

**Struktur, Funktion und potentielle Anwendung
der PKC- und SNZ/SNO-Promotoren aus
Geodia cydonium und *Suberites domuncula***

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von
Jürgen Seack
geb. in Bingen

Mainz, 2000

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Schwämme (Porifera)	1
1.2	Naturstoffe/Sekundärmetabolite aus marinen Schwämmen	2
1.3	Produktion mariner Naturstoffe	7
1.3.1	Chemische Synthese	7
1.3.2	Kontrollierte "Ernte"	7
1.3.3	Aquakultur von Schwämmen	8
1.3.4	<i>In vitro</i> -Produktion	9
1.3.4.1	<i>In vitro</i> -Kultivierung des kompletten Schwammes/Bioreaktoren	9
1.3.4.2	Die Schwamm Gewebe- oder Zellkultur	10
1.3.4.3	Transgene Produktion	11
1.4	Zielsetzung der Arbeit	11
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Chemikalien	13
2.2	Verbrauchsmaterialien	13
2.3	Geräte	13
2.4	Enzyme	14
2.5	Restriktionsenzyme	15
2.6	Kits	15
2.7	Vektoren	15
2.8	Bakterienstämme	16
2.9	Molekulargewichtsmarker	16
2.10	Nährmedien für die Bakterienkultur	16
2.11	Primer	17
2.11.1	Primer für die Amplifikation der <i>S. domuncula</i> „Ethylen“-DNA-Sonden	17
2.11.2	Primer für die Amplifikation der <i>S. domuncula</i> cPKC-Sonde	17
2.11.3	Vektorprimer	17
2.11.4	Primer für die Amplifikation der SNO-cDNA und der genomischen SNO-Sequenz aus <i>S. domuncula</i>	18

2.11.5	Primer für die RT-PCR zur Kartierung des Transkriptionsstartpunktes des <i>S. domuncula</i> SNZ-Gens	18
2.11.6	Primer für die RT-PCR zur Kartierung des Transkriptionsstartpunktes des <i>G. cydonium</i> PKC-Gens	18
2.11.7	Primer für die Konstruktion der Luciferase- und pEGFP-Fusionsplasmide	18
2.11.7.1	<i>G. cydonium</i> PKC	18
2.11.7.2	<i>S. domuncula</i> SNZ/SNO	19
2.11.7.3	<i>S. domuncula</i> PKC	19
2.11.8	Sequenzierprimer (IRD800 gelabelt)	19
2.12	DNA-Techniken	20
2.12.1	Die Polymerasekettenreaktion	20
2.12.1.1	PCR-Ansätze und Temperaturzyklen	20
2.12.1.2	Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) der Primer	21
2.12.2	DNA-Gelelektrophorese	21
2.12.2.1	Auftrennung der DNA-Fragmente	22
2.12.2.2	Sichtbarmachung der DNA-Fragmente im Agarosegel und Dokumentation der Gele	22
2.12.3	Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen	23
2.12.4	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	23
2.12.5	Ligation	24
2.12.6	Restriktion	24
2.12.7	Subklonierung	25
2.12.7.1	Subklonierung von PCR-Produkten mittels T-A Klonierung	25
2.12.7.2	Subklonierung von PCR-Produkten mittels Linkerprimern	26
2.12.7.3	Subklonierung von Restriktionsfragmenten mit homologen Enden	26
2.12.8	Transformation von <i>E. coli</i>	26
2.12.8.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	27
2.12.8.2	Überprüfung der Kompetenz der Bakterienzellen	28
2.12.9	Blau-Weiß Selektion der Transformanten	28
2.12.10	Checking-PCR	29
2.12.11	Kultivierung von Bakterien für die Plasmid-DNA Präparation	29
2.12.11.1	Der Vereinzelausstrich	29
2.12.11.2	Die Suspensionskultur	29
2.12.11.3	Herstellung von Dauerkulturen	30
2.12.12	Messung der optischen Dichte (OD) einer Zellkultur	30

2.12.13	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	30
2.12.14	Midi- bzw. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	31
2.12.15	Präparation von λ -DNA	32
2.12.16	Messung der Konzentration und Reinheit einer DNA/RNA-Lösung	32
2.12.17	Chloroform/Phenol Extraktion von DNA	33
2.12.18	Fällen der DNA durch Ethanolpräzipitation	33
2.12.19	Southern Blotting	34
2.12.19.1	<i>Southern Blotting von λ-DNA</i>	34
2.12.19.2	<i>Southern Blotting von genomischer DNA</i>	34
2.12.20	Zyklische DNA-Sequenzierung mit dem automatischen Sequenzierer LI-COR 4200L	35
2.12.20.1	<i>Gießen des Gels</i>	35
2.12.20.2	<i>Sequenzierreaktion</i>	36
2.12.20.3	<i>Auftragen der Proben und Gellauf</i>	36
2.12.20.4	<i>Auswertung der Gele</i>	37
2.13	Konstruktion genomischer DNA-Bibliotheken von <i>S. domuncula</i>	38
2.13.1	Präparation der genomischen DNA.....	38
2.13.1.1	<i>Checking Gel</i>	39
2.13.2	Partielle Restriktion der genomischen DNA mit <i>Sau 3AI</i>	39
2.13.3	Partielles Auffüllen der Restriktionsenden	40
2.13.4	Ligation mit den λ FIX [®] II Vektorarmen.....	41
2.13.5	<i>In vitro</i> -Verpackung der λ DNA	41
2.13.6	Bestimmung des Phagentiters der genomischen Bank bzw. der Kontrollen....	42
2.13.6.1	<i>Kultivierung der jeweiligen Wirtsbakterien für die Phageninfektion</i>	42
2.13.6.2	<i>Titration der Phagenlösungen</i>	43
2.13.7	Amplifikation der genomischen Bibliothek	43
2.14	Screening der genomischen Bank mit homologen Sonden	44
2.14.1	DIG-Markierung der DNA-Sonden	44
2.14.2	Ausplattieren der Phagen, Transfer auf die Membran und Denaturierung der DNA	44
2.14.3	Prähybridisierung, Hybridisierung und Stringenzwaschschritte	45
2.14.4	Detektion der DIG-markierten Nukleinsäuren	45
2.14.5	Isolierung positiv hybridisierter Plaques.....	46
2.14.6	Anlegen eines Phagenstocks	46

2.15 RNA-Techniken	47
2.15.1 DEPC-Behandlung von Lösungen und Verbrauchsmaterialien.....	47
2.15.2 RNA-Isolation mit Hilfe von TRIzol [®] -Reagenz.....	47
2.15.3 RNA-Checking-Gel.....	48
2.15.4 RT-PCR.....	48
2.16 Konstruktion der pGL2-Fusionsplasmide	49
2.17 Konstruktion der pEGFP-Fusionsplasmide	50
2.18 Zellkultur-Techniken	52
2.18.1 Zellzahlbestimmung.....	52
2.18.2 Subkultivierung der NIH 3T3 Zellen	53
2.18.3 Kryokonservierung der NIH 3T3 Zellen.....	53
2.18.4 Auftauen der Zellen.....	53
2.18.5 Transiente Transfektion von NIH 3T3 Zellen mit LIPOFECTAMINE [™] bzw. LIPOFECTAMINE PLUS [™]	54
2.18.6 Reportergen-Assays	55
2.18.6.1 Lyse der Zellen.....	55
2.18.6.2 β -Galaktosidase-Assay.....	55
2.18.6.3 Luciferase-Assay	56
2.18.6.4 EGFP-Detektion.....	56
2.19 Halterung der Schwamme	57
2.20 Herstellung von Schwamm-Einzelzellsuspensionen.....	57
2.21 Ballistischer Transfer von Plasmid-DNA in Schwammzellen.....	58
2.21.1 Prazipitation der DNA auf die Gold-Mikrocarrier.....	58
2.21.2 Beschichten des Gold-Coat [™] -Schlauches mit DNA-Mikrocarrier Suspension mit Hilfe der <i>Tubing Prep Station</i> und Zuschneiden der Patronen.....	59
2.21.3 Partikelbombardement mit der Genkanone.....	60
2.22 Computerprogramme und <i>Online</i>-Dienste zur Auswertung der Daten	61
2.22.1 Computerprogramme	61
2.22.2 Internet-Adressen	61
3 ERGEBNISSE	62
3.1 Konstruktion der genomischen Bibliotheken von <i>S. domuncula</i>	62
3.2 Screening der genomischen Bibliothek.....	64

3.3	Charakterisierung der "Ethylen"-Klone	65
3.3.1	Analyse der Primärstruktur	65
3.3.2	Genomischer Southern Blot von SD_SNZG	70
3.3.3	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von SD_SNZG	72
3.4	Charakterisierung der <i>S. domuncula</i> SD_SNZG 5'-flankierenden Region	75
3.4.1	Das SNO-Gen.....	75
3.4.1.1	<i>Analyse der Primärstruktur.....</i>	75
3.4.1.2	<i>Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von SD_SNO</i>	78
3.4.2	Analyse der 5'-flankierenden Region von SD_SNZG und SD_SNO	80
3.4.3	Kartierung des Transkriptionsstartpunktes von SD_SNZG	82
3.4.4	Konstruktion der SNZ/SNO 5'-Luciferase- und EGFP-Fusionsplasmide.....	83
3.5	Charakterisierung der <i>S. domuncula</i> cPKC-Klone.....	85
3.5.1	Analyse der Primärstruktur	85
3.5.2	Analyse der 5'-flankierenden Region des <i>S. domuncula</i> cPKC-Klons.....	87
3.5.3	Konstruktion des <i>S. domuncula</i> cPKC 5'-Luciferase-Fusionsplasmids	89
3.6	Charakterisierung der <i>G. cydonium</i> cPKC 5'-flankierenden Region.....	90
3.6.1	Analyse der 5'-flankierenden Region.....	90
3.6.2	Kartierung des Transkriptionsstartpunktes von GCPKC2 <i>Ge</i>	92
3.6.3	Konstruktion der <i>G. cydonium</i> cPKC 5'-Luciferasedeletionsklone und des cPKC 5'-EGFP-Fusionsplasmids	94
3.7	Funktionelle Analyse von 5'-flankierenden Regionen der Schwammgene in NIH 3T3 Zellen.....	95
3.7.1	Analyse der <i>G. cydonium</i> cPKC 5'-Luciferasedeletionsklone	95
3.7.1.1	<i>Effekte des physiologischen Zustands der NIH 3T3 Zellen auf die Promotoraktivität des cPKC-Gens</i>	97
3.7.2	Analyse der <i>S. domuncula</i> SD_SNZG/SD_SNO Luciferasefusionsplasmide ..	98
3.7.2.1	<i>Effekte von Ethylen und reaktiven Sauerstoffspezies auf die Promotoraktivität des SNZ-Promotors in NIH 3T3 Zellen</i>	100
3.7.3	Analyse des <i>S. domuncula</i> cPKC Luciferasefusionsplasmids	102
3.7.4	Expression der EGFP-Fusionsplasmide in NIH 3T3 Zellen	102
3.8	Expression der EGFP-Fusionsplasmide in <i>S. domuncula</i> Zellen.....	105

4	DISKUSSION	109
4.1	Die <i>G. cydonium</i> und <i>S. domuncula</i> cPKC Promotoren.....	109
4.1.1	Die 5'-flankierende Region von GCPKC2 <i>Ge</i> weist eine starke Promotoraktivität in NIH 3T3 Zellen auf und verfügt über einen TATA-losen Promotor	110
4.1.2	Die erste GC-Box des <i>G. cydonium</i> cPKC-Promotors könnte an der Positionierung des Präinitiationskomplexes beteiligt sein.....	111
4.1.3	Die 5'-flankierende Region des <i>S. domuncula</i> cPKC Gens weist eine schwache Promotoraktivität in NIH 3T3 Zellen auf.....	112
4.1.4	Perspektiven	113
4.2	Die SNZ/SNO-Gene aus <i>S. domuncula</i>	114
4.2.1	SD_SNZG und SD_SNO sind Mitglieder hochkonservierter Genfamilien....	114
4.2.2	Mögliche Funktion von SD_SNZG und SD_SNO in Schwämmen.....	116
4.3	Der bidirektionaler Promotor von SD_SNZ und SD_SNO.....	117
4.3.1	Abhängig von der Orientierung ist die Aktivität des SNZ/SNO-Promotors unterschiedlich stark.....	117
4.3.2	Die Aktivität des SNZ-Promotors wird durch Applikation von Methylenblau moduliert	118
4.3.3	Perspektiven	119
4.4	Die Transfektion der <i>S. domuncula</i> Zellen.....	119
4.4.1	Der ballistische Gentransfer ist eine geeignete Methode, um Fremd-DNA in Schwammzellen einzubringen.....	119
4.4.2	Nur der heterologe CMV-Promotor bewirkt eine sichtbare Expression von EGFP in Schwammzellen.....	120
4.4.3	EGFP ist ein für Schwammzellen geeignetes Reportergen.....	120
4.4.4	Perspektiven	121
5	ZUSAMMENFASSUNG	122
6	ABKÜRZUNGS- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	123
7	LITERATUR.....	128

1 EINLEITUNG

1.1 Die Schwämme (Porifera)

Die Schwämme gehören zu den ältesten mehrzelligen Organismen (M e t a z o a). Aus paläontologischen Daten weiß man sicher, daß diese Tiere seit mindestens 600 Millionen Jahren existieren (Übersichtsartikel: MEHL *et al.*, 1998). Molekularbiologische Daten deuten sogar auf ein noch höheres Alter von etwa 800 Millionen Jahren hin (MÜLLER, 1995).

Es gibt keine zuverlässige Schätzung der Artenzahl bei Schwämmen; beschrieben sind etwa 10.000 rezente Arten. Auch über die Systematik der Schwämme herrscht noch Uneinigkeit. Die drei Taxa *Calcarea* (Kalkschwämme), *Demospongiae* (Abb. 1, 5 und 11) und *Hexactinellidae* (Glasschwämme) werden mittlerweile zwar von den meisten Autoren als monophyletische Einheiten im System der Porifera akzeptiert, doch ihre phylogenetische Stellung zueinander ist noch umstritten. Eine Gruppe von Autoren betrachtet Hexactinelliden und Demospongien als Schwestergruppen und stellt sie als **Silicea** zusammengefaßt den **Calcarea** gegenüber (z. B. BÖGER, 1988). Andere Autoren stellen die **Cellularia** mit den beiden Schwestergruppen *Calcarea* und *Demospongiae*, den **Symplasma**, mit einer einzigen Klasse, den Hexactinelliden, gegenüber (z. B. MEHL und REISWIG, 1991; KRUSE *et al.*, 1998a). Die *Demospongiae* stellen mit 80-90% der Schwammarten und einer entsprechenden Formenvielfalt die weitaus größte und wichtigste rezente Gruppe der Porifera dar (WESTHEIDE und RIEGER, 1996).



Abb. 1: *Geodia cydonium*.

Ein etwa kopfgroßes Exemplar von *Geodia cydonium*. Dieses Exemplar, das zum Taxon der *Demospongiae* (Subtaxon *Astrophorida*) gehört, wurde in der nördlichen Adria nahe Rovinj aus dem Meer geholt.

Foto: Prof. W.E.G. Müller

Als sessile Strudler besiedeln die Schwämme, mit Ausnahme der ca. 120 Arten der *Spongillidae* (Süßwasserschwämme), das Meer in allen geographischen Breiten. In Küstennähe, bis in Tiefen von 50 m verbreitet, dringen einige Arten auch bis ins Abyssal vor. Besonders die Hexactinellidae stellen einige Tiefseebewohner, die in Tiefen bis zu 6000 m nachgewiesen wurden (KÄSTNER, 1993).

Durch ein System zahlreicher kleiner Öffnungen (*Ostien*) kann der Schwamm Wasser aufnehmen. Die Wasseraufnahme geschieht teils aktiv durch koordinierten Geißelschlag der *Choanocyten* (Kragengeißelzellen) teils passiv durch die Wasserströmung. Die im Wasser befindlichen Nahrungspartikel werden über Kanäle und Kragengeißelkammern abfiltriert. Die Nahrungsaufnahme selbst geschieht durch Endocytose. Über eine oder mehrere größere Öffnungen (*Oscula*) verläßt das Wasser den Schwammkörper wieder. Im Schwammkörper lebende Mikrosymbionten (Bakterien, Cyanobakterien, einzellige Grünalgen) tragen oft zur Ernährung bei. Auch eine sich carnivor ernährende Schwammart wurde beschrieben (VACELET und BOURY-ESNAULT, 1995).

Die Fortpflanzung verläuft normalerweise sexuell. Viele Arten sind hermaphroditisch, Süßwasserschwämme oft getrenntgeschlechtlich. Auch asexuelle Fortpflanzung ist verbreitet und kann durch *Fragmentierung* oder Ausbildung spezieller *Dauerknospen* erfolgen. Die am weitesten verbreiteten asexuellen Strukturen sind die kapselförmigen *Gemmulae*, die bei den meisten Süßwasserschwämmen und einigen Meeresschwämmen vorkommen (WESTHEIDE und RIEGER, 1996).

