

### 3.0 Ergebnisse

Zunächst eine einleitende Bemerkung: Die proteinbiochemischen, zell- und molekularbiologischen Arbeiten, die zu den folgenden Ergebnissen führten, wurden parallel durchgeführt. Der besseren Übersichtlichkeit wegen sind sie in dieser Schrift aber nacheinander beschrieben.

Die Isolierung des zytolytischen APIT aus der nativen Tinte war einer der ersten Schritte. Dabei zeigte sich bereits, dass es neben dem Glykoprotein keinen weiteren Bestandteil mit zytolytischer Aktivität in der nativen Tinte gibt. In allen Experimenten wurde daher entweder die native Tinte oder aufgereinigtes APIT eingesetzt, je nach den Bedürfnissen der angewandten Technik. So wurde in den chromogenen und luminogenen Assays immer mit aufgereinigtem Glykoprotein gearbeitet, um den störenden Einfluss des in der Tinte enthaltenen Farbstoffs auszuschalten. Im folgenden wird bei jedem Ergebnis die Präparation genannt, mit der gearbeitet wurde.

#### 3.1 Die Probengewinnung

Im Frühjahr/Sommer der Jahre 2001 und 2002 wurde native Tinte von Tieren der Art *Aplysia punctata* in Roscoff, Bretagne gewonnen. Dabei zeigte sich, dass unter den verschiedenen Methoden, mit denen die Tiere zur Abgabe der Sekretion bewegt werden können (Reizstrom, „Melken“ durch vorsichtiges Klopfen auf den Mantel usw.), ein kurzes „Beklatschen“ der lateralen Regionen am adäquatesten ist. Dieser Stimulus ist ausreichend überschwellig, um innerhalb von Sekunden den Ausstoß einer großen Menge Tinte zu erzielen; trotzdem wird das Tier in keiner Weise geschädigt. In der Literatur wird beschrieben, dass nur jeweils rund ein Drittel der verfügbaren, in der Manteldrüse gespeicherten Tinte zur Verteidigung eingesetzt wird. Tatsächlich war es möglich, Tiere an aufeinander folgenden Tagen mehrmals erfolgreich zu stimulieren. Die Menge der abgegebenen Tinte war erstaunlicherweise umgekehrt proportional zur Größe der Tiere: kleine Tiere zeigten sich deutlich ergiebiger als größere Individuen. Möglicherweise ersetzt die zunehmende Größe adulter Tiere und die damit einhergehende Einschränkung des potentiellen Prädatorenkreises andere Verteidigungsstrategien wie eine Tintensekretion, die bei kleineren Individuen dominiert (Johnson, 1999). Parallel mit der Tinte wurde in unterschiedlichem Ausmaß auch Schleim abgegeben. Auch der in Berichten über das Abwehrverhalten der Tiere oft erwähnte „üble“ Geruch, konnte während der Tintenabnahme in ausgeprägter Weise wahrgenommen werden.



*Abb. 3.1-1 zeigt Aufnahmen von der vorübergehenden Haltung der Tiere in Meerwasserbecken der „Station Biologique de Roscoff“.*

## 3.2 Eine erste Feststellung der Aktivität

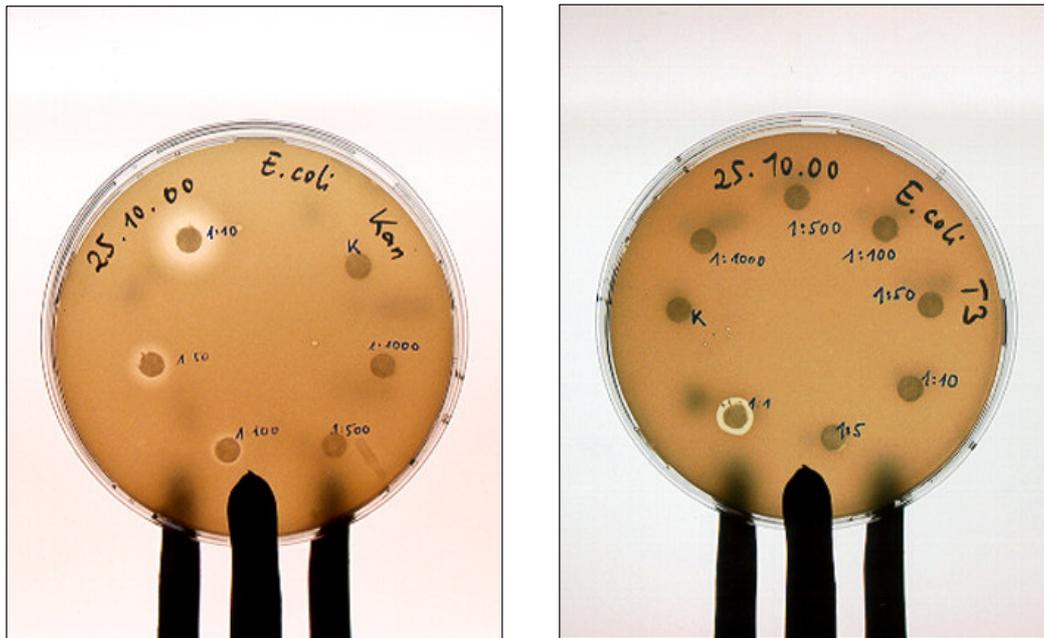
In ersten Experimenten mit der nativen Tinte von *A. punctata* sollte zunächst einmal geklärt werden, ob und in welcher Konzentration eine toxische Aktivität nachweisbar ist.

### 3.2.1 Ist eine antibakterielle Wirkung vorhanden?

Für die meisten der bislang untersuchten zytotoxischen Glykoproteine von Aplysien (Aplysianine, Julianine und Dolabellanine) wurde eine antimikrobielle Aktivität sowohl gegen grampositive als auch gegen gramnegative Bakterien beschrieben. Diese liegt in einer Inhibition der DNA-Synthese und wirkt daher eher bakteriostatisch als bakteriozid (Yamazaki, 1993). Nur Dolabellanin P, ein Bestandteil der *D. auricularia* eigenen Tinte, zeigt keine antibiotische Wirkung.

In einem einfachen Assay, dem Agar-Diffusionstest, wurde die antimikrobielle Wirkung der nativen Tinte von *Aplysia punctata* untersucht (Abbildung 3.2.1-1). Dazu wurde diese in verschiedenen Verdünnungen auf Filterpapier-Scheibchen aufgetragen und auf mit *E.coli* infizierten Nährböden aufgelegt. Bei antibiotischen Eigenschaften weist der nach Inkubation entstandene Bakterienrasen freie „Höfe“ im Bereich der Filterpapiere auf. Zur Kontrolle wurden *E.coli* mit einem konzentrierten Antibiotikum (Kanamycin, 50 – 5.000 µg/ml) entsprechend behandelt.

Die Wirkung des gebräuchlichen Antibiotikums Kanamycin läßt sich mit diesem Assay bis zu einer Konzentration von 500 µg/ml nachweisen, dem Zehnfachen der üblicherweise eingesetzten Konzentration. Native Tinte ruft bei unverdünnter Anwendung ebenfalls einen deutlichen Hof im Zellrasen hervor, bei fünffacher Verdünnung ist ein Effekt gerade noch erkennbar. Das Tinte von *Aplysia punctata* hat also ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften.

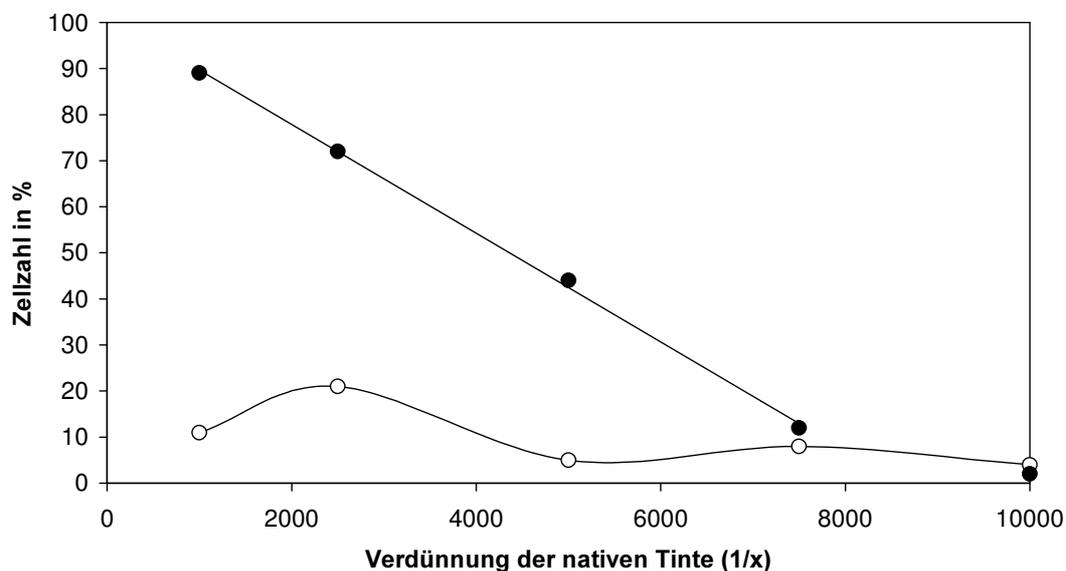


**Abb. 3.2.1-1** zeigt einen **Agardiffusionstest mit *E.coli***. a) **Positivkontrolle mit Kanamycin** (1:10 = 5 mg/ml, 1:1000 = 50 µg/ml), b) **Verschiedene Verdünnungen von nativer Tinte**. „K“ kennzeichnet die jeweilige **Negativkontrolle mit PBS**. **Durchsichtige Bereiche im Bakterienrasen kennzeichnen die induzierten Hemmhöfe**.

### 3.2.2 Findet sich auch eine zytolytische Aktivität?

Im Zentrum dieser Arbeit sollten die zytotoxischen Eigenschaften von APIT stehen. Deshalb sollten im folgenden humane Tumor-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von nativer Tinte behandelt werden. Jurkat-T-Lymphozyten sind einfach zu handhabende humane Suspensionszellen, die in unserem Labor bereits gut charakterisiert sind, beispielsweise hinsichtlich ihres Proteoms. Sie boten sich deshalb als erstes Zellsystem für eine Validierung des toxischen Effektes an.

Jurkat-T-Lymphozyten wurden 15 Stunden mit nativer Tinte in verschiedenen Verdünnungen inkubiert und die Lethalität anschließend durch eine klassische Anfärbung mit Trypanblau bestimmt. Dieser Farbstoff kann nur in tote Zellen eindringen, deren Plasmamembran keine Barriere mehr darstellt. Die Abbildung 3.2.2-1 zeigt die so erhaltene Dosis/Wirkungs-Kurve. Die LD<sub>50</sub>, also diejenige Konzentration, bei welcher 50% der Zellen gestorben sind, ist bei der konzentriertesten Tintenprobe (0,3 mg Gesamtprotein/ml) bei einer Verdünnung von 1:4350 erreicht. Das entspricht einer Gesamtproteinkonzentration von 70 ng/ml Medium. Die Werte der Trypanblauanfärbbarkeit tintenbehandelter Zellen ergeben eine Gerade, der Kontrollwert un behandelter Zellen (2%) ist etwa bei einer Tintenverdünnung von 1:8500 erreicht. Rein rechnerisch wäre eine LD<sub>100</sub> bei einer Tintenverdünnung von 1:120 gegeben. Wertet man Lethalität jedoch nicht nur über den Parameter Trypanblauanfärbbarkeit, sondern zusätzlich über die Morphologie der Zellen aus (siehe 3.3.1), so ist eine LD<sub>100</sub> bereits bei einer Verdünnung von 1:1000 erreicht. Bei einer Verdünnung von 1:2500 gesellen sich zu den rund 70% anfärbbaren Zellen noch etwa 20%, deren Morphologie sie als tot klassifizieren lässt. Erst im Bereich der LD<sub>50</sub> decken sich anfärbbare und morphologisch tote Zellen.

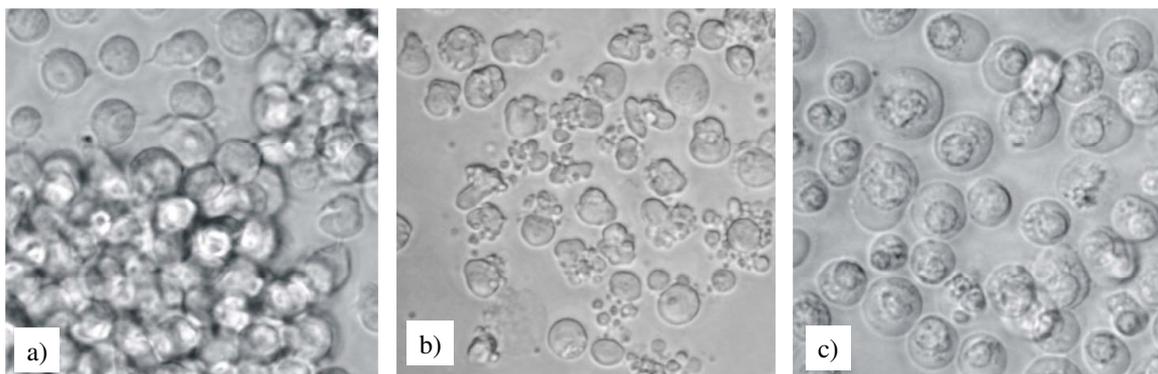


**Abb.3.2.2-1** zeigt das **Ergebnis einer Trypanblaufärbung von Jurkat-T-Lymphozyten**, die 15 Stunden mit unterschiedlichen Verdünnungen von nativer Tinte (300 µg Gesamtprotein/ml) inkubiert wurden (●). Die zweite Kurve (○) gibt den Anteil der Zellen wieder, die weder anfärbbar sind noch eine vitale Morphologie aufweisen.

### 3.3 Die Entschlüsselung des zytolytischen Prinzips

#### 3.3.1 Eine charakteristische Morphologie

Erste Anzeichen eines Effekts auf die Zell-Morphologie stellen sich nach wenigen Stunden ein: Die intrazellulären Bewegungen von Cytoplasma und Organellen scheinen eingefroren, eine intensive Bildung von Vakuolen lässt das Zytoplasma immer granulärer erscheinen. Die Neigung von Jurkat-T-Zellen, Kolonien zu formen, nimmt ab, bis schließlich vereinzelt liegende Zellen das mikroskopische Bild bestimmen. Nach ca. sechs bis acht Stunden tritt dann das charakteristischste Kennzeichen des Tinten-induzierten Zelltodes hervor: eine klare Abgrenzung des Zellkernes gegenüber dem durchsichtig scheinenden Zytoplasma (Abb. 3.3.1-1). Eine Zellkernschrumpfung, wie sie scheinbar abläuft, ließ sich im Zellanalysegerät (CASY Counter, nicht gezeigt) nicht bestätigen. Deutlich verlieren die Zellen jedoch ihre klare, abgerundete Silhouette und Form.



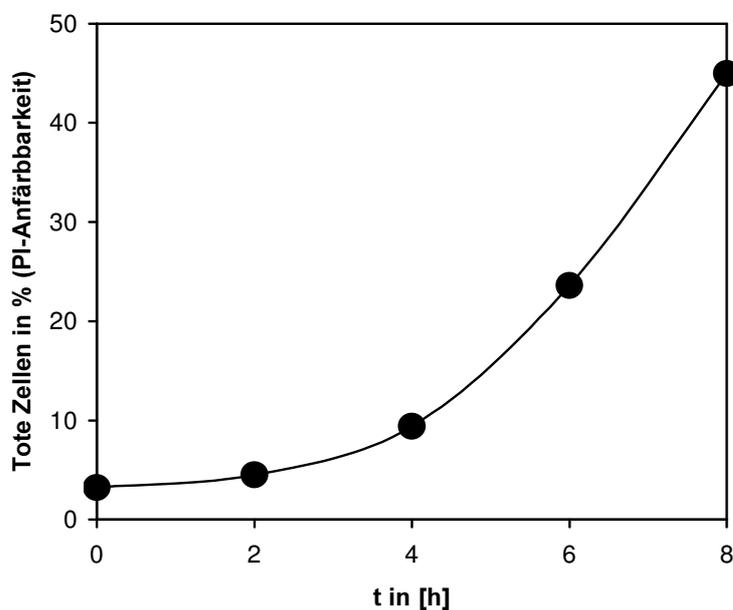
**Abb. 3.3.1-1** zeigt einen **mikroskopischen Vergleich** (nach sieben Stunden Inkubation) von **verschiedenen Arten des Zelltodes**. a) Kontroll-Zellen, b) apoptotisch sterbende Zellen (induziert mit Doxorubicin, 10  $\mu\text{g/ml}$ ) c) Tinten-induziert sterbende Zellen (induziert mit dem aufgereinigten APIT, 30  $\text{ng/ml}$ ).

Vergleicht man die beschriebenen Merkmale mit denen von apoptotisch sterbenden Jurkat-T-Zellen (Abb. 3.3.1-1), werden die Unterschiede zu dieser Form des Zelltodes deutlich. Nach Inkubation mit 10  $\mu\text{g}$  Doxorubicin (Dox) pro ml Zellkulturmedium zeigen jene die klassischen Merkmale der Apoptose: Zellschrumpfung und Fragmentierung der Zellkerne und Zellen in „apoptotische Körperchen“. Doxorubicin induziert Apoptose über eine Inhibition der DNA Topoisomerase II. Im allgemeinen erfasst der programmierte Zelltod eine

Zellpopulation nie vollständig, der Tinten-induzierte Zelltod dagegen zeigt einen umfassenden Effekt von nahezu 100%.

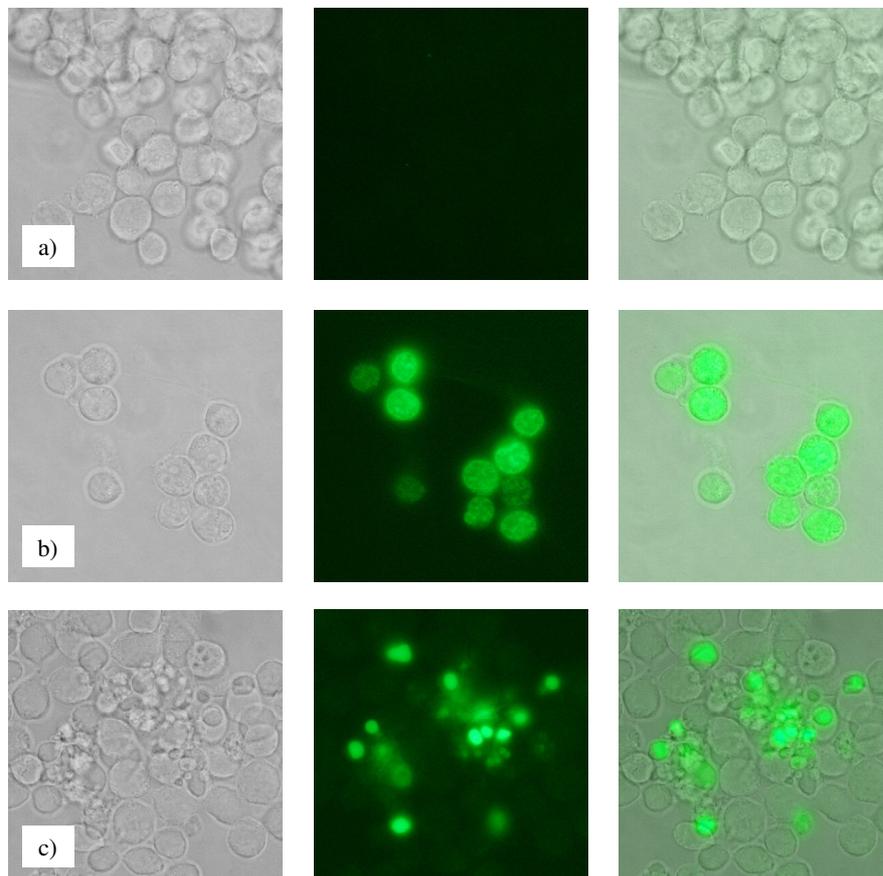
### 3.3.2 Die Integrität von Plasmamembran und Chromatin

Um den Tod der Zellen auf einfache Weise quantitativ feststellen zu können, wurden Jurkat-T-Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit nativer Tinte mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt. Auch dieser ist nicht membrangängig, das heißt, lebende Zellen werden nicht angefärbt, sondern nur jene, die die Integrität ihrer Plasmamembran verloren haben. Das Ausmaß des Zelltodes wurde anschließend quantitativ in einem Durchflusszytometer bestimmt. Abbildung 3.3.2-1 zeigt exemplarisch die Steigerung von Zelltod während der permanenten Inkubation mit nativer Tinte. Liegt der Anteil der toten Zellen nach zwei Stunden (~ 5%) nur wenig über dem der Kontrolle (~ 3%), nimmt er nach vier Stunden rapide zu (~ 9% nach vier Stunden, ~ 24% nach sechs Stunden und ~ 45% nach acht Stunden). Nach zehn Stunden Inkubation ließen sich im allgemeinen etwa 90% der Jurkat-T-Zellen mit PI anfärben (nicht gezeigt).



**Abb. 3.3.2-1** zeigt das *Ergebnis einer durchflusszytometrischen Analyse der PI-Färbung von Jurkat-T-Zellen* nach mehrstündiger Inkubation mit nativer Tinte in einer Verdünnung von 1/1000. PI-Färbung signalisiert den Verlust von Plasmamembran-Integrität und damit den Tod der Zelle.

