

4.0 Diskussion

Der überwiegende Teil der Ziele dieser Doktorarbeit, wie sie in der Einleitung formuliert wurden, sind tatsächlich auch erreicht worden: Die zytolytische P-Glykoproteinvariante des „Seehasen“ *A. punctata* (APIT) ist bis zur Homogenität aufgereinigt und als Flavoprotein mit einer Molekülmasse von rund 60 kD und spärlicher O-Glykosylierung charakterisiert worden. APIT besitzt enzymatische Aktivität, die sich als spezifische oxidative Deaminierung von L-Lysin und L-Arginin, verbunden mit einer Produktion von H₂O₂, Ammoniak und α -Ketosäure, kennzeichnen ließ. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das gebildete H₂O₂ für den zytolytischen Effekt verantwortlich ist. Die cDNA von APIT wurde aus der Manteldrüse von *A. punctata* kloniert und mehrere funktionell kennzeichnende Motive in seiner Aminosäuresequenz beschrieben. Nicht geglückt ist die Expression eines enzymatisch und zytolytisch aktiven rekombinanten APIT in einem heterologen System.

4.1 Molekularbiologische und biochemische Aspekte

4.1.1 Eine kurze Einordnung von APIT in das System der LAAOs

Im N-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz von APIT finden sich zwei Motive, anhand derer eine Klassifizierung und sogar eine Funktionsvorhersage möglich sind: Das erste Motiv, Valin₃₉ bis Glutamat₆₆, repräsentiert das DBM („Dinukleotid-bindendes Motiv“) FAD- bzw. NAD(P)H-abhängiger Oxidoreduktasen (Dym, 2001). Es ist Teil der Rossmann-Faltung ($\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3$) (Rossmann, 1974), die in diesem Bereich einen engen Kontakt mit dem Pyrophosphatanteil des Kofaktors FAD eingehen kann. Aus der Sequenz resultiert eine Strukturtopologie, die APIT mit der „Glutathion Reduktase“-Familie der FAD-bindenden Proteine teilt. Mitglieder dieser Familie sind unter anderem die bereits erwähnte Glukose Oxidase, D-Aminosäure Oxidase, Polyamino Oxidase, aber auch Dehydrogenasen und Reduktasen (Dym, 2001). Das zweite Sequenzmotiv, das sogenannte „GG“-Motiv, ist bei APIT in der unmittelbar an das DBM anschließenden Sequenz₇₀RVGGRLFT₇₇ enthalten. Dieses Motiv findet sich in allen L-Aminosäure Oxidasen, Monoamino Oxidase, Kortikosteroidbindendes Protein und Tryptophan 2-Monooxygenase (Vallon, 2000). Die Sequenzanalyse von APIT bestätigt also die im biochemischen Experiment gefundenen Eigenschaften, nämlich die FAD-Bindung und die enzymatische Aktivität.

Wie erwähnt, verweist das „GG“-Motiv auf die Gruppe der L-Aminosäure Oxidasen (LAAO), die sich in verschiedenen Organismen wiederfinden (Macheroux, 2001), als

sv-LAAOs (snake venom LAAO) der Schlangengifte aber am Besten beschrieben sind (Du, 2002). Diesen Enzymen ist die oxidative Desaminierung von L-Aminosäuren gemeinsam, ihre Substratspezifitäten können jedoch stark variieren. Im allgemeinen werden hydrophobe Aminosäuren wie L-Leucin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Methionin, L-Isoleucin und L-Norleucin bevorzugt (Du, 2002). Einige sv-LAAOs vermögen darüber hinaus auch L-Lysin und L-Ornithin umzusetzen.

Eine breite Substratspezifität mit Bevorzugung hydrophober Aminosäuren zeigt auch Achazin, ein Mucus-Glykoprotein der Landschnecke *Achatina fulica*, dessen enzymatische Aktivität erst kürzlich beschrieben wurde (Ehara, 2003). Neben den oben erwähnten zählen auch L-Lysin, L-Arginin, L-Cystein, L-Asparagin und - eher schlecht - L-Tyrosin und L-Alanin zu den Substraten. AIP („apoptosis-inducing protein“), die fc-LAAO (fish capsule LAAO) der Mittelmeer-Makrele *S. Japonicus*, zeigt demgegenüber hohe Substratspezifität fast ausschließlich für L-Lysin (Jung, 2000). So auch die nach ihrer Spezifität bezeichnete L-Lysine Oxidase (EC 1.4.3.14) des Pilzes *Trichoderma viride*, die aber zusätzlich, wenn auch weniger ausgeprägt, L-Ornithin, L-Phenylalanin, L-Tyrosin, L-Arginin and L-Histidin umsetzen kann (Kusakabe, 1980).

APIT, das in der hier üblichen Nomenklatur als sni-LAAO (snail ink LAAO) bezeichnet werden kann, zeigt also gemeinsam mit der fc-LAAO die eingeschränkteste Substratspezifität, nämlich ausschließlich für L-Lysin und L-Arginin.

Ein weiteres Charakteristikum sind Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt. Bei ersterem befindet sich APIT im üblichen Rahmen der bisher beschriebenen LAAOs, die auf einem SDS-PAGE alle bei 50 – 70kD detektiert werden (Du, 2002; Jung, 2000; Niedermann, 1990; Sun, 2002). Größenbestimmungen über die nicht-denaturierende Gelfiltration zeigen bislang, dass die untersuchten LAAOs im allgemeinen in homodimerer Form vorliegen (Du, 2002; Sun, 2002). Ob dies auch für APIT zutrifft, konnte noch nicht eindeutig gezeigt werden. Die anderen bislang beschriebenen P-Formen zytolytischer Seehasen-Glykoproteine gelten aber als Monomere (Yamazaki, 1993).

Hinsichtlich des isoelektrischen Punktes (pI) gibt es bei den sv-LAAOs drei Varianten: eine basische, eine neutrale und eine saure (Du, 2002). Möglicherweise besitzen diese Varianten unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften und Zielstrukturen analog den Phospholipase A₂ (PLA₂)-Variationen der Schlangengifte. Bei diesen ist die saure Variante mit einer Aktivität gegen Thrombozyten verknüpft, die neutrale Variante ist ein ausgeprägtes

Neurotoxin, die basische Variante wirkt hämolytisch (Du, 2002). Der experimentell gefundene pI von APIT liegt bei 4.8 und damit im sauren Bereich. Ob dieses Wissen eine Voraussage über spezifische Wechselwirkungen analog den PLA₂ zulässt, ist nicht klar.