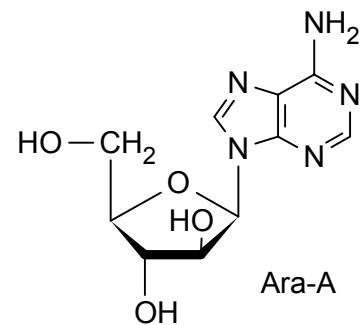
Von den anderen Metazoen unterscheiden sich die Schwämme durch das Fehlen echter Epithelien und Organe, eines Nervensystems und von Blutgefäßen. Einige Schwammzellen sind jedoch in epithelienartigen Geweben (*Pinacoderm*, *Choanoderm*) und organähnlichen Zusammenschlüssen (*Kragengeißelkammern*) organisiert. Zwischen den beiden epithelartigen Gewebeschichten befindet sich das mehr oder weniger stark entwickelte *Mesohyl* mit Einzelzellen, extrazellulärer Matrix (ECM) und meist mit einem anorganischen Stützskelett aus Siliciumoxid oder Calciumcarbonat.

1.2 Naturstoffe/Sekundärmetabolite aus marinen Schwämmen

Das Streben nach körperlicher Gesundheit hat den Menschen seit altersher zur Erfüllung dieses Wunsches nach Hilfe im Angebot der Natur suchen lassen. Vorzugsweise Pflanzen bzw. deren Extrakte dienten aufgrund ihrer meist leicht zu bewerkstelligen Beschaffung und Lagerung sowie ihrer reproduzierbaren Wirkung als traditionelle, natürliche Heilmittel. So ist es nicht weiter verwunderlich, daß pflanzli-

che Arzneimittel oder nach dem Vorbild pflanzlicher Inhaltsstoffe hergestellte Medikamente mindestens ein Viertel der heute in Industrieländern eingesetzten Wirkstoffe ausmachen (LOZOYA, 1997). Neben Ansätzen neue Wirkstoffe durch Methoden der kombinatorischen Chemie, der Bio- und Gentechnologie sowie durch gezieltes Design am Computer aufzuspüren, wird auch in jüngster Zeit weiterhin der Weg verfolgt, neue bioaktiv wirksame Substanzen aus natürlichen Quellen zu isolieren. Dafür bieten sich auch künftig Pflanzen und Mikroorganismen an. Aber wie man mit der Isolierung der Nucleosidanaloga Spongouridin und Spongothymidin aus dem Schwamm *Cryptotethya crypta* durch BERGMAN und FEENEY, (1951) erkannt hat, gilt dies ebenso für marine Organismen. Das aus diesen beiden Nucleosiden entwickelte Arabinofuranosyladenin (Ara-A; **Abb. 2**) besitzt eine stark virustatische Wirkung (MÜLLER *et al.*, 1977). Es kam in den siebziger Jahren unter der Bezeichnung Vidarabin als Medikament zur Bekämpfung von *Herpes*-Erkrankungen auf den Markt.

Abb. 2: Strukturformel des Arabinofuranosyladenin (Ara-A). Dieses Medikament, das sich unter der Bezeichnung Vidarabin im Einsatz gegen *Herpes*-Viruserkrankungen auf dem Markt befindet, wurde anhand von Nucleosidanaloga, die aus dem marinen Schwamm *Cryptotethya crypta* isoliert wurden (BERGMAN und FEENEY, 1951), entwickelt.



Seit Beginn der siebziger Jahre wurden aus tausenden von marinen Organismen ebenso viele Naturstoffe, auch Sekundärmetabolite genannt, isoliert (Übersichtsartikel: IRELAND *et al.*, 1993; SARMA *et al.*, 1993; FAULKNER, 1995 und 1997). Die bisher untersuchten Naturstoffe gehören den unterschiedlichsten Substanzklassen an (z. B. Sterole, Terpenoide, Alkaloide, Aminosäurederivate, Saponine und Makrolide). Viele dieser Stoffe besitzen das Potential, als Pharmazeutika, Kosmetika, Nahrungszusätze, molekulare Sonden und vieles weitere mehr eingesetzt oder weiterentwickelt zu werden (Übersichtsartikel: MUNRO *et al.*, 1994; CRAGG *et al.*, 1997; MUNRO *et al.*, 1999; POMPONI, 1999). Bei einigen ist dies bereits geschehen wie bei dem oben erwähnten Ara-A. Weitere Beispiele sind die Okadainsäure (**Abb. 3**), die ursprünglich aus marinen Schwämmen der Gattung *Halichondria* isoliert wurde (TACHIBANA *et al.*, 1981), und Manoalid (**Abb. 3**), das ebenfalls aus einer marinen Schwammspezies (*Luffariella variabilis*) stammt (DE SILVA und SCHEURER, 1980; GLASER und JACOBS, 1986). Beide Substanzen kommen als molekulare Sonden (Phosphataseinhibitor/Phospholipase-A₂ Inhibitor) zum Einsatz.

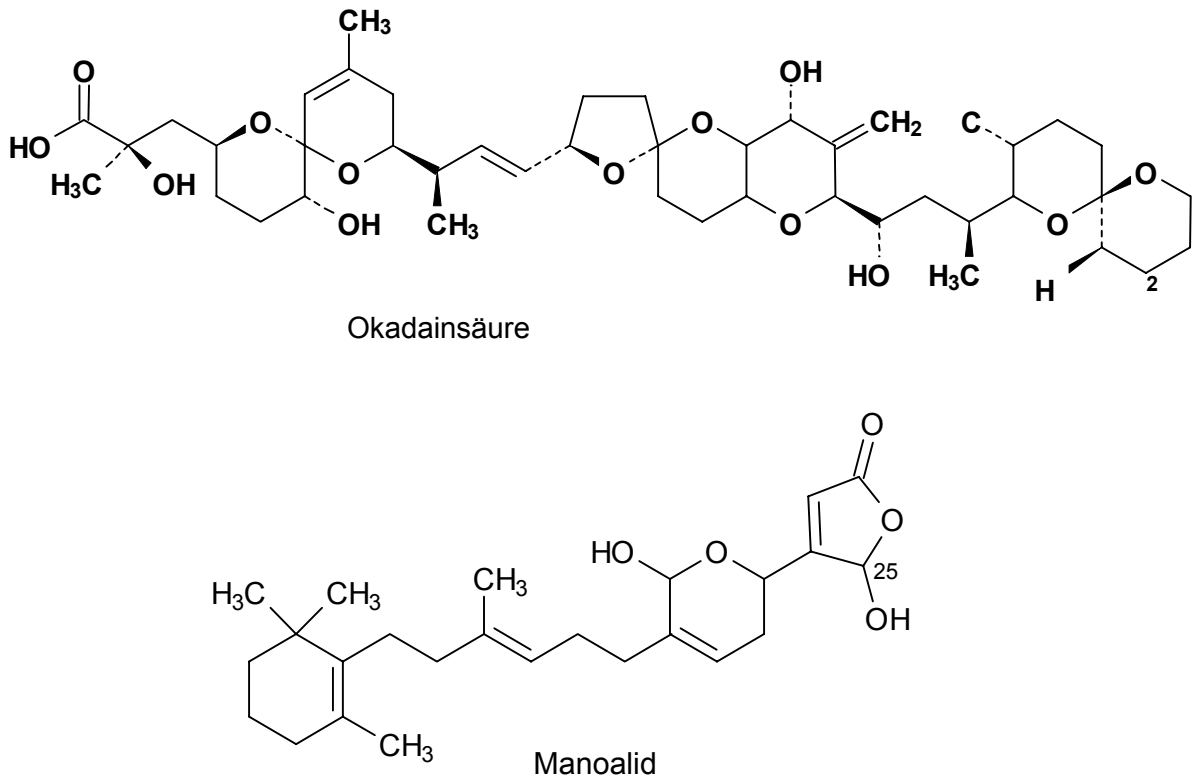


Abb. 3: Strukturformeln der beiden aus unterschiedlichen Schwammspezies gewonnenen Naturstoffe **Okadainsäure** und **Manoalid**. Okadainsäure wurde ursprünglich aus Schwämmen der Gattung *Halichondria* isoliert (TACHIBANA *et al.*, 1981). Wie sich später herausstellte, ist sie jedoch ein Sekundärmetabolit verschiedener Dinoflagellatengattungen (z. B. *Dinophysis*) und wird in Schwämmen, aber auch Muscheln und Fischen über die Nahrungskette angereichert. Okadainsäure ist ein starkes Toxin, das als Mitverursacher der DSP (*Diarretic Shellfish Poisoning*) verantwortlich gemacht wird. In der Forschung findet Okadainsäure als Inhibitor der Proteinphosphatasen 1/2A und als Tumorpromotor Verwendung. Das Sesterterpen Manoalid wurde aus dem Schwamm *Luffariella variabilis* isoliert (DE SILVA und SCHEURER, 1980; GLASER und JACOBS, 1986). Es wirkt entzündungshemmend, analgetisch und immunsuppressiv. Zum Einsatz kommt es zur Zeit als spezifischer Inhibitor der Phospholipase-A₂.

Daß die Suche nach Sekundärmetaboliten aus marinen Organismen trotz des teilweise hohen Aufwands sinnvoll ist, bestätigen die statistischen Daten des Screening Programms des NCI (*US National Cancer Institute* [englische Termini werden ab hier *kursiv* hervorgehoben]). Diese Daten wurden von Dr. Peter Murphy zur Verfügung gestellt und zuerst von GARSON (1994) publiziert. Diese Tests zeigten, daß die Ausbeute an cytotoxisch wirksamen Extrakten aus Meeresorganismen deutlich höher war als bei Organismen aus terrestrischen Lebensräumen. Annähernd 2% der über 6000 getesteten marinen Tierextrakte wiesen eine signifikante cytotoxische Wirkung auf. Dagegen lag der Anteil bei terrestrischen Pflanzen und Tieren deutlich unter 1% (**Abb. 4**).

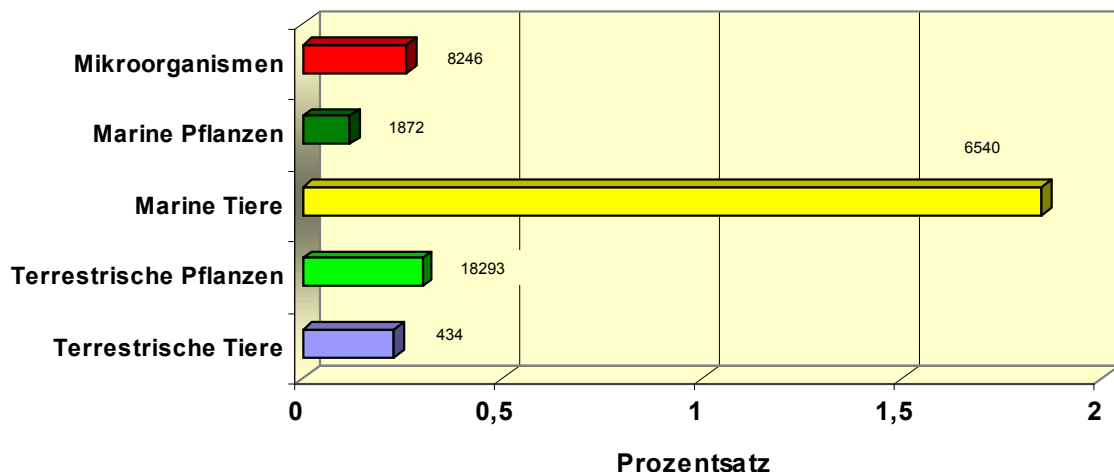


Abb. 4: Verteilung der Proben mit signifikanter Cytotoxizität beim vorklinischen Screening des NCI's. Diese Daten wurden von Dr. Peter Murphy vom NCI zur Verfügung gestellt und zuerst von GARSON, (1994) publiziert. Die kleine Zahl neben bzw. über den Balken gibt die absolute Anzahl der jeweils getesteten Spezies an. Weitere Details siehe Text.

Von den 26 im marinen Habitat vertretenen Tierstämmen wiesen die Extrakte aus den invertebraten Stämmen der Bryozoa, Cnidaria und Porifera eine besonders hohe Bioaktivität auf.

Speziell die Schwämme besitzen abgesehen von ihrem Gehalt an Nadeln, der jedoch nicht immer vorhanden ist, keinerlei wirksame morphologische Schutzmechanismen. Die Produktion von bioaktiven Substanzen dient demzufolge wahrscheinlich in den meisten Fällen dem Schutz des Schwammes, sei es zum Schutz vor Fraßfeinden (PAWLIK *et al.*, 1995; CHANAS *et al.*, 1996), vor der Besiedlung durch Epibionten (*Fouling*) (DAVIS *et al.*, 1991; HENRIKSON und PAWLIK, 1995; MIKI *et al.*, 1996) oder vor Mikroorganismen und UV-Strahlung (PAUL, 1992). Aber auch eine Rolle bei allelopathischen Interaktionen zwischen Koralle und Schwamm wird diskutiert (SULLIVAN *et al.*, 1983; PORTER und TARGETT, 1988).

Die Sekundärmetabolite der Schwämme, die man bis jetzt isoliert und getestet hat, weisen die unterschiedlichsten biologischen Eigenschaften auf. So wurden neben cytotoxischen auch antibakterielle, antivirale, fungizide, antihelminthische, antiinflammatorische und immunsuppressive Aktivitäten gefunden (MÜLLER und SCHRÖDER, 1997). Neben dem bereits erwähnten Ara-A besitzen beispielsweise auch die Sesquiterpene Avarol und seine oxidierte Form Avaron, die aus dem Mittelmeerschwamm *Dysidea avara* (Abb. 5) stammen, antivirale und zellprotektive Eigenschaften. Beide Substanzen können bereits in geringen Konzentrationen die

Vermehrung des HI-1 Virus verhindern und gesunde Zellen vor Infektion mit dem AIDS-Erreger schützen (SARIN *et al.*, 1987; SARMA *et al.*, 1993).

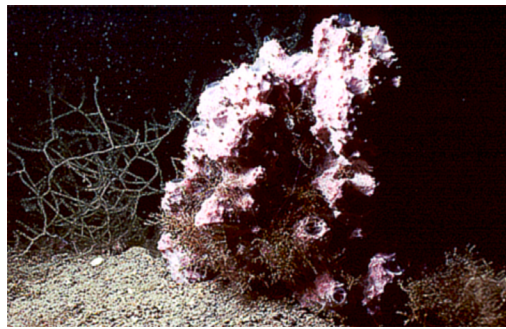
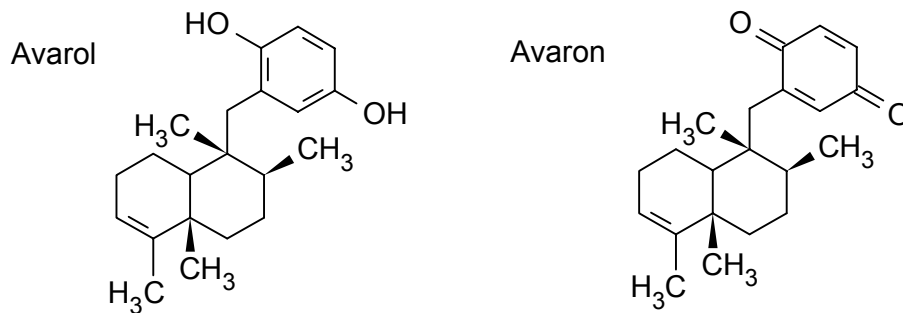


Abb. 5: Strukturformeln der beiden Sesquiterpene Avarol und Avaron. Darunter abgebildet der Mittelmeerschwamm *Dysidea avara* (Demospongia/Dictyoceratida), aus dem diese beiden Sekundärmetabolite isoliert wurden. Beide Substanzen inhibieren im Zellversuch die Vermehrung des Humanen Immunschwächevirus Typ 1 (HIV 1) (SARIN *et al.*, 1987). Beide Substanzen kommen im Schwamm in großen Mengen vor (ca. 2,5 g/kg Feuchtgewicht).

Es ist bekannt, daß die Assoziation von Schwämmen mit Mikroorganismen wahrscheinlich schon mindestens 500 Millionen Jahre besteht (WILKINSON, 1984). Im Verlauf der Evolution haben eine Anzahl von Mikroorganismen eine wahrscheinlich oft symbiontische Beziehung zu ihren Schwammwirten aufgenommen. Es handelt sich hierbei um so unterschiedliche Organismen wie Cyanobakterien (VACELET, 1971), diverse heterotrophe Bakterien (SANTAVY *et al.*, 1990; ALTHOFF *et al.*, 1998; FRIEDRICH *et al.*, 1999), einzellige Algen (RÜTZLER, 1985) und Zoochlorella (GILBERT und ALLEN, 1973). Diese Mikroorganismen tragen aller Wahrscheinlichkeit nach zur Ernährung ihrer Wirte bei (BOROWITZKA *et al.*, 1988), sind aber wohl auch an der Synthese von Sekundärmetaboliten beteiligt (PROKSCH, 1994; UNSON *et al.*, 1994; BEWLEY *et al.*, 1996). Wenn man also von aus Schwämmen isolierten Naturstoffen spricht, ist es nicht immer leicht, zu unterscheiden, ob diese Naturstoffe aus den Schwämmen selbst oder von den mit ihnen assoziierten Mikroorganismen stammen.