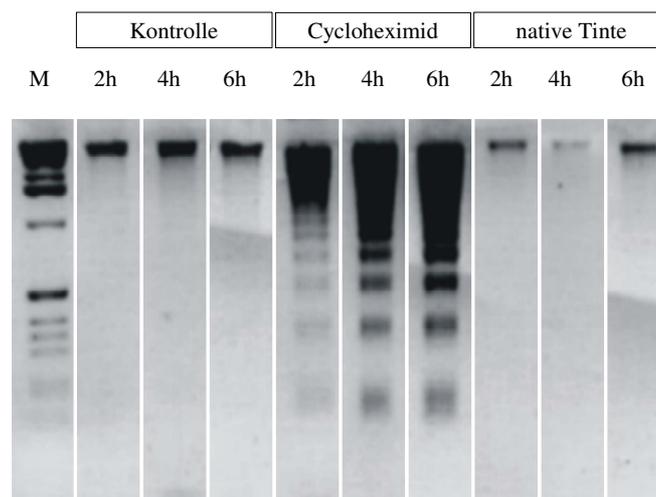
Neben der Integrität bzw. Funktionalität der Plasmamembran als Barriere, die Zellinneres vom Interstitium trennt, geben auch der Zustand anderer Zellorganellen und -bestandteile wie Mitochondrien und Chromatin Hinweise auf Ablauf und Ursache des eingetretenen Zelltodes. Diese entscheidenden Strukturen der Zellvitalität können während des programmierten Zelltodes spezifisch „kurzgeschlossen“ bzw. abgebaut werden. Bei von der Zelle selbst nicht mehr kontrollierbaren Formen des Todes werden Mitochondrien wie Chromatin dagegen in unspezifischer Weise geschädigt. Ein „TUNEL“-Assay gibt erste Auskunft über das Vorhandensein von DNA-Strangbrüchen. Hierbei überträgt ein Enzym, die terminale Transferase, fluoreszenzmarkierte Nukleotide auf Doppelstrang- und Einzelstrangbrüche in der DNA-Helix. Diese können dann im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (Abbildung 3.3.2-2).



**Abb. 3.3.2-2 zeigt phasenkontrast- (links) und fluoreszenzmikroskopische (Mitte) Aufnahmen von Jurkat-T-Zellen bzw. deren Überlagerung (rechts), nach Färbung mit einer fluorochromen Sonde. Grünfärbung signalisiert Chromatinschäden. a) Kontrollzellen, b) Tinten-induzierte Zellen (induziert mit aufgereinigtem APIT, 130 ng/ml), c) apoptotische Zelle (induziert mit Cycloheximid, 10 µg/ml).**

Jurkat-T-Lymphozyten zeigen nach vierstündiger Inkubation mit 10 µg/ml Cycloheximid eine typische DNA-Kondensation und eine Fragmentierung der Zellkerne in apoptotische Kernkörperchen - gleichzeitig sind sie „TUNEL-Assay-positiv“. Cycloheximid inhibiert die Proteinbiosynthese auf Ebene der Ribosomen. Auch Tinten-induzierte Zellen weisen nach dieser Zeit eine deutliche Schädigung der DNA auf. Eine Kondensation der DNA und eine Kernfragmentierung zeigt sich dagegen nicht.

Der TUNEL-Assay für sich alleine genommen zeigt nur eine allgemeine Schädigung der zellulären Erbsubstanz an. Um weiterführende Hinweise auf die Ursache des Zelltodes zu erhalten, muß die Art der Schädigung dokumentiert werden. Dafür bietet sich eine zweite Technik zur Darstellung von irreversibler Schädigung an: Die Analyse der zellulären DNA auf einem Agarosegel, das Fragmente nach ihrer Größe trennt (Abbildung 3.3.2-3). Ist die genomische DNA noch unfragmentiert, so wird sie während der Isolierung abgetrennt und lässt sich nicht auf dem Gel wiederfinden. Sind dagegen schon Doppelstrangbrüche vorhanden, werden die DNA-Fragmente isoliert und lassen sich auf dem Gel anfärben.



**Abb. 3.3.2-3** zeigt eine **gelelektrophoretische Analyse der zellulären DNA von Jurkat-T-Zellen** nach Inkubation über den angezeigten Zeitraum (in Stunden). Die DNA apoptotischer Zellen zeigt ein charakteristisches „Leiter-Muster“.

Das Vorliegen einer hochmolekularen Bande in allen Gel-Spuren weist auf die Qualität der DNA-Isolation hin: Bei ihr handelt es sich um die mitochondriale DNA mit einer Größe von 16,5 kB. Ist diese Bande schwach ausgeprägt, so ist in der dazugehörigen Probe wenig zelluläre DNA vorhanden. Diese Qualitätseinschränkung trifft nur auf die Probe zellulärer DNA zu, die nach vierstündiger Inkubation von Zellen mit nativer Tinte gewonnen wurde.

Wegen dem Verlust der Zellintegrität war DNA aus tintenbehandelten Zellen insgesamt aber schlechter zu isolieren als aus Kontrollzellen.

Jurkat-T-Lymphozyten, die unter den üblichen Kulturbedingungen ohne Zusatz von Noxen gehalten werden, zeigen keine Anzeichen einer Fragmentierung der genomischen DNA. Bei Inkubation mit dem Apoptose-Stimulanz Cycloheximid (siehe oben), lassen die Zellen bereits nach zwei Stunden ein charakteristisches „Leitermuster“ erkennen, das die apoptosetypische Fragmentierung der genomischen DNA in einzelne Nukleosomen (~200 bp) bzw. dem Vielfachen davon widerspiegelt. In einer spezifischen Reaktion wird das Chromatin im Bereich der „Linker“-DNA geschnitten. Längere Inkubation verstärkt die Zerstückelung der Erbsubstanz.

Der Tinten-induzierte Zelltod geht nicht mit einer Fragmentierung des Chromatins einher, weder in spezifischer Form, noch auf unspezifische Art und Weise. Dies würde sich auf dem Gel durch einen „Schmier“ von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe dokumentieren lassen.

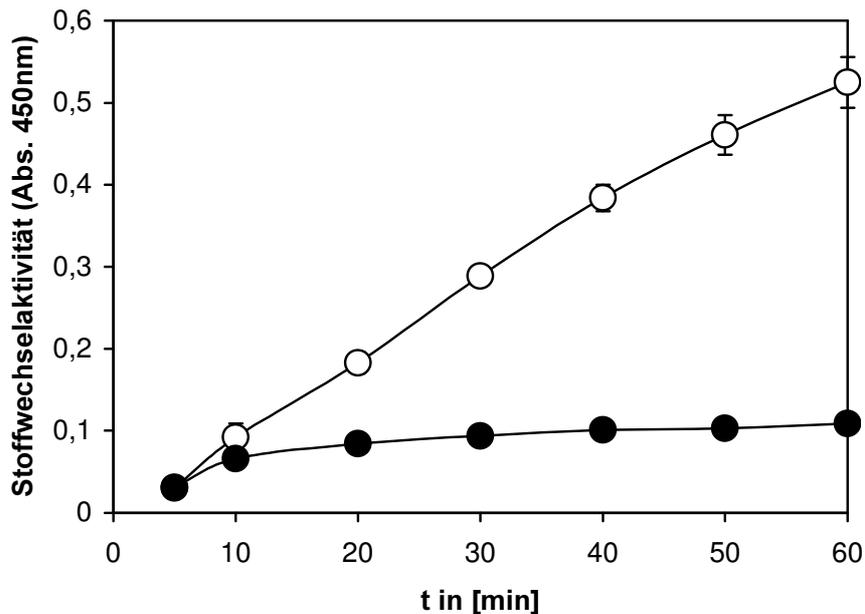
### **3.3.3 Auch die Stoffwechselaktivität ist früh betroffen**

Neben der Proliferationsrate stellt die Stoffwechselaktivität einer Zellpopulation einen äußerst sensitiven Monitor ihrer Vitalität dar. Letztere lässt sich recht einfach über den Umsatz des chromogenen Substrates WST-1 quantifizieren. Man muss natürlich einschränkend anmerken, dass nur ein spezifischer Teilbereich der Stoffwechselaktivität erfasst wird. In Vorversuchen wurde gezeigt, daß sich der WST-1-Vitalitätstest auch für den Tinten-induzierten Zelltod eignet (siehe auch 3.3.7). Durch Abänderung des ursprünglichen Protokolls läßt sich der Assay für die Darstellung des zeitlichen Ablaufes des Zelltodes nutzen: Gibt man das chromogene Substrat und APIT bzw. eine Kontrolle zeitgleich zu einer Zellkultur und misst in regelmäßigen Abständen die Zunahme des umgesetzten Substrates, so kann man den Zeitpunkt des Zusammenbruchs zellulärer „Stoffwechselaktivität“ genau bestimmen.

Dieses Wissen liefert ein weiteres Differenzierungsmerkmal zur Apoptose. Bei dieser bleibt die als WST-1-Umsatz bzw. Esteraseaktivität gemessene Stoffwechselaktivität nämlich recht lange bestehen. Bei Zelltodformen, bei denen sie früh beeinträchtigt wird, erlaubt das beschriebene Vorgehen dagegen eine zeitliche Einschränkung ursächlicher, toxischer Prozesse.

Die Abbildung 3.3.3-1 zeigt den WST-1-Vitalitätstest in der erörterten Form. Die Zunahme des umgesetzten Substrates verläuft bei den Kontrollzellen in den ersten 40 Minuten linear.

Danach findet eine leichte Abnahme der Umsatzrate statt. Bei Zellen, denen gleichzeitig ~200 ng/ml aufgereinigtes APIT zugesetzt wurde, findet bereits nach zehn Minuten kaum noch ein Umsatz statt. Die messbare Stoffwechselaktivität ist also bereits zu einem Zeitpunkt erloschen, zu dem es noch keine anderen Anzeichen (Morphologie, PI-Staining) für einen Zelltod gibt. Zu erwähnen bleibt, dass der Zeitpunkt des „Stoffwechseltodes“ durch Titrierung von APIT nach hinten verschoben werden kann (nicht gezeigt).



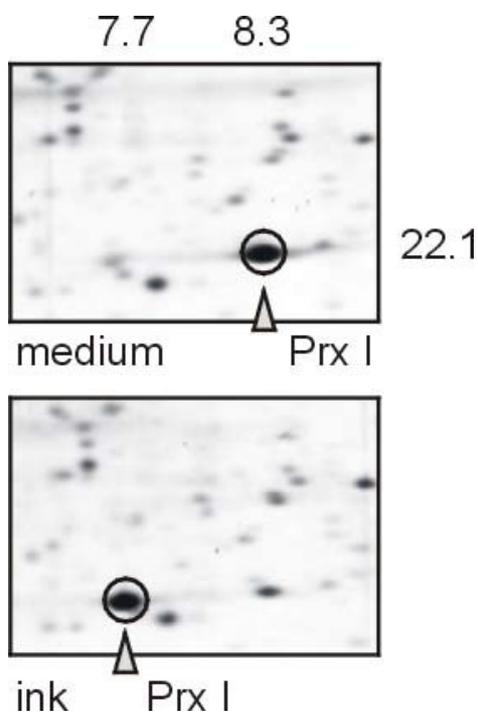
**Abb.3.3.3-1** zeigt eine Analyse der Stoffwechselaktivität von Jurkat-T-Zellen mit einem chromogenen Assay (WST-1). Dargestellt sind die Mittelwerte von sechs Replikaten und deren Standardabweichungen. Eine Zunahme der Absorption bedeutet einen aktiven Zellstoffwechsel. Ungefüllte Punkte (○) geben die Kontrollwerte, gefüllte Punkte (●) die Werte APIT-behandelter Zellen wieder (200 ng/ml).

### 3.3.4 Ein wichtiger Hinweis kommt vom zellulären Proteom

In Zusammenarbeit mit der Gruppe „Apoptose-Proteomics“ des MPIIB wurde das Proteom von Tinten-induzierten Jurkat-T-Zellen bzw. Kontrollen auf 2-DE Gelen dargestellt. Auf diesen lassen sich physikochemische Veränderungen von häufig exprimierten zellulären Proteinen erkennen. Besonders eignen sich dafür Modifikationen, die mit einer Änderung des isoelektrischen Punktes (pI), also der Ladung und/oder des Molekulargewichtes (in kD), verbunden sind. Während letzteres nach vollständiger Reduktion eines Proteins immer auf

Abspaltung eines Teiles hinweist, sind die möglichen Ursachen für eine Änderungen des pI zahlreich.

Die Abbildung 3.3.4-1 zeigt Ausschnitte von Kontroll- bzw. Tinten-behandelten Zellen. Tatsächlich gibt es mehrere in der beschriebenen Weise darstellbare Veränderungen des Proteoms von Tinten-induzierten Zellen. Hier soll aber nur auf die für die funktionelle Darstellung von APIT wesentlichste eingegangen werden. Gefunden wurde in allen Stichproben eine pI-Wert-Verschiebung eines 22 kD Proteins von pI 8.3 in den Bereich von pI 7.7. In einer massenspektrometrischen Analyse wurde dieses Protein als Peroxiredoxin I identifiziert, einem cytoplasmatischen Enzym, das an der Entgiftung von reaktiven Oxygenspezies (ROS) beteiligt ist.



*Abb.3.3.4-1 zeigt Ausschnitte eines 2DE-Vergleichs von Kontroll- bzw. Tinten-behandelten Jurkat-T-Zellen. Jeder angefärbte „Spot“ entspricht einer zellulären Proteinspezies, eine Verschiebung weist auf eine Veränderung von physikochemischen Eigenschaften hin. Die Werte in der horizontalen Dimension geben den pI, die in der vertikalen Dimension das Molekulargewicht der umrandeten Proteine an.*

### 3.3.5 Ein Schlüsselmolekül des Tinten-induzierten Zelltodes?

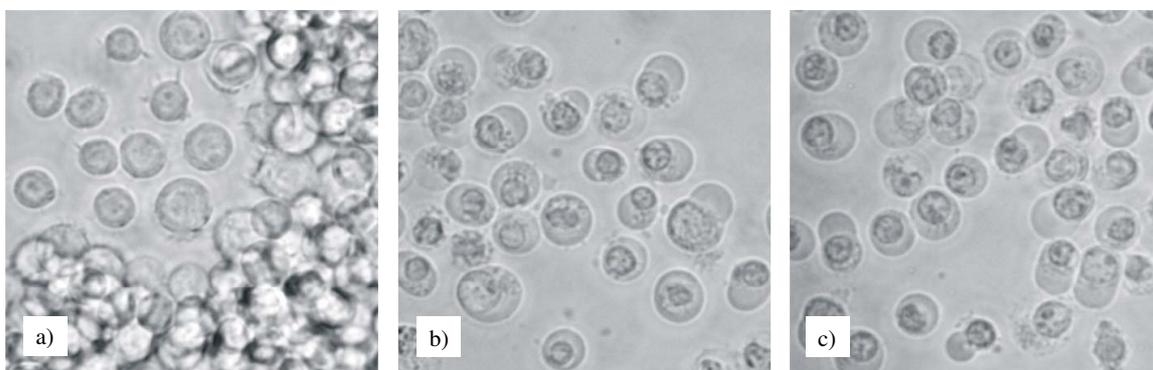
Die Analyse des Proteoms Tinten-behandelter Zellen hatte also Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften eines Enzyms aufgezeigt, das am Abbau reaktiver Oxygenspezies beteiligt ist. Ob diese Veränderungen mit einer Modifikation der Enzymfunktionalität einhergehen, einer Inhibition oder einer Steigerung der Aktivität, blieb noch offen. Zunächst stellte sich nun aber die Frage, ob reaktive Oxygenspezies selber möglicherweise einen

wesentlichen Anteil am zytolytischen Geschehen haben. Für ein erstes klärendes Experiment wurden deshalb Zellen in Anwesenheit von Antioxidantien mit nativer Tinte behandelt.

Tatsächlich ließ sich ein Schutz der Zellen durch N-Acetylcystein oder Liponsäure, beides übliche Antioxidantien, erreichen. Die dazu nötigen Konzentrationen lagen allerdings so hoch (50 mM für NAC), dass unspezifische Effekte nicht ausgeschlossen werden können - die Ergebnisse sind deshalb hier nicht dargestellt.

In einem anderen Ansatz wurden Zellen direkt mit reaktiven Oxygenspezies behandelt und die induzierten Schädigungen mit den durch Tinte ausgelösten verglichen: Als Zwischenprodukt ROS-induzierter Schädigungen taucht in der Zelle Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) auf. So wird von Oxidasen (z.B. Xanthin Oxidase, NADPH Oxidase) produziertes Superoxid ( $O_2^-$ ) durch die Superoxid Dismutase in  $H_2O_2$  umgesetzt. Letzteres ist Ausgang für weitere ROS-Spezies oder wird durch zelleigene Entgiftungssysteme (Thioredoxin, Gluthation) unschädlich gemacht.  $H_2O_2$  in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen induziert Apoptose, also einen Phänotyp, der sich klar vom Tinten-induzierten unterscheidet. In höheren Konzentrationen (ab  $\sim 200 \mu M$ ) werden Schlüsselenzyme der Apoptose inhibiert (Hampton, 1997), und es findet eine wenig charakterisierte Form von oxidativer Nekrose statt.

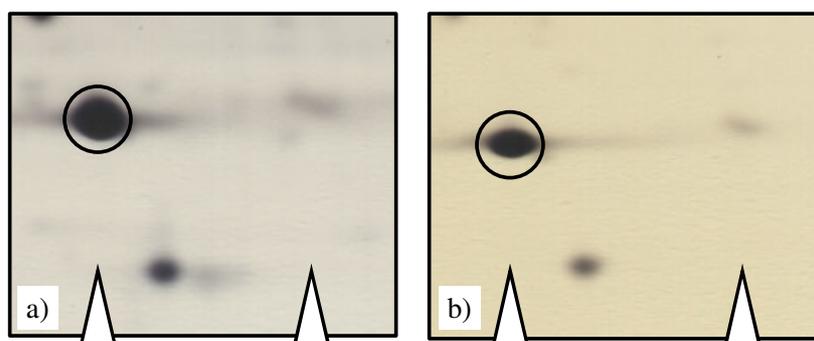
Da eine Beteiligung von apoptotischen Motiven wie zuvor beschrieben ja ausgeschlossen werden konnte, wurden Jurkat-T-Zellen folglich mit hohen Dosen  $H_2O_2$  behandelt ( $500 \mu M$ ) und ihre Zellmorphologie und Proteomveränderungen in der bereits beschriebenen Weise untersucht. Abbildung 3.3.5-1 zeigt einen Vergleich von Tinten- bzw.  $H_2O_2$ -behandelten Zellen im Lichtmikroskop.



**Abb. 3.3.5-1** zeigt eine *mikroskopische Aufnahme von Jurkat-T-Zellen* nach achtstündiger Inkubation mit a) Medium, b) APIT (60 ng/ml) oder c)  $500 \mu M H_2O_2$ .

Tatsächlich stimmen die induzierten Morphologieänderungen in allen oben beschriebenen Details überein. Auch der charakteristische pI-Shift von Peroxiredoxin I ist in der 2DE-Proteom-Analyse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelter Zellen deutlich erkennbar (Abbildung 3.3.5-2).

Der Tinten-induzierte Zelltod kann in seinen Auswirkungen also durch Behandlung mit hohen Dosen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nachgeahmt werden.

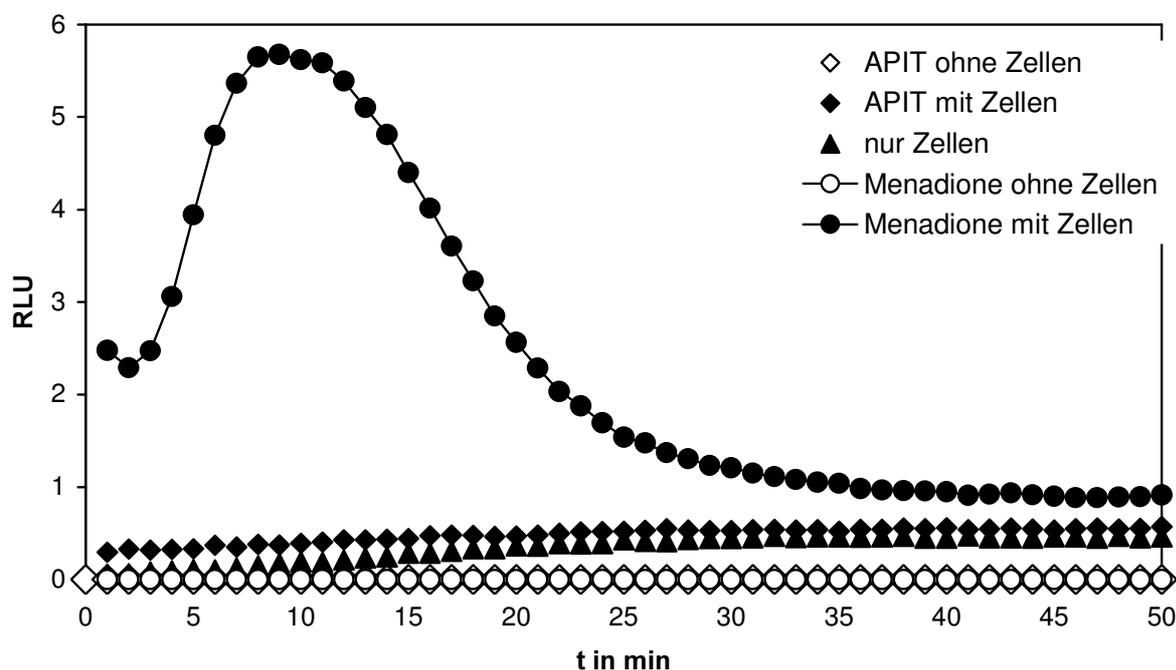


**Abb. 3.3.5-2** zeigt Ausschnitte aus einem 2DE-Vergleich (analog dem in Abb. 3.3.4-1) von a) Tinten-behandelten und b) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-behandelten Jurkat-T-Zellen. Weiße Pfeile weisen auf einen pI-Shift von Peroxiredoxin I hin.