Wie im Ergebnisteil dargestellt, zeigt APIT eine wenig ausgeprägte O-Glykosilierung. Sie scheint nicht maßgeblich an der enzymatischen Reaktion beteiligt zu sein, da eine üblicherweise zerstörende Periodatoxidation der Zuckerseitenketten keinen spezifischen Effekt zeigt.

Das bedeutet jedoch nicht, dass diese Seitenketten ohne Funktion sind. Der überwiegende Teil der bislang beschriebenen zytolytischen Aplysia-Glykoproteine mit antineoplastischer und antibiotischer Wirkung zeigen eine ausgeprägte Glykosilierung, die bis zu 18% des Molekulargewichtes (Aplysianin P) ausmachen kann (Yamazaki, 1993). Nur die P-Formen von Dolabellanin und Dactylomelin weisen eine rudimentäre Glykosilierung von weniger als 1% des Molekulargewichtes auf. Bei beiden korreliert damit eine Einschränkung in der Funktionalität bzw. Spezifität. So lysiert Dolabellanin P unterschiedslos alle kernhaltigen Säugerzellen (Tumorzellen wie normale), Dactylomelin P dagegen weist keine lytische, sondern eine hämaggutinierende Aktivität auf. Dolabellanin P unterscheidet sich außerdem durch ein Fehlen antibakterieller Eigenschaften von den übrigen Aplysia-Glykoproteinen (Yamazaki, 1993).

Dass beide Befunde möglicherweise ursächlich miteinander verknüpft sind, wird in einer analytischen Arbeit über die Glykosilierung der sv-LAAO von *C. rhodostoma* (Geyer, 2001) angedacht. Die Autoren argumentieren hier mit einem Vergleich der sv-LAAO und der D-Aminosäure Oxidase (DAAO), die zwar gleiche toxische Reaktionsprodukte bilden (NH₃, H₂O₂), sich jedoch in ihrem antibakteriellen Effekt unterscheiden: Die sv-LAAO ist glykosiliert und wirkt antibakteriell, die DAAO ist nicht glykosiliert und zeigt keinen antibakteriellen Effekt. Außerdem, so die Autoren, sei gezeigt, dass einige sv-LAAOs (Suhr, 1996) spezifisch an Zellmembranen andocken und so hohe Dosen der schädigenden Reaktionsprodukte lokal applizieren könnten. Sicherlich sollte man in dieser Hinsicht auf jeden Fall auch die unterschiedlichen Substratspezifitäten und Umsatzgeschwindigkeiten der verschiedenen Enzyme berücksichtigen. Wie dem auch sei - trotzdem fällt bei den genannten Proteinen eine allgemeine Korrelation zwischen Glykosilierung (bzw. Glykosilierungsgrad) und antibakterieller Wirkung ins Auge.

Bei APIT ließ sich nun trotz spärlicher Glykosilierung ein ausgeprägter antibakterieller Effekt nachweisen. Das widerlegt entweder die obige These von der Notwendigkeit eines Andockens an die Membran der Zielzelle oder eröffnet die Möglichkeit einer Funktionsübernahme durch das Polypeptid. Wie beschrieben, gibt es am N-Terminus des Proteins, unmittelbar vor dem DBM, eine kurze Aminosäurefolge mit drei Cysteinen und überwiegend basischen Aminosäuren. Dieses „Motiv“ findet sich mit großer Übereinstimmung in mehreren Phospholipasen A₂, z.B. von *Enhydrina* und *Notechis*. Bei letzterer (Notexin) bildet dieser Bereich das Ende eines antiparallelen β -Faltblatts, eine daran anschließende Schleife und den ersten Abschnitt einer α -Helix mit unmittelbar folgendem aktivem Zentrum. Möglicherweise vermittelt dieses Strukturmotiv eine Wechselwirkung mit negativ geladenen Strukturen/Bestandteilen von Zellmembranen (Westerlund, 1992). Solch eine Interaktion könnte dann ein spezifisches Andocken von APIT nach sich ziehen - eine vielleicht notwendige Voraussetzung für seine spezifischen Effekte (siehe unten). In Übereinstimmung zu dieser Überlegung zeichnet sich das oben beschriebene, nicht antibakteriell wirksame Dolabellanin P neben seiner spärlichen Glykosilierung auch durch ein Fehlen jeglicher Cysteine im Proteinanteil aus (Yamazaki, 1989).

4.1.2 Aktivität nach Proteolyse

Einen recht eigenen Charakter zeigt APIT bzw. seine enzymatische Aktivität hinsichtlich seiner Sensitivitäten gegenüber unterschiedlichen Behandlungen. Diese „individuelle Note“ sorgte während dieser Arbeit für viel Kopfzerbrechen. So zeigt die Aktivität zwar eine proteintypische Temperatursensitivität, ist andererseits aber unempfindlich gegen denaturierende Konzentrationen von Harnstoff oder proteolytischen Verdau mit Trypsin bzw. Proteinase K. Die Identifizierung als Flavoprotein brachte, zumindest teilweise, die Lösung: Für verschiedene andere Flavoproteine ist bereits eine erhöhte Stabilität gegenüber hohen Urea-Konzentrationen (Madden, 1984) und tryptischem Verdau (Decker, 1997) beschrieben worden. Diese Eigenschaften sind abhängig von der Beladung mit Kofaktor bzw. seinem Redoxstatus. Sie lassen sich deshalb auch zur Definition von Holo- bzw. Apo-Enzym-Konfiguration und oxidiertem bzw. reduziertem FAD einsetzen.

Unerklärt sind dagegen noch die vollständige Resistenz der enzymatischen Aktivität trotz Verlust der hochmolekularen Proteinstruktur bei Verdau mit Proteinase K und die Steigerung der Aktivität nach tryptischem Verdau. Bei letzterem lässt sich auch auf einem, diesen Molekulargewichtsbereich hochauflösenden SDS-PAGE keine Molekulargewichts-Veränderung detektieren, wie sie etwa mit der Abspaltung einer negativ regulierenden

Domäne verbunden wäre. Deshalb drängt sich der Gedanke an einen trypsinsensitiven Inhibitor auf, der mit nativem APIT nichtkovalent verbunden ist. Im folgenden sei kurz ein denkbare Szenario beschrieben.

Wenn man die unter LAAOs allgemein übliche Dimerisierung ins Auge fasst, so lässt sich mit dem Wissen um die APIT-Sequenzvariationen (siehe unten) annehmen, dass ein Teil der Dimere einen unfunktionellen (im Sinne der katalytischen Aktivität) Partner enthält. Natürlich könnte auch ein Kofaktorverlust bei gleichzeitiger Wahrung der Dimerisierungskapazität unfunktionelle Partner erzeugen. Ist ein Dimer aus zwei funktionellen Partnern aber Voraussetzung für den Ablauf bzw. die Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion, so könnte Verdau des Unfunktionellen, über die daraus resultierende Möglichkeit zur Neubildung eines funktionellen Dimers, den gezeigten aktivitätssteigernden Effekt bedingen.