1.3 Produktion mariner Naturstoffe

Naturstoffe/Sekundärmetaboliten sind in den Organismen, die sie produzieren, meist nur in äußerst geringen Mengen vorhanden. Der Bedarf an einer bestimmten Substanz liegt jedoch beispielsweise zum Zweck präklinischer Studien oft bei einigen Gramm. Um diese Substanzmengen aufzureinigen, werden meist mehrere Tonnen Naßgewicht benötigt. So wurden z. B. aus 12.000 kg Naßgewicht der Bryozoenpezies *Bugula neritina*, die die krebshemmende Substanz Bryostatin 1 enthält, nur 18 g dieser Substanz gewonnen (SCHAUFFELBERGER *et al.*, 1991). Diese Menge reichte in jenem speziellen Fall zwar für alle präklinischen und klinischen Studien aus, allerdings ist die erwähnte Spezies weltweit abundant verbreitet. Die umfangreiche "Ernte" hatte keinerlei negative Auswirkungen auf die Gesamtpopulation. In anderen Fällen kann durch solch massive Eingriffe, besonders wenn es sich um eine langsam wachsende, nicht abundante Spezies handelt, das gesamte Ökosystem empfindlich gestört werden. Tatsächlich ist also die Beschaffung der marinen Organismen (speziell auch der Schwämme) und der in ihnen enthaltenen Verbindungen in ausreichender Menge das größte zu bewältigende Problem ("*supply-problem*"; z. B. MUNRO *et al.*, 1994; ILAN *et al.*, 1996).

1.3.1 Chemische Synthese

Ein Ansatz zur Lösung des "*supply-problem*" ist die chemische Synthese der jeweiligen Verbindung. Sobald die chemische Struktur und der Biosyntheseweg einer Substanz bekannt sind, kann ein Weg für deren chemische Synthese entwickelt werden (GARSON *et al.*, 1994). Dieser Weg konnte beispielsweise für den Wirkstoff Ecteinasidin 743 (*Tunicata*/antimitotisch) eingeschlagen werden (COREY *et al.*, 1996). Die Entwicklung eines chemischen Produktionsprozesses kann jedoch sehr zeit- und kostenintensiv sein. Deshalb wird vor Abschluß der klinischen Untersuchungen meist noch nicht damit begonnen.

1.3.2 Kontrollierte "Ernte"

Die "Ernte" bzw. das großangelegte Sammeln von Organismen zur Aufreinigung eines Naturstoffes sollte prinzipiell nur dann eine Alternative sein, wenn vorher eine Machbarkeitsstudie durchgeführt worden ist. Dabei sollten unter anderem die Populationsdichte, die Wachstumsrate, die Faktoren, die die Wachstumsrate beeinflussen, und die

Auswirkungen des Absammelns auf den Bestand untersucht werden. Mit Hilfe der gesammelten Daten könnte man über eine kontrollierte "Ernte" des betreffenden Organismus entscheiden. Die Daten könnten aber auch bei der Evaluierung einer Aquakultur und/oder einer *in vitro* Produktion des Wirkstoffs von Nutzen sein (POMPONI, 1999). In den meisten Fällen dürfte jedoch selbst eine kontrollierte "Ernte" auf lange Sicht einen zu starken äußeren Druck auf die Population ausüben, so daß zum momentanen Zeitpunkt eine biotechnologische Produktion der Naturstoffe in Form von Aquakulturen und *in vitro*-Produktion als einzige sinnvolle Alternative zur chemischen Synthese in Frage zu kommen scheint (MUNRO *et al.*, 1999).

1.3.3 Aquakultur von Schwämmen

Wie in dem Übersichtsartikel von OSINGA *et al.* (1999a) erwähnt, werden die Schwämme in Form von natürlichen Badeschwämmen (Mitglieder der Familie Spongiidae) schon seit Jahrtausenden genutzt. Bereits in altgriechischen Quellen wird der Handel mit Badeschwämmen erwähnt. So ist es nicht weiter verwunderlich, daß auch die Kultivierung von Schwämmen seit langer Zeit von Interesse ist. Die ersten wissenschaftlichen Publikationen zu diesem Thema erschienen Ende des neunzehnten, Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts (SMITH, 1897; ALLEMAND, 1906). Die erste detaillierte Beschreibung einer Vorgehensweise zur Kultivierung von Badeschwämmen im Meer stammt von MOORE (1910). Die grundlegenden Methoden dieser *in situ*-Kultivierung finden teilweise heute noch Verwendung.

Doch erst seit einigen Jahren wird diese Form der Kultivierung, die sogenannte Aquakultur, für die Produktion von bioaktiven Schwammmetaboliten in Erwägung gezogen. In Neuseeland beispielsweise werden Fortschritte bei der Kultivierung des Schwammes *Lissodendoryx* n. sp. 1 gemacht (BATTERSHILL und PAGE, 1996). Aus dieser Schwammespezies isoliert man vielversprechende, krebshemmende Verbindungen, die zur Halichondrin B Familie gehören. Diese Verbindungen konnten auch aus den kultivierten Organismen isoliert werden (DUMDEI *et al.*, 1998).

In Schottland wird die Aquakultur von Schwämmen auf Kammuscheln (*scallops*) z. B. der Spezies *Chlamys opercularis* erforscht. Die Besiedlung der Muschelschalen durch Schwämme der Spezies *Suberites ficus* ssp. *rubrus* verhindern ein Bewachsen der Muschelschalen mit epibiontischen Organismen (*Antifouling*). Dies könnte von zweifachem Nutzen sein: erstens die Produktion von Muscheln, die nicht von allen möglichen Organismen überwachsen sind (und somit für einen höheren Preis in den Handel gehen können) und zweitens die gleichzeitige Produktion bioaktiver Substanzen aus den die Muscheln besiedelnden Schwämmen (ARMSTRONG *et al.*, 1999).

Einen weiteren verheißungsvollen Ansatz zum Start einer marinen Aquakultur gibt es in Rovinj (Kroatien). Hier gelang es, den Adriaschwamm *G. cydonium*, der bisher noch nicht näher identifizierte cytotoxische Substanzen enthält (REUTER, 1978), in der Nähe einer Fisch- und Muschelfarm sowie in großen Bassins mit offener Seewasserkirkulation zu kultivieren. Die dort herangezogenen Exemplare wiesen anfangs im Vergleich zu den Wildtypen eine geringere cytotoxische Aktivität auf. Dies relativierte sich jedoch nach einer Kultivierung über 3-6 Monate hinweg. Diese älteren Zuchtexemplare wiesen eine hohe Wachstumsrate auf. Ihre cytotoxische Aktivität lag nahe bei 100% (MÜLLER *et al.*, 1999b).

1.3.4 *In vitro*-Produktion

1.3.4.1 *In vitro*-Kultivierung des kompletten Schwammes/Bioreaktoren

Die Langzeitkultivierung von Schwämmen in Meerwasseraquarien ist ein sehr schwieriges Unterfangen. Die meisten Berichte erfolgreicher *in vitro*-Kultivierungen stammen von großen öffentlichen Aquarien oder von privaten Aquarienbesitzern (Übersichtsartikel: KINNE, 1977). Die Schwierigkeiten, die bei der Hälterung von Meeresschwämmen zu bewältigen sind, wurden in einem Übersichtsartikel von OSINGA *et al.* (1999a) angesprochen. Zu Erwähnen sind unter anderem die problematische Versorgung der Schwämme mit dem richtigen Futter, gelöstem Silikat, Sauerstoff und Licht. Weitere Faktoren, die das Wachstum der Schwämme limitieren können, sind die Einstellung der korrekten Salinität, die Temperatur, die Wasserqualität und mögliche Giftstoffe und Krankheiten, die sich in einem geschlossenen System akkumulieren bzw. schnell ausbreiten können. So sind zwar zahlreiche Versuche im Gange, Schwämme in speziellen Meeresbioreaktoren zu kultivieren (z. B. THOMASSEN und RIISGARD, 1995; OSINGA *et al.*, 1998 und 1999b). Von der erfolgreichen Isolierung einer ausreichenden Menge an bioaktiven Sekundärmetaboliten aus diesen Kulturen ist man aber noch ein gutes Stück entfernt.

Im Institut für Physiologische Chemie in Mainz ist es uns gelungen, Schwämme der Spezies *S. domuncula* und *G. cydonium* über mehrere Monate hinweg in speziellen Meerwasseraquarien zu halten (2.19). Diese Tiere zeigten, wenn überhaupt, nur geringes Wachstum, konnten aber für die in dieser Arbeit erwähnten Experimente eingesetzt werden.

1.3.4.2 Die Schwamm Gewebe- oder Zellkultur

Wie in dem Übersichtsartikel von RINKEVICH (1999) zusammengestellt, konnte in den letzten zehn Jahren trotz teilweise erheblicher Anstrengungen von keiner marinen Invertebratenspezies eine kontinuierliche, proliferierende Zelllinie entwickelt werden. Auch auf dem Gebiet der Schwammforschung fanden zahlreiche Versuche statt, mit den dissoziierten Zellen diverser Schwammspezies eine Zelllinie zu etablieren (KLAUTAU *et al.*, 1993 und 1994; POMPONI und WILLOUGHBY, 1994; POMPONI *et al.*, 1997; IMSIECKE *et al.*, 1995b; ILAN *et al.*, 1996; LEYS, 1997; RINKEVICH *et al.*, 1998). Doch auch hier blieben alle Versuche mehr oder weniger erfolglos. Die größte der zu begehrenden Schwierigkeit ist die Gefahr der Kontamination durch Protozoen (speziell: Thraustochytriden; CUSTODIO *et al.*, 1995) und Bakterien (POMPONI und WILLOUGHBY, 1994). Durch Zugabe von Antibiotika kann die Kontamination der Kulturen zwar teilweise vermieden werden, ihr Gebrauch könnte aber auch negative Effekte haben, da auch endosymbiontisch lebende Bakterien geschädigt werden.

Die Entwicklung primärer Zellkulturen verläuft etwas vielversprechender. So konnten POMPONI *et al.* (1997 und 1998) und ILAN *et al.* (1996) bei der Kultivierung von *Teichaxinella morchella* bzw. *Latrunculia magnifica* durch Zugabe von Lektinen und anderen wachstumsregulierenden Substanzen erste Erfolge erzielen.

Das Fehlschlagen der Etablierung einer kontinuierlichen Schwammzelllinie könnte durch die Befunde von KOZIOL *et al.* (1998) erklärbar werden. Hier wurde gezeigt, daß Gewebe von *G. cydonium* und *S. domuncula* eine hohe Telomeraseaktivität aufweist. Dies deutet auf eine große Proliferationsfähigkeit dieser Schwammzellen hin. Die dissoziierten Zellen von *G. cydonium* jedoch verloren diese Telomeraseaktivität sehr schnell. Offensichtlich benötigen Schwammzellen den Zell-Zell Kontakt und die Anwesenheit extrazellulärer Adhäsionsfaktoren, um ihre Proliferationsfähigkeit zu behalten (KOZIOL *et al.*, 1998). Anhand dieser Befunde entwickelten CUSTODIO *et al.* (1998) und MÜLLER *et al.* (1999a) eine Methode zur Kultivierung von *S. domuncula* in Form sogenannter Primmorphe, multizellulärer Aggregate, die sich innerhalb von ca. 5 Tagen zu sphäkulären Partikeln formieren und bis zu 5 Monate in artifiziellem Seewasser gehalten werden können. Eine Steigerung der Proliferationsrate vorausgesetzt ist diese Vorgehensweise sicherlich eine interessante Methode mit hohem biotechnologisch nutzbaren Potential.

1.3.4.3 *Transgene Produktion*

Wenn der Biosyntheseweg der Zielsubstanz aufgeklärt ist, könnte es eventuell möglich sein, die Gene, die für die Produktion des Sekundärmetaboliten verantwortlich sind, zu identifizieren, anschließend zu isolieren und zu klonieren und in einem heterologen oder homologen Wirt zu exprimieren. Dies dürfte in vielen Fällen natürlich schwierig werden, da die Biosynthesewege für die meisten biologisch wirksamen Substanzen aus Schwämmen noch nicht aufgeklärt sind und weil wahrscheinlich oft eine komplette Enzymkaskade an deren Synthese beteiligt ist.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Aquakultur und die Zellkultur von Schwämmen sind die vielversprechendsten Methoden, aus diesen Organismen bioaktive Substanzen in größerem Maßstab zu gewinnen. Die Erzeugung transgener Tiere bzw. Zellkulturen stellt eine Möglichkeit dar, die Produktion dieser Substanzen weiter zu steigern. Ein Nebeneffekt könnte die Transformation einer primären Schwammzellkultur sein; ein möglicher Weg, eine permanente proliferative Schwammzelllinie zu etablieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine geeignete Methode gefunden werden, Schwammzellen zu transfizieren. Über die genregulatorischen Vorgänge in Schwämmen ist aber noch sehr wenig bekannt. Daher war eine weitere Aufgabenstellung (die im Verlauf der Arbeit immer mehr in den Vordergrund rückte), mehr über die Promotorstruktur und -funktion dieser primitivsten aller Metazoen herauszufinden.

Es ist nachgewiesen, daß auch Schwämme, wie alle anderen Organismen, auf bestimmte äußere Reize mit einer Steigerung der Genaktivität reagieren. Ein Beispiel dafür ist die Modulation der *myb*-Genexpression durch Retinsäure in *G. cydonium* (BIESALSKI *et al.*, 1992). Außerdem sind in den letzten Jahren die cDNAs bzw. Gene einer Anzahl von Transkriptionsfaktoren aus Schwämmen kloniert worden, beispielsweise verschiedene Klassen von Genen, die das Homeobox-Motiv enthalten, aus den Süßwasserschwämmen *Ephydatia fluviatilis* (SEIMIYA *et al.*, 1994 und 1995) und *Ephydatia mülleri* (RICHELLE-MAURER *et al.*, 1998) sowie aus *Tethya aurantia* und *Haliclona spec.* (DEGNAN *et al.*, 1995). Desweiteren wurden aus *G. cydonium* die cDNA-Sequenzen für die Transkriptionsfaktoren HSP70 (KOZIOL *et al.*, 1996) und des SRF (*Serum Response Factor*) (SCHEFFER *et al.*, 1997) isoliert. DEGNAN *et al.* (1993)

gelang der Nachweis mehrerer Sequenzen mit ETS-Domäne aus *Tethya aurantia* und *Haliclona spec.*. Schließlich gibt es Hinweise für das Vorhandensein von Steroidrezeptoren in Schwämmen (BIESALSKI *et al.*, 1992; GUNDACKER, pers. Kommunikation).

Trotz dieser Indizien konnte jedoch nicht davon ausgegangen werden, daß herkömmliche eukaryotische Expressionsvektoren, bei denen meist ein viraler Promotor für die effektive, konstitutive Transkription eines Gens verantwortlich ist, auch im Schwammsystem eine effektive Transkription der jeweiligen Gene gewährleisten würden. Das Ziel war daher, sowohl den Promotor eines konstitutiv exprimierten als auch den Promotor eines induzierbaren Gens aus Schwämmen zu klonieren und strukturell und funktionell zu charakterisieren. Die Wahl fiel dabei zuerst auf die 5'-Region des bis dahin am besten charakterisierten Haushaltsgens aus *G. cydonium*, dem PKC-Gen (KRUSE *et al.*, 1996 und 1997; KRUSE, 1998b).

In den letzten drei Jahren wurde der bis dahin bevorzugte Modellorganismus *G. cydonium* in unserer Gruppe in immer größerem Maßstab durch *S. domuncula* abgelöst. Dies ist hauptsächlich durch die Fortschritte der *in vitro*-Kultivierung dieser Schwammspezies begründet (1.3.4.2). Der Versuch, die primäre Zellkultur (Primmorphe) von *S. domuncula* zu transfizieren, war deshalb die logische Konsequenz. Der erste Schritt hierzu war die Herstellung einer genomischen Bibliothek von *S. domuncula*. Diese Bibliothek sollte nach der 5'-Region des PKC-Gens durchsucht werden. Zusätzlich sollte die 5'-Region eines induzierbaren Gens, dessen cDNA erst kürzlich isoliert worden war (KRASKO *et al.*, 1999), kloniert werden. Nach dem Funktionstest dieser Promotoren durch Transfektion in Zellen höherer Metazoen sollte anschließend eine geeignete Methode gefunden werden, die *S. domuncula* Primmorphe zu transfizieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen SIGMA, Deisenhofen, ROTH, Karlsruhe oder MERCK, Darmstadt in p.a.-Qualität bezogen.