### 3.3.6 Der erste Nachweisversuch scheitert

Der unmittelbarste Weg, die Beteiligung von ROS nachzuweisen, ist die direkte Messung ihrer Entstehung. Obwohl die für den Tinten-induzierten Zelltod nötige Menge recht hoch liegt (~200 µM), ist es am naheliegendsten, die behandelten Zellen selbst als Quelle zu vermuten. Ein üblicherweise verwendetes Messsystem zur kinetischen Darstellung von ROS-Produktion durch Zellen ist ein luminogener Assay mit Luminol. Der Nachweis einer intrazellulären Entstehung von Superoxid bzw. Hydrogenperoxid mit diesem zellpermeablen Agens hängt allerdings vom Vorhandensein einer granulären Myeloperoxidase (MPO) ab. Ihre enzymatische Aktivität ist notwendig für eine Anregung von Luminol durch genannte ROS (Dahlgren, 1999). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Jurkat-T-Zellen ist das Vorkommen der MPO recht fraglich, trotzdem wurde eine ROS-Generierung auch bei diesen bereits erfolgreich gemessen (Suzuki, 1999). Dazu ersetzt man MPO durch extern zugegebene Meerrettichperoxidase (HRP). Ein Anwendungsbeispiel ist die kinetische Darstellung einer ROS-Produktion nach Stimulation von T-Lymphozyten mit Menadion (Vitamin K<sub>3</sub>) (Suzuki, 1999), die in dieser Arbeit als Positivkontrolle Verwendung fand. Menadion stimuliert eine endogene NADPH: Quinon Oxidase, wobei O<sub>2</sub><sup>-</sup> und/oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entstehen.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.3, der rasche Zusammenbruch der zellulären Stoffwechselaktivität, deuteten auf eine sehr unmittelbare Wirkung von APIT. Deshalb wurde die luminol erzeugte Chemilumineszenz des Zellen-HRP-Systems in einem Krebs-Ringer innerhalb der ersten 50 Minuten nach Zugabe von Menadion ( $250 \mu\text{M}$ ) bzw. aufgereinigtem APIT ( $200 \text{ ng/ml}$ ) verfolgt. Zur Kontrolle wurde die Chemilumineszenz unbehandelter Zellen, ausgelöst durch den Ruhestoffwechsel der Zellen, aufgenommen. Auch eine störende, direkte Interaktion von Stimulanz und Meerrettichperoxidase wurde durch ein entsprechendes Experiment ausgeschlossen. Abbildung 3.3.6-1 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer solchen parallelen Messung.



**Abb.3.3.6-1** zeigt einen **Lumineszenz-Assay nach zellulärer ROS-Produktion**. Ein Anstieg der relativen Lumineszenz Units (RLU) bedeutet eine Produktion von reaktiven Oxygen-Spezies (ROS). Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Das Lumineszenzsignal nach Zugabe von Stimulanz zu einem zellfreien System ist gleich Null, das heißt, jegliches gemessene Signal ist tatsächlich auf eine ROS-Produktion durch die eingesetzten Zellen zurückzuführen. Der Ruhestoffwechsel der unstimulierten Zellen trägt dagegen deutlich zur Entwicklung eines anhaltenden Lumineszenzsignals bei, muss also von den entsprechenden Werten nach Stimulanzgabe abgezogen werden. Übrigens hatte Ethanol in einer Konzentration von 0,1%, als Lösungsvermittler von Menadion, keine Steigerung des Signals zur Folge (nicht gezeigt).

Der in der Literatur beschriebene Effekt von Menadion, eine Anregung der zellulären Produktion von ROS, konnte bestätigt werden: Deutlich ist ein Anstieg des Lumineszenzsignals innerhalb der ersten zehn Minuten nach Zugabe und ein Abfall in den folgenden 20 Minuten zu erkennen. Gleichzeitig bestätigt diese Messung die Funktionalität des aufgebauten Messsystems.

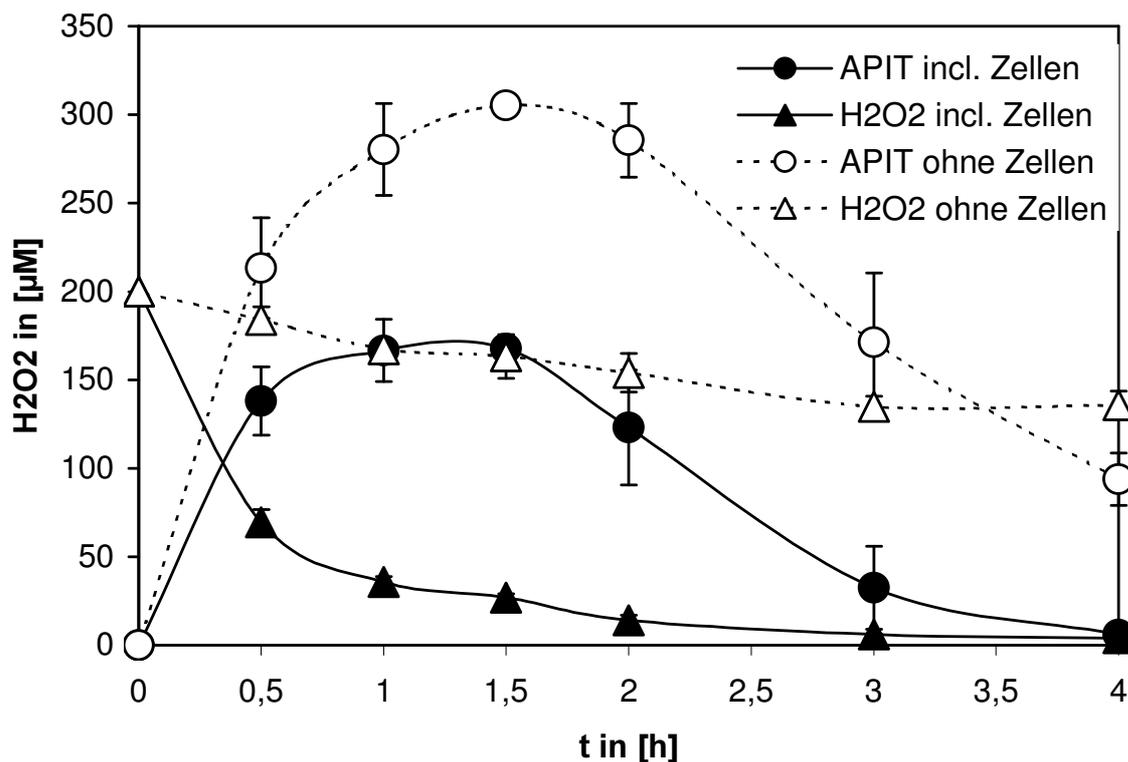
Überraschenderweise war keine Produktion von ROS durch Zellen nach Induktion mit aufgereinigtem APIT nachweisbar. Das Lumineszenzsignal steigt nicht signifikant über das von Zellen allein produzierte an.

### **3.3.7 Ein anderer Assay bringt den Erfolg - und ein unerwartetes Ergebnis**

Nach dem negativen Befund im Luminolassay galt es zunächst, die Wirksamkeit von APIT im benutzten Krebs-Ringer zu bestätigen. Dazu wurden Zellen in üblicher Weise mit APIT inkubiert, allerdings nicht im eigentlichen Zellkulturmedium (RPMI), sondern eben in besagtem Krebs-Ringer, einer phosphatgepufferten Saline inklusive Glucose. Tatsächlich starben viele Zellen, sowohl Kontroll- wie APIT-behandelte, nach einigen Stunden Aufenthalt in diesem Mangelmedium in apoptotischer Manier. Kennzeichen des Tinten-induzierten Zelltodes waren aber nicht auszumachen (nicht gezeigt). Die zytolytische Wirkung von APIT auf Zellen ließ sich also mit der Anwesenheit von Zellkulturmedium im Ansatz verknüpfen.

Da der direkte Nachweis einer Entstehung von ROS wegen der fehlenden Aktivität im Luminol-Assay also nicht gelingen konnte, kam ein anderes Detektionssystem zum Einsatz: ABTS ist ein Substrat, das bei Anwesenheit von  $H_2O_2$  durch die HRP quantitativ zu einem chromogenen Produkt umgesetzt wird. Will man das  $H_2O_2$ -Vorkommen in einem System aus APIT, Zellen und Zellkulturmedium bestimmen, so kann man dessen Überstände nach bestimmten Inkubationszeiten als Substrat für eine HRP/ABTS-Reaktion einsetzen. Befindet sich  $H_2O_2$  im Überstand, so wird dies proportional in eine Grünfärbung übersetzt, die anschließend photometrisch bestimmt werden kann.

Abbildung 3.3.7-1 zeigt das gemittelte Ergebnis dreier unabhängiger Experimente, bei denen parallel die  $H_2O_2$ -Generierung durch aufgereinigtes APIT und die  $H_2O_2$ -Konsumierung durch Medium bzw. Zellen festgestellt wurde.



**Abb.3.3.7-1** zeigt einen *chromogenen Assay (HRP/ABTS) nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Zellkulturüberstand*. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit ihren Standardabweichungen.

Zunächst zur Konsumierung: Stellt man eine definierte Konzentration an freiem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in diesem Fall 200 µM, in einem Zellkulturmedium (RPMI) incl. FCS (10%) ein, so wird innerhalb von drei Stunden rund ein Drittel von diesem (hier ~65 µM) umgesetzt (△). Befinden sich außerdem noch Zellen (Jurkat-T-Lymphozyten, 1 x 10<sup>5</sup>/ml) im System, so ist das freie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Überstand nach drei Stunden bereits nahezu „verbraucht“ bzw. der Messung in der oben beschriebenen Weise entzogen (▲). Der stärkste Abfall findet hierbei innerhalb der ersten Stunde statt (~ -80%).

Nun zur Produktion: Gibt man aufgereinigtes APIT in einer Menge von 200 ng/ml zu einer Zellsuspension in Medium incl. FCS, so kann man tatsächlich eine Produktion von meßbarem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> feststellen (●). Diese übertrifft die oben beschriebene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konsumierung durch Medium und Zellen (▲), so daß es innerhalb der ersten halben Stunde zu einem steilen Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration im Überstand kommt (~140 µM), die bereits fast den späteren Höchstwert von 170 µM erreicht. An eine fast einstündige Plateauphase, in der sich die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration nicht wesentlich ändert, schließt sich ein ausgeprägter

Konzentrationsabfall an. Bei der letzten Messung nach vier Stunden befindet sich kaum noch freies  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Überstand.

Überraschenderweise findet man eine Produktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auch in einem Kontroll-System ohne Zellen ( $\odot$ ). Die erreichten Höchstwerte der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Überstand, rund  $300 \mu\text{M}$  nach 1,5 Stunden, liegen sogar beinahe doppelt so hoch wie diejenigen bei Anwesenheit von Zellen. Das bedeutet, APIT selbst ist der Produzent, Zellen sind nur Konsumenten. In den folgenden 2,5 Stunden fällt die gemessene Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}_2$  um zwei Drittel auf etwa  $100 \mu\text{M}$  ab – viel stärker als aufgrund der Kontrolle zu erwarten gewesen wäre. Interessanterweise ist die Steilheit dieses Konzentrationsabfalls mit und ohne Zellen nahezu identisch, nur kommt es bei Abwesenheit von Zellen zu einer etwa halbstündigen Verzögerung.

Nach diesem unerwarteten Ergebnis - der selbständigen Generierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch APIT bei Anwesenheit von Medium - sollte nun geklärt werden, ob diese Aktivität möglicherweise das ursächliche, zytotoxische Prinzip der Aplysien-Tinte darstellt. Dazu wurde dem Zellkulturmedium das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -abbauende Enzym Catalase in ausreichend hoher Konzentration zugesetzt und die verbleibende Zytotoxizität sowohl von nativer Tinte als auch aufgereinigtem APIT anhand der PI-Anfärbbarkeit und Stoffwechselaktivität von behandelten Jurkat-T-Lymphozyten untersucht. Um die Wirksamkeit der Catalase sicherzustellen, wurden Zellen im WST-1-Assay parallel mit einer hohen Konzentration  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziert. Außerdem gab es Ansätze, bei denen ein Apoptose-auslösender Antikörper (anti-CD95) in Verbindung mit Catalase zum Einsatz kam, um unspezifische Effekte des Enzyms auf den Ablauf des Zelltodprogramms auszuschließen.

Abbildung 3.3.7-2 zeigt das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Analyse von Zellen, die acht Stunden mit nativer Tinte behandelt wurden, nach Anfärbung mit PI. Die Zugabe von Catalase zum Ansatz senkt die Zahl der PI-anfärbbaren, also toten Zellen nach Behandlung mit Tinte auf den Hintergrundwert von 3 bis 4 %. Ohne Catalase sind nach acht Stunden rund 45% der Zellen den Tinten-induzierten Tod gestorben. Ein qualitativ gleiches Ergebnis findet sich auch bei Verwendung von aufgereinigtem APIT. Das heißt, bei Zugabe von Catalase ist bei diesem Assay keine zytolytische Aktivität von APIT - sowohl in nativer (Tinte), als auch aufgereinigter Form - bei Jurkat-T-Lymphozyten mehr nachweisbar. Einschränkend muss allerdings hinzugefügt werden, dass der Anteil apoptotischer Zellen (die durch diesen Assay ja nicht erfasst werden) bei gleichzeitiger Behandlung mit Tinte bzw. APIT und Catalase gegenüber der Kontrolle deutlich gesteigert war (mikroskopische Bewertung).

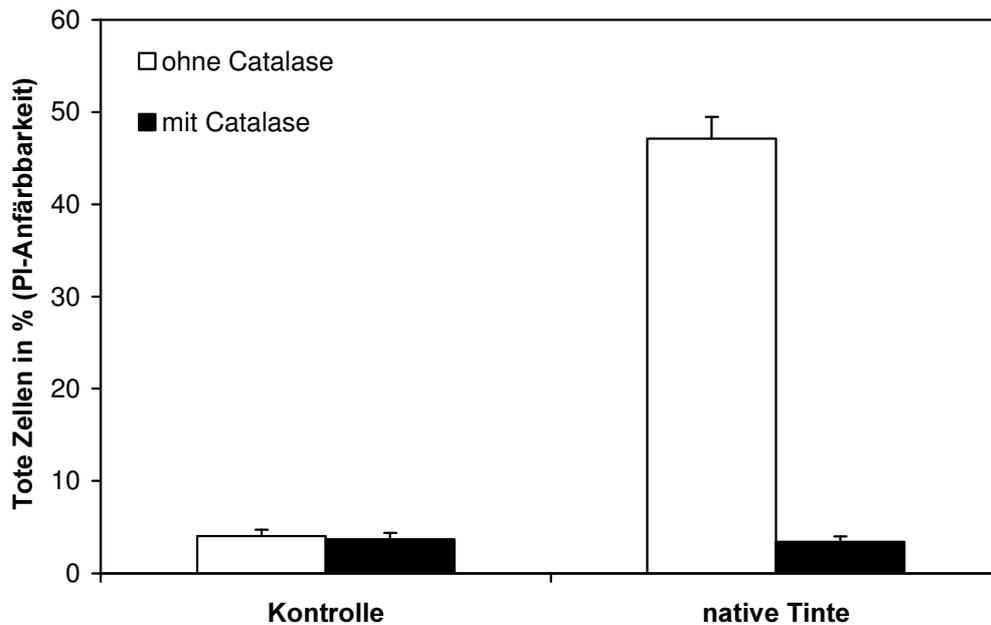


Abb. 3.3.7-2 zeigt eine *durchflußzytometrische Analyse der PI-Anfärbarkeit von Jurkat-T-Zellen* nach achtstündiger Inkubation mit nativer Tinte incl. bzw. ohne Catalase. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils drei Replikaten, eins davon mit aufgereinigtem APIT.

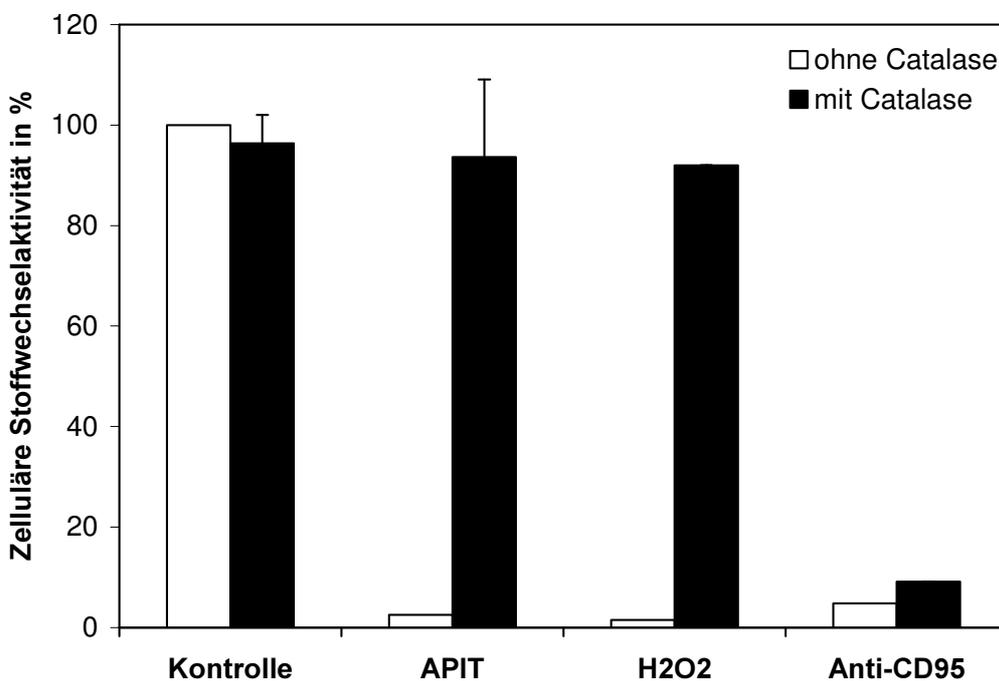
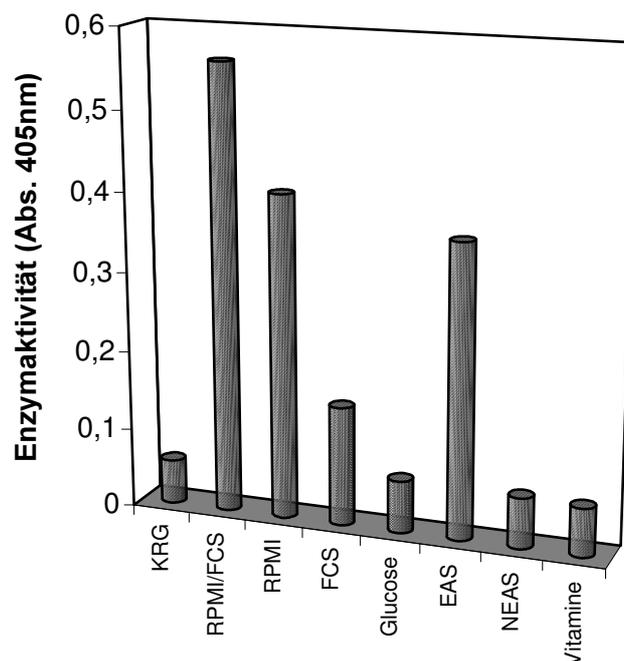


Abb.3.3.7-3 zeigt das *Ergebnis eines chromogenen Assays nach zellulärer Stoffwechselaktivität (WST-1)*. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte (mit Standardfehler) zweier unabhängiger Experimente mit insgesamt zehn Replikaten in %. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- bzw. Anti-CD95-Induktion haben nur jeweils in einem Experiment stattgefunden.

Das gleiche Bild ergibt sich im WST-1-Assay (Abbildung 3.3.7-3). Nach dreistündiger Inkubation mit aufgereinigtem APIT erreichen Zellen unter Standardbedingungen nur noch zwei bis drei % der Stoffwechselaktivität unbehandelter Kontrollen. Dieser Wert ändert sich bei Zugabe von Catalase dramatisch: Ein Unterschied zwischen Kontroll- und APIT-behandelten Zellen ist nun nicht mehr feststellbar. Das gleiche gilt für die Induktion des Zelltodes direkt mit  $H_2O_2$ , nicht aber mit dem Anti-CD95. Bei letzterem ist der zytotoxische Effekt mit und ohne Anwesenheit von Catalase im wesentlichen gleich, was für ihre spezifische,  $H_2O_2$ -entgiftende Aktivität spricht.

