoffe aus dem Meer	1
1.2 „Seehasen“ als Wirkstoffquelle	3
1.3 Aplysianine, Julianine und andere bioaktive Glykoproteine	6
1.4 Die Wege einer Zelle in den Tod	8
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit	12
2.0 Material und Methoden	
2.1 Probengewinnung	13
2.2 Bakterien und Agar-Diffusionstest	13
2.2.1 Bakterienkultur	13
2.2.2 Agar-Diffusionstest mit E. coli	13
2.3 Zellkultur und Toxizitätsassays	14
2.3.1 Zellkultur und spezielle Medien	14
2.3.2 Behandlung der Zellen	14
2.3.3 Mikroskopie und Trypanblau-Test	15
2.3.4 Propidiumiodidfärbung und Durchflusszytometrie	15
2.3.5 TUNEL-Assay nach DNA-Strangbrüchen	15
2.3.6 Laddering-Assay nach DNA-Fragmentierung	15
2.3.7 Proteomanalyse	17
2.3.8 WST-1-Assay nach Zellvitalität	17
2.3.9 Chemilumineszenz-Assay nach zellulärer ROS-Produktion	17
2.4 Assays nach enzymatischer Aktivität	18
2.4.1 HRP/ABTS-Assay	18
2.4.2 MBTH-Assay	20
2.5 Proteinbiochemische Methoden	22
2.5.1 Isolierung des zytolytischen Proteins aus der nativen Tinte	22
2.5.2 SDS-PAGE und Silberfärbung	23
2.5.3 Westernblot	23
2.5.4 Nachweis der Glykosilierung	24
2.5.5 Periodatoxidation	26
2.5.6 Saure Ammoniumsulfatfällung zur Ablösung des Flavin-Kofaktors	27

2.5.7	Quantitative Proteinbestimmung	27
2.5.8	Reaktivierung des ApoEnzyms mit Kofaktor	28
2.5.9	Behandlung mit proteolytischen Enzymen, Hitze, Säure und Urea	28
2.5.10	Sequenzierung	29
2.6	Klonierung und heterologe Expression der cDNA von APIT	29
2.6.1	RNA-Präparation und Reverse Transkription	30
2.6.2	PCR	30
2.6.3	DiTriSEC	30
2.6.4	5'-RACE	31
2.6.5	heterologe Expression in 293T-Zellen	31
2.7	Materialien und Geräte	34
3.0	Ergebnisse	
3.1	Die Probengewinnung	37
3.2	Eine erste Feststellung der Aktivität	38
3.2.1	Ist eine antibakterielle Wirkung vorhanden?	38
3.2.2	Findet sich auch eine zytolytische Aktivität?	39
3.3	Die Entschlüsselung des zytolytischen Prinzips	41
3.3.1	Eine charakteristische Morphologie	41
3.3.2	Die Integrität von Plasmamembran und Chromatin	42
3.3.3	Auch die Stoffwechselaktivität ist früh betroffen	45
3.3.4	Ein wichtiger Hinweis kommt vom zellulären Proteom	46
3.3.5	Ein Schlüsselmolekül des Tinten-induzierten Zelltodes?	47
3.3.6	Der erste Nachweisversuch scheitert	49
3.3.7	Ein anderer Assay bringt den Erfolg - und ein unerwartetes Ergebnis	51
3.3.8	Die Suche nach dem Substrat von APIT	55
3.3.9	Eine letzte Bestätigung	59
3.4	Isolierung und proteinbiochemische Charakterisierung	62
3.4.1	Die Isolierung des zytotoxischen Bestandteils	62
3.4.2	Sind Zuckerseitenketten beteiligt?	64
3.4.3	Der Kofaktor Flavin	66
3.4.4	„Schwer verdaulich“	68
3.4.5	Stabilität und Sensitivität	70

3.5	Klonierung und Reproduktion von APIT	73
3.5.1	Vom Peptid zum Primer	73
3.5.2	„most wanted“ – ein Steckbrief der genetischen Information	75
3.5.3	Die cDNA stammt aus dem Mantelgewebe	75
3.5.4	Eine Sequenzanalyse bestätigt die zytologischen und biochemischen Befunde	78
4.0	Diskussion	
4.1	Molekularbiologische und biochemische Aspekte	86
4.1.1	Eine kurze Einordnung von APIT in das System der LAAOs	86
4.1.2	Aktivität nach Proteolyse	89
4.1.3	Duplikation und Divergenz	90
4.2	Der Tinten-induzierte Zelltod und sein Mediator	92
4.2.1	Vier Pfade der Zellschädigung: was ist zu erwarten?	92
4.2.2	Der Tinten-induzierte Zelltod: Apoptose oder Nekrose?	94
4.2.3	Das orthodoxe Modell einer dosisabhängigen Steigerung von Zellschädigungen läßt sich nicht anwenden	96
4.2.4	Findet eine zweite Form der Interaktion statt?	98
4.3	Die biologische Funktion von APIT	100
5.0	Literaturverzeichnis	103
6.0	Abkürzungsverzeichnis	110
7.0	Danksagung	112
8.0	Lebenslauf	113