2.2 Verbrauchsmaterialien

Einwegspritzen	B. BRAUN, Melsungen
Entwickler & Fixierer für Röntgenfilme	KODAK, Paris, F
Falcon Reaktionsgefäße (5, 15 und 50 ml)	BECTON & DICKINSON, New Jersey, USA
Filterpapier	MACHEREY & NAGEL, Düren
Frischhaltefolie	MELITTA, Minden
Kryoröhrchen für die Zellkultur	NUNC, Wiesbaden
Latexhandschuhe	N.S. UNI-GLOVES SDN. BHD., Serembau, Malaysia
<i>Microstrips</i> 0,2 ml, <i>tubes</i> und <i>caps</i>	DIANOVA, Hamburg
Nitrocellulosemembranen	SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel
Nylonmembranen	AMERSHAM, Braunschweig
Nylonmembranen positiv geladen	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
<i>Omnistrips</i> 0,3 ml, <i>tubes</i> und <i>caps</i>	DIANOVA, Hamburg
Parafilm M	AMERICAN NATIONAL CAN, Greenwich, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Petrischalen	GREINER, Frickenhausen
	NUNC, Wiesbaden
pH-Indikatorpapier/-sticks	MERCK, Darmstadt
Pipettenspitzen	ROTH, Karlsruhe
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz	BIOZYM, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml	EPPENDORF, Hamburg
Röntgenfilm FUJI New RX	FUJI, über BECHTHOLD, Kelkheim
Screeningplatten	NUNC, Wiesbaden
Sterilfilter 0,2 µm	MILLIPORE, Bedford, USA
Videoprinterpapier	ROTHHAAR & SCHRÖDER, Heidelberg
Whatman 3MM-Papier	WHATMAN, über BENDER & HOBEIN, Bruchsal
Zellkulturflaschen 25 und 75 cm ²	NUNC, Wiesbaden
Zellschaber	NUNC, Wiesbaden
6 und 24 <i>well</i> Platten	NUNC, Wiesbaden

2.3 Geräte

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Automatischer DNA-Sequenzierer	LI-COR Model 4200L	MWG BIOTECH, Ebersberg
Brutschrank	BK 2/56	EHRET GmbH, Emmendingen
CO ₂ -Inkubator	QW5005VUA	NUNC, Wiesbaden
Elektrophoresekammern		BIORAD, München
Fluoreszenzmikroskop	AH3BT3	OLYMPUS, Hamburg
Folienschweißautomat		PETRA-ELECTRIC, Burgau
Haemocytometer nach Neubauer		ROTH, Karlsruhe

Heizblock	Thermostat 5320 Thermomixer 5436	EPPENDORF, Hamburg EPPENDORF, Hamburg
Helios <i>Gene Gun</i> System		BIORAD, München
Hybridisierungsschrank	Hy-St-1	SAUER, Reutlingen
Inkubator und Schüttler	Certomat [®] H Certomat [®] R	BRAUN, Melsungen
Kühlschränke (-20 & 4°C) -80°C Schrank		LIEBHERR, Ochsenhausen NUNC, Wiesbaden
<i>Laminar flow</i> Sterilbank		SLEE, Mainz
Luminometer	LUMAT LB9501	BERTHOLD, Wildbad
Magnetrührer mit Heizplatte	Ikamag RCT	IKA Labortechnik, Staufen
Mörser & Pistill		BENDER & HOBEIN, Bruchsal
pH-Meter	HI 9023	HANNA INSTRUMENTS, Kehl
Pipetten	Pipetman	GILSON, Villieres-Le-Bel, F
Reinraumarbeitsplatz	8580	KÖTTERMANN, Uetze-Hängingen
Rollinkubator		Institutswerkstatt
Rotoren	GSA, HB 6	DU PONT, Bad Homburg
Spannungsgerät	200/2.0	BIORAD, München
Speed Vac	SVC100/RH40-11	SAVANT INSTRUMENTS, Farmingdale, USA
Spektralphotometer	DU 64 Genequant II	BECKMANN, München PHARMACIA, Freiburg
Sterilisator	TK/L7	EHRET GmbH, Emmendingen
Thermocycler	Touchdown Perkin Elmer Geneamp 9600	HYBAID/AGS, Heidelberg APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt
Transilluminator und Gel- dokumentationssystem		UVP LIMITED, Cambridge, UK
Ultraschallbad	Sonorex RK 100	BENDER & HOBEIN, Karlsruhe
Umkehrmikroskop		HUND, Wetzlar
Umkehrmikroskop mit Fluoreszenz- beleuchtung	IX70 AH2-RX	OLYMPUS, Hamburg
UV-Crosslinker	Stratalinker 1800	STRATAGENE, Amsterdam, Nieder- lande
Vortexer		LABOTEC, Wiesbaden
Waagen	PT 120 R6	SARTORIUS, Göttingen METTLER SPOERHASE, Gießen
Wasserbad (beheizbar)	3047	KÖTTERMANN, Uetze-Hängingen
Zentrifugen	Sorvall RC-5B Haemofuge Centrifuge 5415 C Kühlzentrifuge 5402	DU PONT, Bad Homburg HERAEUS, Hanau EPPENDORF, Hamburg EPPENDORF, Hamburg

2.4 Enzyme

AccuTherm™ DNA-Polymerase
 Alkalische Phosphatase (CIAP)
 FirePol DNA-Polymerase
 Klenow Fragment
 Protease
 Reverse Transkriptase (Superscript II)
 RNase A
 Synergy DNA-Polymerase
 Taq DNA-Polymerase
 T4-Ligase

GENECRAFT, Münster
 PROMEGA, Mannheim
 OÜ SOOLIS, Tara, Estland
 PROMEGA, Mannheim
 SIGMA, Deisenhofen
 GIBCO BRL, Eggenstein
 QIAGEN, Hilden
 GENECRAFT, Münster
 ROCHE-DIAGNOSTICS, Mannheim
 MBI, St. Leon-Rot

2.5 Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI	MBI, St. Leon-Rot
<i>Bgl</i> II	PROMEGA, Mannheim
<i>Eco</i> RI	MBI, St. Leon-Rot
<i>Hind</i> III	MBI, St. Leon-Rot
<i>Kpn</i> I	PROMEGA, Mannheim
<i>Not</i> I	MBI, St. Leon-Rot
<i>Nco</i> I	MBI, St. Leon-Rot
<i>Nhe</i> I	PROMEGA, Mannheim
<i>Pae</i> I (<i>Sph</i> I)	MBI, St. Leon-Rot
<i>Sac</i> I	MBI, St. Leon-Rot
<i>Sal</i> I	MBI, St. Leon-Rot
<i>Sau</i> 3AI	GIBCO BRL, Eggenstein
<i>Vsp</i> I	PROMEGA, Mannheim
<i>Xba</i> I	MBI, St. Leon-Rot
<i>Xho</i> I	MBI, St. Leon-Rot

2.6 Kits

DNA Ligation Kit	STRATAGENE, Amsterdam, NL
High Pure™ PCR Product Purification Kit	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
High Pure™ Plasmid Isolation Kit	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
Klenow Fill-In Kit	STRATAGENE, Amsterdam, NL
λ FIX® II/ <i>Xho</i> I Partial Fill-In Vector Kit	STRATAGENE, Amsterdam, NL
Luciferase Assay System	PROMEGA, Mannheim
PCR DIG Probe Synthesis Kit	ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim
pGEM®-T Cloning Kit I	PROMEGA, Mannheim
QIAGEN Genomic DNA Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN λ Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
Superscript™ II Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis	GIBCO BRL, Eggenstein
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	AMERSHAM-PHARMACIA, Braunschweig

2.7 Vektoren

pBK-CMV	STRATAGENE, Amsterdam, NL
pBluescript II SK (+/-) (pBS)	STRATAGENE, Amsterdam, NL
pCMV-β-Gal	CLONTECH, Palo Alto, USA
pEGFP-N3	CLONTECH, Palo Alto, USA
pGEM®-T	PROMEGA, Mannheim
pGL-2-Basic/Control/Promoter	PROMEGA, Mannheim
λ FIX® II	STRATAGENE, Amsterdam, NL

2.8 Bakterienstämme

KW251 (PROMEGA, Mannheim)

SupE44 galK2 galT22 metB1 hsdR2 recD mcrA mcrB

LE392MP (EPICENTRE TECHNOLOGIES vertrieben über BIOZYM, Hessisch Oldendorf)

F⁻ e14^(McrA⁻) Δ(mcrC-mrr) (Tet^r) hsd R514 sup U44 sup F58 lacY1 or Δ(lacIZY)6 galK2 galT22 metB1 trpR55, λ⁻

XL1-Blue MRA (STRATAGENE, Amsterdam, NL)

Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac

XL1-Blue MRA (P2) (STRATAGENE, Amsterdam, NL)

XL1-Blue MRA (P2 lysogen)

XL1-Blue MRF' (STRATAGENE, Amsterdam, NL)

Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]

2.9 Molekulargewichtsmarker

20 bp Super Ladder (MBI, St. Leon-Rot)

DNA Fragmente der Längen 20 bp x n (n=1, 2, 3 usw.)

123 bp DNA Ladder (GIBCO BRL, Eggenstein)

DNA-Fragmente der Längen 123 bp x n (n=1, 2, 3 usw.).

1 Kb Plus DNA Ladder (GIBCO BRL, Eggenstein)

DNA-Fragmente der Längen 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000, 1650, 2000, 3054, 4072, 5000, 6108, 7126, 8144, 9126, 10180, 11198 und 12216 bp

DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim)

DNA-Fragmente der Längen 125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148 und 21226 bp

DNA Molecular Weight Marker VII, DIG-labeled (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim)

DNA-Fragmente der Längen 359, 492, 710, 992, 1164, 1482, 1515, 1882, 1953, 2799, 3639, 4899, 6106, 7427, 8576

High Molecular Weight Marker (GIBCO BRL, Eggenstein)

DNA-Fragmente der Längen 8271, 8612, 10086, 12220, 15004, 17057, 19399, 22621, 24776, 29942, 33498, 38416 und 48502 bp

Lambda DNA/Eco130 I Marker (MBI, St. Leon-Rot)

DNA-Fragmente der Längen 421, 925, 1489, 1882, 2690, 3472, 4254, 6223, 7743 und 19329 bp

2.10 Nährmedien für die Bakterienkultur

LB-Medium

10 g/l Casein

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Top-Agar/Agarose

10 g/l	Casein	
5 g/l	Hefeextrakt	Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,5 eingestellt und anschließend
5 g/l	NaCl	autoklaviert.
7 g/l	Agar/Agarose	

LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal, LB-Kanamycin oder LB/Tetrazyklin Platten

Dem LB-Medium wurde Bacto-Agar (GIBCO, Eggenstein) in einer Konzentration von 15 g/l zugesetzt und die Lösung autoklaviert. Die Flüssigkeit wurde anschließend auf 50°C abgekühlt und dann Ampicillin (100 µg/ml), IPTG (0,5 mM) und X-Gal (80 µg/ml, in N,N'-Dimethylformamid gelöst) bzw. Kanamycin (50 µg/ml) oder Tetrazyklin (10 µg/ml, in Ethanol gelöst) zugegeben. Je 20 ml wurden in 85 mm Petrischalen ausgegossen und die Platten nach dem Erstarren dunkel bei 4°C gelagert.

2.11 Primer

Die hier verwendeten Primer wurden alle von der Firma MWG BIOTECH, Ebersberg synthetisiert. Die Orientierung ist jeweils in 5' → 3' Richtung angegeben.

2.11.1 Primer für die Amplifikation der *S. domuncula* „Ethylen“-DNA-Sonden

EthylenF1	: AGC CAC CAG TGA GAC CCA GAC	T _m =55°C
EthylenR1	: GAT CAT AGC AGC TCC CTC AGA	T _m =55°C
EthylenR2	: TTG TAT TAA AGC CTC AGT T	T _m =52°C

2.11.2 Primer für die Amplifikation der *S. domuncula* cPKC-Sonde

SubcPKCF1	: GAA GCG TAG AAA TGC CGT GAG	T _m =54°C
SubcPKCR1	: GTG GTG AGT CTT TGA GCG TTT CT	T _m =54°C

2.11.3 Vektorprimer

T3	: CGG AAT TAA CCC TCA CTA AAG	T _m =60°C
T7	: GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	T _m =62°C
SP6	: TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C	T _m =60°C
BK	: ACA GGA AAC AGC TAT GAC CTT G	T _m =64°C
BKCMV	: GGT CTA TAT AAG CAG AGC TGG T	T _m =64°C
M13+	: TGT AAA ACG ACG GCC AGT G	T _m =60°C
GLprimer1	: TGT ATC TTA TGG TAC TGT AAC TG	T _m =62°C
GLprimer2	: CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA	T _m =64°C
EGFPF1	: CTG TGG ATA ACC GTA TTA CCG	T _m =58°C
EGFPR1	: TCG CCG TCC AGC TCG ACC A	T _m =58°C

2.11.4 Primer für die Amplifikation der SNO-cDNA und der genomischen SNO-Sequenz aus *S. domuncula*

SNOF1	: GAG CAT TCA TTG AAC ACA TAC AC	$T_m=64^\circ\text{C}$
SNOF2	: GAT GGT CTG ATC ATC CCT GGA	$T_m=64^\circ\text{C}$
SNOF3	: TTG GAA TAG AAC GCA GTA AAG TA	$T_m=62^\circ\text{C}$
SNOr1	: TCC AGG GAT GAT CAG ACC ATC	$T_m=64^\circ\text{C}$
SNOr2	: GTG TAT GTG TTC AAT GAA TGC TC	$T_m=64^\circ\text{C}$
SNOr3	: AAA GGC ATG GAT ATC TGA CAA ACA	$T_m=62^\circ\text{C}$

2.11.5 Primer für die RT-PCR zur Kartierung des Transkriptionsstartpunktes des *S. domuncula* SNZ-Gens

TiEthylenR1:	GTC TGG GTC TCA CTG GT	$T_m=54^\circ\text{C}$
TiEthylenF1:	CAA CAG GTG GTT TCA TCA T	$T_m=54^\circ\text{C}$
TiEthylenF2:	AAA TAG CTA TGT AAC AAC CG	$T_m=54^\circ\text{C}$
TiEthylenF3:	AGA AAT GAA CCA CGT GGC	$T_m=54^\circ\text{C}$

2.11.6 Primer für die RT-PCR zur Kartierung des Transkriptionsstartpunktes des *G. cydonium* PKC-Gens

PKCTir1	: TGA TCC GCC GTC CGC CAT C	$T_m=64^\circ\text{C}$
PKCTif1	: GGT CTA AGA CAG GCG GTT GC	$T_m=64^\circ\text{C}$
PKCTif2	: TCC GCC TAT GAA TTC TGT TTA C	$T_m=62^\circ\text{C}$
PKCTif3	: ATG ATG AAG GAG CAA TCA GGG	$T_m=62^\circ\text{C}$
PKCTif4	: AAA GGG GGC GGG GCA GGA A	$T_m=64^\circ\text{C}$

2.11.7 Primer für die Konstruktion der Luciferase- und pEGFP-Fusionsplasmide

2.11.7.1 *G. cydonium* PKC

PKCr1	: <u>GAA GAT CTC</u> TTT CTC TAC ACC TCA CTG CAC	$T_m=62^\circ\text{C}$
PKCf1	: <u>GGG GTA CCC</u> ATT CCA GAT GCA CCA GGC	$T_m=60^\circ\text{C}$
PKCf2	: <u>GGG GTA CCC</u> TAC AGT GTT AGG TTG CCT AGT	$T_m=62^\circ\text{C}$
PKCf3	: <u>GGG GTA CCG</u> GTA TTC CCT CCT CTT GAG C	$T_m=62^\circ\text{C}$
PKCf4	: <u>GGG GTA CCC</u> CAA CAC GGC CCT ACG CA	$T_m=60^\circ\text{C}$
PKCf5	: <u>GGG GTA CCG</u> GCT GCT GCA GAC TGG GA	$T_m=60^\circ\text{C}$
PKCf6	: <u>GGG GTA CCG</u> GAA ACG TGG ATG ATG AAG G	$T_m=60^\circ\text{C}$
PKCf7	: <u>GGG GTA CCG</u> TCC GCC TAT GAA TTC TGT TT	$T_m=60^\circ\text{C}$
PKCf1-EGFP	: <u>GAA GAT CTC</u> ATT CCA GAT GCA CCA GGC	$T_m=56^\circ\text{C}$
PKCr1-EGFP	: <u>GGG GTA CCC</u> TTT CTC TAC ACC TCA CTG CAC	$T_m=56^\circ\text{C}$

2.11.7.2 *S. domuncula* SNZ/SNO

BiPromR0	: GAA <u>GAT CTG</u> AGA TCT GCC TTG CTT CAC AT	$T_m=58^\circ\text{C}$
BiPromF0	: GGG <u>GTA CCG</u> TCA GCC AAG GAA AAA GGA GG	$T_m=58^\circ\text{C}$
BiPromF1	: GGG <u>GTA CCG</u> AAG GAG TTC ACA ACA GAT C	$T_m=54^\circ\text{C}$
BiPromR1	: CCC <u>AAG CTT</u> GAG ATC TGC CTT GCT TCA CAT	$T_m=54^\circ\text{C}$
BiPromF2	: GGG <u>GTA CCG</u> AGA TCT GCC TTG CTT CAC AT	$T_m=54^\circ\text{C}$
BiPromR2	: CCC <u>AAG CTT</u> GAA GGA GTT CAC AAC AGA TC	$T_m=54^\circ\text{C}$
BiPromF3	: CAG <u>GTA CCT</u> TCT CCA ATG CCA TTA C	$T_m=54^\circ\text{C}$
EthyleneGFPPr1	: GGG <u>GTA CCG</u> AGA TCT GCC TTG CTT CAC AT	$T_m=58^\circ\text{C}$
EthyleneGFPfl	: CCG <u>CTC GAG</u> GTC AGC CAA GGC AAA AGG AGG	$T_m=58^\circ\text{C}$

2.11.7.3 *S. domuncula* PKC

pGL2PKCSubr2	: CCC <u>AAG CTT</u> GTT AAC TAT CTT CCA CTA ACT	$T_m=58^\circ\text{C}$
pGL2PKCSubf2	: GGG <u>GTA CCC</u> ATG GAT GTG ATT TAG TGC TA	$T_m=58^\circ\text{C}$

Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Bgl II* (AGATCT), *Kpn I* (GGTACC) *Xho I* (CTCGAG) und *Hind III* (AAGCTT) sind unterstrichen.