### 3.3.8 Die Suche nach dem Substrat von APIT

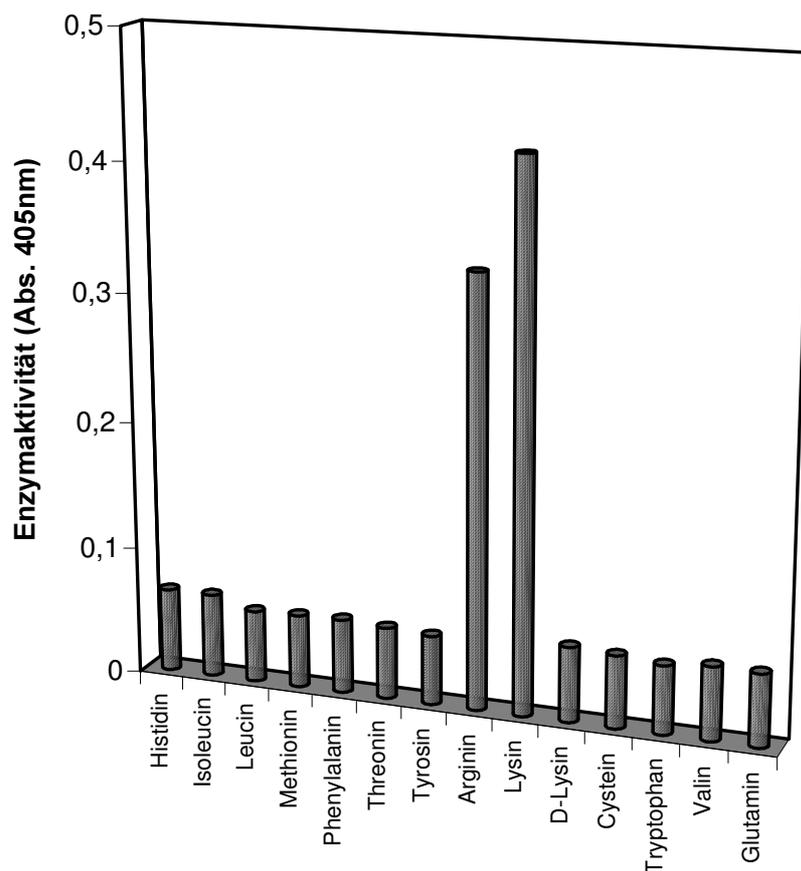
APIT war also für eine Produktion von  $H_2O_2$  verantwortlich und diese war das ursächliche zytolytische Prinzip. Unbeantwortet war immer noch die Frage nach dem Substrat für diese enzymatische Aktivität. Bereits gezeigt war ja die Notwendigkeit von Medium für den lytischen Effekt bzw. die  $H_2O_2$ -Produktion (siehe 3.3.7). Das Substrat mußten also ein oder mehrere Bestandteile des Zellkulturmediums und /oder des FCS sein.



**Abb. 3.3.8-1** zeigt einen *chromogenen Assay (HRP/ABTS) nach  $H_2O_2$ -Produktion* durch APIT nach einstündiger Inkubation mit unterschiedlichen Bestandteilen des Zellkulturmediums. KRG = Krebs Ringer, RPMI = Grundmedium, FCS = Fötale Kälber Serum, EAS = Mix aus essentiellen Aminosäuren, NEAS = Mix aus nicht essentiellen Aminosäuren. Die einzelnen Bestandteile wurden entsprechend ihren Konzentrationen im Medium eingesetzt. Der mit KRG erzielte Wert entspricht dem Hintergrundsignal des Nachweises.

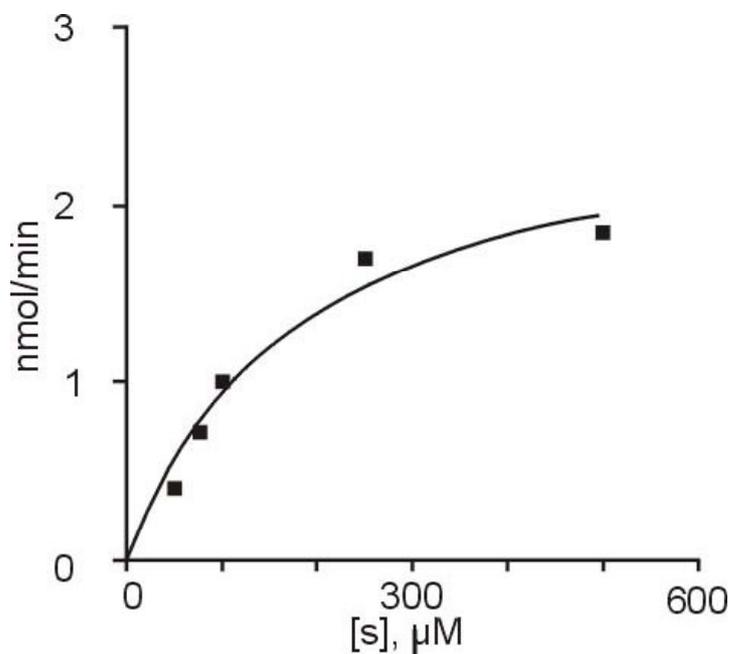
Deshalb wurden zunächst RPMI-Medium und FCS getrennt mit aufgereinigtem APIT inkubiert und das Reaktionsprodukt  $H_2O_2$  im HRP/ABTS-Assay nachgewiesen. Beide wurden entsprechend ihrer Anteile im gebräuchlichen Vollmedium (90 % und 10 %) eingesetzt und dafür mit dem inerten Krebs Ringer verdünnt, der schon bei den Lumineszenzmessungen zum Einsatz kam. Wie Abbildung 3.3.8-1 dokumentiert, sind Substrate sowohl in RPMI-Medium, als auch in FCS enthalten.

Nun ist FCS ein natürliches und damit recht komplexes Gemisch verschiedenster Biomoleküle, RPMI-Medium dagegen künstlich aus Vitaminen, Aminosäuren und gepufferter Saline zusammengestellt und damit einfach in seine Bestandteile aufzulösen. Im folgenden wurden diese einzeln als Substrat für eine Reaktion mit dem aufgereinigten APIT eingesetzt und das Produkt  $H_2O_2$  im HRP/ABTS-Assay nachgewiesen. Abbildungen 3.3.8-1 und -2 zeigen das Ergebnis dieser Suche.



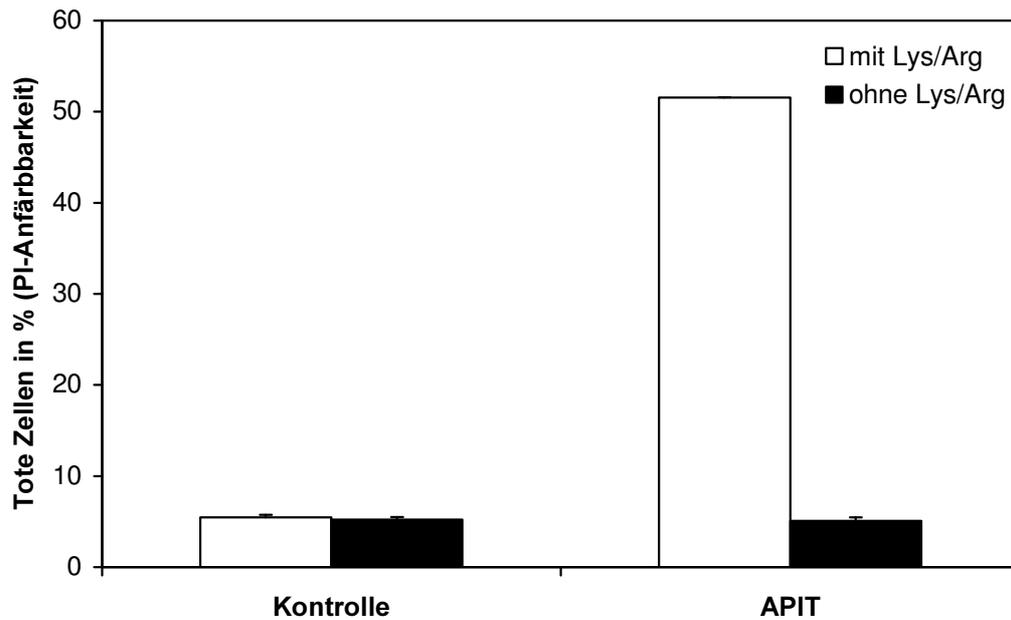
**Abb. 3.3.8-2** zeigt einen *chromogenen Assay (HRP/ABTS) nach  $H_2O_2$ -Produktion durch APIT nach einstündiger Inkubation mit einzelnen L-Aminosäuren (jeweils 1 mM).*

Die Substrate, die von APIT umgesetzt werden, sind die beiden Aminosäuren Lysin und Arginin. Im Falle von Lysin lässt sich diese Aussage noch präzisieren: nur L-Lysin. Keine andere proteinogene Aminosäure kann für eine enzymatische Reaktion eingesetzt werden. Eine wichtige „Kennzahl“ von Enzymen ist deren Substrataffinität, die man mit Hilfe einer Michaelis-Menten-Kinetik ermitteln kann. Hierzu wird das zu untersuchende Enzym mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen inkubiert, und die Anfangsgeschwindigkeiten (lineare Phase) des Umsatzes werden in einem Diagramm dargestellt, aus dem dann die Substrataffinität ermittelt werden kann. Die Abbildung 3.3.8.-2 zeigt dieses Diagramm für den Umsatz von L-Lysin.

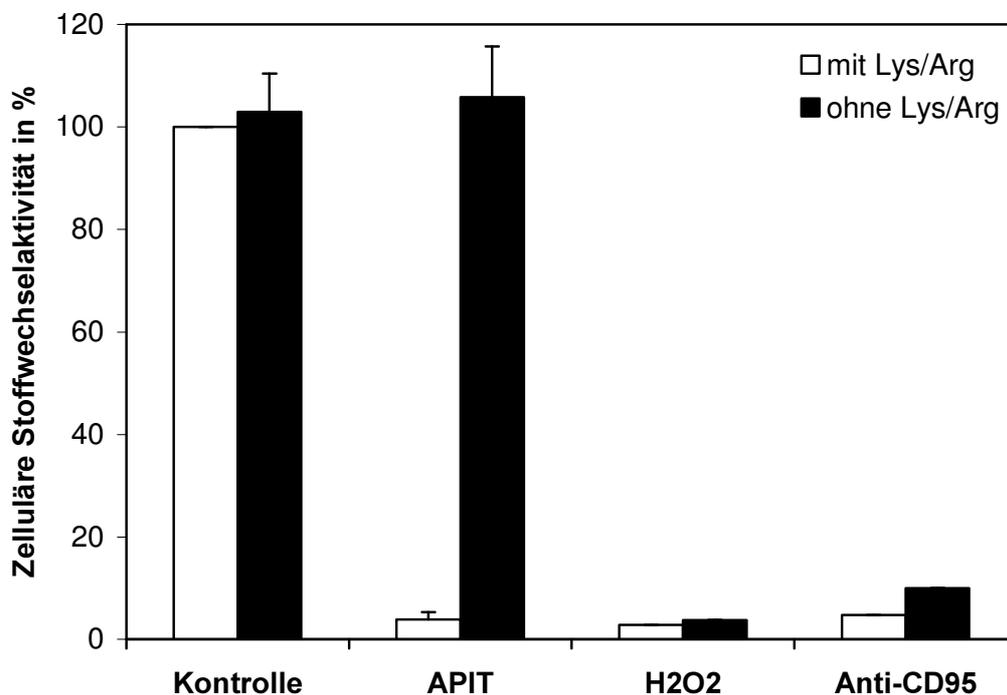


*Abb. 3.3.8-2 zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik von APIT für das Substrat L-Lysin. Die Substratkonzentration ist in  $\mu\text{M}$  angegeben, die Umsatzgeschwindigkeit in  $\text{nmol}/\text{min}$ . Der rechnerisch ermittelte  $K_m$ -Wert ist  $182 \mu\text{M}$ .*

Entsprechend dem Vorgehen in 3.3.7 sollte das gefundene Ergebnis in Toxizitätsassays bestätigt werden. Hierfür wurden Jurkat-T-Zellen in einem Vollmedium ohne Lysin und Arginin kultiviert und der verbleibende lytische bzw. toxische Effekt von aufgereinigtem APIT mittels PI-Anfärbbarkeit und Stoffwechselaktivität der Zellen untersucht. Um andere Effekte auf den Ablauf der verschiedenen Zelltod-Mechanismen durch Lysin/Arginin-Entzug ausschließen zu können, wurden Zellen beim WST-1-Assay parallel auch wieder mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  direkt bzw. dem Apoptose auslösenden Anti-CD95 inkubiert.



**Abb. 3.3.8-3** zeigt eine *durchflusszytometrische Analyse der PI-Anfärbarkeit von Jurkat-T-Lymphozyten* nach sechsstündiger Inkubation mit aufgereinigtem APIT in einem Medium incl. bzw. ohne L-Lysin und L-Arginin. Das Ergebnis ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente mit jeweils drei Replikaten.



**Abb.3.3.8-4** zeigt das Ergebnis eines *chromogenen Assays nach zellulärer Stoffwechselaktivität (WST-1)*. Dargestellt sind die relativen Mittelwerte (mit Standardfehler) zweier unabhängiger Experimente mit insgesamt zehn Replikaten in %. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- bzw. Anti-CD95-Induktion haben nur jeweils in einem Experiment stattgefunden

Abbildung 3.3.8-3 stellt das Ergebnis der Zelltod-Analyse (als PI-Anfärbbarkeit) dar: Erreicht die Sterblichkeit von Zellen nach sechsständiger Inkubation mit aufgereinigtem APIT in gebräuchlichem Vollmedium einen Wert von rund 50%, sinkt sie bei Mangel von Lysin und Arginin auf den Kontrollwert von 5% ab. Es ist also kein lytischer Effekt mehr nachweisbar. Dies gilt auch für den Einsatz von nativer Tinte (nicht gezeigt). Gleichzeitig beantwortet der letztere Befund die Frage, ob in der nativen Tinte selbst ein Substrat für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generierung enthalten ist mit „nein“.

Der gleiche Befund ergibt sich im WST-1-Assay (Abbildung 3.3.8-4): Trotz dreistündiger Inkubation mit aufgereinigtem APIT bleibt der Stoffwechsel von Lysin/Arginin-frei kultivierten Zellen voll aktiv. Die Kontrollen, 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. Anti-CD95, entfalten dagegen unvermindert ihre Wirkung. Den prinzipiellen Ablauf des Zelltodes beeinträchtigt der Aminosäuremangel also nicht.

### 3.3.9 Eine letzte Bestätigung

Die enzymatische Aktivität von APIT lässt sich zunächst also durch den Verbrauch der Aminosäuren L-Lysin und Arginin sowie die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grob skizzieren. Führt man mit diesen Stichwörtern eine Literaturrecherche durch, so wird man auf das Enzym L-Lysin  $\alpha$ -Oxidase des bodenbewohnenden Pilzes *Trichoderma sp.* verwiesen, dessen Aufreinigung und Aktivität 1980 erstmals beschrieben wurde (Kusakabe, 1980). Hauptsächliches Substrat ist L-Lysin, aber auch L-Ornithin, L-Phenylalanin, L-Arginin, L-Tyrosin und L-Histidin werden im Beisein von Sauerstoff, zu den Endprodukten  $\alpha$ -Ketosäure, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Ammoniak umgesetzt. Auch dieses Enzym wurde in einem Screen durch seinen zytotoxischen Effekt identifiziert. Da die L-Lysin  $\alpha$ -Oxidase kommerziell erhältlich ist, war es naheliegend, den durch sie induzierten Phänotyp mit dem Tinten-induzierten zu vergleichen.

Die Abbildungen 3.3.9-1 und -2 zeigen die Kennzeichen des L-Lysin- $\alpha$ -Oxidase-induzierten Zelltodes, dargestellt mit den hier üblichen Assays.

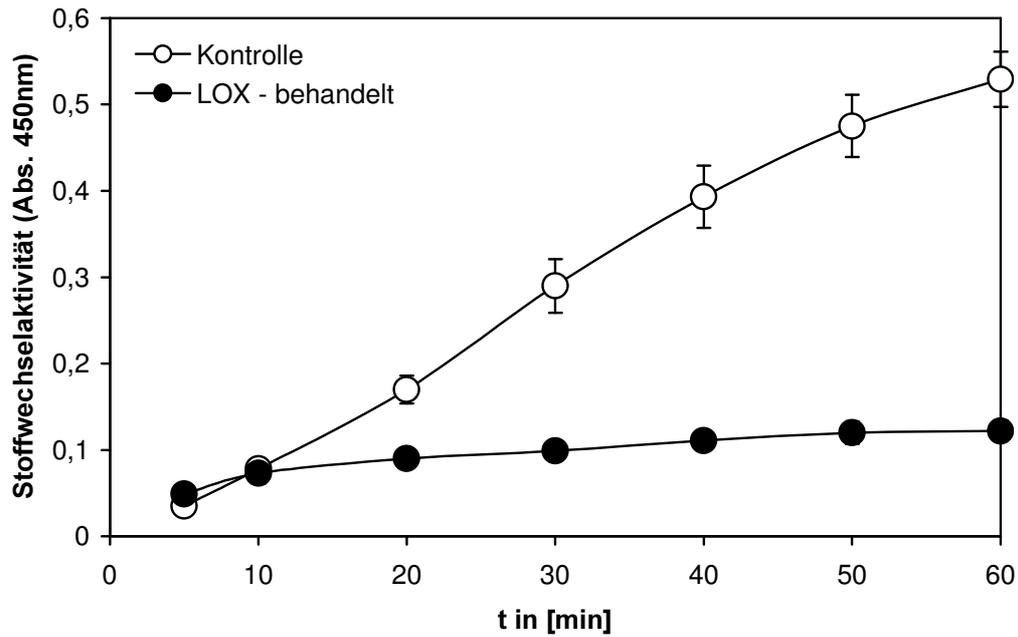


Abb.3.3.9-1 zeigt einen *chromogenen Assay (WST-1)* nach zellulärer Stoffwechselaktivität von Kontroll- (○) bzw. L-Lysin- $\alpha$ -Oxidase-behandelten (●; LOX; 10mU/ml) Jurkat-T-Zellen (fünf Replikate).

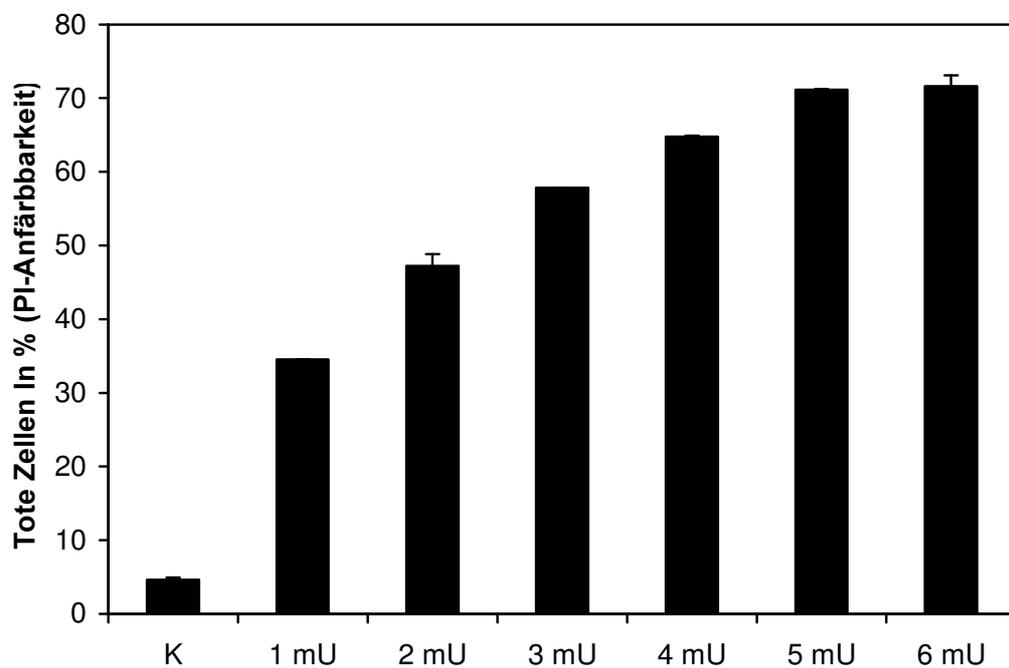
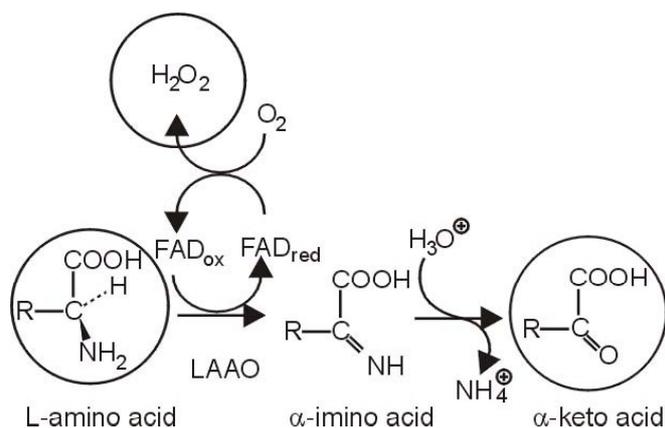


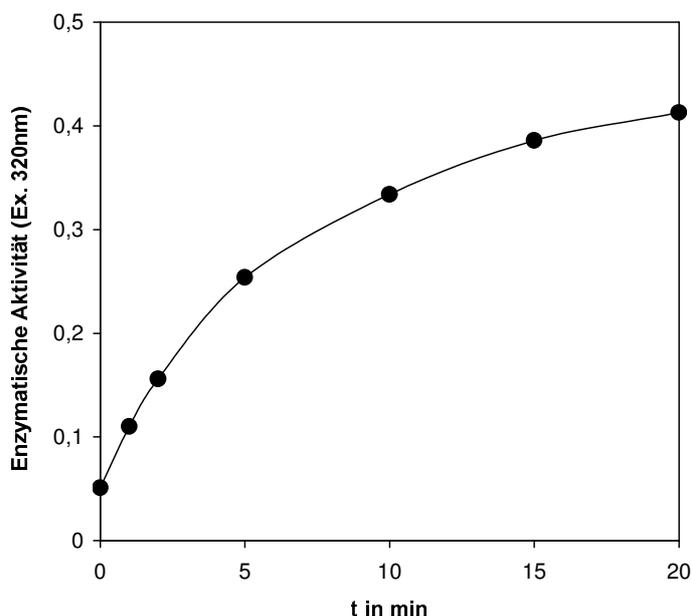
Abb.3.3.9-2 zeigt eine **durchflusszytometrische Analyse der PI-Anfärbarkeit von Jurkat-T-Zellen** nach achtstündiger Inkubation mit den angezeigten Mengen an L-Lysin  $\alpha$ -Oxidase (zwei Replikate).