Dass dieser Gedankengang nicht ganz abwegig ist, zeigt wieder ein Beispiel der PLA₂: So dient ein Komplex aus einer basischen, stark neurotoxischen PLA₂-Komponente und einer sauren, katalytisch inaktiven PLA₂-Komponente beim Vipoxin der osteuropäischen *Vipera ammodytes meridionalis* zur Stabilisierung der ersten Komponente. Diese weist für sich allein genommen zwar eine höhere Toxizität und auch katalytische Aktivität auf, ist aber auch recht instabil und kurzlebig (Betzel, 1999).

Rätselhaft bleibt dagegen die Reaktion auf proteolytischen Verdau mit Proteinase K. Dieser scheint vollständig abzulaufen, lässt sich doch auf einem SDS-PAGE anschließend keine Proteinbande mehr nachweisen; trotzdem bleiben Enzymaktivität und Substratspezifität vollständig erhalten. Dieser Befund impliziert das Vorhandensein einer kleinen, proteaseresistenten Gruppe, die alle Enzymcharakteristika enthält – möglicherweise, allerdings recht unwahrscheinlich, ein einzelnes Peptid. Bislang ist es jedoch nicht gelungen, diese Gruppe zu isolieren.

4.1.3 Duplikation und Divergenz

Die Klonierung und Sequenzanalyse der für APIT kodierenden cDNA erbrachte keine eindeutige Nukleotidsequenz. Vielmehr scheint das Gewebe der Manteldrüse eine unbekannte Zahl von ähnlichen mRNAs mit Unterschieden, die hauptsächlich die dritte Position eines Kodons betreffen, herzustellen. Daraus ergeben sich APIT-Varianten mit geringfügigen Abweichungen in der Aminosäuresequenz.

Am ehesten lässt sich dieser Sachverhalt durch die Mechanismen der Genduplikation und des ungleichen „Crossover“ erklären. Zur Duplikation von Genen auf einem DNA-Strang kann es

zum Beispiel bei der Reparatur disintegrierter Chromosomen oder bei einem ungleichen „Crossover“ kommen - einem Rekombinationsprozess, bei dem eine der Schwester-Chromatiden auf Kosten der anderen einen DNA-Abschnitt erwirbt (Alberts, 1996). Wenn die verdoppelten Sequenzen in der gleichen Leserichtung liegen, nennt man sie „Tandem-Wiederholungen“. Sobald solch eine Wiederholung vorliegt, kann sie im Zuge weiterer ungleicher „Crossover“ zu langen Serien von homologen Genen expandieren. Durch Mutationsereignisse, die die verschiedenen Wiederholungen in unterschiedlichem Maße betreffen, kann es zu Variationen in deren Nucleotidsequenzen kommen. Auch Mutationen, die zu einem Verlust der ursprünglichen Funktion führen, können sich wegen der Redundanz der genetischen Information ansammeln – der negative Selektionsdruck wird, in bestimmten Grenzen, ausgehebelt. Dieser Weg gilt als der wichtigste Mechanismus für die Evolution von neuen Funktionen in einer Genfamilie (Zhang, 1998). Daraus ergibt sich aber auch das Vorhandensein eines gewissen Anteils (vorübergehend) unfunktionaler Proteine in der Zelle.

Aller Wahrscheinlichkeit nach gibt es auch im Falle von APIT eine solche Multigenfamilie. Zu dieser gehört sicherlich auch Cyplasin aus der Albumen Drüse von *Aplysia punctata*, das sich durch 61%-ige Homologie auszeichnet, funktionell möglicherweise aber schon divergiert. Wieviele Gene diese Familie umfasst und wie diese strukturell organisiert sind, muß noch auf Ebene der genomischen DNA geklärt werden.

Klar ableiten lässt sich dagegen aber eine Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes, der auf die verschiedenen Familienmitglieder wirkt. So fällt das ausgeprägte Missverhältnis zwischen Nukleotid- und Aminosäurevariationen bei APIT auf. Von 48 Nukleotidvariationen führen bei 3 verschiedenen cDNAs nur sieben auch zu einem Aminosäureaustausch. Rund 85% sind sogenannte stille Mutationen, fast alle betreffen die dritte Position eines Kodons. Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen bietet sich die These an, dass bereits kleine Abweichungen in der Aminosäuresequenz zu einem Funktionsverlust des gebildeten Proteins führen. Wenn die biologische Wirksamkeit der Tinte aber von der in ihr enthaltenen Gesamtzymmenge abhängt, muss das Produkt jedes duplizierten Genes funktionell sein und einen quantitativen Beitrag an Aktivität leisten, um das Überleben des Tieres zu sichern. Kodierten zum Beispiel 30% der APIT-Gene für unfunktionelle APIT-Varianten, so stünden der betroffenen Aplysie im Falle eines Angriffs nur 70% Verteidigungskapazität zur Verfügung. Ist eine Dimerisierung zweier funktioneller APIT-Untereinheiten notwendige Voraussetzung für enzymatische Aktivität, wie oben angedacht, so würden der betroffenen Aplysie sogar nur noch 40% Verteidigungskapazität zur Verfügung stehen. Da nun Tinte im

Meerwasser stark verdünnt wird, ist es denkbar, dass diese quantitativen Aspekte große Bedeutung für ihre Effektivität haben. Tiere mit unfunktionellen APIT-Varianten hätten trotz Redundanz der APIT-Gene einen klaren Selektionsnachteil. Mutationen in der Nucleotidsequenz könnten sich deshalb nur auf Positionen ansammeln, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen bzw. zu einem, der die Funktionalität des Proteins nicht beeinträchtigt.

4.2 Der Tinten-induzierte Zelltod und sein Mediator

4.2.1 Vier Pfade der Zellschädigung: was ist zu erwarten?

Aus der in 3.3.9 dargestellten Enzymreaktion von APIT ergeben sich vier Pfade, die bekanntermaßen zu einer Schädigung von Zellen führen. Was ist zu erwarten, berücksichtigt man die in der Literatur beschriebenen Resultate dieser Pfade?