2.11.8 Sequenzierprimer (IRD800 gelabelt)

(-40)Reverse	: GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG	$T_m=64^\circ\text{C}$
(-40)Forward	: AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT	$T_m=65^\circ\text{C}$
T7	: GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG	$T_m=56^\circ\text{C}$
T3	: AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	$T_m=56^\circ\text{C}$
SP6	: TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA C	$T_m=56^\circ\text{C}$
M13(-20)	: GTA AAA CGA CGG CCA GT	$T_m=55^\circ\text{C}$
M13(reverse)	: GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	$T_m=56^\circ\text{C}$
GLprimer1ir	: TGT ATC TTA TGG TAC TGT AAC TG	$T_m=62^\circ\text{C}$
GLprimer2ir	: CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA	$T_m=64^\circ\text{C}$
EGFPF1ir	: CTG TGG ATA ACC GTA TTA CCG	$T_m=58^\circ\text{C}$
EGFPR1ir	: TCG CCG TCC AGC TCG ACC A	$T_m=58^\circ\text{C}$
C18F1ir	: CAT TCT AGC CAC CCC ACC ATC	$T_m=58^\circ\text{C}$
C18R1ir	: TGC ACA GGA CAC CCA CAG TAA TAG	$T_m=58^\circ\text{C}$
SubPKCf1	: CCT CAC GGC ATT TCT ACG	$T_m=56^\circ\text{C}$
SubPKCf2	: ACG TAG GTT GGG GGT ATC C	$T_m=56^\circ\text{C}$
SubPKCf3	: TTA GAG GAG AGG TTG TTG TTT GAG	$T_m=58^\circ\text{C}$
SubPKCr1	: GAC CAA CCT TGA CCA GAT G	$T_m=56^\circ\text{C}$

2.12 DNA-Techniken

2.12.1 Die Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Kary Mullis hat die PCR-Methode im Jahre 1985 entwickelt (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS *et al.*, 1986). Ein Standard PCR-Experiment umfaßt folgende Schritte:

1. Die DNA-Matrize (*Template*) wird durch Hitzeeinwirkung (95-100°C) denaturiert, so daß sie einzelsträngig vorliegt.
2. Oligonukleotidprimer (Vorwärts- und Rückwärts-Primer), kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind, lagern sich bei einer bestimmten Temperatur (T_m =Schmelz- oder Hybridisierungstemperatur) an die Matrize an (*Annealing*).
3. Eine DNA-Polymerase verlängert unter geeigneten Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der Matrize und synthetisiert so neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist.

Die oben beschriebenen Schritte, die einen Zyklus darstellen, werden 30-40 mal wiederholt. Man erhält dann ein millionenfach kopiertes PCR-Produkt, dessen Enden die Oligonukleotidsequenzen der Primer tragen. Eine professionelle Anwendung dieser Technik wurde jedoch erst durch den Einsatz hitzestabiler DNA-Polymerasen und der Entwicklung von Geräten für die Steuerung der Temperaturzyklen möglich. Als erste hitzestabile DNA-Polymerase verwendete man die *Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (SAIKI *et al.*, 1988).

2.12.1.1 PCR-Ansätze und Temperaturzyklen

Für einen PCR-Ansatz wurden folgende Reagenzien in einem 0,2 ml *microstrip tube* zusammenpipettiert:

xx	µl	Steriles Wasser (variierte je nach Versuchsansatz)
5	µl	10 x PCR-Puffer
x	µl	<i>Template</i> (variierte je nach Versuchsansatz)
1	µl	dNTP-Mix (10mM)
1	µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
1	µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
0,5	µl	<i>Taq</i> -Polymerase (4-5 U/µl) oder andere hitzestabile DNA-Polymerasen
50	µl	

Die PCR wurde in den Thermocyclern der Firmen APPLIED BIOSYSTEMS (*Perkin Elmer Geneamp 9600*) und HYBAID (*Touchdown*) in der Regel mit folgenden Temperaturzyklen durchgeführt:

Schritt 1	:	3 min	95°C	initiale Denaturierung der DNA-Matrize
Zyklen 1-35	:	30 sec	95°C	Denaturierung der DNA-Doppelstränge
		30 sec	T_m	<i>Annealing</i> der Primer
		x sec	72°C	Verlängerung der Primer

Je nach Anwendung und Art des *Templates* wurden bei den PCR-Reaktionen die *Annealing*-Temperaturen, die Verlängerungszeiten und die Anzahl der Zyklen variiert, um die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Die Zeitdauer x des Verlängerungsschrittes betrug 60 sec je kb des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Bei Verwendung anderer thermostabiler DNA-Polymerasen (z. B. *Synergy*) wurden 150 sec pro kb berechnet.

Da ein wichtiger Nachteil der *Taq*-Polymerase darin besteht, daß sie eine relativ hohe Fehlerquote bei den Neusynthese eines DNA-Stranges produziert, wurde so häufig wie möglich und besonders bei kritischen Klonierungen eine thermostabile DNA-Polymerase mit 3' → 5'-Exonukleaseaktivität verwendet. Die Analyse der so amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese (2.12.2).

10 x PCR-Puffer (mit *Taq*-Polymerase mitgeliefert)

100 mmol/l	Tris-HCl; pH 8,5
15 mmol/l	MgCl ₂
500 mmol/l	KCl
1 mg/ml	Gelatine

dNTP-Mix

100 mmol/l	dATP	Jeweils 10 µl wurden zusammenpipettiert, 60 µl steriles Wasser zugefügt (⇒ Konz. 10 mM), aliquotiert und bei -20°C gelagert.
100 mmol/l	dCTP	
100 mmol/l	dGTP	
100 mmol/l	dTTP	

2.12.1.2 Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) der Primer

Die Schmelztemperaturen der Primer sind je nach Basenzusammensetzung und Länge des Oligonukleotids verschieden und wurden nach folgender Annäherungsformel (THEIN und WALLACE, 1986) berechnet:

$$T_m = (\text{Anzahl von A+T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G+C}) \times 4^\circ\text{C}$$

2.12.2 DNA-Gelelektrophorese

Als Elektrophorese bezeichnet man die Auftrennung von Molekülen aufgrund ihrer elektrischen Ladung. DNA-Fragmente tragen aufgrund ihrer Phosphatgruppen eine negative Ladung und wandern im elektrischen Feld immer in Richtung der Anode. Läßt man eine Elektrophorese in einer porösen Gelmatrix ablaufen, hängt die Wandergeschwindigkeit der DNA-Moleküle von der Porengröße ab. Je kleiner ein DNA-

Fragment ist, desto schneller kann es sich durch das Gel bewegen (BROWN, 1993). Die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente durch das Gel ist weiterhin von der Art der Gelmatrix (Agarose, Polyacrylamid) und deren Konzentration, der angelegten Stromspannung, der Zusammensetzung des Laufpuffers, der Temperatur und einigen weiteren Faktoren abhängig (SAMBROOK *et al.*, 1989).

2.12.2.1 *Auftrennung der DNA-Fragmente*

Die aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden im Verhältnis 6:1 (v/v) mit 6x Gelladepuffer gemischt und in die Taschen eines Agarosegels pipettiert. Je nach Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde die Konzentration der Agarose unterschiedlich gewählt. Als DNA-Längenstandards dienten die unter 2.9 erwähnten Produkte der Firmen GIBCO BRL, ROCHE DIAGNOSTICS und MBI. Die Elektrophorese wurde in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit 1x TAE als Laufpuffer durchgeführt. Die angelegte Spannung betrug 4-5 V/cm, bezogen auf den Abstand zwischen den Elektroden. Der Lauf wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblaufront des Gelladepuffers etwa zwei Drittel der Gellänge durchlaufen hatte.

2.12.2.2 *Sichtbarmachung der DNA-Fragmente im Agarosegel und Dokumentation der Gele*

Zum Färben wurden die Gele nach Beendigung der Elektrophorese 15-30 min in eine Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gelegt. Dieser fluoreszierende Farbstoff bindet an die DNA-Moleküle, indem er sich zwischen benachbarte Basenpaare schiebt (interkaliert). Bestrahlt man das Gel nun mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 254 nm, wird die Strahlung von der DNA adsorbiert und auf das Ethidiumbromid (EtBr) übertragen. Strahlungen der Wellenlängen 302 und 366 nm werden von dem gebundenen Farbstoff selbst adsorbiert. In beiden Fällen wird die Energie in Form von sichtbarem Licht der Wellenlänge 590 nm (orange) zurückemittiert (SAMBROOK *et al.*, 1989). DNA-Mengen von weniger als 10 ng können so sichtbar gemacht werden.

Die Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe eines Transilluminators und des Geldokumentationssystems der Firma UVP LIMITED. Dieses besteht aus einer Videokamera, einem daran angeschlossenen Computer mit Monitor und einem SONY Videoprinter. Die Bilder der aufgenommenen Gele können mit diesem System weiter bearbeitet, ausgedruckt und auf Diskette abgespeichert werden.

50x TAE-Puffer (Laufpuffer)

242 g	Tris-Base	
57,1 ml	Eisessig	mit <i>Aqua dest.</i> auf 1 l Volumen aufgefüllt und autoklaviert
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0)	

6x Gelladepuffer

0,25 %	Bromphenolblau	
40 %	(w/v) Saccharose	mit <i>Aqua bidest.</i> auf 100% aufgefüllt und bei 4°C gelagert

2.12.3 Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen

Für die weitere Manipulation mittels PCR amplifizierter bzw. mittels Restriktion verdauter DNA-Fragmente ist es häufig notwendig, eventuell störende Bestandteile (in Form von Restriktionsenzymen bzw. DNA-Polymerasen, Salzen, Primern usw.) der vorangegangenen Reaktionen aus dem Ansatz zu entfernen.

Die Aufreinigung dieser Ansätze geschah unter Verwendung des *High Pure™ PCR Product Purification Kit* der Firma ROCHE DIAGNOSTICS. Bei diesem Kit macht man sich zunutze, daß Nukleinsäuren in Anwesenheit von hohen Konzentrationen chaotropher Salze, die die Struktur des Wassers verändern, an Silica (Glas) Oberflächen adsorbieren (VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979; HAMAGUCHI und GEIDUSCHEK, 1962). Bis zu 10 µg DNA ab 100 bp Länge können an die mitgelieferten Säulen mit Glasfaser Fleece binden. Die Verunreinigungen fließen durch. Salze werden mit einem ethanolhaltigen Puffer ausgewaschen. Die Elution der DNA erfolgt durch *Aqua bidest.* oder TE-Puffer. Die Zusammensetzung der mitgelieferten Puffer (P1=Bindepuffer, P2=Waschpuffer) ist bei ROCHE DIAGNOSTICS zu erfahren.

Die zu reinigenden Ansätze wurden mit TE-Puffer auf ein Volumen von 100 µl eingestellt, mit 500 µl P1 versetzt und gut gevortext. Anschließend steckte man die Säulen in 2 ml Sammelgefäße und trug die Proben auf. In einer Tischzentrifuge wurden die Säulen 30-60 sec bei 10.000 x g zentrifugiert und danach die Durchflußfraktion aus dem Sammelgefäß entfernt. Im nächsten Schritt wurden 500 µl P2 auf die Säule aufgetragen und wiederum 30-60 sec bei 10.000 x g zentrifugiert. Nachdem die Durchflußfraktion entfernt worden war, wurde nochmals mit 200 µl P2 gewaschen. Schließlich folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, bei dem der restliche P2 entfernt wurde. Nun wurden die Säulen in 1,5 ml Reaktionsgefäße plaziert, 30-100 µl *Aqua bidest.* bzw. TE-Puffer hinzugefügt und die DNA durch einminütiges Zentrifugieren bei 10.000 x g eluiert.

2.12.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für bestimmte Anwendungen ist es notwendig, DNA-Fragmente, die mittels Gel-elektrophorese aufgetrennt wurden, aus der Gelmatrix zurückzugewinnen. Dazu muß die das DNA-Fragment umgebende Gelmatrix chemisch aufgelöst werden. Die so freigesetzte DNA gelangt in die Lösung, wird an ein Glasfaser Fleece gebunden, durch Waschschriffe gereinigt und wieder eluiert. Für die Elution der DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde wiederum der *High Pure™ PCR Product Purification Kit* der Firma ROCHE DIAGNOSTICS verwendet.

Die zu eluierende DNA-Fragment Bande wurde mit einem sauberen Skalpell aus dem mit EtBr gefärbten Gel (2.12.2.2) ausgeschnitten und in ein vorher ausgewogenes 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Für je 100 mg Agarosegel wurden 300 µl P1 zugefügt, kurz gevortext

und die Suspension für 10 min bei 56°C im Thermomixer inkubiert. War die Gel-matrix komplett aufgelöst, wurden 150 µl Isopropanol je 100 mg Gel zugefügt und wiederum gründlich gevortext. Das Gemisch wurde auf eine Säule aufgetragen und 30 sec bei 10.000 x g zentrifugiert. Die Waschschritte und die Elution der DNA erfolgte exakt wie unter **2.12.3** beschrieben.

2.12.5 Ligation

Die Verknüpfung eines Vektormoleküls mit DNA, die man klonieren möchte, nennt man Ligation. Ein Enzym, das diesen Vorgang katalysiert, heißt T4 DNA-Ligase. *In vivo* repariert das Enzym alle Brüche, die in einem Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls auftreten können. *In vitro* können gereinigte Ligasen auch verschiedene DNA-Moleküle oder die beiden Enden eines Moleküls in ATP-abhängiger Art und Weise unter Bildung von Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpfen (ENGLER und ZIMMERMANN, 1982).

Für einen Ligationsansatz wurden in der Regel der Vektor und das einzuligierende DNA-Fragment in äquimolaren Verhältnissen eingesetzt. Der Gesamtansatz enthielt meist etwa 100 ng DNA. Außerdem wurden 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl rATP (10 mM) und 0,5 µl T4-Ligase (4 U/µl) zugegeben und mit *Aqua bidest.* auf 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte entweder bei 4°C über Nacht oder 2-3 h bei *RT* (*sticky end* Ligationen). Bei *blunt end* Ligationen wurde zwei Tage bei 4°C in einem größeren Volumen (40 µl) ligiert. Die Reaktion wurde durch 20minütige Inkubation bei 65°C abgestoppt.

10x Ligase-Puffer

500	mM Tris-HCl; pH 7,5
70	mM MgCl ₂
10	mM DTT

2.12.6 Restriktion

Die meisten Bakterien besitzen Schutzvorrichtungen, um sich gegen eindringende Fremd-DNA, wie z. B. Phagen-DNA, zu schützen. Einer dieser Schutzmechanismen besteht darin, die fremde DNA mit Hilfe von Enzymen zu zerschneiden, ein Vorgang, den man als Restriktion bezeichnet. Zuständig dafür sind bestimmte Enzyme, die sogenannten Restriktionsendonukleasen, die doppelsträngige DNA nur an einer für jedes dieser Enzyme typischen Erkennungssequenz schneiden (SMITH und WILCOX, 1970).

In der Gentechnik verwendet man diese Enzyme z. B. um Nukleinsäuren definiert zu zerschneiden und in ebenso geschnittene Vektoren einligieren zu können (**2.12.7**).

Auch die Fragmentierung genomischer DNA (**2.13.2** und **2.12.19**) und die Erstellung von Restriktionskarten werden damit bewerkstelligt.

Für einen Restriktionsansatz wurden in der Regel 0,1 bis 3 µg DNA eingesetzt. Zur DNA-Lösung wurden 1 µl 10x Restriktionspuffer (spezifisch für jedes Enzym) und die jeweilige Restriktionsendonuklease (3-4 U/µg DNA) zugegeben. Der Gesamtansatz wurde mit *Aqua bidest.* auf 10 µl aufgefüllt und ca. 2 h bei 37°C inkubiert. Einem Verdau, bei dem die Schnittstellen nahe am Ende eines DNA-Doppelstranges lagen (**2.12.7.2**) wurde die doppelte Enzymmenge zugesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Termination der Reaktion erfolgte durch Erhitzen auf 65°C für 20 min.

Restriktionen mit zwei oder mehr Enzymen gleichzeitig sind mit Hilfe eines Spezialpuffers (hier der Y⁺/Tango™ Puffer der Firma MBI) möglich. In diesem Puffer besitzen einige Enzyme eine etwas verminderte Aktivität, die jedoch für die meisten Anwendungen absolut ausreichend ist. Der Puffer wurde je nach Art des Enzyms einfach oder zweifach konzentriert eingesetzt.