Neben dem APIT-analogen Verlust von Stoffwechselaktivität und Membranintegrität, zeigten mit L-Lysin  $\alpha$ -Oxidase behandelte Zellen auch die typische Tinten-induzierte Morphologie (nicht gezeigt). Der Tinten-induzierte Zelltod kann also durch den Einsatz einer gleichartigen enzymatischen Aktivität in seinen wesentlichen Gesichtspunkten nachgeahmt werden.



**Abb.3.3.9-4** stellt die von der L-Lysin  $\alpha$ -Oxidase (bzw. einer anderen L-Aminosäure Oxidase [LAAO]) **katalysierte Reaktion** schematisch vor.

Das Schema der Abbildung 3.3.9-3 zeigt die von der L-Lysin  $\alpha$ -Oxidase katalysierte Reaktion mit allen Zwischen- und Endprodukten, unter anderem  $\alpha$ -Ketosäure. Nach Etablierung eines entsprechenden biochemischen Assays (MBTH) wurde deren Entstehung auch in der APIT-katalysierten Reaktion nachgewiesen (Abbildung 3.3.9-5). Es handelt sich bei dem zytolytischen Glykoprotein der Tinte von *A. punctata* also um eine L-Lysin/Arginin  $\alpha$ -Oxidase.



**Abb.3.3.9-5** zeigt einen **chromogenen Assay (MBTH) nach Formation von  $\alpha$ -Ketosäure** durch das aufgereinigte APIT.

### 3.4 Isolierung und proteinbiochemische Charakterisierung

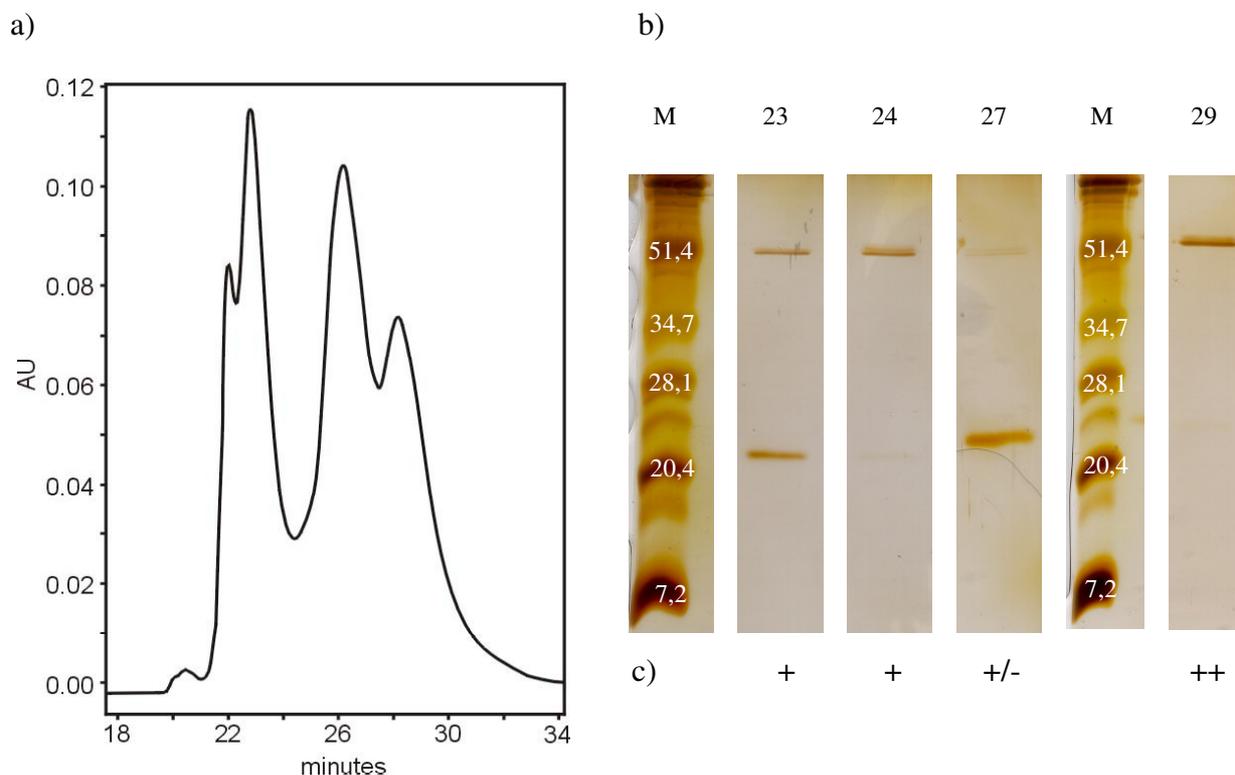
#### 3.4.1 Die Isolierung des zytotoxischen Bestandteils

Im vorangegangenen Abschnitt wurde ja bereits öfter auf die Verwendung des aufgereinigten APIT hingewiesen. Hier soll nun beschrieben werden, welche Ergebnisse am Ende der Isolierungsbemühungen standen.

Leitmotiv der Aufreinigung war die Zytotoxizität, ermittelt mit den oben beschriebenen Assays (Morphology, WST-1). Vorversuche hatten auf Beteiligung eines Proteins gedeutet. So nahm die toxische Aktivität während Erhitzung über 50 °C wesentlich ab, Techniken zur spezifischen Entfernung von Proteinen aus der Probe („Strataclean-Resin“) resultierten in vollständigem Aktivitätsverlust (nicht gezeigt). Die eingesetzten Methoden eigneten sich dementsprechend vorzugsweise zur Isolation von Proteinen.

Zunächst wurde die native Tinte durch Filtrierung von groben Verunreinigungen befreit und mittels einer Säulenzentrifugation konzentriert. Bei dieser wurden außerdem alle Bestandteile kleiner 15 kD in unterschiedlichem Maße (1,5 kD ~95%, 6 kD ~35% und 14 kD ~5%) abgetrennt. Da die zytotoxische Aktivität im Rückstand voll erhalten blieb, im Durchfluss dagegen nicht nachzuweisen war, ergab sich daraus bereits eine Mindestmolekülgröße von 15 kD. Es folgten eine zweistündige Dialyse gegen Tris-Puffer und ein weiterer Filtrierungsschritt (0,45 µm). Die so vorbereitete Probe wurde über eine erste Ionenaustauschsäule (FPLC) chromatographisch nach Ladungen aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen hinsichtlich ihres Proteingehalts (280 nm-Absorption), ihrer Proteinzusammensetzung (SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung) und ihrer zytotoxischen Aktivität (Mikroskopie, WST-1-Assay) analysiert. Von den 60 erhaltenen Fraktionen zeigten ausschließlich die Fraktionen 42 bis 48 ausgeprägte Zytotoxizität bei einer Verdünnung von 1/2700. Eine folgende SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass es sich bei ihnen noch um ein Gemisch verschiedener Proteine handelte. Deshalb wurden die aktiven Fraktionen gepoolt und über eine Gelfiltration nach Größen aufgetrennt. Von den neuerlich erhaltenen 28 Fraktionen zeigten nur die Fraktionen 10 bis 15 eine ausgeprägte Zytotoxizität bei einer Verdünnung von 1/2700. Auch diese Aufreinigung hatte allerdings noch keine homogenen Proteinisolate ergeben. Deshalb wurden die aktiven Fraktionen erneut gepoolt und über eine weitere Ionenaustausch-Chromatographie (HPLC) fraktioniert. Wieder wurde die 280 nm-Absorption, ein Maß des Proteingehaltes der gesammelten Fraktionen, aufgenommen und die Proteinzusammensetzung außerdem durch SDS-PAGE und

anschließende Silberfärbung sichtbar gemacht. Abbildung 3.4.1-1 zeigt das Elutionsprofil dieser letzten Ionenaustausch-Chromatographie in der 280 nm-Absorption. Für die Peak-Fractionen 23, 24, 27 und 29 (gesammelt von Minute 22 bis 23, 23 bis 24 usw.) sind außerdem das Ergebnis der SDS-PAGE/Silberfärbung und die zytotoxische Aktivität (im WST-1-Assay) dargestellt.



**Abb.3.4.1-1 a)** zeigt die **280 nm-Absorption** von zytotoxischen Fraktionen, die mittels Ionenaustausch-Chromatographie erhalten wurden. Hohe Absorptionswerte (AU, arbitrary units) korrelieren mit hohem Proteingehalt. In **b)** ist das Ergebnis einer **SDS-PAGE** (15%) /Silber-färbung der Fraktionen 23, 24, 27 und 29 min und in **c)** deren **zytotoxische Aktivität** im WST-1-Assay dargestellt (+ = vollständige Inhibition der Stoffwechselaktivität bei einer Verdünnung von 1:2700, +/- = 1:900, ++ = 1:8100). Die eingezeichneten Werte in b) geben das Molekulargewicht in kD der angefärbten Proteine an; M = Marker.

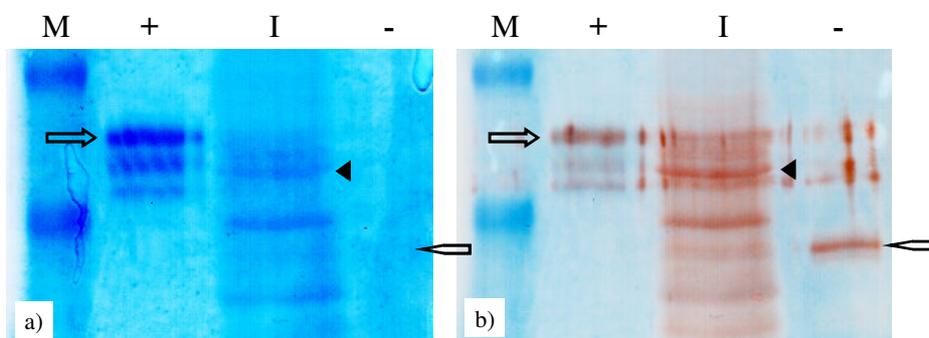
Bei diesem letzten Aufreinigungsschritt ließ sich nur in den zwischen Minute 23 und 31 eluierten Fraktionen eine wesentliche (vollständige Inhibition des WST-1-Umsatzes bei einer Verdünnung von 1/900) zytotoxische Aktivität nachweisen. In der 280 nm-Absorption dieses Bereiches finden sich insgesamt vier Peaks: in der 22. Minute, der 23. Minute, der 26. Minute

und der 28. Minute. In der SDS-PAGE kann man in den dazugehörigen Fraktionen drei Proteinbanden unterscheiden: eine obere (bzw. schwerere) bei etwa 50 - 60 kD (läuft auf einem 10%-igen Gel bei 60 kD), die in den Fraktionen 24 und 29 dominiert, und zwei untere (bzw. leichtere) bei etwa 20 - 25 kD. Die etwas größere dieser beiden bestimmt den Proteingehalt der Fraktion 27. Das 60 kD-Protein ist in der Fraktion 29 am stärksten enthalten, und damit korreliert auch eine ausgeprägte zytotoxische Aktivität dieser Fraktion. In der Fraktion 27 ist das 60 kD-Protein kaum, das 24 kD-Protein dagegen stark enthalten. Damit korreliert eine schwache Aktivität.

Zytotoxizität ist also qualitativ und quantitativ mit dem Vorhandensein des 60 kD-Proteins verbunden. Fraktionen, die nur dieses enthielten, wurden deshalb als reines APIT betrachtet.

### 3.4.2 Sind Zuckerseitenketten beteiligt?

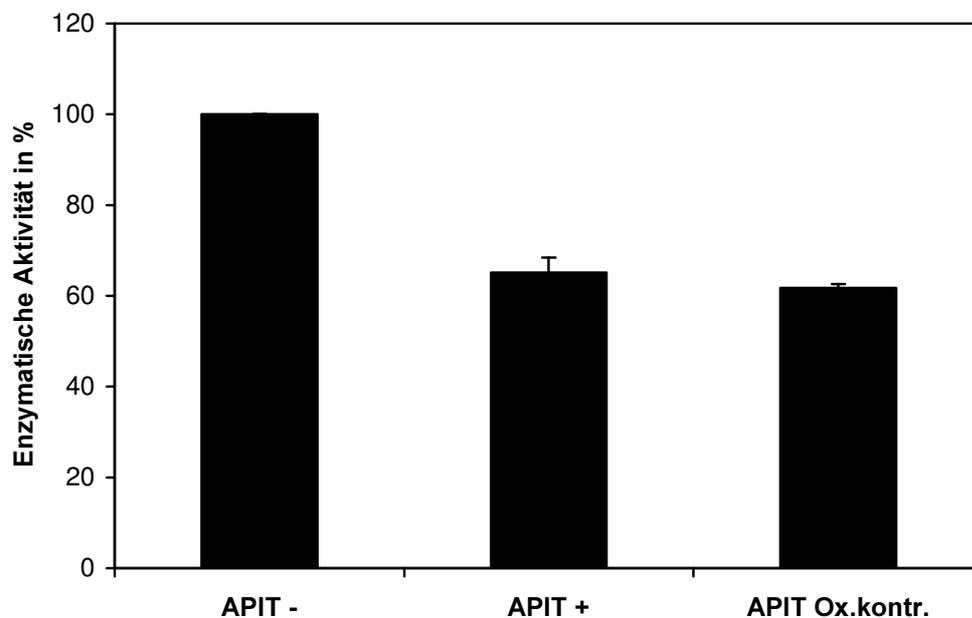
Da die in der Literatur bereits beschriebenen zytolytischen Aplysienproteine entweder eine schwache oder eine ausgeprägte Glykosilierung zeigen, sollte dieser, möglicherweise für die Funktionalität entscheidende Aspekt auch bei APIT untersucht werden. Dazu wurde native Tinte über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran geblottet. Dann wurden Zucker-Seitenketten in einer Reaktion mit Periodat in Aldehyde überführt. Diese wiederum wurden über ein Hydrazid mit Digoxigenin gekoppelt, welches von spezifischen Antikörpern erkannt wird. Proteine selbst wurden parallel mit FLUOS gekoppelt, für das ebenfalls ein spezifischer Antikörper existiert. In einer anschließenden Farbreaktionen konnten schließlich Bereiche der Antikörperbindung auf der Membran sichtbar gemacht und so Glykosilierungen und/oder Proteine nachgewiesen werden. Die Abbildung 3.4.2-1 zeigt die Reproduktion solch eines Blots.



**Abb.3.4.2-1** zeigt einen *Westernblot nach glykosilierten Proteinen*. *a)* Blaufärbung zeigt Glykosilierung an, *b)* Braunfärbung zeigt Proteine an. M = Marker (91 kD und 51,4 kD-

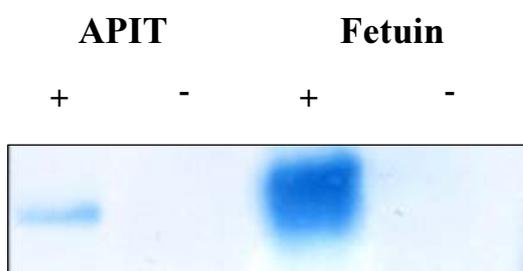
Banden), + = Positivkontrolle (Fetuin), I = native Tinte, - = Negativkontrolle (Kreatinase). Ungefüllte Pfeile verweisen auf die Bande des vollständig glykosilierten Fetuin, gefüllte Dreiecke auf die Bande des 60 kD-Proteins der nativen Tinte und ungefüllte Spitzen auf die Bande der unglykosilierten Kreatinase.

Wie erwartet, zeigt der Test auf Glykosilierung eine stark positive Reaktion mit Fetuin, einem ausgeprägt glykosilierten Kontrollprotein. Creatinase dagegen reagiert nicht, was ihrem Einsatz als Negativkontrolle entspricht. Beide Kontrollen werden ordnungsgemäß beim Test auf Protein angefärbt. Das 60 kD-Protein der Tinte ist etwa in gleicher Menge wie die beiden Kontrollen enthalten, das zeigt die Reaktion gegen Protein. Der Test auf Glykosilierung fällt ebenfalls positiv aus, allerdings ist die Färbung eher schwach. APIT lässt sich hinsichtlich seines Zuckeranteils also zusammen mit den ebenfalls spärlich glykosilierten Dolabellin P und Dactylomelin P eingruppiieren. Auch andere Proteine der nativen Tinte zeigen eine Glykosilierung. Ein anschließender Verdau von nativer Tinte mit N-Glykosidase F resultierte weder in einem Aktivitätsverlust noch einer wahrnehmbaren Änderung des Molekulargewichtes von APIT oder einem Verlust der Glykosilierung (nicht gezeigt). Der Zuckerrest von APIT ist mit dem Protein also wahrscheinlich über ein Sauerstoffmolekül verknüpft (O-Verknüpfung).



**Abb. 3.4.2-2 a)** zeigt einen **chromogenen Assay (HRP/ABTS) nach  $H_2O_2$ -Produktion** von APIT ohne (-) bzw. nach (+) Behandlung mit Periodat und Disulfit. Gezeigt sind die relativen Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichungen.

Ein erstes, recht einfaches Experiment, um eine funktionelle Beteiligung von Zuckergruppen an der toxischen bzw. enzymatischen Aktivität von APIT zu überprüfen, ist deren Zerstörung mit Periodat (siehe oben). Dazu wurde aufgereinigtes APIT mit Periodat inkubiert und überschüssiges Oxidationsmittel anschließend mit Disulfit neutralisiert. Schließlich wurde die verbliebene enzymatische Aktivität mittels eines HRP/ABTS-Assays nach  $H_2O_2$ -Generierung bei Inkubation mit L-Lysin aufgenommen. Um einen anderen Einfluss als die spezifische Zerstörung von Zuckerseitengruppen auf die Aktivität auszuschließen, wurde in einem parallelen Ansatz mit Periodat gearbeitet, das schon zuvor mit Disulfit neutralisiert worden war („APIT Oxidationskontrolle“). Abbildung 3.4.2-2 zeigt das Ergebnis.



*In b) ist eine **Kontrolle der Oxidationsbedingungen** dargestellt: Nur erfolgreich oxidierte (und damit zerstörte) Zuckerseitenketten lassen sich in der oben beschriebenen Antikörperreaktion nachweisen (blau). + = oxidiert, - = Oxidationskontrolle.*

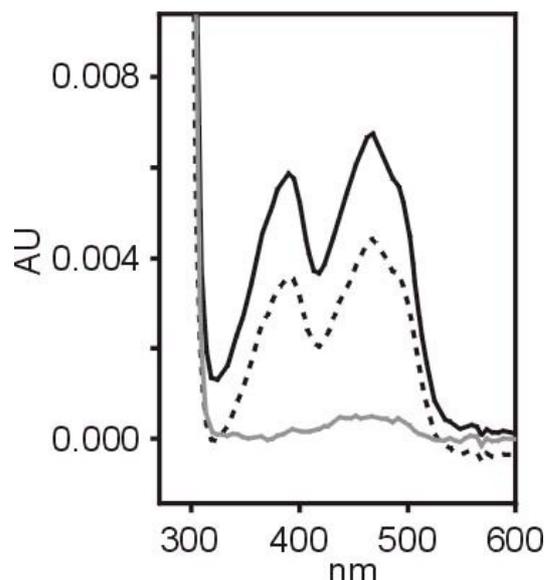
Zwar sinkt die enzymatische Produktion von  $H_2O_2$  durch APIT nach erfolgreicher Oxidation mit Periodat auf etwa zwei Drittel der ursprünglichen ab, jedoch wird dieser Effekt auch in der nicht oxidierten Kontrolle erreicht. Weitergehende Experimente mit einer Titrierung von Disulfit zeigten schließlich dessen Verantwortlichkeit für den Effekt (nicht gezeigt). Das zur Neutralisierung von Periodat unerlässliche Disulfit interferiert nämlich mit dem HRP/ABTS-Assay.