Da ist zunächst der Verbrauch von Sauerstoff, der zu einer Hypoxie, also einer Mangelversorgung von Zellen mit diesem Atemgas führen kann. Als Folge ist sowohl eine Induktion von Apoptose, als auch von Nekrose (abhängig vom betrachteten Zelltyp) beschrieben worden (Simizu, 1996). Für luftatmende Organismen (bzw. Zellen unter „in vitro“-Kulturbedingungen) ist dieser Pfad wegen des hohen atmosphärischen Anteils von Sauerstoff (rund 21%) sicherlich vernachlässigbar, denn die Substrate für eine Reaktion mit O₂ (Lysin und Arginin) liegen ja nur sehr begrenzt vor. Ganz anders mag sich der Faktor „Sauerstoffentzug“ dagegen im aquatischen System auswirken, wo die O₂-Verfügbarkeit wegen des geringeren Partialdrucks wesentlich eingeschränkt ist (0,7%).

Fatale Auswirkungen hat langfristig gesehen auch der Verbrauch von Arginin und Lysin (Jouanneau, 1985; Murakawa, 2001), letzteres eine essentielle Aminosäure. Beides sind proteinogene Aminosäuren, die wegen ihrer basischen Seitenketten wesentlich an den Wechselwirkungen von Proteinen mit negativ geladenen Molekülen beteiligt sind (z.B. von Histonen mit DNA). Auch einige klassische Signalpeptide, die den Transport von Proteinen ins adequate Zellkompartiment steuern, sind reich an beiden Aminosäuren (z.B. Importsignale für den Zellkern). Arginin ist zudem Ausgangsmolekül für die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die NO-Synthase. NO ist ein essentielles Botenmolekül, das beispielsweise im Gefäßsystem den Tonus der glatten Muskelzellen steuert. Darüber hinaus hat NO in verschiedenen Geweben, so zum Beispiel in der Leber, aber auch eine Schutzfunktion, die in einem antiapoptotischen Effekt bei Schädigung besteht (Yagnik, 2002).

Neben dem Entzug dieser essentiellen Stoffwechselfsubstrate besteht die unmittelbar schädigende Wirkung von APIT wesentlich in der Produktion von Zellgiften. So entsteht bei der oxidativen Desaminierung von Lysin und Arginin zum einen Ammoniak (NH_3 , bzw. Ammonium NH_4), zum anderen Hydrogenperoxid (H_2O_2). Beide Metaboliten sind der Zelle prinzipiell nicht unbekannt, folgt APIT in seiner Reaktion teilweise doch zelleigenen, katabolischen Stoffwechselwegen.

Endprodukt fast aller Desaminierungsreaktionen in Landsäugetieren ist Glutamat. Dieses wird durch die mitochondriale Glutamat-Dehydrogenase von Leberzellen oxidativ zu α -Ketoglutarat und Ammoniak desaminiert. Im weiteren ist α -Ketoglutarat wichtiger Bestandteil von Transaminierungsreaktionen; Ammoniak wird via Harnstoffzyklus in weniger toxischen Harnstoff umgewandelt, der im intakten Tier der Sekretion zugeführt wird. Ammoniak in hohen Konzentrationen (10 mM) ist ein Neurotoxin, das in isolierten Gliomazellen langfristig Apoptose induziert (Buzanska, 2000). Bei anderen Zellen scheint es bereits in Konzentrationen ab 2 mM antiproliferative Wirkung zu zeigen (Horakova, 1989). Da die Substrate von APIT unter Zellkulturbedingungen nicht in ausreichend hoher Konzentration vorliegen (zusammen nur etwa 1,4 mM), um einen entsprechend hohen Wert von Ammoniak zu erzeugen, ist die Wirkung dieses Reaktionsproduktes vernachlässigbar.

H_2O_2 bzw. ROS sind ein Stoffwechselprodukt, das ebenfalls ständig in der Zelle anfällt. Hauptproduktionsort sind stoffwechselaktive Mitochondrien (1-2% des konsumierten O_2 , Fiers, 1999), aber auch im Bereich anderer Membrankompartimente (Lysosomen/Peroxisomen, Plasmamembran, ER) werden ROS für unterschiedliche Zwecke produziert (z.B. Immunantwort; Redoxsignalwege). Organismen besitzen eine Vielzahl von ROS-abfangenden Mechanismen - von Enzymsystemen wie den Superoxiddismutasen, Catalasen und Peroxidasen über freie Thiole des Glutathion bis hin zu Antioxidantien, wie Vitamin C oder freien Aminosäuren (Dröge, 2002).

Behandelt man Zellen mit zusätzlichem H_2O_2 , zeigen die Phänotypen im Allgemeinen Übergänge in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis. Geringe Mengen dieser ROS (0,1 bis $0,5\mu\text{mol}/10^7$ Zellen) sollen die Proliferation stimulieren, größere Mengen (2 bis $5\mu\text{mol}/10^7$ Zellen bzw. 9 bis $14\mu\text{mol}/10^7$ Zellen) induzieren einen temporären bis hin zum dauerhaften Wachstumsstopp. Noch größere Mengen an H_2O_2 (15 bis $30\mu\text{mol}/10^7$ Zellen bzw. 150 bis $300\mu\text{mol}/10^7$ Zellen) sollen Apoptose und schließlich Nekrose bedingen (Davies, 1999).

Die Apoptoseinduktion durch H_2O_2 scheint dabei über eine umfangreiche Freisetzung von Calciumionen aus den zellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum) und einer damit verbundenen Schädigung von Mitochondrien zu funktionieren (Scorrano, 2003). An der Induktion von Nekrose ist zum einen die Inhibition von Schlüsselenzymen der Apoptose durch hohe Konzentrationen von H_2O_2 (Hampton, 1997), zum anderen die direkte Schädigung von Membranbestandteilen und ein daraus resultierender Integrationsverlust der Zellbarriere beteiligt (Buja, 1993).

In der Literatur finden sich widersprüchliche Angaben über die Höhe der für den jeweiligen Effekt einzusetzenden Konzentrationen (z.B. Kumar, 2001; Sakamoto, 1996; Hampton, 1997; Borutaite, 2001). Möglicherweise ist diese Unstimmigkeit auf variierende Induktionszeiten und Zellmodelle zurückzuführen. Einigkeit besteht jedoch über die Aufeinanderfolge der sehr unterschiedlichen Phänotypen.