10x Y⁺/Tango™-Puffer

330 mM	Tris-Acetat; pH 7,9
100 mM	Mg-Acetat
660 mM	K-Acetat
1 mg/ml	BSA

2.12.7 Subklonierung

2.12.7.1 Subklonierung von PCR-Produkten mittels T-A Klonierung

Bei der PCR hängt die *Taq*-Polymerase an das 3'-Ende der DNA normalerweise ein Adenin-Nukleotid an (CLARK, 1988). Dieses Phänomen macht man sich bei der Ligation von PCR-Produkten mit einem Vektor zunutze. Im Handel werden Vektoren angeboten, die in linearer Form vorliegen und an beiden 3'-Enden ein Thymin angehängt haben. Eine Ligation über diese überstehenden Basen ist wesentlich effizienter als eine über glatte Enden. Die Orientierung der eingebauten DNA kann man dabei jedoch nicht beeinflussen. Hier wurde der *pGEM[®]-T Cloning Kit I* der Firma PROMEGA verwendet.

Für die Ligation wurden 2 µl des gereinigten PCR-Produktes (**2.12.3**) eingesetzt. Befanden sich außer der gewünschten noch weitere Banden im Ansatz, wurde die zu ligierende Bande zunächst aus einem Gel eluiert (**2.12.4**). In diesem Fall wurden für die Ligation 7 µl verwendet. Zu dieser Lösung wurden 1 µl pGEM[®]-T Vektor (50 ng/µl), 1 µl 10x Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (1 U/µl) pipettiert und gegebenenfalls mit *Aqua bidest.* auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C ligiert und anschließend zur Transformation (**2.12.8**) verwendet.

pGEM[®]-T Cloning Kit I (PROMEGA, Mannheim)

pGEM[®]-T Vektor (50 ng/μl)
 Kontroll-DNA (4 ng/μl)
 T4 DNA-Ligase (1 U/μl)

10x Ligase-Puffer

10 mmol/l ATP
 100 mmol/l Dithiothreitol
 100 mmol/l MgCl₂
 300 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5)

2.12.7.2 Subklonierung von PCR-Produkten mittels Linkerprimern

Eine gerichtete Subklonierung von PCR-Produkten ist durch die Konstruktion von PCR Primern möglich, die an ihrem 5'-Ende Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme tragen (heterologe Enden) (SCHARF *et al.*, 1986).

Nach der Amplifikation (2.12.1) mit solchen Primern wurde das erhaltene DNA-Fragment aufgereinigt (2.12.3), mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten (2.12.3) und in einen Vektor ligiert, der ebenfalls mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten worden war.

2.12.7.3 Subklonierung von Restriktionsfragmenten mit homologen Enden

Restriktionsfragmente, die an beiden Enden die Überhänge des gleichen Restriktionsenzym tragen (homologe Enden), können ebenfalls, allerdings wiederum ungerichtet, in einen Vektor subkloniert werden, der mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut wurde. Um eine Religation der Vektorenden zu vermeiden, müssen diese allerdings mit Hilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase (CIAP) am 5'-Ende dephosphoryliert werden (AUSUBEL *et al.*, 1987-2000).

Der Restriktionsverdau mit dem geschnittenen Vektor wurde mit 5 μl 10x CIAP-Puffer und 1 μl CIAP versetzt und mit *Aqua bidest.* auf 50 μl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde je 15 min bei 37°C bzw. 56°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 μl CIAP wurden die Inkubationsschritte wiederholt, danach 2 μl 0,5 M EDTA-Lösung zur Probe zugegeben und 20 min bei 65°C deaktiviert. Die Ligation erfolgte wie unter 2.12.5 beschrieben.

10x CIAP-Puffer

20 mM Tris-HCl; pH 7,5
 0,1 mM MgCl₂

2.12.8 Transformation von *E. coli*

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von DNA-Molekülen in eine beliebige lebende Zelle. Die transformierten Zellen wachsen, teilen sich und vermehren dabei das eingeschleuste DNA-Molekül. Dieser Vorgang wird als Klonierung bezeichnet. Bakterienzellen müssen vor der Transformation einer speziellen Behandlung unterzogen werden um sie "kompetent" zu machen (2.12.8.1). So behandelte Zellen

nehmen DNA wesentlich effizienter auf als unbehandelte Zellen. Ein Hitzeschock von 42°C fördert die DNA-Aufnahme zusätzlich (COHEN *et al.*, 1972).

Ein 100 µl Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen (**2.12.8.1**) wurde aus dem -80°C Eisschrank entnommen und auf Eis langsam aufgetaut. Danach wurden 1-5 µl des Ligationsansatzes bzw. ca. 1 ng Plasmid-DNA hinzugefügt, kurz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit den Zellen 45-60 sec in ein 42°C warmes Wasserbad getaucht (Hitzeschock). Nach einminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium überführt und 1 h bei 200 upm und 37°C im Inkubator geschüttelt. Im Anschluß wurden die Zellen in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, bei 1000 x g etwa 3 min lang abzentrifugiert, das überstehende Medium abgegossen und die pelletierten Zellen in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Mit Hilfe eines sterilen Drigalsky-Spatels, der vorher mit Ethanol abgeflammt wurde, wurden die Zellen dann auf LB-Amp/IPTG/X-Gal-Platten ausplattiert. Das Wachstum der Bakterienkolonien erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

2.12.8.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Bakterien

Die meisten Bakterienarten, darunter auch *E. coli*, nehmen DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang auf. Um solche Arten wirksam zu transformieren, muß man die Zellen einer physikalischen und/oder chemischen Behandlung unterziehen, die ihre Fähigkeit, DNA aufzunehmen, verstärkt. Die Fähigkeit von Zellen, DNA in sich aufzunehmen, bezeichnet man als Kompetenz.

Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden nach dem Protokoll von NISHIMURA *et al.* (1990) hergestellt. Der Erfolg dieser Methode beruht auf dem Wachstum der Zellen in einem Medium, das Mg²⁺ und Glucose als Kohlenstoffquelle enthält. Die Anwesenheit von Mg²⁺ im Medium stimuliert die Transformationseffizienz (HANAHAN, 1983). Auch die Lagerung der Zellen in einem Glycerin-PEG-Mg²⁺-Medium erhöht die Effektivität dieser Methode gegenüber anderen Protokollen. Verwendet wurde der *E. coli*-Stamm *XL1 Blue MRF'* (STRATAGENE).

5 ml einer tetrazyklinhaltigen Suspensionskultur (**2.12.11.2**) von *E. coli* Zellen wurden in 500 ml Medium A überführt und bis zur mittleren logarithmischen Phase (OD₆₀₀=0,4; **2.12.12**) bei 250 upm und 37°C im Inkubator geschüttelt. Danach wurden die Zellen 10 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden sie in einer Kühlzentrifuge 10 min bei 4°C und 1500 x g abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Die weiteren Schritte wurden in einem Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die pelletierten Zellen wurden in 5 ml auf Eis vorgekühltem Medium A vorsichtig resuspendiert und dann mit 25 ml Medium B versetzt. Nach nochmaligem vorsichtigem Mischen wurden 100 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

Medium A

10 mM MgSO₄ x 7 H₂O
0,2 % (w/v) Glucose

⇒ mit sterilem LB-Medium auf 100% aufgefüllt

Medium B

36	%	(v/v) Glycerin	
12	%	(w/v) PEG (MW 7500)	⇒ mit LB-Medium auf 100% aufgefüllt und sterilfiltriert
12	mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	

2.12.8.2 Überprüfung der Kompetenz der Bakterienzellen

Die Überprüfung der Kompetenz der neu hergestellten kompetenten Bakterien erfolgte durch Transformation mit 0,1 bzw. 1,0 ng pBluescript. Am folgenden Tag wurden die Kolonien auf beiden Platten ausgezählt und die Transformationseffizienz mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \text{Kolonien}/\mu\text{g eingesetztes Plasmid}$$

Die Transformationseffizienz der verwendeten Zellen lag in der Regel zwischen 10^6 und 10^7 Kolonien/ μg .

2.12.9 Blau-Weiß Selektion der Transformanten

Die Transformation kompetenter Bakterien ist ein recht ineffektiver Vorgang. Meist werden nur 0,1% oder weniger der eingesetzten Vektormoleküle in die Zellen aufgenommen. Zur Selektion der Transformanten waren in den für diese Arbeit eingesetzten Vektoren pGEM[®]-T und pBS zwei selektierbare Marker eingefügt. Ein Ampicillinresistenzgen bewirkt, daß nur transformierte Zellen auf ampicillinhaltigen Nährböden zu wachsen vermögen. Weiterhin enthalten die Vektoren das *lacZ* Gen, welches einen Teil des Enzyms β -Galaktosidase kodiert. Der verwendete *E. coli* Stamm ist ohne diesen Teil nicht in der Lage, ein vollständiges Enzym herzustellen. Da sich innerhalb des *lacZ* Gens die Klonierungsstelle (MCS) befindet und bei Einbau eines DNA-Fragments der Leserahmen unterbrochen wird, können rekombinante Bakterien die β -Galaktosidase nicht mehr herstellen. Dem Agar, auf dem die Zellen ausplattiert wurden, wurde IPTG und X-Gal zugesetzt. IPTG ist ein Induktor für β -Galaktosidase. X-Gal ist ein Laktoseanalogon, das von der β -Galaktosidase zu einem dunkelblauen Reaktionsprodukt abgebaut wird.

Korrekt transformierte *E. coli* Zellen bilden auf LB-Amp/IPTG/X-Gal Platten weiße Kolonien. Zellen, die zwar transformiert sind, in deren Vektor das *lacZ* Gen jedoch nicht unterbrochen ist, können X-Gal umsetzen und bilden deshalb blaue Kolonien.

2.12.10 Checking-PCR

Bakterienkolonien lassen sich mit Hilfe der PCR-Technik rasch auf das Vorhandensein bzw. Fehlen rekombinanter Plasmide überprüfen. Dies ist besonders von Vorteil, wenn der verwendete Vektor keine Möglichkeit zur Blau-Weiß Selektion (2.12.9) bietet. Außerdem kann die Länge eines in einen Vektor einligierten DNA-Fragments genau bestimmt werden.

Mit Hilfe steriler Pipettenspitzen wurde etwas Bakterienmaterial in 30 µl LB-Medium überführt. 1 µl dieser Lösung wurde dann für eine PCR mit Primern, die die *multiple cloning site* des Plasmides flankierten, verwendet. In der anschließenden Elektrophorese (2.12.2) zeigten sich Banden entsprechend der Größe des Plasmidinserts.

2.12.11 Kultivierung von Bakterien für die Plasmid-DNA Präparation

2.12.11.1 *Der Vereinzelausstrich*

Um von Bakterienkulturen einzelne Kolonien zu erhalten, wurde mittels einer durch Ausglühen sterilisierten Impföse etwas Zellmaterial von der Oberfläche der jeweiligen Dauerkulturen (2.12.11.3) abgekratzt und auf Agarplatten, je nach verwendeter Zelllinie und übertragenem Plasmid, mit oder ohne Antibiotikazusatz ausgestrichen. Durch Inkubation bei 37°C wuchsen über Nacht separat liegende Bakterienkolonien heran.

2.12.11.2 *Die Suspensionskultur*

Die meisten Bakterien kann man ohne große Schwierigkeiten in einem Flüssigmedium heranzüchten. Das Kulturmedium muß eine ausgewogene Mischung der lebensnotwendigen Nährstoffe enthalten, und zwar in Konzentrationen, die es den Bakterien ermöglichen, effizient zu wachsen und sich zu teilen. Ein geeignetes Medium für diese Ansprüche stellt das Luria-Bertani Medium (LB-Medium) dar. Damit sich nur die erwünschten Bakterien vermehren, wird dem Medium meist ein selektierendes Agens (Antibiotikum) zugesetzt.

5 ml LB-Medium wurden mit dem selektierenden Agens versetzt. Danach wurde das Medium unter sterilen Bedingungen mit den Bakterien angeimpft. Die Bakterien wurden mit einem Zahnstocher oder einer Pipettenspitze aus einer Dauerkultur entnommen oder von einer Agarplatte gepickt. Ging eine Checking-PCR voraus, wurden 10 µl des bakterienhaltigen LB-Mediums überimpft (SAMBROOK *et al.*, 1989). Die Kulturen wurden 12-16 h über Nacht bei 250 upm und 37°C im Inkubator geschüttelt, bis die OD₆₀₀ bei etwa 1,5-4,0 Einheiten lag.

Ampicillin-Stammlösung

40 mg/ml in *Aqua bidest.*, sterilfiltriert und dunkel bei -20°C gelagert

Tetrazyklin-Stammlösung

10 mg/ml in Ethanol, sterilfiltriert und dunkel bei -20°C gelagert

Kanamycin-Stammlösung

10 mg/ml in *Aqua bidest.*, sterilfiltriert und dunkel bei -20°C gelagert

2.12.11.3 Herstellung von Dauerkulturen

850 µl einer Suspensionskultur wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und mit 150 µl 96%igem Glycerin versetzt. Durch kräftiges Vortexen wurde gut durchmischt und die Reaktionsgefäße auf Trockeneis gestellt. Die Lagerung dieser *Stocks* erfolgte bei -80°C.

2.12.12 Messung der optischen Dichte (OD) einer Zellkultur

Das Wachstum einer Bakterienkultur kann man verfolgen, indem man ihre optische Dichte (OD) bei 600 nm mißt. In einem Spektralphotometer wird eine Glasküvette mit der zu messenden Probe, mit Licht der Wellenlänge 600 nm durchstrahlt. Die Lichtmenge, welche die Kultur durchdringt, wird gemessen und die optische Dichte (=Absorption) berechnet. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine OD-Einheit bei *E. coli* etwa $0,8 \times 10^9$ Zellen je Milliliter (BROWN, 1993).

Für die Messung der optischen Dichte wurde das Spektralphotometer *DU 64* der Firma BECKMANN benutzt. Ein Aliquot der Suspensionskultur wurde 1:10 verdünnt und in einer 100 µl Mikrogasküvette gemessen.

2.12.13 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Um aus einer Bakterienzelle DNA und in diesem Falle Plasmid-DNA reinigen zu können, müssen zuerst die äußeren Barrieren wie die Zellwand und die Zellmembran durchbrochen werden. Diese sogenannte Lyse wird durch Zusatz eines SDS/NaOH enthaltenden Puffers (P2=Lysispuffer) in der Anwesenheit von RNase A (in P1=Suspensionspuffer) herbeigeführt (BIRNBOIM und DOLY, 1979). Das SDS bringt die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembranen in Lösung. Dies führt zur Lyse und zur Freisetzung des Zellinhalts. Die alkalischen Bedingungen dienen der Denaturierung der chromosomalen und Plasmid-DNA sowie der Proteine. RNase A baut die freigesetzte RNA zum größten Teil ab. Im nächsten Schritt wird das Lysat durch Zugabe eines Puffers (P3=Bindepuffer) mit hoher Salzkonzentration neutralisiert. Die hohe Salzkonzentration bewirkt, daß denaturierte Proteine, chromosomale DNA, Zelltrümmer und SDS präzipitieren, während die kürzere Plasmid-DNA korrekt renaturiert und in Lösung verbleibt. Nach einem Zentrifugationsschritt bleibt nur die

Plasmid-DNA im Überstand zurück. Dieser Überstand wird auf eine Säule geladen, die ein Glasfaser-Fleece enthält. An dieser Membran werden DNA-Moleküle unter geeigneten Bedingungen festgehalten und können durch *Aqua bidest.* oder TE-Puffer wieder eluiert werden (VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979; HAMAGUCHI und GEIDUSCHEK, 1962).

Die Mini Plasmid-DNA Präparation wurde unter Verwendung des *High Pure™ Plasmid Isolation Kit* der Firma ROCHE DIAGNOSTICS durchgeführt. Die verwendeten Puffer (P1-P5) und Säulen waren Bestandteile dieses Kits. Alle Zentrifugationsschritte, soweit nicht anders vermerkt, wurden bei 10.000 x g durchgeführt.

2 ml einer Suspensionskultur (**2.12.11.2**) wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 3000 x g abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde abgegossen und die pelletierten Bakterienzellen in 250 µl Puffer P1 (enthält RNase A) mit Hilfe des Vortexers resuspendiert. Danach wurden 250 µl Puffer P2 zugefügt und das Reaktionsgefäß 4-6 mal sanft invertiert. Anschließend wurden 350 µl gekühlter Puffer P3 hinzupipettiert und wiederum durch sanftes Invertieren gemischt. Nach einer 5minütigen Inkubation auf Eis schloß sich ein 10minütiger Zentrifugationsschritt an. Der klare Überstand wurde auf eine Säule aufgetragen und diese 1 min zentrifugiert. Die Durchflußfraktion wurde verworfen, 500 µl P4 (Waschpuffer I) aufgetragen und wiederum 1 min zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 700 µl P5 (Waschpuffer II). Die DNA wurde daraufhin mit 50-100 µl *Aqua bidest.* bzw. TE-Puffer von der Säule eluiert.