Ein Beweis für die funktionelle Beteiligung der nachgewiesenen Zuckerseitengruppen an der enzymatischen bzw. zytotoxischen Aktivität von APIT ließ sich mit der angewendeten Methode also nicht erbringen. Auch die für Aplysianin P beschriebene Inhibition der Zytolyse durch Anwesenheit hoher Konzentrationen des negativ geladenen Zuckers Sialinsäure (Yamazaki, 1989) ließ sich nicht nachvollziehen.

### 3.4.3 Der Kofaktor Flavin

Die Charakterisierung der zytotoxischen Aktivität (3.3) hatte eine funktionelle Analogie von APIT mit der L-Lysin  $\alpha$ -Oxidase von *Trichoderma sp.* aufgezeigt. Bei dieser handelt es sich um ein Flavoprotein, das heißt Kofaktor der Aktivität ist ein Flavin - FAD oder FMN. Es

drängte sich deshalb die Frage auf, ob auch APIT auf diesen Kofaktor angewiesen ist, der sich übrigens recht einfach nachweisen lässt. Flavoproteine zeigen nämlich ein charakteristisches Absorptionsspektrum mit Doppelpeak etwa bei 390 und 470 nm. Tatsächlich ergab eine nachträgliche Analyse der bereits in 3.4.1 gezeigten Absorptionmessungen ein Vorhandensein des gesuchten Doppelpeaks in den Fraktionen, in denen sich auch das zytotoxische 60 kD-Protein fand (siehe Abbildung 3.4.3-1).

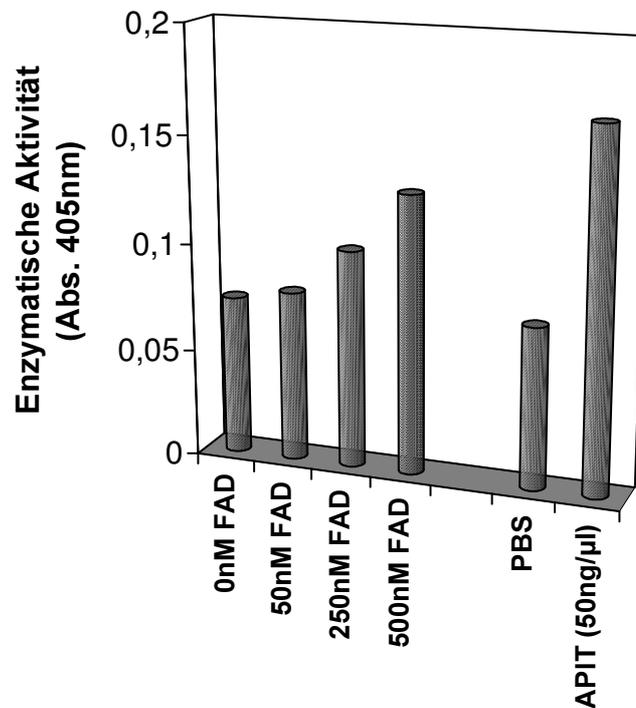


**Abb.3.4.3-1 zeigt Absorptionsspektren** der, in 3.4.1 bereits dargestellten Fraktionen aus einer Ionenaustausch-Chromatographie von Tinte. Ein Doppelpeak bei 390/470 nm ist charakteristisch für proteingebundene Flavine. Fraktion 24 = dunkel, 27 = hell, 29 = unterbrochen.

In einem nächsten Experiment sollte nun geklärt werden, um welches Flavin – FAD oder FMN – es sich bei dem APIT-assoziierten handelt. Für diese Entscheidung bietet sich folgendes Vorgehen an: Es ist möglich, nichtkovalent gebundenes Flavin durch starkes Erhitzen von seinem Apoenzym zu trennen. Dies geht zwar mit einer irreversiblen Denaturierung des Apoenzyms einher, man erhält das freie Flavin aber dafür in einem physiologischen Puffer. Eine andere Technik, um Apoenzym und Flavin voneinander zu trennen, ist eine saure Ammoniumsulfatfällung. Dabei bleibt der Kofaktor im sauren, Ammoniumsulfat gesättigten Überstand, während das Apoenzym unlöslich wird und ausfällt. Einige einfache Flavoproteine lassen sich anschließend wieder in physiologischem Puffer lösen und erlangen nach Zugabe von Kofaktor ihre volle Funktion zurück. Das ist der Fall bei dem FAD-abhängigen Enzym Glukose Oxidase (GOX). Ihr Apoenzym (ApoGOX) erhält nach Zugabe von FAD die enzymatische Aktivität, den Umsatz von Glukose und die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zurück.

Erhitzt man nun ein Flavoprotein mit unbekanntem Flavin und inkubiert den Überstand anschließend mit ApoGOX, so zeigt deren Reaktivierung, die recht einfach im HRP/ABTS-Assay meßbar ist, die Identität auf.

Abbildung 3.4.3-2 zeigt das Resultat, wendet man das beschriebene Vorgehen auf APIT an. Der Kofaktor ist FAD.

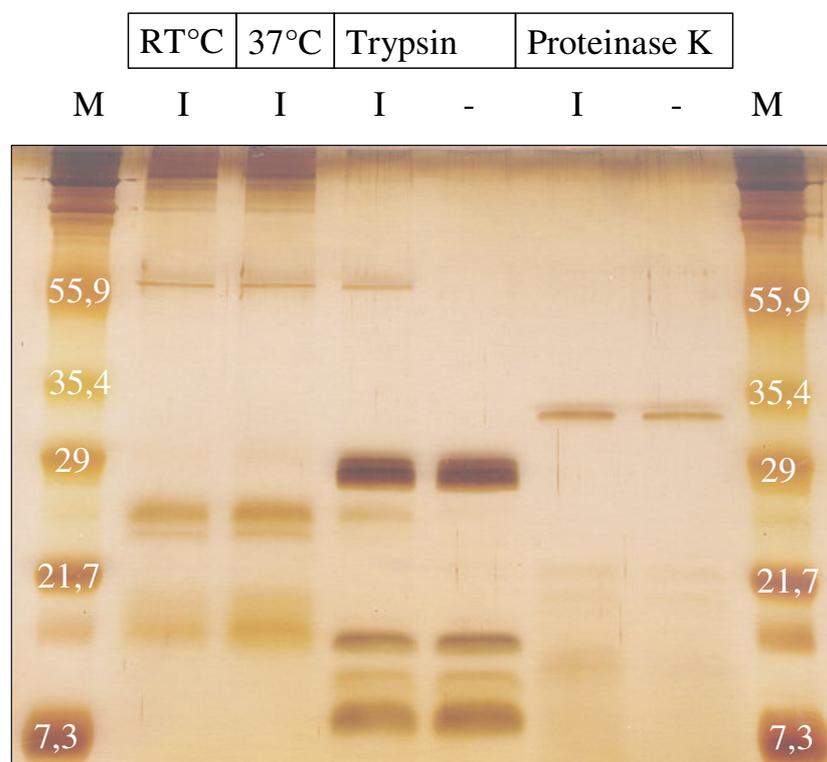


*Abb.3.4.3-2 zeigt einen chromogenen Assay (HRP/ABTS) nach Enzymaktivität einer reaktivierten Apo-GOX-Präparation. Der PBS-Wert entspricht dem Hintergrund des Assays.*

### 3.4.4 „Schwer verdaulich“

Eine Inkubation von Proteinen mit proteolytischen Enzymen führt zu deren Zerlegung in Peptide bzw. einzelne Aminosäuren. Da proteolytische Enzyme bestimmte Aminosäurefolgen erkennen und spezifisch schneiden, im Falle von Trypsin beispielsweise nach Lysin und Arginin, hängt die Größe der erhaltenen Fragmente von der Häufigkeit der Schnittstellen in der Aminosäurefolge ab. Die Inkubation eines unbekanntes Toxins mit proteolytischen Enzymen kann Aufschluss über seine molekulare Identität geben: Ist der toxische Effekt beeinflussbar, so ist die Beteiligung eines Proteins sicher. Zeigt sich dagegen kein Einfluss, so spricht dies nicht unbedingt gegen ein Protein. Es gibt Enzyme, die vollständig proteasenresistent sind, z.B. viele Flavoproteine gegenüber Trypsin, bei anderen steckt die biologische Aktivität in einem einzelnen Teilpeptid, z.B. antibiotische Peptide.

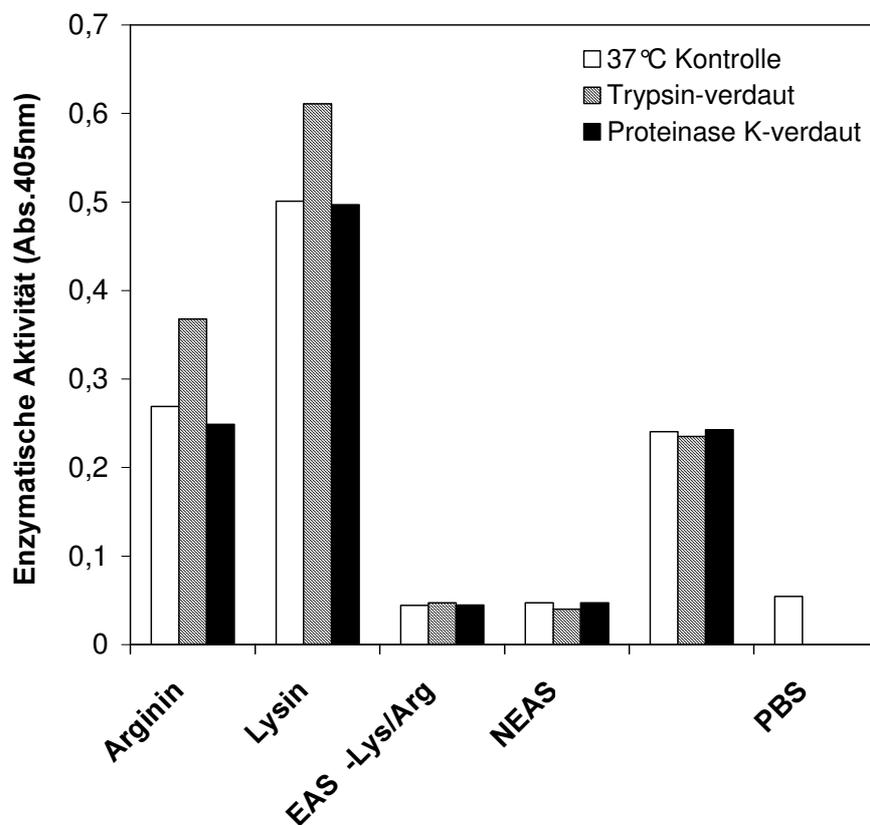
Die Abbildung 3.4.4-1 zeigt das Ergebnis eines zweistündigen proteolytischen Verdau von nativer Tinte mit den Enzymen Trypsin und Proteinase K bei 37°C. Um Banden, die von den Enzymen bzw. deren Inhibitoren stammen, auf dem silbergefärbten SDS-PAGE eindeutig zuordnen zu können, sind diese parallel ohne Zugabe von nativer Tinte aufgetragen. Der Verdau mit Proteinase K erfasst restlos alle Proteine der nativen Tinte. Übrig bleiben nur Banden, die ebenfalls in der Enzymkontrolle enthalten sind, also aus dessen Präparation stammen. Beim Verdau mit Trypsin dagegen bleibt ein 60 kD Protein erhalten. Alle anderen Proteine der nativen Tinte werden proteolytisch zerlegt. Auch das aufgereinigte 60 kD Protein (siehe 3.4.1) weist diese Resistenz gegenüber Proteolyse mit Trypsin auf (nicht gezeigt).



**Abb.3.4.4-1** zeigt ein 15%-iges **SDS-PAA-Gel nach Silberfärbung**. M = Marker, I = native Tinte. Native Tinte wurde zwei Stunden lang bei den angezeigten Temperaturen oder bei 37 °C mit Trypsin oder Proteinase K inkubiert. Zur Kontrolle (-) wurden die eingesetzten Proteasen ohne Zugabe von nativer Tinte inkubiert.

Soweit zur Integrität des hochmolekularen Proteins. Ein ganz anderes Bild ergibt sich bei einem funktionellen Assay der Enzymaktivität nach proteolytischem Verdau. Parallel zu dem gezeigten SDS-PAA-Gel wurden die Aktivität und Substratspezifität der nativen Tinte nach Verdau in einem HRP/ABTS-Assay analysiert. Überraschenderweise bleibt beides - sowohl

bei Inkubation mit Trypsin als auch mit Proteinase K - voll erhalten. Die Aktivität steigt nach Trypsinverdau sogar noch an (siehe Abbildung 3.4.4-2).

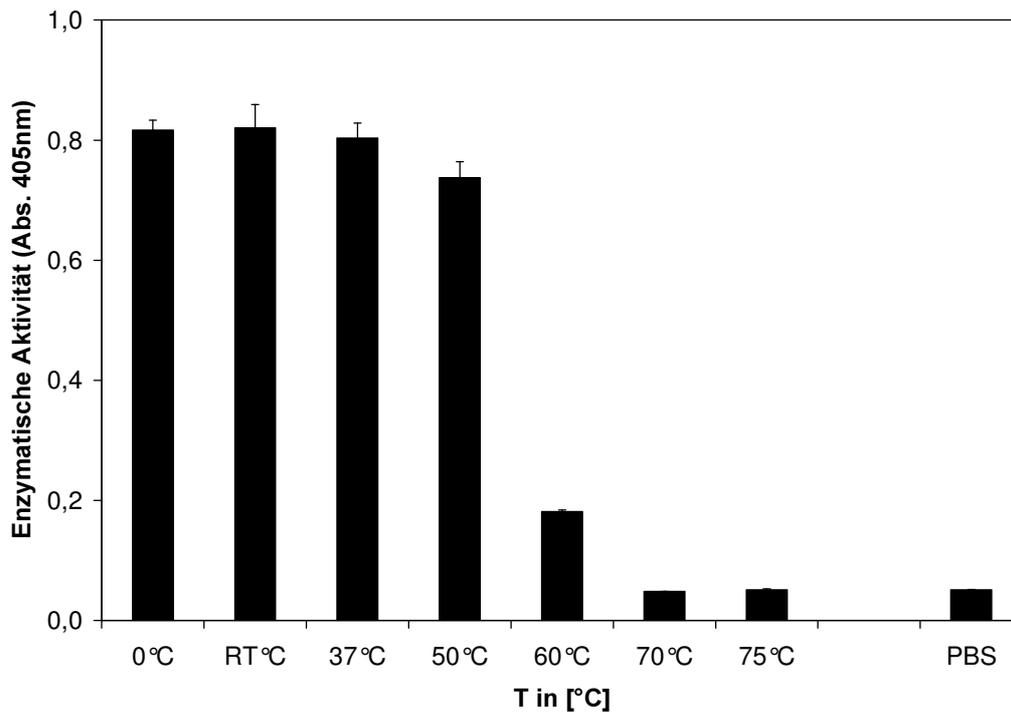


**Abb.3.4.4-2 zeigt einen chromogenen Assay (HRP/ABTS) nach Enzymaktivität von nativer Tinte nach proteolytischem Verdau.** Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. EAS = essentielle Aminosäuren außer Lysin und Arginin, NEAS = nicht-essentielle Aminosäuren. Der PBS-Wert entspricht dem Hintergrund des Assays.

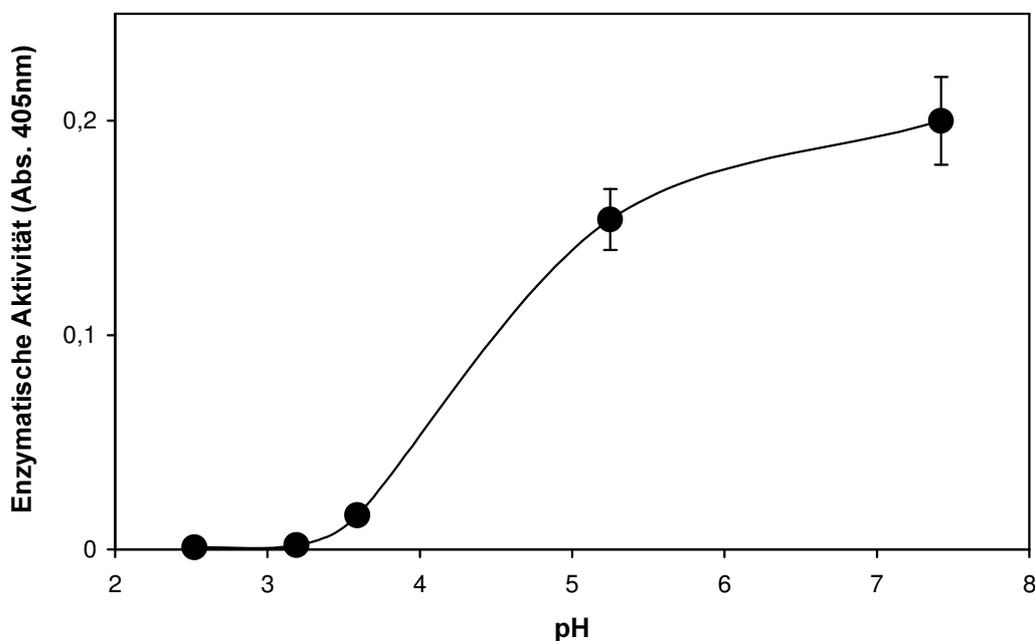
Die eben beschriebenen Verdauexperimente wurden auch mit der L-Lysin  $\alpha$ -Oxidase von *Trichoderma sp.* wiederholt, um zu überprüfen, ob die Proteasenresistenz von APIT möglicherweise ein unterscheidendes Merkmal ist. Die Befunde waren bei beiden Enzymen aber identisch (nicht gezeigt).

### 3.4.5 Stabilität und Sensitivität

Bereits erwähnt wurde ja die Hitzesensibilität von nativer Tinte bzw. aufgereinigtem APIT. Die Abbildung 3.4.5-1 stellt die Abnahme der enzymatischen Reaktion nach einer zehnmütigen Inkubation bei den angegebenen Temperaturen dar. Der stärkste Abfall erfolgt zwischen 50 und 60 °C (auf ~25% des RT °C-Wertes, nach Abzug des Hintergrundes). Eine Inkubation bei 70 °C zerstört die Aktivität vollständig.



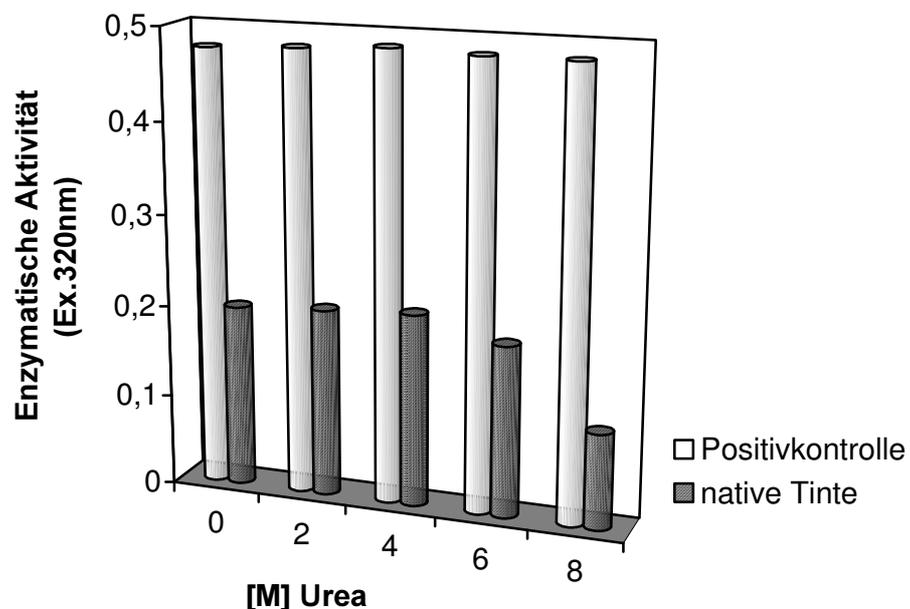
*Abb.3.4.5-1 zeigt einen chromogenen Assay (HRP/ABTS) nach Enzymaktivität von aufgereinigtem APIT nach zehnminütiger Inkubation bei den angezeigten Temperaturen. Angegeben sind die Mittelwerte von drei Replikaten und deren Standardabweichungen. Der PBS-Wert entspricht dem Hintergrund des Assays.*



*Abb.3.4.5-2 zeigt einen chromogenen Assay (HRP/ABTS) nach Enzymaktivität von aufgereinigtem APIT nach zehnminütiger Inkubation bei den angezeigten pH-Werten. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Replikaten und deren Standardabweichungen.*

Analog wurde die Empfindlichkeit von aufgereinigtem APIT gegenüber einem Absenken des pH-Wertes in einem Kaliumphosphat-Puffersystem aufgenommen. Das Ergebnis findet sich in Abbildung 3.4.5-2. Nach zehnminütiger Inkubation bei pH 3.2 ist die Aktivität vollständig erloschen.

Ein weiteres außergewöhnliches Merkmal von APIT ist - neben seiner Trypsinresistenz - die Unempfindlichkeit gegen denaturierende Konzentrationen von Harnstoff. Dieser ist ein gebräuchliches Mittel, um durch Interaktion mit Wasserstoffbrücken die Faltung von Proteinen aufzulösen. Eine 30-minütige Inkubation von nativer Tinte in 6 M Harnstoff zeigt noch keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität (hier bestimmt mit dem MBTH-Assay nach  $\alpha$ -Ketosäuren-Produktion). Erst darüber hinaus findet eine Einschränkung der anschließenden enzymatischen Reaktion statt (siehe Abbildung 3.4.5-3).