Läuft nun die Reaktion von APIT auch in stöchiometrischer Hinsicht analog zur L-Lysine α -Oxidase ab, werden also pro Mol Substrat 0,5 Mol H_2O_2 produziert, dann können bei vollständigem Umsatz von RPMI-Medium (FCS nicht eingeschlossen) rund $700\mu M$ H_2O_2 gebildet werden. Auf Stoffmenge/Zelle umgerechnet, sind das $14\mu mol/10^7$ Zellen (unter unseren Bedingungen, also 5×10^5 Zellen/ml). Nach Davies reicht diese Menge für einen dauerhaften Wachstumsstopp, anderen Autoren zufolge (siehe oben) ist mit der angegebenen Konzentration die Schwelle für eine Nekroseinduktion bereits weit überschritten. So ist bei Behandlung von Jurkat-T-Zellen ($10^6/ml$) mit $500\mu M$ H_2O_2 (entspricht $5\mu mol/10^7$ Zellen) nach sechs Stunden bereits mit etwa 25% nekrotischen Zellen zu rechnen (Hampton, 1997).

4.2.2 Der Tinten-induzierte Zelltod: Apoptose oder Nekrose?

Inkubiert man nun Zellen unter Kulturbedingungen mit APIT, so lassen sich nach dem gesagten eine Proliferationsinhibition und eine Induktion von Zelltod - entweder durch Apoptose oder durch Nekrose (bzw. einer Zwischenform) - prognostizieren. Hierbei lässt sich noch eine kurzfristige Zelltodinduktion durch toxisches H_2O_2 von einer längerfristigen durch Entzug von metabolischen Substraten unterscheiden (siehe auch Murakawa, 2001).

Tatsächlich lässt sich bei Behandlung von Jurkat-T-Zellen mit nativer Tinte bzw. aufgereinigtem APIT eine schnelle Lyse (PI-Anfärbbarkeit) der Zellen unter ausgeprägter Vakuolisierung des Cytoplasmas ohne apoptosetypische Fragmentierung auslösen. Der sechs-Stunden-Wert von rund 25% PI-anfärbbaren Zellen (siehe Abbildung 3.3.2-1) ist in guter Übereinstimmung mit dem von Hampton (siehe oben) erzielten Ergebnis. Die zelluläre DNA

wird zwar geschädigt (TUNEL), fragmentiert jedoch nicht (Laddering-Assay); das Proteom zeigt nur geringe, mit der reduzierenden 2DE-Technik detektierbare Veränderungen. Diese decken sich nicht mit den Modifikationen, die bei Induktion von Apoptose durch einen anti-CD95-Antikörper in Jurkat-T-Zellen ausgelöst werden (Thiede, 2001).

Es lässt sich also eindeutig sagen, dass die unmittelbare Nekroseinduktion das dominierende, von APIT induzierte Motiv darstellt. Bei Zugabe von Catalase, die das von APIT gebildete H_2O_2 abbaut, wird diese Nekroseinduktion zugunsten einer wenig ausgeprägten Apoptoseinduktion vollständig aufgehoben. Das bedeutet, Mediator des dominierenden Zelltodmotivs ist H_2O_2 . Wird dieses aber abgefangen, werden die anderen toxischen Pfade des APIT-Mechanismus manifest. Wahrscheinlich handelt es sich aus den oben erläuterten, quantitativen Überlegungen um eine Apoptoseinduktion durch Entzug von Lysin und Arginin. Tatsächlich findet man - entfernt man diese Substrate vor APIT-Zugabe aus dem Medium - nicht den schnellen nekrotischen Phänotyp, sondern wieder eine langsame Apoptose-Induktion, analog derjenigen bei Catalasezugabe.

Bislang wurde der Term Nekrose gewählt, um den Tinten-induzierten Zelltod von der Apoptose abzugrenzen, so wie das häufig auch in der Literatur geschieht, wenn „nicht-apoptotische“ Phänotypen beschrieben werden. Im folgenden soll nun kurz die Rechtmäßigkeit dieser Bezeichnung in Betracht gezogen werden.

Wie in der Einleitung dargestellt, ist Nekrose als ein „katastrophales Versagen der Homöostase“ definiert, ausgelöst durch übermäßig hohe Dosen bzw. Raten eines zellschädigenden Stimulus (Raffray, 1997). Klassische Merkmale sind ein Schwellen und Abrunden der betroffenen Zellen, bis hin zum Integritätsverlust der Plasmamembran incl. einem Verlust zelleigener Bestandteile an das umgebende Kompartiment (Fiers, 1999). Letzteres ist im Organismus meist mit entzündlichen Prozessen verbunden. Demgemäß wird Nekrose auch entweder durch den Einsatz von Farbstoffen, die nur permeabilisierte Zellmembranen passieren können (z.B. Propidiumiodid, Trypanblau), bzw. über den Nachweis zelleigener Bestandteile im Überstand (Lactatdehydrogenase) bestimmt. Beschrieben ist eine ausgeprägte Vakuolisierung des Zytoplasmas (Sperandio, 2000) und - analog zum apoptotischen Phänotyp - auch eine Bläschenbildung der nekrotischen Zellen (Nicotera, 1992). Hierfür zeichnen neutrale Proteasen nichtlysosomaler Herkunft, sogenannte Calpaine, verantwortlich. Das Fehlen einer spezifischen Prozessierung der genomischen DNA in internukleosomale Fragmente dagegen ist ein klares Unterscheidungsmerkmal zur Apoptose. Zwar soll eine DNA-Degradation auch bei Nekrose stattfinden, doch ist diese eher

Resultat einer unspezifischen, enzymatischen Aktivität von hydrolytischen lysosomalen Enzymen (Raffray, 1997). Andere Autoren verweisen auf ein im Allgemeinen negatives Ergebnis im TUNEL-Assay (Sperandio, 2000) wenn man die DNA nekrotischer Zellen untersucht - was vor dem Hintergrund einer DNA-Degradation allerdings nicht ganz verständlich ist.

Bis auf das Anschwellen der Zelle lassen sich alle erwähnten Charakteristika auch beim Tinten-induzierten Zelltod nachweisen (siehe oben). Es handelt sich beim induzierten Zelltod also um eine Form von Nekrose - und zwar unabhängig von der eingesetzten Menge von APIT.

4.2.3 Das orthodoxe Modell einer dosisabhängigen Steigerung von Zellschädigungen lässt sich nicht anwenden

Diese überraschende Eigenschaft wird z.B. während einer Letalitätsbestimmung (LD_{50}) deutlich (siehe 3.2.2). Senkt man die eingesetzte Menge von APIT bzw. Tinte bei gleichbleibender Substratkonzentration kontinuierlich ab, so zeigen dementsprechend immer weniger Zellen die Anzeichen einer Nekrose (Morphologie, Trypanblauanfärbbarkeit), immer mehr erscheinen ungestört vital. Nun ist nach orthodoxen Modellen, bei denen die Nekrose am Ende einer dosisabhängigen Steigerung von Zellschädigungen steht (Raffray, 1997; Davies, 1999), zu erwarten, dass bei abnehmender „Intensität“ andere zelluläre Reaktionen auf Schädigung ausgeprägt werden. In dem Intensitätsbereich, in dem sich die APIT-Effekte bewegen, ist also ein Übergang von Nekrose zur Apoptose zu erwarten. Keinesfalls ist ein Übergang von Nekrose zu „kein Effekt messbar“ voraussagbar, wie das unter den gerade beschriebenen Versuchsbedingungen aber der Fall ist.