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl; pH 8,5
1 mM EDTA

2.12.14 Midi- bzw. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Midi- bzw. Maxi Präparation von Plasmid-DNA erfolgte unter Zuhilfenahme der entsprechenden Kits der Firma QIAGEN. Die Aufreinigung erfolgte nach dem unter **2.12.13** beschriebenen Prinzip, jedoch bestand das die DNA adsorbierende Material aus feinen Silicagel Partikeln, die mit DEAE (Diethylaminoethanol) überzogen sind.

Für eine Midi-/Maxi Präparation wurden 25/100 ml einer Suspensionskultur (**2.12.11.2**) verwendet. Die Lyse der Zellen und Adsorption der Plasmid DNA erfolgte wie in **2.12.13** besprochen. Die adsorbierte Plasmid-DNA wurde allerdings mit einem speziellen Puffer (QF) von der Säule eluiert, anschließend mit Isopropanol gefällt, mit 70%igen Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen *Aqua bidest.* bzw. TE-Puffer aufgenommen. Die Volumina der verwendeten Puffer (P1, P2, P3, QBT, QC und QF), deren Zusammensetzung bei QIAGEN zu erfahren ist, wurden entsprechend angepaßt.

2.12.15 Präparation von λ -DNA

Der erste Schritt bei der Aufreinigung von λ -Phagen-DNA, ist die Bereitstellung einer ausreichend großen Menge reiner Phagenpartikel. Eine geeignete Methode hierfür ist das Herstellen von Plattenlysaten, wie unter **2.13.9** beschrieben. Allerdings müssen hierfür sowohl der Top- als auch der Bottom-Agar mit Agarose zubereitet werden, denn der sonst verwendete Agar enthält polyanionische Kontaminationen, die nachfolgende enzymatische Manipulationen inhibieren können.

Der zweite Schritt besteht aus der Präzipitation der Phagenpartikel, deren Lyse und der Aufreinigung der freigesetzten λ -DNA. Dieser Schritt wurde mit Hilfe des λ Midi Kits der Firma QIAGEN durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwandten Puffer ist dort zu erfahren.

50 ml eines Phageneluats wurden mit 100 μ l P1 versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Die in diesem Puffer enthaltene RNase A und DNase I baut restliche bakterielle RNA bzw. DNA ab. Danach wurden 10 ml kalter P2 hinzupipettiert und 60 min auf Eis inkubiert. Das in P2 enthaltene PEG fällt die Phagenpartikel in Gegenwart von Salzen und Wasser aus. Durch 10minütiges Abzentrifugieren bei $>10.000 \times g$ wurden die Phagen gesammelt und mit 3 ml P3 wieder in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 3 ml des SDS-haltigen P4 wurden die Phagen nun 20 min bei 70°C lysiert und die Lösung anschließend auf Eis gekühlt. Der stark salzhaltige Puffer P5, von dem ebenfalls 3 ml eingesetzt wurden, fällt die mit SDS komplexierten Phagenproteine aus, die durch 30 min bei $>10.000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert wurden. Der Überstand, der die λ DNA enthielt, wurde auf eine QIAGEN Säule aufgetragen. Die weitere Prozessierung erfolgte entsprechend der Midi Präparation von Plasmid-DNA (**2.12.14**). Die Qualität der präparierten λ -DNA wurde gelelektrophoretisch (**2.12.2**) überprüft.

2.12.16 Messung der Konzentration und Reinheit einer DNA/RNA-Lösung

Die Nukleinsäure-Konzentration einer wäßrigen Lösung kann man mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie sehr exakt messen. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer Nukleinsäure-Lösung absorbiert wird, ist ihrem Gehalt an Nukleinsäure direkt proportional. Die Absorption einer DNA/RNA-Lösung wird bei 260 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA und 40 μ g/ml RNA (AUSUBEL *et al.*, 1987-2000). Anhand der Ultraviolettabsorption kann man auch die Reinheit einer DNA/RNA-Präparation überprüfen. Bei reinen Proben liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 und 280 nm bei etwa 1,8. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung hin.

Alle Messungen wurden mit dem Spektralphotometer *Genequant II* der Firma PHARMACIA durchgeführt. 100 μ l einer 1:20 Verdünnung der Nukleinsäure-Lösungen wurden in eine

Mikroquarzküvette pipettiert und die Absorption bei 260 und 280 nm in einem Schritt gemessen. Das Gerät war so programmiert, daß es sowohl die Konzentration, als auch die Reinheit der DNA-Lösung anzeigte.

2.12.17 Chloroform/Phenol Extraktion von DNA

Die gängigste Methode eine DNA-Lösung von Proteinkontaminationen zu befreien, ist die Extraktion mit Hilfe eines Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol-Gemischs. Das Phenol denaturiert und löst die Proteine (KIRBY, 1957), Chloroform stabilisiert die Grenze zwischen phenolischer und wässriger Phase (PENMAN, 1966), und der Isoamylalkohol hilft bei der Trennung von organischer und wäßriger Schicht (MARMUR, 1961).

Zu der aufzureinigenden DNA Präparation wurde das gleiche Volumen eines 25/24/1 (v/v/v) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemischs pipettiert und durch Vortexen kräftig durchmischt. Nach kurzer Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurde die obere, die DNA enthaltende wäßrige Phase in eine neues Reaktionsgefäß überführt und der gesamte Vorgang nochmals wiederholt. Anschließend folgte eine Extraktion nur mit Chloroform, um das restliche Phenol zu entfernen.

2.12.18 Fällen der DNA durch Ethanolpräzipitation

Die am häufigsten benutzte Methode zur Anreicherung und Reinigung einer DNA-Lösung nach Phenol/Chloroform Extraktion ist die Ethanolpräzipitation. In Gegenwart relativ hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen, welche die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäure neutralisieren und bei Temperaturen unterhalb von -20°C , induziert das Ethanol eine strukturelle Veränderung der DNA, wodurch sie aggregiert und anschließend ausfällt (EICKBUSH und MOUDRIANAKIS, 1978).

Falls der Salzgehalt der DNA-Lösung nicht schon vor der Phenol/Chloroform Extraktion eingestellt worden war, wurden nun 1/10 des Ursprungsvolumen 3 M NaAc und 2 bis 2½ Volumen 100%iges Ethanol zu der Lösung pipettiert und kräftig gevortext. Nach ca. einstündiger Inkubation auf Trockeneis wurde 20 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert, das Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen *Aqua bidest.* bzw. TE-Puffer aufgenommen.

2.12.19 Southern Blotting

Das von SOUTHERN (1975) ausgearbeitete Verfahren dient der Übertragung und Immobilisierung von DNA-Fragmenten, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine Membran. Die geblotteten DNA-Banden können durch die Hybridisierung mit gelabelten DNA-Sonden spezifisch nachgewiesen werden.

2.12.19.1 Southern Blotting von λ -DNA

Für Southern Blots mit λ -DNA wurden je 2 μ g DNA mit Restriktionsenzymen geschnitten (2.12.6) und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (2.12.2). Das Gel wurde nach Färbung mit EtBr und Dokumentation zum Auftrennen der DNA-Doppelstränge in Denaturierungslösung eingelegt und 2 x 15 min bei *RT* sanft bewegt. Einem kurzem Waschschrift mit *Aqua dest.* folgte ein zweimaliges Bad für 15 min in Neutralisierungslösung 1. Dann folgte der eigentliche Transfer der DNA. Zu diesem Zweck wurde das Gel auf eine Lage WHATMAN 3MM-Papier gelegt, das an beiden Enden in das als Transferpuffer benutzte 20x SSC ragte. Auf das Gel wurde eine adäquat zugeschnittene, positiv geladene Nylonmembran (ROCHE DIAGNOSTICS) gelegt, der wiederum zwei Lagen WHATMAN 3MM-Papier sowie ein ca. 6 cm dicker Stapel saugfähiges Papier folgten. Zuerst wurde eine mit einem Gewicht (ca. 500 g) versehene Glasplatte plaziert. Dieser ganze Aufbau wurde mit Frischhaltefolie abgedichtet, so daß der durch die kapillaren Saugkräfte des Papierstapels stattfindende Transfer der DNA über Nacht ablaufen konnte. Am nächsten Morgen wurde die Membran getrocknet und die DNA durch UV-Crosslinking kovalent gebunden. Die Hybridisierung mit der DIG gelabelten DNA-Sonde, die Stringenzwaschschriffe und die Detektion erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie unter 2.14.3 und 2.14.4 beschrieben.

2.12.19.2 Southern Blotting von genomischer DNA

Für genomische Southern Blots wurden je 10 μ g genomischer DNA (2.13.1) mit 40 Units Restriktionsenzym über mehrere Stunden hinweg verdaut (2.12.6). 40 weitere Units wurden zugegeben und über Nacht inkubiert. Die Auftrennung der so vollständig fragmentierten DNA erfolgte in einem 0,6%igen Agarosegel und bei 1V/cm ebenfalls über Nacht. Das weitere Vorgehen entsprach dem unter 2.12.19.1 Beschriebenen. Zur Reduktion der Stringenz wurde der zweite Waschschrift nach der Hybridisierung bei 55°C durchgeführt. Die Detektion erfolgte jedoch unter Verwendung des chemilumineszenten Substrats CPD-Star™ (ROCHE DIAGNOSTICS). Bei dieser Detektionsmethode erfolgte der Einsatz des Anti-DIG-AP-Ak in einer Verdünnung von 1:20.000, die Signale selbst wurden durch Belichtung eines Röntgenfilms aufgenommen.

Denaturierungslösung

0.5 N NaOH
1.5 M NaCl

Neutralisierungslösung 1

0.5 mol/l Tris-HCl, pH 7,5
3 mol/l NaCl

20x SSC

3 M NaCl, pH 7,0
300 mM Natriumcitrat

2.12.20 Zyklische DNA-Sequenzierung mit dem automatischen Sequenzierer LI-COR 4200L

Die DNA-Sequenzierung ist eine Methode, mit der man die genaue Reihenfolge der Nukleotide in einem DNA-Abschnitt bestimmen kann. Die Sequenzanalyse der in die unterschiedlichen Vektoren inklinierten DNA-Fragmente erfolgte hier durch die Kettenabbruchmethode nach Sanger (SANGER *et al.*, 1977).

Die zyklische Sequenzierung ähnelt sehr einer üblichen PCR (2.12.1). Statt eines Vorwärts- und eines Rückwärts-Primer verwendet man hier allerdings nur einen Primer, was zu einer linearen Amplifizierung führt. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, daß man über einen längeren Bereich hinweg zuverlässige Sequenzen, die sich außerdem gut lesen lassen, erhält. Auch benötigt man wesentlich geringere Mengen der DNA-Matrize.

Es gibt die unterschiedlichsten Methoden, die DNA-Banden innerhalb des Sequenziergels sichtbar zu machen. Bei der Sequenzierung mit dem automatischen DNA-Sequenzierer LI-COR 4200L der Firma MWG BIOTECH macht man sich die Detektion farbstoffgelabelter Primer zunutze. Die Primer, die man bei der zyklischen Sequenzierreaktion verwendet, sind am 5'-Ende mit einem Infrarotfarbstoff (IRD800) markiert. Dieser Farbstoff wird durch einen Laser, der in regelmäßigen Abständen die gesamte Breite des Gels erfaßt, angeregt, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu emittieren. Nur dort im Gel, wo sich ein DNA-Fragment befindet, wird Licht emittiert. Das restliche Gel bleibt dunkel. Ein Scanner, der gleichzeitig mit dem Laser das gesamte Gel abfährt, nimmt diese Informationen auf und leitet sie an einen Computer weiter. Mit der entsprechenden Software (*Image Collection*) ist man nun in der Lage, ein Bild des gesamten Gels zu erstellen.

Für die zyklische Sequenzierung wurde der *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* der Firma AMERSHAM/ PHARMACIA benutzt. Die Komponenten für die Kettenabbruchreaktion sind in diesem Kit in sogenannten Terminationsmixen vereinigt. Anstelle von dGTP ist den Terminationsgemischen 7-deaza-dGTP beigelegt. Dies soll Kompressionen, die während der Gelelektrophorese auftreten können, verhindern.

2.12.20.1 Gießen des Gels

Das Polyacrylamidgel für die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde zwischen speziell dafür zugeschnittene Glasplatten gegossen. Zu diesem Zweck wurden die Glasplatten vorher gründlich mit *Aqua bidest.* gereinigt und mit Isopropanol entfettet. Zwischen die Platten wurden Abstandhalter von 0,25 mm Dicke geschoben. Zum Gießen des Sequenziergels wurde

die Zweikomponentengellösung *Sequagel XR* der Firma BIOZYM verwendet. 24 ml der Komponente I und 6 ml der Komponente II wurden in einem Meßbecher vereinigt und 175 µl 10%iges APS dazupipettiert. Durch Zugabe des APS wird der Polymerisationsvorgang gestartet. Aus diesem Grund wurde nach kurzem Mischen die Lösung sofort in eine 20 ml Spritze aufgezogen und zwischen die bereitliegenden Glasplatten gespritzt. Anschließend wurde der Vorkamm in das noch flüssige Gel gesteckt. Es dauerte 2-3 h bis das Gel vollständig auspolymerisiert war.

2.12.20.2 Sequenzierreaktion

Folgende Reagenzien wurden für einen Ansatz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammenpipettiert:

x	µl	DNA (ca. 1 µg)
0,8	µl	mit Infrarotfarbstoff markierter Primer (2 pmol/µl)
y	µl	<i>Aqua bidest.</i> (auf 18 µl Gesamtvolumen aufgefüllt)

Der gesamte Ansatz wurde gut durchmischt, kurz abzentrifugiert und auf Eis gestellt. In PCR-Reaktionsgefäße wurden je 1,5 µl der vier Terminationsmixe vorgelegt und dann je 4,5 µl des obigen Gemischs dazupipettiert.

Die Sequenzierreaktion wurde im *Touchdown* Thermocycler der Firma HYBAID mit folgenden Temperaturzyklen durchgeführt:

Schritt 1	:	3 min	95°C	Denaturierung der DNA-Matrize
Zyklus 1-30	:	30 sec	95°C	Denaturierung der DNA-Doppelstränge
		30 sec	T _m	<i>Annealing</i> des Primers
		60 sec	70°C	Verlängerung des Primers

Im Anschluß an diese Zyklen wurden die Proben nochmals 3 min bei 95°C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und 3 µl Stop/Ladepuffer dazupipettiert.

2.12.20.3 Auftragen der Proben und Gellauf

Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde der Vorkamm entfernt, das Gel in die dafür vorgesehene Apparatur eingehängt und ein 45minütiger Vorlauf gestartet. Dieser diente der Vorheizung des Gels auf 50°C. Als Laufpuffer wurde frisch angesetzter 1x TBE Puffer verwendet, die Stromspannung betrug 1500 V.

Nach Beendigung des Vorlaufs wurde ein Haifischzahnkamm in das Gel eingestochen und 1,5 µl der Proben in der Reihenfolge A,C,G,T in die entstandenen Taschen (48) pipettiert. Anschließend wurde die Elektrophorese wieder gestartet. Ein durchschnittlicher Lauf dauerte etwa 6-7 h.

2.12.20.4 Auswertung der Gele

Mit Hilfe der passenden Software (*Image Analysis*) wurde die Abfolge der Banden automatisch ermittelt. Alle Sequenzen wurden per Hand noch einmal durchgesehen, gegebenenfalls korrigiert und dann abgespeichert. In der Regel konnten zwischen 500 und 800 Nukleotide gelesen werden.

10 x TBE-Puffer (Laufpuffer)

107,8	g	Tris-Base	
55,0	g	Borsäure	mit <i>Aqua bidest.</i> auf 1 l Volumen aufgefüllt und autoklaviert
7,4	g	EDTA	

Stop-/Ladepuffer

95%	(v/v)	Formamid	
10	mM	EDTA	mit <i>Aqua bidest.</i> auf 100% aufgefüllt und bei -20°C gelagert
0,1%	(w/v)	Xylencyanol	
0,1%	(w/v)	Bromphenolblau	

2.13 Konstruktion genomischer DNA-Bibliotheken von *S. domuncula*

Eine genomische Bibliothek ist eine Sammlung von Rekombinantenklonen, die zusammen die gesamte DNA eines einzigen Organismus repräsentieren (BROWN, 1993). Substitutionsvektoren auf Basis des Phagen λ , wie der hier verwendete λ FIX[®] II Vektor der Firma STRATAGENE, die große DNA-Fragmente aufnehmen können, eignen sich besonders gut für die Konstruktion genomischer Bibliotheken.