*Abb.3.4.5-3 zeigt einen chromogenen Assay (MBTH) nach Enzymaktivität von aufgereinigtem APIT nach 30-minütiger Inkubation in den angezeigten Konzentrationen von Urea bei RT °C. Zur Kontrolle des Assays ist parallel ein  $\alpha$ -Ketosäurestandard bei den unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen quantitativ bestimmt worden.*

## 3.5 Klonierung und Reproduktion von APIT

### 3.5.1 Vom Peptid zum Primer

Der erste Schritt auf dem Weg zur Klonierung der cDNA eines Proteins ist seine Isolierung in möglichst reiner Form. Der Weg dahin wurde für APIT ja bereits in 3.4.1 beschrieben. Die aus der Aufreinigung erhaltene APIT-Präparation wurde über SDS-PAGE weiter aufgetrennt, die Proteinbande mit Coomassie angefärbt und aus dem Gel ausgeschnitten. Nach einem vollständigen tryptischen Verdau des denaturierten Proteins wurden die einzelnen Peptide über eine „reverse phase“-HPLC separiert und die so erhaltenen Fraktionen massenspektrometrisch (MALDI) analysiert. Mit Fraktionen, die nur eine Masse bzw. ein Peptid enthielten, wurde eine N-terminale Sequenzierung (Edman) des Peptids durchgeführt. Fraktionen mit mehreren Massen bzw. Peptiden wurden über ESI-MS sequenziert.

A	D(Q)GI(V)CRNQ(R)RQ(P)
B1	DSGLDIAVFEYS DR
B2	VISELGLTPK
B3	XGDVPYDLSPEEK
B4	ATQAYAAVRPI PASK
B5	DALFFQMYD
B6	SEASGDYILIAS YADGLK

*Abb. 3.5.1-1 zeigt eine Zusammenstellung der gefundenen Peptidsequenzen nach tryptischer Spaltung des denaturierten APIT und anschließender N-terminaler Sequenzierung der Fragmente. A = Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung des nativen Proteins, B = Ergebnisse einzelner tryptischer Peptide.*

Anhand der gefundenen Peptidsequenzen ist es möglich, Primer für eine PCR zu gestalten. Mit dieser kann eine Kopie der genetischen Information für APIT, nämlich die in cDNA umgeschriebene mRNA, beliebig vervielfältigt und anschließend mittels molekularbiologischer Methoden analysiert werden.

Nun gibt es dabei zwei grundsätzliche Probleme: Erstens ist normalerweise nicht bekannt, welchem Bereich des Proteins die gefundene Peptidsequenz zuzuordnen ist. Der beschriebene Weg erbringt Sequenzabschnitte in loser Reihenfolge, unabhängig von ihrer tatsächlichen Folge im nativen Protein. Das bedeutet, die Größe des spezifischen PCR-Produktes ist nicht voraussagbar, was bei Erhalt von mehreren, darunter auch unspezifischen, eine Auswahl des richtigen erschwert.

Das zweite Problem liegt in der Degeneriertheit des genetischen Codes. Will heißen, eine Aminosäuresequenz ist nicht eindeutig in eine cDNA-Sequenz übersetzbar, weil für eine beliebige Aminosäure mehrere Basentriplets codieren. Im schlimmsten Fall, z.B. Serin, gibt es sechs verschiedene Codierungs-Möglichkeiten. Will man nun auf der Basis einer Aminosäuresequenz einen Primer gestalten, muss man alle diese verschiedenen Möglichkeiten in dessen Sequenz mit einbeziehen. Für das Teilpeptid „SEASGD“ ergeben sich zum Beispiel  $6 \times 2 \times 4 \times 6 \times 4 \times 2 = 2304$  Möglichkeiten der Codierung auf DNA-Ebene. Der resultierende Primer müsste auf 18 Positionen alle diese Möglichkeiten einbeziehen, wäre also entschieden degeneriert und damit sehr unspezifisch in seiner Bindung.

Die Kunst des Primerdesigns besteht nun darin, trotz der beschriebenen Unwegbarkeiten einen möglichst „passenden“ Primer zu gestalten: Dieser muss so spezifisch wie möglich sein und trotzdem alle wahrscheinlichen Möglichkeiten einschließen. Glücklicherweise gibt es dabei einige Tricks und Kniffe. Zunächst sucht man sich unter den Peptiden natürlich dasjenige aus, das die geringste Zahl an Kodierungsmöglichkeiten aufweist. Dies ist im Falle von APIT in der Peptidsequenz „VFEYSD“ realisiert: „nur“ 384 Möglichkeiten. Nun muss man wissen, dass es für den genetischen Code, wie für jede andere Sprache auch, „Dialekte“ und „Ausspracheregeln“ bei den verschiedenen Organismen gibt. So bevorzugt jeder andere Basentriplets für eine beliebige Aminosäure (Codon-Bias). Außerdem determiniert die vorangegangene Base in einigen Fällen die folgende und umgekehrt. Deshalb ist es sehr nützlich, anhand bereits clonierter Sequenzen die Codon-Bias eines Organismus auszumachen.

Mit den Aplysien-„Sprachregelungen“ reduziert sich die Zahl der wahrscheinlichsten Codierungsmöglichkeiten für das genannte Peptid immerhin auf 16. Fügt man schließlich an der besonders unwägbarsten dritten Position des Serin-Triplets noch die „Jokerbase“ Inosin ein, die mit allen vier Basen paaren kann, bleiben nur noch vier Möglichkeiten übrig. Die Sequenz des so gestalteten Primers „V-FEY3 DTS 5'“ ist in Abbildung 3.5.1-2 gezeigt.

V	F	E	Y	S	D	R	
tc	gtg	ttc	ga(a/g)	tac	tc(i)	ga(t/c)	cg

**Abb.3.5.1-2** zeigt die **Basenfolge des APIT-spezifischen Primers „V-FEY3 DTS 5'“** und darüber die jeweils codierte Aminosäure. Die ersten beiden Basen dienen der späteren DiTriSEC.

### 3.5.2 „most wanted“ - ein Steckbrief der genetischen Information

Mit dem nötigen „Rüstzeug“ in Form eines mehr oder weniger spezifischen 5'-Primers wurde nun die Klonierung eines ersten cDNA-Fragments unternommen. Es wurde ja bereits erwähnt, dass dessen zu erwartende Größe noch unbekannt war. Man kann anhand der Proteinmasse aber zumindest eine Maximalgröße definieren: APIT hat auf dem SDS-PAGE ein Molekulargewicht von rund 60 kD (siehe 3.4.1). Bei einem mittleren Aminosäuregewicht von 110 D sollte es also aus rund 540 Aminosäuren zusammengesetzt sein. Ein hoher Anteil von Zuckerseitenketten am Proteingewicht ist nach der in 3.4.2 gezeigten spezifischen Färbung nicht anzunehmen. Der kodierende Teil der mRNA bzw. cDNA sollte also im Bereich von 1600 bp liegen. Dazu kommen noch die nicht kodierenden Bereiche (5' und 3') und ein poly-A-Schwanz variabler Größe. Insgesamt macht es also Sinn, von einer Maximalgröße auszugehen, die im Bereich von 1800 – 2000 bp liegt.

Zunächst wurde RNA aus verschiedenen Geweben (Mantel, Nidamental- und Opaldrüse) von *Aplysia punctata* isoliert. Ohne vorherige mRNA-Selektion wurde diese dann mittels eines „getagten“ Oligo-dT-Primers in einer Reverse Transkriptase Reaktion in cDNA umgeschrieben. Die „Tag“-Sequenz, die so in die cDNA eingeführt wurde, diente in der folgenden PCR als Bindungsstelle für einen spezifischen 3'-Primer.

Tatsächlich resultierte eine PCR mit dem APIT-spezifischen 5'-Primer „V-FEY 3 DTS 5'“ und der aus Mantel-Gewebe gewonnenen cDNA in der Vervielfältigung eines ~1600 bp Fragments inklusive Poly-A-Schwanz (nicht gezeigt). Die Reaktion mit cDNA aus den anderen Geweben blieb dagegen ohne Ergebnis. Das cDNA-Fragment wurde mit Hilfe der DiTRiSEC-Technik in den pCMV-Vektor kloniert und sequenziert. In der ermittelten Sequenz waren alle in 3.5.1 aufgeführten Peptide von APIT kodiert. Die gefundene cDNA war also die gesuchte.

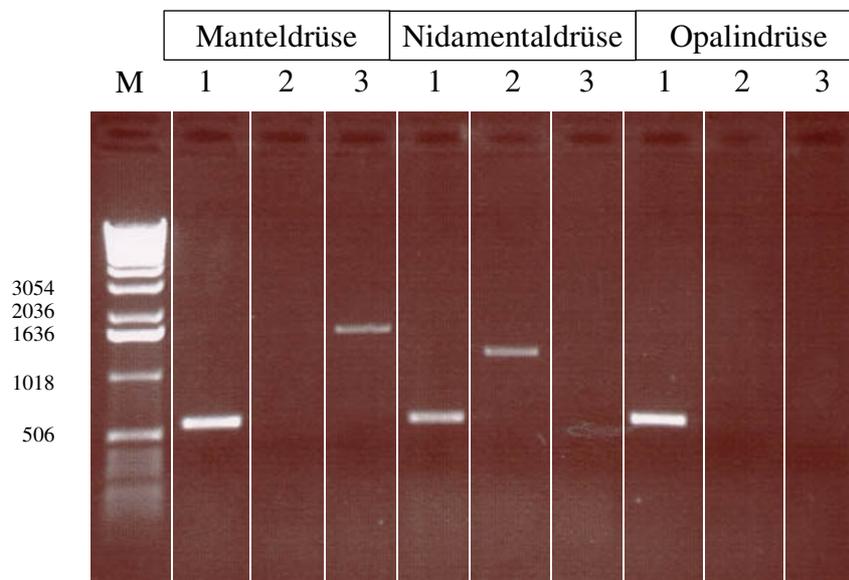
Auf Grundlage der ersten Teilsequenz wurden nun mehrere spezifische 3'-Primer gestaltet und mit der 5'-RACE-Technik der 5'-Terminus der APIT-cDNA vervielfältigt (nicht gezeigt). Auch dieser wurde kloniert und anschließend sequenziert. In der resultierenden Sequenz fand sich der via Edman-Abbau ermittelte N-terminus des nativen APIT, auch dieses Vorgehen hatte also ein spezifisches cDNA-Teilstück erbracht.

### 3.5.3 Die cDNA stammt aus dem Mantelgewebe

Die beiden cDNA-Fragmente enthielten das Start- (ATG) und das Stopcodon (TAA). Die unmittelbar an diese anschließenden kodierenden Sequenzbereiche dienten im folgenden als

Bindungsstellen für Primer, um mit einer PCR die komplette cDNA von APIT vervielfältigen zu können. Wieder wurde die Reaktion mit cDNA verschiedener Gewebe durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden Primer gegen ein kurzes cDNA-Fragment eines unbekannten Gens eingesetzt, das aus einer früheren Klonierung stammte („Apl.Frag 1“). Dieses lässt sich in allen untersuchten Aplysiengeweben nachweisen. Parallel sollte außerdem die Gewebeverteilung von cDNA eines anderen, in der Literatur beschriebenen zytotoxischen Aplysienproteins untersucht werden: „Cyplasin“, ein 56 kD Protein, wurde ebenfalls von *A. punctata* isoliert, allerdings aus dem Mucus der Albumen Drüse, einem Bestandteil der Nidamentaldrüse (Petzelt, 2002). Sein zytotoxischer Effekt liegt in einer Aktin-Depolymerisierung.

Abbildung 3.5.4-1 zeigt eine gelelektrophoretische Analyse der so vervielfältigten cDNA-Fragmente.



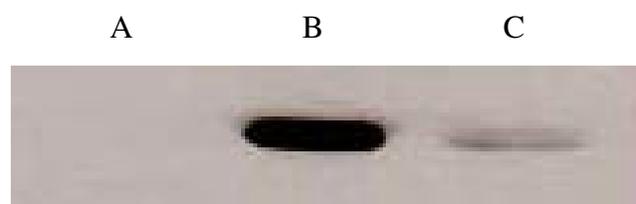
**Abb. 3.5.4-1** zeigt ein 0,8 %iges Agarosegel, auf dem die nach Größe getrennte DNA mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurde. 1 = Primerkombination für Vervielfältigung von „Apl.Frag 1“, 2 = Primerkombination für Vervielfältigung eines „Cyplasin“-Fragments, 3 = Primerkombination zur Vervielfältigung von „APIT“. Links ist die Basenzahl (bp) der Marker-DNA-Fragmente angegeben.

Tatsächlich lässt sich die Positivkontrolle in allen eingesetzten Geweben nachweisen. Das Cyplasin-Fragment findet sich in der erwarteten Größe von rund 1250 bp nur nach einer PCR mit cDNA aus der Nidamental Drüse - ebenfalls ein zu erwartendes Ergebnis. Die für APIT

kodierende cDNA findet sich dagegen ausschließlich im Gewebe des Mantels, dem Ort der Tinten-Sekretion. Ihre Größe lässt sich auf dem Gel auf etwa 1600 bp abschätzen.

Die komplette cDNA wurde nun mittels DiTriSEC-Technik in einen prokaryotischen Expressionsvektor (pGEM-4T3) kloniert und durchsequenziert. Die Besprechung der DNA-Sequenz folgt im nächsten Abschnitt. Außerdem fand bereits eine heterologe Expression in *E.coli* statt, die ein rekombinantes Protein mit der richtigen Größe herstellten (nicht gezeigt). Die verschiedenen Assays nach Enzymaktivität (HRP/ABTS, MBTH) verliefen allerdings negativ (nicht gezeigt).

Prokaryoten sind keine geeigneten Systeme zur Expression von glykosilierten Proteinen oder jenen, bei denen intramolekulare Disulfidbrücken in spezifischer Weise geknüpft sein müssen. Auch eukaryotische Signalpeptide, möglicherweise wichtig für die Proteinreifung, werden nicht erkannt und umgesetzt. Da dies alles aber Faktoren sein können, die die Enzymaktivität von APIT maßgeblich bestimmen, wurde die cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor (pCMV-Tag1) subkloniert. Transfektion von Mammalia-Zellen mit diesem Vektor induziert eine Produktion des gewünschten Proteins incl. einer Markierungstelle für Antikörper (myc-Tag). Abbildung 3.5.4-2 zeigt die Autoradiographie eines Westernblots gegen diese Markierungstelle. Aufgetragen sind Zellysate von 293-T-Zellen, einer humanen Nierenzelllinie. Diese wurden mit zwei cDNA-Konstrukten von APIT (mit und ohne Signalpeptid, siehe unten) bzw. dem leeren Vektor transfiziert. Die Kontrolle ist negativ, das bedeutet, nachgewiesene Banden stammen nicht vom endogenen c-myc-Protein. In den transfizierten Zellen lässt sich ein Protein nachweisen, das mit einem spezifischen Anti-myc-Antikörper reagiert und auf dem Blot etwa eine Größe von 60 kD erkennen lässt. Anschließend Assays nach Enzymaktivität mit den dargestellten Lysaten verliefen bislang jedoch negativ (nicht gezeigt).



**Abb.3.5.4-2** zeigt einen **Ausschnitt eines Westernblots** nach anti-myc-reaktiven Proteinen. *A = Kontrolltransfektion, B = Transfektion mit einem APIT (incl. Signalsequenz) – myc – Konstrukt, C = Transfektion mit einem APIT (ohne Signal) – myc – Konstrukt.*

### 3.5.5 Eine Sequenzanalyse bestätigt die zytologischen und biochemischen Befunde

In der Sequenzanalyse erwies sich die klonierte cDNA als open reading frame (ORF) von 1608 bp, der für ein Protein kodiert, das aus 535 Aminosäuren besteht. Mittels einer Software (Clone Manager 5, Scientific & Educational Software) lassen sich theoretisches Molekulargewicht und pI dieses Proteins mit 60,167 kD bzw. pI 4.59 vorhersagen. Diese Werte stimmen mit den experimentell durch Gelelektrophorese ermittelten Daten für APIT präzise überein. Alle Peptidsequenzen, die der Edman-Abbau proteolytischer Fragmente des nativen APIT erbrachte, lassen sich in kodierter Form auch in der klonierten cDNA wiederfinden (siehe Abbildung 3.5.5-1). Darüber hinaus finden sich am N-Terminus des kodierten Proteins noch 18 weitere Aminosäuren, die in der reifen, sekretierten Form fehlen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Glykosilierungsstudie befindet sich in der cDNA-Sequenz kein geeignetes Asparagin für eine Zuckerseitenkettenverknüpfung via dessen Stickstoff (N-verknüpft). Eine O-Verknüpfung via Sauerstoffmolekül eines Threonin oder Serin ist deshalb anzunehmen.

Unternimmt man mit der translatierten Proteinsequenz von APIT eine Recherche nach Homologien mit anderen Proteinen, so stößt man auf einen Bereich, der in einer Gruppe von Enzymen mit Redoxreaktion strukturell stark konserviert ist: Die Aminosäuren 39 bis 66 umfassen das sogenannte „Dinukleotid-Bindemotiv“ (DBM) derjenigen Strukturfamilie von FAD-bindenden Proteinen, die durch die Glutathion Reduktase repräsentiert wird (Dym, 2001). Zu dieser gehören verschiedene Oxidasen, Reduktasen, Dehydrogenasen und Hydroxylasen. Klassifizierendes Sequenzmotiv dieser Strukturfamilie ist die Aminosäurefolge „GxGxxG“, die im gefalteten Protein in einem Schleifenbereich zwischen dem ersten  $\beta$ -Faltblatt und der anschließenden  $\alpha$ -Helix der „Rossmann-Falte“ liegt. In diesem Bereich findet ein enger Kontakt mit dem Pyrophosphat-Anteil von FAD statt.

In unmittelbarer Nachbarschaft zum „DBM“ lässt sich in der Proteinsequenz von APIT noch ein zweites charakteristisches Motiv ausmachen: Das „GG“-Motiv (Vallon, 2000) bezeichnet die Aminosäurefolge „RxGGRxx(S/T)“, typisch für Oxidasen wie die L-Aminosäure Oxidase von Vipern (Macheroux, 2001) oder die Monoamine Oxidase, die an der oxidativen Deaminierung von Neurotransmittern beteiligt ist (Binda, 2001).

```

M S S A V L L L A C A L V I S V H A D G
atgtcgtctgctgtgcttctcctggctgtgcttggtcatctctgtccacgccgacggt
V C R N R R Q C N R E V C G S T Y D V A
atctgcagaaacagacgtcaatgtaacagagaggtgtgctggttctacctacgatgtggcc
V V G A G P G G A N S A Y M L R D S G L
gtcgtggggggcggggcctgggggagctaaactccgcc tacatgctgagggactccggcctg
D I A V F E Y S D R V G G R L F T Y Q L
gacatcgtctgtgttcgagtactcggaccgagtggtggcgccggctgttcacctaccagctg
P N T P D V N L E I G G M R F I E G A M
cccaacacaccccgacgttaacctggagattggcgccatgaggttcacgaaggcccatg
H R L W R V I S E L G L T P K V F K E G
cacaggctctggagggctatttcagaactcggcctaaccaccaagggtgttcaaggaaggt
T G G K E G G R Q A R F Y L R G G Q S L T K K Q
ttcggacaggagcagacaaatgttacctgctggggacagagcctgaccaagaacag
V K S G D V P Y D L S P E E K E N Q G N
gtcaagagtggggacgtaccctatgacctagcccgaggagaaagaaaaccagggaaat
L V E Y Y L E K L T G L Q L N G E P L K
ctggtcgaatactacctggagaaactgacaggtctacaactcaacggcgagccgctcaaa
R E V A L K L T V P D G R F L Y D L S F
cgtgaggttgccgttaaaactaacctgscggacggcagattcctctatgacctctcgttt
D E A M D L V A S P E G K E F T R D T H
gacgaagccatggatctggttgccctccctgagggcaaaagagttcacccgagacacgcac
V F T G E V T L D A S A V S L F D D H L
gtcttcacaggagaggtcaccctggacgcgtcggctgtctcctcttcgacgaccacctg
G E D Y Y G S E I Y T L K E G L S S V P
ggagaggactactatggcagtgagatctacaccctaaagggaaggactgtcttccgctcca
Q G L L Q A F L D A A D S N E F Y P N S
caaggctcctacagcttttctggacgcgcagactccaacgagttctataccaacagc
H L K A L R R R K T N G Q Y V L Y F E P T
cacctgaaggccctgagacgtaagaccaacggtcagtatgttctttactttgagccacc
T S K D G Q T T I N Y L E P L Q V V C A
acctccaaggatggacaaaccacaatcaactatctggaaccctgcaggttggtgtgca
Q R V I L A M P V Y A L N Q L D W N Q L
caaaagtcacctcctggcctgcccgtatagctctgaaccaactagactggaatcagctc
R N D R A T Q A Y A A V R P I P A S K V
agaaatgaccqagccaccaagcgtacgctgccgttcgcccattcctqcaagtaagqtg
F M T F D Q P W W L E N E R K S W V T K
ttcatgtcctttgatcagccctgggtggtggagaacgagaggaaatcctgggtcaccaag
S D A L F S Q M Y D W Q K S E A S G D Y
tcggacgcgcttttcagccaaatgtacgactggcagaaagtctgagggcgtccggagactac
I L I A S Y A D G L K A Q Y L R E L K N
atcctgatcgccagctacgcgcgacctcaaaagcccagctacctgcccggagctgaagaat
Q G E D I P G S D P G Y N Q V T E P L K
cagggagaggacatcccaggctctgacccaggctacaaccagggttaccgaacccctcaag
D T I L D H L T E A Y G V E R D S I P E
gacaccattcttgaccacctcactgaggttatggcgtggagcagactcgaatccggaa
P V T A A S Q F W T D Y P F G C G W I T
cccgtagccgcgcttccagttcttgacagactaccggttggctgtggatggatcacc
W R A G G F H F D D V I S T M R R P S L K
tggagggcgggttccatttegatgacgtcatcagcaccatgctgctgcccgtcaetgaaa
D E V Y V V G A D Y S W G L I S S W I E
gatgaggtatacgtggtgggagccgactactcctggggacttatctcctcctggatagag
G A L E T S E N V I N D Y F L
ggcgtctggagacctcggaaaacgtcatcaacgactacttctc

```

**Abb.3.5.5-1** präsentiert die Nucleotidsequenz der APIT-cDNA (Kleinbuchstaben, Klon 2 - siehe 3.5.5-3) und die translatierte Aminosäuresequenz (Großbuchstaben). Das „DBM“ ist mit einem hellen Grau, das „GG-Motiv“ mit einem dunklen Grau unterlegt. Unterstrichen sind die ursprünglich mittels Edman-Abbau von Peptifragmenten des nativen APIT bestimmten Sequenzbereiche. Der N-Terminus des nativen Proteins ist gestrichelt unterstrichen. Eingerahmt sind die konservierten Aminosäuren der Motive.