Titriert man statt des Enzyms direkt das Reaktionsprodukt H_2O_2 , wird der vorausgesagte Übergang (Hampton, 1997) tatsächlich manifest. Bei Behandlung von Jurkat-T-Lymphozyten mit H_2O_2 in Konzentrationen unter $100\mu M$ findet man ausschließlich apoptotische Zellen; bei Konzentrationen über $100-200\mu M$ findet man den nekrotischen Phänotyp (Ergebnisse nicht gezeigt). Warum liegen die Verhältnisse bei Titration des Enzyms anders?

Zunächst kann eine genauere Definition des hier benutzen Begriffs der Schädigungsintensität hilfreich sein, um dann zu hinterfragen, inwieweit sich Enzym- bzw. Reaktionsprodukt-Titration darin quantitativ unterscheiden.

Die Intensität ist das Produkt aus Amplitude und Persistenz einer Schädigung. Im Falle einer Behandlung von Zellen mit H_2O_2 sind also die eingesetzte Konzentration und die Inkubationsdauer (permanent oder begrenzt) bestimmende Größen des induzierten Effektes.

Dazu gesellt sich noch eine andere Variable, nämlich die Anstiegssteilheit. Sie definiert die Zeit, die bis zum Erreichen einer bestimmten Schädigungsamplitude verstreicht. Genau dieser Parameter ist es aber, den man durch Titration von APIT bei gleichbleibender Substratkonzentration (im Überfluss) variiert: Eine größere Menge APIT kann in einer gegebenen Zeit natürlich mehr Lysin und Arginin umsetzen bzw. mehr H_2O_2 produzieren, als eine geringere Enzymmenge es vermag. Die erreichbare Gesamtmenge, also die Amplitude der H_2O_2 -Schädigung ist jedoch weiterhin durch die Substratkonzentration vorgegeben und ändert sich nicht.

Wie bereits erwähnt, verfügt eine Zelle über verschiedene Entgiftungssysteme für ROS mit unterschiedlichen Kennlinien. Da aufgrund der Stoffwechsellätigkeit ständig ROS in den Mitochondrien anfallen, gibt es zunächst einmal ein basales System von ständig exprimierten Enzymen (Catalasen, Peroxidasen) und Antioxidantien (Glutathion, Vitamine, freie Aminosäuren) mit einer den Bedürfnissen angepassten Kapazität. Bei steigender Belastung bzw. beginnender Schädigung kann diese basale Entgiftungskapazität bis zu einem gewissen Punkt linear mitwachsen. Nach oxidativer Modifikation von Proteinen kann es zu deren proteolytischen Degradation in freie Aminosäuren kommen, die eine umfangreichere antioxidative Kapazität besitzen als das Ausgangsprotein (Dröge, 2002). Diese proteolytische Kapazitätssteigerung wächst mit steigender oxidativer Schädigung bis zu einem Punkt, an dem das System selbst oxidativ geschädigt wird.

Neben diesem ständig verfügbaren Entgiftungssystem gibt es ein zweites, zeitabhängig induzierbares, das aus antioxidativen Genen mit Promotoren für redoxsensitive Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1, NF- κ B) besteht. Als Beispiele seien hier Peroxiredoxin I und der Cystine-Transporter X_c^- genannt (Dröge, 2002). Eine Induktion dieser Gene stärkt die antioxidative Kapazität der Zelle um ein vielfaches, allein es benötigt eine gewisse Zeit.

Was lässt sich mit diesen Vorgaben nun bei einer Änderung des Parameters Anstiegssteilheit erwarten? Es lässt sich eine bestimmte Menge von APIT postulieren, deren H_2O_2 -Produktionsrate sich mit der H_2O_2 -Umsatzrate des basalen antioxidativen Systems der Zellpopulation deckt. Diese Enzymmenge ist nicht in der Lage, darüber hinaus ausreichend H_2O_2 für eine oxidative Schädigung der Zellen zu produzieren. Erhöht man nun die H_2O_2 -

Produktionsrate durch Einsatz einer größeren Menge APIT, so erhöht sich zunächst auch die basale antioxidative Kapazität der Zellen durch proteolytische Degradation geschädigter Proteine. Gleichzeitig wird durch positive Genregulation eine größere Menge antioxidativer Enzyme zur Verfügung gestellt. Diese zweite Stufe hat eine gewisse Zeitkonstante, das heißt, wenn die Möglichkeiten der basalen antioxidativen Kapazitäten ausgeschöpft sind, können sich schädigende ROS in der Zelle ansammeln, bis die zweite Stufe der antioxidativen Kapazität exprimiert ist.

Umso mehr APIT eingesetzt wird, umso höher also die Anstiegssteilheit einer H_2O_2 -Produktion ist, desto größer ist die erreichte Amplitude der Schädigung (bis zu einem Maximalwert, der durch die Substratkonzentration vorgegeben ist) und ebenso ihre Persistenz. Kommt es in dieser Zeit zu irreversiblen Schäden, die die zelluläre Schwelle einer Apoptoseinduktion überschreiten, wird diese Form des Zelltodes eintreten. Überschreiten die Schäden dagegen schon die zelluläre Schwelle für Nekrose, ist ein Aufrechterhalten der Homöostase also nicht mehr möglich, ergibt sich die zweite Form von Zelltod. Das kann beispielsweise der Fall sein, wenn die angesammelten ROS bereits in der notwendigen Konzentration vorliegen, um die Schlüsselenzyme der Apoptose via Oxidation ihres aktiven Cystein auszuschalten (Hampton, 1997; Borutaite, 2001). Oder wenn es der Zelle aufgrund exzessiver Schädigung gar nicht mehr möglich ist, die zweite Stufe der Antioxidantien herzustellen.

Nach diesen quantitativen Betrachtungen sollte eine Änderung der Anstiegssteilheit der H_2O_2 -Produktion via Titration der eingesetzten APIT-Menge also ebenso zur hierarchischen Ausprägung der Phänotypen führen wie eine Amplitudenänderung durch direkte H_2O_2 -Titration.

4.2.4 Findet eine zweite Form der Interaktion statt?

Warum findet man diesen Übergang also nicht bei der Letalitätsbestimmung? Es gibt auf diese Frage bislang keine experimentell fundierte Antwort. Trotzdem lässt sich vor dem Hintergrund einiger Versuchsdaten ein kühnes Postulat formulieren.

Es muss eine zweite Form der Interaktion zwischen APIT und Zellen geben, die dazu führt, dass immer der maximale Schädigungseffekt (bleibt abhängig von der Substratkonzentration) erzielt wird. Für die zweite Form der Interaktion müssen alle Zellen gleich sensitiv sein, es darf keine Variabilität in der Population geben.

Was führt zu dieser Hypothese? Zum einen, wie bereits ausführlich diskutiert, die Stereotypie des induzierten Phänotyps. Daneben wirft aber auch der lineare Verlauf der Letalitätsskurve (siehe 3.2.2) entsprechende Fragen auf. Wäre einzig die gleichmäßig im Medium erreichte H_2O_2 -Konzentration ursächlich für den Zelltod, dann wäre ein sigmoidaler Kurvenverlauf zu erwarten. Die antioxidativen Kapazitäten sollten in der Zellpopulation ja normalverteilt sein, das heißt, es gibt einige empfindlichere Zellen, viele durchschnittlich empfindliche und einige weniger empfindliche. Bei Anstieg der Schädigungsintensität sollte sich diese Normalverteilung entsprechend als sigmoidaler Verlauf in der Letalitätsskurve widerspiegeln. Der tatsächlich erreichte lineare Verlauf zeigt nun aber, dass der letale Effekt unabhängig von der antioxidativen Kapazität der Zelle, jedoch abhängig von der APIT-Menge ist. Daraus leitet sich eine Invarianz der Sensibilität für den zweiten Effekt innerhalb der Zellpopulation ab und eine direkte Proportionalität dieses zweiten Effekts zur eingesetzten Enzymmenge.

Für eine andere *sv*-LAAO wurde bereits eine spezifische Bindung an zelluläre Membranen beschrieben (Suhr, 1996), und auch für APIT liegt eine derartige Wechselwirkung im Bereich des Möglichen - sie könnte den postulierten zweiten Effekt darstellen. Sein Ergebnis wäre die lokale Produktion hoher H_2O_2 -Konzentrationen in direkter Umgebung der zellulären Membran, die, wie in der Einleitung angedacht, möglicherweise ein Integrationszentrum für eine Entscheidung der Zelltodvariante darstellt. Steht entsprechend viel Substrat zur Verfügung, könnte so leicht die Schwelle für eine punktuelle, nekrogene Induktion überschritten werden. So würden einzelne, direkt betroffene Zellen also bereits nekrotisch zugrunde gehen, noch bevor im Gesamtmedium (schnell genug) eine H_2O_2 -Konzentration erreicht ist, die für eine indirekte Schädigung anderer Zellen ausreicht. Eine größere Menge APIT könnte dementsprechend mit mehr Zellen direkt interagieren, was sich in einem linearen Verlauf der Letalitätsskurve widerspiegeln würde.

Interessanterweise gibt es einen Grad der APIT-Verdünnung (etwa im Bereich des LD_{50} -Wertes) ab dem bei weiter erhöhter Enzymmenge ebenfalls eine Population von Zellen mit spezifischen Charakteristika zunimmt. Diese sind zwar nicht Trypanblau-anfärbbar, weisen aber eine letale Morphologie auf. Möglicherweise zeigen sich ab diesem Punkt also neben direkt betroffenen Zellen (trypanblauanfärbbar) auch die indirekt durch freies H_2O_2 im Medium geschädigten Zellen, deren Membranintegrität noch vorhanden ist. Ihr Anteil nimmt zunächst zu (~20% der Zellen bei 75% Trypanblau-anfärbbaren Zellen), dann wieder zugunsten einer (weiter linear ansteigenden) Trypanblau-anfärbbarkeit ab (~10% bei 90% Trypanblau-anfärbbaren Zellen).

Wie könnte man sich nun eine derartige Wechselwirkung zwischen APIT und Zellmembran auf molekularer Ebene vorstellen? Bei der Besprechung der Sequenzanalyse wurde ja bereits auf ein N-terminales Motiv unmittelbar vor dem FAD-bindenden Bereich hingewiesen, das sich für eine Wechselwirkung mit Zellmembranen anbietet. Weitere Experimente müssen nun klären, ob dies tatsächlich der Fall ist.

Bleibt nur noch, ein gewichtiges Gegenargument dieser Hypothese der Nekroseinduktion aus dem Weg zu räumen. Wie bereits erwähnt, gibt es eine sv-LAAO, deren Interaktion mit Zellmembranen bereits nachgewiesen wurde und die genauso wie APIT L-Aminosäuren zu Ammoniak und H_2O_2 umsetzt. Diese induziert bei den betroffenen Zellen - wie übrigens die meisten anderen LAAOs auch (Du, 2002) - allerdings Apoptose, trotz einer lokalen Produktion von H_2O_2 in unmittelbarer Nachbarschaft zur Zellmembran. Der Schlüssel zu einer Erklärung dieses Unterschieds liegt in der Substratspezifität: Nur APIT und die L-Lysine α -Oxidase von *Trichoderma* sind in der Lage, L-Arginin als Substrat umzusetzen. Dessen Anteil an Zellkulturmedien liegt mit rund 1,15 mM (RPMI 1640) aber deutlich höher als derjenige anderer Aminosäuren, die z.B. von den sv-LAAOs oder der fc-LAAO umgesetzt werden können. So liegt die Konzentration der für APIT verfügbaren Substrate (Lysin und Arginin) im RPMI-Medium zusammen bei rund 1,35 mM. Die Konzentration der für sv-LAAOs gängigen Substrate (Leucin, Methionin, Phenylalanin und Tryptophan) liegt im RPMI-Medium insgesamt dagegen nur bei rund 0,6 mM. Das bedeutet aber, dass APIT insgesamt 0,675 mM H_2O_2 produzieren kann, eine sv-LAAO aber nur 0,3 mM. Der Unterschied in der Substratkonzentration wirkt sich natürlich auch auf die Produktionsrate von H_2O_2 aus.

Vor dem Hintergrund einer zellulären nekrogenen Schwelle, deren Überschreitung eine definierte, in einer bestimmten Zeit erreichte, H_2O_2 -Konzentration fordert, ist eine Differenz der induzierten Zelltodmotive bei den unterschiedlichen LAAOs plausibel.