Eine außerordentlich große Homologie findet sich im direkten Vergleich mit den Aminosäuresequenzen des bereits erwähnten Cyplasin L (dem zytotoxischen Protein der Albumen Drüse von *A. punctata*) und Aplysianin A (dem zytolytischen Glykoprotein der Albumen Drüse von *A. kurodai*).

		1		50
Aplysianin A	(1)	M--AVRFLALGLLIFVTSCSGRRVCESQQS	CDDEQCD	ETLNIAIVGAGFS
Cyplasin L	(1)	M--AVRFLAPGLITLALVSGRTVCESKQ	CDAAQCDK	TLDVAIVGAGAA
APIT	(1)	MSSAVLLLLACAIIVTISVHADG---	VCRNRRCNRFVCGS	TYDVAIVGAGFG
Consensus	(1)	M AVRFLA GLLI VTA SGR VCESKQ	CD EQCD TLDVAIVGAGPA	
		51		100
Aplysianin A	(49)	GAYSAYKMRHSGKDVCLFEYCNRVGGRL	TYQLPNTPDVNLELGGMR	YIT
Cyplasin L	(49)	GAYSAYLLRNKGNIGVFEFCDRVGGRLF	TYQLPNTPDVQLELGGMR	YIT
APIT	(48)	GANSAYMLRDSGLDIAVFEYSDRVGGRLF	TYQLPNTPDVNLELGGMR	FTE
Consensus	(51)	GAYSAYLLR SG DIGVFEYCDRVGGRLF	TYQLPNTPDVNLELGGMR	YIT
		101		150
Aplysianin A	(99)	GAHNILIQEVTKELGKSVLFTIEGFG	GRTRYFLRGQSLTHEE	VQSGDVP
Cyplasin L	(99)	GAHNILIEGVVVRQLGLTPVVFTEGFG	KLGRTRYFLRGQSLTFQ	EVLTGDVP
APIT	(98)	GAMHRLWRVISELGLTPKVFKEGFG	KEGRQRFYLRGQSLTKKQ	VKSGDVP
Consensus	(101)	GAHNIL VIKELGLTPVVFTEGFG	GRTRYFLRGQSLT EV	SGDVP
		151		200
Aplysianin A	(149)	YNLTTIEKLNQGRITYEYKELTGFDI	GNCSISREQLLKL	RVSDGRLLYQ
Cyplasin L	(149)	YNLTVAEKQNDNIFAYLKELTRFD	VGDGFVTR	REQLLKL
APIT	(148)	YDLSPEEKENQGNLVEYYIEKLT	GLQINGEPLKREVAL	LKLTVPDGRFLYD
Consensus	(151)	YNLT EK NQGNIFEYKELTGFDIG	G ISREQLLKL	RVSDGRLLYQ
		201		250
Aplysianin A	(199)	LTFDEALDLVASPEGKEFARDVHV	FHTTEVTS	DANAVSVFDDHLGEDG
Cyplasin L	(199)	LTFDEALDLVASPEGKEFARDI	HVFTTEVSD	DANAVSVFDDHLGEDG
APIT	(198)	LSFDEAMD	DLVASPEGKEFTRDTHVFT	TEVTLDA
Consensus	(201)	LTFDEALDLVASPEGKEFARDI	HVFTTEVT DANAVSVFDDHLGEDG	GD
		251		300
Aplysianin A	(249)	AILTVEEGMQKVPKEI	LIKEFKKTSAS	NOVQLNKYLQAIRSKSDHSHV
Cyplasin L	(249)	EIHTVQEGMQKVP	EQLLRAFGNSSVFGHRVFT	NLQLKAIRSKSDKSHV
APIT	(248)	EIYTLKEGLSSV	QGLLQAF	LDAADS
Consensus	(251)	EIHTV EGMQKVP LLKAF	SS S N VF N	HLKAIRSKSD SHV
		301		350
Aplysianin A	(298)	FRPTSTVDGKTTILDYRPLQ	RVCARQVILALPVFALRR	LDWPPLEHGRAE
Cyplasin L	(299)	FRTTSTVDGKTTILKFEPLQ	KVCTRQIILALPVFALM	VDWPPLEENRAQ
APIT	(297)	FEPTTSKDGQTTINYLEPLQ	VVCAQRVILAMPVYAL	NOLDWNQLRNDRAT
Consensus	(301)	FRPTSTVDGKTTIL FEPLQKVCARQVILALPVFAL	QLDWPPLE	RA
		351		400
Aplysianin A	(348)	TAYAAVRNMAASKVFM	TFDQAWWLD	RNF
Cyplasin L	(349)	KAYGAVRTIPASKVFM	TFDQEWLQNDV	TFP
APIT	(347)	QAYAAVRP	IPASKVFM	TFDQFWWLEN
Consensus	(351)	AYAAVR IPASKVFM	TFDQPWWLDN TD	AFVTKGDT FSQMYDWKK
		401		450
Aplysianin A	(398)	SNVSGDYILIASYADGNNTLYQ	KVLRDQGES	INGSEPGANRVSEPLKNNI
Cyplasin L	(399)	SNVSGDYILIASYADGNNTL	FQVLRDQGEF	INGSEAGAHIVSEPLKNOI
APIT	(394)	SEASGDYILIASYADGLKAQ	YLFELKNOGED	IFGSDFGYNQVTEPLKDTI
Consensus	(401)	SNVSGDYILIASYADGNNTLYQ	RVLRDQGE INGSEPGAN	VSEPLKNNI
		451		500
Aplysianin A	(448)	LDHLS	EAYGVD	RDSIPEPKTAVSQF
Cyplasin L	(449)	LDHL	ADAF	GVPRSDIQEPKTA
APIT	(444)	LDHL	TEAYGVE	RDSIPEPV
Consensus	(451)	LDHLSEAYGVD	RSSIPEPKTAVSQF	WTDYPF



vermittelt dieses oberflächlich gelegene, stark positiv geladene Strukturmotiv eine Wechselwirkung mit negativ geladenen Strukturen/Bestandteilen von Zellmembranen.

Bislang wurde die Sequenz eines cDNA-Klons von APIT präsentiert. Tatsächlich gibt es aber eine unbekannte Zahl verschiedener cDNAs, die Varianten mit geringen Abweichungen in der Aminosäuresequenz, aber häufigeren Abweichungen in der Nucleotidsequenz repräsentieren. In Abbildung 3.5.5-3 sind exemplarisch die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen dreier verschiedener cDNA-Klone dargestellt.

```

M S S A V L L L A C A L V I S V H A D G LV C
ATGTCGTCGTGTGCTTCTCCTGGCTTGTGCGTTGGTCATCTCTGTCCACGCCGACGGTATCTGC
...TCGTCGTGTGCTTCTCCTGGCTTGTGCGTTGGTCATCTCTGTCCACGCCGACGGTGTCTGC
.....GACGGTATCTGC

```

```

R N R R Q C N R E V C G S T Y D V A V V G A
AGAAACAGACGTCAATGTAACAGAGAGGTGTGCGTTTCTACCTACGATGTGGCCGTCGTGGGGGCG
AGAAACAGACGTCAATGTAACAGAGAGGTGTGCGTTTCTACCTACGATGTGGCCGTCGTGGGGGCG
AGAAACAGACGTCAATGTAACAGAGAGGTGTGCGTTTCTACCTACGATGTGGCTGTCGTGGGGGCG

```

```

G P G G A N S A Y M L R D S G L D I A V F E
GGGCCTGGGGGAGCTAACTCCGCCTACATGCTGAGGGACTCCGGCCTGGACATCGCTGTGTTCGAG
GGGCCTGGGGGAGCTAACTCCGCCTACATGCTGAGGGACTCCGGCCTGGACATCGCTGTGTTCGAG
GGGCCTGGGGGAGCTAACTCCGCCTACATGCTGAGGGACTCCGGCCTGGACATCGCTGTGTTCGAG

```

```

Y S D R V G G R L F T Y Q L P N T P D V N L
TACTCGGACCGAGTGGGCGCCGGCTGTTACCTACCAGCTGCCAACACACCCGACGTTAACCTG
TACTCAGACCGAGTGGGCGCCGGCTGTTACCTACCAGCTGCCAACACACCCGACGTTAATCTC
TACTCANACCGAGTGGGCGCCGGCTGTTACCTACCAGCTGCCAACACACCCGACGTTAATCTC

```

```

E I G G M R F I E G A M H R L W R V I S E L
GAGATTGGCGGCATGAGGTTTCATCGAAGGCGCCATGCACAGGCTCTGGAGGGTCATTTCAGAACTC
GAGATTGGCGGCATGAGGTTTCATCGAGGGCGCCATGCACAGGCTCTGGAGGGTCATTTCAGAACTC
GAGATTGGCGGCATGAGGTTTCATCGAGGGCGCCATGCACAGGCTCTGGAGGGTCATTTCAGAACTC

```

```

G L T P K V F K E G F G K E G R Q R F Y L R
GGCCTAACCCCAAGGTGTTCAGGAAGGTTTCGGCAAGGAGGGCAGACAAAGATTTTACCTGCGG
GGCCTAACCCCAAGGTGTTCAGGAAGGTTTCGGAAAGGAGGGCAGACAGAGATTTTACCTGCGG
GGCCTAACCCCAAGGTGTTCAGGAAGGTTTCGGAAAGGAGGGCAGACAGAGATTTTACCTGCGG

```

```

G Q S L T K K Q V K S G D V P Y D L S P E E
GGACAGAGCCTGACCAAGAAACAGGTCAAGAGTGGGGACGTACCCTATGACCTCAGCCCGAGGAG
GGACAGAGCCTGACCAAGAAACAGGTCAAGAGTGGGGACGTACCCTATGACCTCAGCCCGAGGAG
GGACAGAGCCTGACCAAGAAACAGGTCAAGAGTGGGGACGTACCCTATGACCTCAGCCCGAGGAG

```

K E N Q G N L V E Y Y L E K L T G L **QK** L N G  
AAAGAAAACCAGGGAAATCTGGTCGAATACTACCTGGAGAACTGACAGGTCTACAACCTCAACGGC  
AAAGAAAACCAGGGAAATCTGGTCGAATACTACCTGGAGAACTGACAGGTCTACAACCTCAA**TGGT**  
AAAGAAAACCAGGGAAATCTGGTCGAATACTACCTGGAGAACTGACAGGTCTAA**AA**ACTCAACGGC

**EG** P L K R E V A L K L T V P D G R F L Y D L  
GA**CC**CGCTCAAACGTGAGGTTGCGCTTAAACTAACCGTGCCGGACGGCAGATTCCCTCTATGACCTC  
GAACCGCTCAAACGTGAGGTTGCGCTTAAACTAACCGTGCCGGACGGCAGATTCCCTCTATGACCTC  
GA**CC**CGCTCAAACGTGAGGTTGCGCTTAAACTAACCGTGCCGGACGGCAGATTCCCTCTATGACCTC

S F D E A M D L V A S P E G K E F T R D T H  
TCGTTTGACGAAGCCATGGATCTGGTTGCTCCCTGAGGGCAAAGAGTTCACCCGAGACACGCAC  
TCGTTTGACGAAGCCATGGATCTGGTTGCTCCCTGAGGGCAAAGAGTTCACCCGAGACACGCAC  
TCGTTTGACGAAGCCATGGATCTGGTTGCTCCCTGAGGGCAAAGAGTTCACCCGAGACACGCAC

V F T G E V T L **DG** A S A V S L F D D H L G E  
GTCTTAC**AG**GAGAGGTACCCTGGACGCGTCGGCTGTCTCCCTCTTCGACGACCACCTGGGAGAG  
GTCTTACCCGGAGAGGTACCCTGG**CG**CGTCGGCTGTCTCCCTCTTCGACGACCACCTGGGAGAG  
GTCTTACCCGGAG**AG**ATCACCTGGACGCGTCGGCTGTCTCCCTCTTCGACGACCACCTGGGAGAG

D Y Y G S E I Y T L K E G L S S V P Q G L L  
GACTACTATGGCAGTGAGATCTACACCTAAAGGAAGGACTGTCTTCCGTCCCACAAGGGCTCCTA  
GACTACTA**CG**GCAGTGAGATCTACACCT**CA**AGGAAGGACTGTCTTCCGTCCCT**CA**AGGGCTCCTA  
GACTACTATGGCAGTGAGATCTACACCTAAAGGAAGGACTGTCTTCCGTCCCACAAGGGCTCCTA

Q **AT** F L D A A D S N E F Y P N S H L K A L R  
CAGGCTTTTCTGGACGCCGAGACTCCAACGAGTCTATCCCAACAGCCACCTGAAGGCCCTGAGA  
CAGGCTTTTCTGGACGCCGAGACTCCAACGAGTCTATCCCAACAGCCACCTGAAGGCCCTGAGA  
CAG**ACT**TTTCTGGACGCCGAGACTCCAACGAGTCTATCCCAACAGCCACCTGAAGGCCCTGAGA

R K T N G Q Y V L Y F E P T T S K D G Q T T  
CGTAAGACCAACGGTCAGTATGTTCTTTACTTTGAGCCCACCACCTCCAAGGATGGACAAACCACA  
CGTAAGACCAACGGTCAGTATGTTCTTTACTTTGAGCCCACCACCTCCAAGGATGGACAAACCACA  
CGTAAGACCAACGGTCAGTATGTTCTTTACTTTGAGCCCACCACCTCCAAGGATGGACAAACCACA

I N Y L E P L Q V V C A Q R V I L A M P V Y  
ATCAACTATCTGGAACCCCTGCAGTTGTGTGTGCACA**AA**AGAGTCATCCTGGCCATGCCGGT**AT**AC  
ATCAACTATCTGGAACCCCTGCAGTTGTGTGTGCACAGAGAGTCAT**TCT**GGCCATGCCG**GNCTTC**  
ATCAACTATCTGGAACCCCTGCAGTTGTGTGTGCACAGAGAGTCATCCTGGCCATGCCGGTCTAC

A L N Q L D W N Q L R N D R A T Q A Y A A V  
GCTCT**GA**ACCAACT**AG**ACTGGAATCAGCTCAGAAATGACCGAGCCACCCAAGCGTACGCTGCCGT**T**  
GCTCTA**CC**CA**GT**TGGA**TT**GGAATCAGCTCAGAAATGACCGAGCCACCCAAGCGTACG**TTCC**CGTG  
GCTCTA**CC**CAACTGGACTGGAATCAGCTCAGAAATGACCGAGCCACCCAAGCGTACGCTGCCGTG

R P I P A S K V F M **TS** F D Q P W W L E N E R  
CGCCCGATTCTGCAAGTAAGGTGTTTCATG**T**CCTTTGATCAGCCCTGGTGGTTGGAGAACGAGAGG  
CGCCCGATTCTGCAAGTAAGGTGTTTCATGACCTTTGATCAGCCCTGGTGGTTGGAGAACGAGAGG  
CGCCCGATTCTGCAAGTAA**A**GTGTTTCATGACCTTTGATCAGCCCTGGTGGTTGGAGAACGAGAGG

K S W V T K S D A L F S Q M Y D W Q K S E A  
AAATCCTGGGTACCAAGTCGGACGCGCTTTTCAGCCAAATGTACGACTGGCAGAAGTCTGAGGCG  
AAATCCTGGGTACCAAGTCGGACGCGCTTTTCAG**T**CAAATGTACGACTGGCAGAAGTCTGAGGCG  
AAATCCTGGGTACCAAGTCGGACGCGCTTTTCAGCCAAATGTACGACTGGCAGAAGTCTGAGGCG

S G D Y I L I A S Y A D G L K A Q Y L R E L  
TCCGGAGACTACATCCTGATCGCCAGCTACGCCGACGGCCTCAAAGCCCAGTACCTGCGGGAGCTG  
TCCGGAGACTACATCCTGATCGCCAGCTACGCCGACGGCCTCAAAGCCCAGTACCTGCGGGAGCTG  
TCCGGAGACTACATCCTGATCGCCAGCTACGCCGACGGCCTCAAAGCCCAGTACCTGCGGGAGCTG

K N Q G E D I P G S D P G Y N Q V T E P L K  
AAGAATCAGGGAGAGGACATCCCAGGCTCTGACCCAGGCTACAACCAGGT**T**ACCGAACCCCTCAAG  
AAGAATCAGGGAGAGGACATCCCAGGCTCTGACCCAGGCTACAACCAGGTACCGAACCCCTCAAG  
AAGAATCAGGGAGAGGACATCCCAGGCTCTGACCCAGGCTACAACCAGGTACCGAACCCCTCAAG

D T I L D H L T E A Y G V E R D S I **PR** E P V  
GACACCATTCTTGACCACCTCACTGAGGCTTATGGCGTGGAGCGAGACTCGATCCCAGAACCCGTG  
GACACCATTCTTGACCACCTCACTGAGG**C**TATGGCGTGGAGCGAGACTCGAT**CG**GGAACCCGTG  
GACACCATTCTTGACCACCTCACTGAGGCTTATGGCGTGG**A**ACGAGACTCGATCCCAGAACCCGTG

T A A S Q F W T D Y P F G C G W I T W R A G  
ACCGCCGCTTCCCAGTTCTGGACAGACTACCCGTTTGGCTGTGGATGGATCACCTGGAGGGCCGGC  
ACCGCCGCTTCCCAGTTCTGGACAGACTACCCGTTTGGCTGTGGATGGATCACCTGGAGGGCCGGC  
ACCGCCGCTTCCCAGTTCTGG**AC**GACTACCCGTT**CG**GCTGTGGATGGATCACCTGGAGGG**CA**GGC

F H F D D V I S T M R R P S L K D E V Y V V  
TTCCATTTTCGATGACGTATCAGCACCATGCGTGCCTGCTCACTGAAAGATGAGGT**A**TACGTGGTG  
TTCCATTTTCGATGACGTATCAGCACCATGCGTGCCTGCTCACTGAAAGATGAGGTCTACGTGGTG  
TTCCATTT**T**GATGACGTATCAGCACCATGCGTGCCTGCTCACTGAAAGATGAGGTCTACGTGGTG

G A D Y S W G L I S S W I E G A L E T S E N  
GGAGCCG**A**CTACTCCTGGGACTTATCTCCTCCTGGATAGAGGGCGCTCTGGAGACCTCGGAAAAC  
GGAGCCGATTACTCCTGGGACTTATCTCCTCCTGGATAGAGGGCGCTCTGGAGACCT**CA**GAAAAC  
GGAGCCGATTACTCCTGGGACTTATCTCCTCCTGGATAGAGGGCGCTCTGGAGACCTCGGAAAAC

V I N D Y F L -  
GTCATCAACGACTACTTCCTCTAA  
GTCATCAACGACTACTTCCTCTAA  
GTCATCAACGACTACTTCCTCTAA

*Abb.3.5.5-3 zeigt ein **Alignment der Nucleotid- und Aminosäuresequenzen** dreier verschiedener cDNA-Klone von APIT. Abweichungen in der Nucleotidsequenz sind in Rot, ein resultierender Aminosäureaustausch in Grün dargestellt. Unterstrichen sind Bereiche mit unsicherem Analyseergebnis.*

Bei drei Klonen lassen sich insgesamt 48 Positionen der Nucleotid-Variabilität ausmachen. Nur sieben davon führen allerdings auch zu einem Aminosäureaustausch. Überraschenderweise betreffen die Basenaustausche in 37 von 48 Fällen die dritte Position eines Triplets. Vier der elf Fälle, die eine andere Triplettposition betreffen, liegen in Bereichen von unsicherer Sequenzanalyse. Schließt man diese aus, so betrifft die Nucleotid-Variabilität in 85% der Fälle die dritte Position eines Aminosäure kodierenden Triplets.