4.3 Die biologische Funktion von APIT

Warum Seehasen eine möglicherweise antipredatorische Tinte produzieren und abgeben, war lange Zeit umstritten (Nolen, 1995). Das verwundert zunächst, denkt man doch sofort an die Analogie zu Tinten„fischen“, die bei Gefahr eine Tintenwolke ausstoßen und sich unter deren Sichtschutz schnell davon machen. Der Annahme, dass dem auch bei Seehasen so ist, widersprechen einige Tatsachen: So passieren viele Kontakte mit Räubern in der Gezeitenzone, wo aufgrund der Meeresspegelschwankungen starke Strömungen herrschen.

Eine vor dem „Wahrgenommen-Werden“ schützende Tintenwolke kann hier deshalb nicht zustande kommen. Auch sollen Seehasen nicht in der Lage sein, sich übermäßig rasch zu bewegen und den Schutz solch einer Wolke zu nutzen.

Diesen Argumenten zum Trotz zeigten sorgfältige Fraßstudien mit einem potentiellen Seehasenprädatoren, der Seeanemone *Anthopleura xanthogrammica*, einen ausgeprägten Einfluss von Tinte auf das Überleben der eingesetzten Seehasen (*Aplysia californica*; Nolen, 1995). Um den chemischen Schutz von sekundären Rotalgenmetaboliten auszuschalten, wurden einige Seehasen vor diesen Studien nur mit Grünalgen ernährt. Dann wurden sie in ein Aquarium mit den Seeanemonen gesetzt, und die Zahl der überlebenden Tiere wurde nach Kontakt mit dem Prädatoren aufgenommen. Nur 7% der grünalgenernährten Tiere, die übrigens auch keine Tinte abgaben, überlebten das Treffen. Wurde bei Kontakt zwischen Seeanemonen und diesen Seehasen allerdings eine gewöhnliche Menge frisch gewonnener Tinte von rotalgenernährten Seehasen dazugegeben, stieg die Zahl der Überlebenden auf 71%. Der gleiche Effekt - also eine Ablehnung der Beute - zeigte sich bei Fischteilen, bot man sie den Seeanemonen gleichzeitig mit Tinte an.

Interessanterweise bestand diese Ablehnung bei Tintenapplikation in einem Ausweichen/ Einziehen der Seeanemontentakel und sogar in einem Ausspucken bereits verschlungener Seehasen. Der Raum zwischen den Tentakeln und dem „Magen“ der Seeanemone stellen Bereiche dar, die vor der Strömung geschützt seien und so ein Wirken der konzentrierten Tinte auf empfindliche Strukturen erlaube, so die Autoren (Nolen, 1995).

Welcher Bestandteil der Tinte für diese Reaktion verantwortlich zeichnet, ist nicht geklärt. Sicher scheint nur, dass eine Rotalgen beinhaltende Ernährung von *A. californica* für deren Tintensekretion bei Prädatorenkontakt unerlässlich ist. Möglicherweise gibt es eine Art Rückkopplung zwischen den Tintenvesikeln in der Manteldrüse und dem Sekretion auslösenden Reflexzentrum, die dieses Abwehrverhalten bei Nichtverfügbarkeit von Tinte zugunsten eines anderen inhibiert. Ein essentieller Bestandteil der Wirksamkeit stammt also aus Rotalgen - so scheint es.

Nun gibt es eine Seehasenart, *A. juliana*, die sich ausschließlich von Grünalgen ernährt und deren infolgedessen weißliche Tinte genauso antiprädatoren wirksam ist wie diejenige ihrer rotalgenverzehrenden Verwandten (Pennings, 1994). Aus ihrer Tinte („fetid secretion“) wurde ebenfalls ein zytolytisches Glykoprotein isoliert, Julianin S. Dieses Beispiel widerspricht der These von der generellen Rotalgenherkunft des antiprädatoren Agens.

Nach der Charakterisierung eines zytolytischen Seehasenproteins als ROS-herstellendes Enzym liegt die Vermutung nahe, diese Proteine seien für die Ungenießbarkeit Tinte einsetzender Seehasen verantwortlich. Der Einsatz eines solchen Enzyms als Waffe hat im Tierreich verschiedene Beispiele: So setzt der Baumwollkapselbohrer *Helicoverpa zea* eine ROS-produzierende Glukose Oxidase ein, um die Abwehrmechanismen von ihm befallener Pflanzen, z.B. die Produktion toxischen Nikotins durch die Tabakpflanze *Nicotiana tabacum*, lahmzulegen (Musser, 2002). Ein anderes eindrucksvolles Beispiel liefert die bereits erwähnte Mittelmeer-Makrele *S. Japonicus*. Nach Infektion durch den Nematoden *Anisakis simplex* bildet sie eine Gewebekapsel um dessen Larven aus, um ein großangelegtes Eindringen des Parasiten in ihr Körpergewebe zu unterbinden. Im Bereich dieser Kapsel wird zudem eine L-Lysin Oxidase exprimiert, die oben beschriebene fc-LAAO, die eine larvenabtötende Wirkung haben soll (Jung, 2000).

Bei APIT könnten entweder das generierte H_2O_2 oder der lokale Sauerstoffentzug die betroffene Seeanemone zum Ablassen von der Beute bewegen. Ob Lysin/Arginin-Analoga in ausreichendem Maße als Substrate verfügbar sind bzw. ein völlig anderes Molekül das natürliche Substrat darstellt, ist unklar. Das im Ergebnisteil geschilderte Experiment mit Lysin/Arginin-frei kultivierten Zellen, die bei Behandlung mit nativer Tinte keine Zytolyse zeigten, schließt tinteneigene Bestandteile als mögliche Enzymsubstrate jedoch aus. Sollte Enzymtätigkeit also tatsächlich den Abwehrmechanismus darstellen, muss ein im Bereich der Seeanemone vorhandenes Substrat postuliert werden.

Trifft diese Erklärung den Kern, bleibt unverständlich, warum bei dem oben geschilderten Experiment grünalgenernährte *A. californica* bei Angriff keine Tinte sezernieren, die zwar den Rotalgenfarbstoff, nicht aber die tiereigene sni-LAAO vermissen ließe. Dieses Ergebnis macht nur Sinn, wenn ein Bestandteil der Algenkost für die Funktionalität des tinteninherenten Abwehrmechanismus unabdingbar ist.

Eine wirkliche Aufklärung können nur Fraßexperimente analog den oben geschilderten bringen, bei denen die Enzymaktivität der sni-LAAOs z.B. durch Erhitzen zerstört wurde, bzw. das Protein aus der Tinte entfernt wurde.