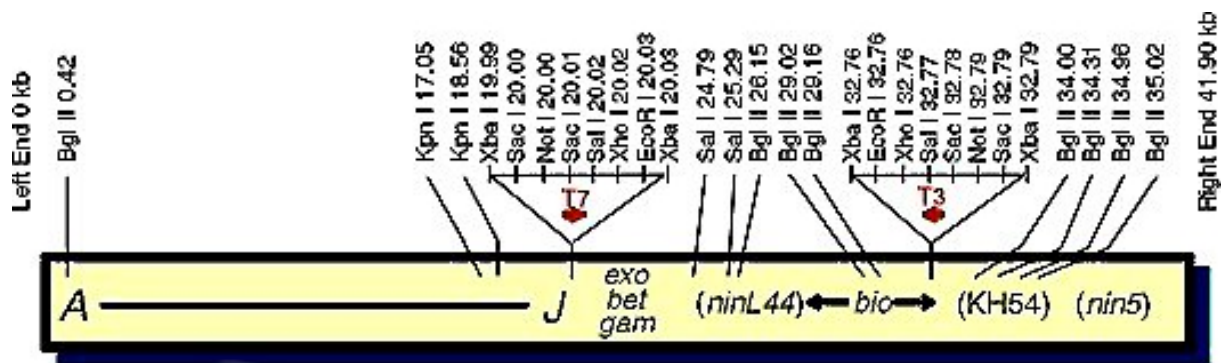


Abb. 6: Karte des λ FIX[®] II Substitutionsvektors.

2.13.1 Präparation der genomischen DNA

Um genomische DNA aus Gewebe isolieren zu können, muß das Gewebe zuerst mechanisch dissoziiert und die vereinzelteten Zellen mit einem geeigneten Puffer lysiert werden. Die so freigesetzte DNA wird anschließend aufgereinigt und konzentriert. Für diese beiden aufeinanderfolgenden Schritte wurde ein leicht verändertes Protokoll der Firma QIAGEN angewandt.

Im Gegensatz zu der empfohlenen Menge von 400 mg Gewebe wurden 5 g Frischgewebe des Schwammes *S. domuncula* mit Hilfe eines Skalpell abgetrennt und nach kurzer Inkubation in *Aqua dest.* sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Die so tiefgefrorenen Schwammstücke wurden in einem zuvor mit flüssigen Stickstoff vorgekühlten Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben. Dieses Pulver wurde zu 19 ml Puffer G2 gegeben. Nach Zugabe von 1 ml Protease-Lösung (20 mg/ml) wurde vorsichtig gevortext und 2 h in einem Wasserbad bei 50°C inkubiert. Bei diesem Schritt werden die Zellkerne lysiert, die DNA freigesetzt und Proteine, wie z. B. Histone, Nukleasen usw. denaturiert. RNase A sorgt für den Abbau der RNA, die Protease spaltet die Proteine in kleinere Fragmente.

Nach einer 10minütigen Zentrifugation (5000 x g bei 4°C) zur Entfernung grober Partikel aus dem Lysat, wurde der resultierende Überstand auf eine zuvor mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte Säule (QIAGEN Genomic-tip 500/G) aufgetragen. Die DNA wird hierbei unter definierten pH und Salzbedingungen an feine Silicagel Partikel, die mit DEAE überzogen sind, gebunden (VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979). Alle anderen im Lysat enthaltenen Unreinheiten (RNA, Proteine, Carbohydrate usw.) fließen durch bzw. werden durch die folgenden Waschschrte mit Puffer QC (2 x 15ml) von der Säule gewaschen. Die DNA wurde daraufhin mit 15 ml Puffer QF eluiert und durch Zugabe von 10,5 ml *RT* Isopropanol präzipitiert. Durch eine anschließende Zentrifugation (20 min, 8000 x g bei 4°C) wurde die präzipitierte DNA gesammelt, mit 70%igen Ethanol gewaschen und nach kurzem Trocknen in 1 ml 5 mM Tris/HCl, pH 8,5 über Nacht gelöst. Die Ausbeute an DNA wurde photometrisch bestimmt (2.12.16). Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist wiederum bei QIAGEN zu erfahren.

Lysispuffer G2

30	mmol/l	EDTA
800	mmol/l	GuHCl
200	mg/l	RNase A
30	mmol/l	Tris-HCl (pH 8,0)
0,5	%	Triton X-100
5	%	Tween 20

2.13.1.1 Checking Gel

3 µg der so isolierten genomischen DNA wurden auf ein 0,5%iges TAE-Agarosegel aufgetragen und bei 0,8 V/cm über Nacht aufgetrennt (2.12.2). Der Anteil an hochmolekularen Fragmenten konnte so überprüft werden. Als Standard diente der *High Molecular Weight Marker* der Firma GIBCO.

2.13.2 Partielle Restriktion der genomischen DNA mit *Sau 3AI*

In einer genomischen Bibliothek sollten die klonierten DNA Fragmente (optimale Größe zwischen 9 und 23 kb für den λ FIX[®] II Vektor) das Genom des verwendeten Organismus zufällig repräsentieren. Dies kann nur erreicht werden, wenn die Ziel-DNA vor der Ligation mit dem Vektor völlig zufällig geschnitten wird. Der partielle Verdau der DNA mit einem Restriktionsenzym ist hierfür ein probates Mittel (SEED *et al.*, 1982). Um abschätzen zu können, unter welchen Bedingungen die Fragmente der gewünschten Größe am stärksten repräsentiert sind, wird die genomische DNA unter limitierender Menge eines bestimmten Restriktionsenzym (hier das zu diesem Zweck besonders geeignete *Sau 3AI*) für unterschiedlich lange Zeit inkubiert.

Für den Testverdau wurden 50 µg genomische DNA mit *Aqua bidest.* auf 450 µl aufgefüllt und 50 µl des geeigneten Restriktionsenzym-puffers zugefügt. Nach 15minütiger Inkubation bei 37°C zur Vorwärmung der Lösung wurde 1 µl einer 1:10 Verdünnung des Restriktionsenzym *Sau 3AI* dazupipettiert und wieder 10 min bei 37°C inkubiert. 40 µl des Ansatzes

wurden nach dieser Zeit entnommen, mit 10 µl Stop-Lösung versetzt und auf Eis gestellt. Der Rest des Ansatzes wurde weiter inkubiert und nach je 10 min wurden wiederum 40 µl entnommen und abgestoppt. Die so erhaltenen 12 Aliquots wurden neben der unverdauten genomischen DNA und dem *High Molecular Weight Standard* auf ein Gel aufgetragen und über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt.

Für den Hauptverdau wurden in drei Reaktionsgefäßen je 50 µg genomische DNA mit *Aqua bidest.* auf 450 µl aufgefüllt, mit 50 µl Puffer versetzt, 15 min bei 37°C vorgewärmt und dann mit 1 µl einer 1:10 Verdünnung des Restriktionsenzym *Sau 3AI* versetzt. Nach 5, 10 bzw. 15minütiger Inkubation wurden die Ansätze direkt in 1,5 ml eines Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol-Gemischs pipettiert und einer Chloroform/Phenol Extraktion (2.12.17) mit anschließender Ethanolpräzipitation (2.12.18) unterzogen. Die DNA-Pellets wurden in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und 2 µl davon mit Hilfe eines Agarose-Gels analysiert (2.12.2 und Abb. 12).

<u>Stop-Lösung</u>	
10	mM Tris-HCl; pH 7,5
20	% Glycerol
0,1	% SDS
0,1	% Bromphenolblau

2.13.3 Partielles Auffüllen der Restriktionsenden

Das partielle Auffüllen von Vektorarmen und genomischen DNA-Fragmenten, die 5'-Überhänge enthalten, führt bei der Konstruktion von genomischen Bibliotheken durch das Verhindern von Selbstligationen zu einer genaueren Repräsentanz von benachbarten genomischen Sequenzen (FRISCHAUF *et al.*, 1983). Der λ FIX[®] II Vektor, dessen sogenanntes *stuffer* Fragment durch den Verdau mit *Xho I* entfernt wurde, wird mit partiell aufgefüllten *Xho I* Schnittstellen geliefert (3'-CT-5' Überhänge). Um eine effiziente Ligation zu ermöglichen, wird die mit *Sau 3AI* geschnittene genomische DNA mit dATP und dGTP aufgefüllt, so daß kompatible 3'-AG-5' Überhänge entstehen. Das Auffüllen der Enden selbst geschieht mit Hilfe der Klenow-Polymerase. Alle benötigten Reagenzien waren im *Klenow Fill-In Kit* der Firma STRATAGENE enthalten.

Folgende Reaktionsansätze wurden zusammenpipettiert, kurz gemischt und 15 min bei *RT* inkubiert:

<u>Kontroll-Reaktion</u>		<u>Proben-Reaktionen</u>	
1	µg Kontroll-DNA(pUC19/ <i>Bam HI</i>)	48	µl DNA in TE aufgenommen (ca. 45µg)
2,5	µl 10x <i>Fill-In</i> -Puffer	30	µl 10x <i>Fill-In</i> -Puffer
1	µl dATP (10 mM)	5	µl dATP (10 mM)
1	µl dGTP (10 mM)	5	µl dGTP (10 mM)
1	µl Klenow (5U/µl)	3	µl Klenow (5 U/µl)
mit <i>Aqua bidest.</i> auf 25 µl aufgefüllt		mit <i>Aqua bidest.</i> auf 300 µl aufgefüllt	

Nach der Inkubation wurde den Proben-Reaktionen 150 µl 1x STE-Puffer und 50 µl 10x STE-Puffer, der Kontrollreaktion 475 µl 1x STE-Puffer zugefügt. Es folgte eine Phenol/

Chloroform Extraktion (2.12.17) und Ethanolpräzipitation (2.12.18). Die DNA-Pellets wurden in 25 bzw. 3,5 µl TE-Puffer wiederaufgenommen. Die partiell aufgefüllte Kontroll-DNA sowie eine weitere Kontrolle (pUC19/*Bam HI* geschnitten) wurden nun über Nacht bei 4°C ligiert (2.12.5) und am nächsten Tag zusammen mit einer unligierten Kontrolle (pUC19/*Bam HI* geschnitten) und einem Längenstandard (*1 kb Plus ladder*, GIBCO) in einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt (2.12.2 und Abb. 13).

<u>10x Fill-In-Puffer</u>			<u>10x STE-Puffer</u>		
60	mM	Tris-HCl; pH 7,5	200	mM	Tris-HCl; pH 7,5
60	mM	NaCl	1	M	NaCl
60	mM	MgCl ₂	100	mM	EDTA
0,5	%	Gelatine			
10	mM	DTT			

2.13.4 Ligation mit den λ FIX[®] II Vektorarmen

Für die Ligation der partiell aufgefüllten genomischen DNA in die λ FIX[®] II Vektorarme wurde der *DNA Ligation Kit* der Firma STRATAGENE verwendet. Vor der Ligation der eigentlichen Probenreaktion, wurde eine Kontrolligation mit einem *BamHI* geschnittenen Test-*insert*, das ebenfalls partiell aufgefüllt war, durchgeführt. Diese Ligationsreaktion diente auch als Kontrolle der Verpackungseffizienz (2.13.5).

Folgende Reaktionsansätze wurden für die Kontrolligation bzw. für die eigentlichen Probenligationen zusammenpipettiert und bei 4°C über Nacht ligiert:

<u>Kontroll-Reaktion</u>		<u>Proben-Reaktionen</u>	
1	µl λ FIX [®] II (1µg/µl; 1:3 verd.)	1	µl λ FIX [®] II (1µg/µl)
0,4	µl pMF/ <i>BamHI insert</i> (0,1µg)	2,5	µl partiell aufgefüllte genomische DNA (ca. 2µg)
0,5	µl 10x Ligase-Puffer	0,5	µl 10x Ligase Puffer
0,5	µl 10 mM rATP	0,5	µl 10 mM rATP
0,5	µl T4 Ligase (4U/µl)	0,5	µl T4 Ligase (4U/µl)
mit <i>Aqua bidest.</i> auf 5 µl aufgefüllt			

2.13.5 *In vitro*-Verpackung der λ DNA

Unter *in vitro*-Verpackung versteht man den Vorgang, bei dem λ-Moleküle, die 78 % bis 105 % der Länge des Phagen-genoms entsprechen, im Reaktionsgefäß in die Kopf-Schwanz-Struktur der Phagen verpackt werden (AUSUBEL *et al.*, 1987-2000). Dazu benötigt man die Lysate zweier komplementärer, lysogener Bakterienstämme (BHB2690 und BHB2688). Die infizierten Stämme weisen jeweils eine Mutation in einem Bestandteil der Phagenhülle auf, so daß die Phagenpartikel nicht mehr zusammengesetzt werden können. Das Gemisch beider Lysate enthält alle erforderlichen Bestandteile für die *in vitro*-Verpackung rekombinanter λ-Moleküle (HOHN und MURRAY, 1977). Hier wurde der MaxPlax[™] λ *Packaging Extract* der Firma

EPICENTRE verwendet. Bei diesem System wird zur Gewinnung des Extrakts der Stamm BHB2690 durch den Stamm NM759 ersetzt, was zu einer extrem hohen Verpackungseffizienz führt (GUNTHER *et al.*, 1993).

Die bei -80°C gelagerten Aliquots des Verpackungsextrakts wurden bei *RT* aufgetaut und halbiert (25 μl) bzw. für die Kontrollen geviertelt (12,5 μl). 2,5 μl der Ligationsansätze (vorher 15 min bei 65°C inaktiviert) bzw. der Kontroll-DNA ($\lambda\text{cl}857$ *Sam7*) wurden dazu pipettiert und gut gemischt. Es folgte eine 90minütige Inkubation bei 30°C . Nach dieser Zeit wurden weitere Aliquots des Extrakts aufgetaut, in entsprechenden Mengen (25 bzw. 12,5 μl) zu den jeweiligen Reaktionen pipettiert und wiederum 90 min bei 30°C inkubiert. Abgestoppt wurden die Reaktionen durch Zugabe von 500/250 μl SM-Puffer und 25/12,5 μl Chloroform. Es folgte die Bestimmung des Phagentiters der so hergestellten genomischen Bibliotheken bzw. der Kontrollen.

<u>SM-Puffer</u>		
5,8 g/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Der Puffer wurde vor der Verwendung autoklaviert
50 ml/l	1 M Tris-HCl; pH 7,5	
100 mg/l	Gelatine	

2.13.6 Bestimmung des Phagentiters der genomischen Bank bzw. der Kontrollen

Die verpackten rekombinanten Phagen müssen für die Titration bzw. die spätere Amplifikation selektiert werden. Dies geschieht mit Hilfe des *E. coli* Stammes XL1-Blue MRA (P2). Diese Bakterien beinhalten den Phagen P2 als Prophagen und können deshalb von λ -Phagen nicht infiziert werden. Man spricht von Phagen, die sensitiv gegenüber der P2-Prophagen-Inhibition sind (Spi^+). λ FIX[®] II ist jedoch so konstruiert, daß der Einbau fremder DNA den Übergang von Spi^+ zu Spi^- bewirkt. Rekombinante Phagen sind in der Lage, P2 beherbergende *E. coli* Stämme zu infizieren. Für das Ausplattieren rekombinanter Phagen wurde also der Stamm XL1-Blue MRA (P2), für die Kontrolle mit $\lambda\text{cl}857$ *Sam7* der Stamm LE392MP verwendet.

2.13.6.1 Kultivierung der jeweiligen Wirtsbakterien für die Phageninfektion

Die jeweiligen Bakterienstämme wurden auf LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine einzelne Kolonie gepickt und in LB-Medium supplementiert mit 0,2% Maltose und 10 mM MgSO₄ überführt. Beide Zusätze verstärken die Adsorption der Phagen. Nach 4-6 h Wachstum bei 250 upm und 37°C im Schüttelinkubator wurde eine OD₆₀₀ von ca. 0,8-1,0 erreicht. Diese Bakteriensuspension wurde bis zum Gebrauch, längstens aber für 1 Woche bei 4°C gelagert.

Maltose-Stammlösung

20 % (w/v) Maltose in *Aqua bidest.* gelöst, auf 100 % aufgefüllt und sterilfiltriert

Magnesiumsulfat-Stammlösung

1 M MgSO₄ in *Aqua bidest.* gelöst und sterilfiltriert

2.13.6.2 Titration der Phagenlösungen

Der Phagentiter wird durch das Ausplattieren einer seriellen Verdünnungsreihe der jeweiligen Lösungen ermittelt. Durch Auszählen der sich im Bakterienrasen bildenden Plaques kann man auf den Ursprungstiter zurückrechnen.

Ausgehend von einer 10^{-2} Verdünnung (10 μ l der Ursprungslösung in 990 μ l SM-Puffer) wurden weitere 1:10 Verdünnungen hergestellt (100 μ l der Verdünnungen zu 900 μ l SM-Puffer). 100 μ l jeder dieser Verdünnungsstufen wurden zu je 100 μ l Bakteriensuspension pipettiert (2.13.6.1) und 15 min bei 37°C auf einem Heizblock inkubiert. Diese Präinkubation dient der Anheftung der Phagen an die bakteriellen *lamB*-Rezeptoren, die normalerweise dem Transport von Maltose in die Zelle dienen. Anschließend wurden je 3,5 ml 50°C warmer Top-Agar mit den Bakterien/Phagenmischungen angeimpft und auf vorgewärmte LB-Agarplatten ausgegossen. Nach dem Erstarren des Top-Agars wurden die Platten über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Morgen wurden die Plaques ausgezählt und unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe die *plaque forming units per ml* (pfu/ml) der Ursprungslösung berechnet.

2.13.7 Amplifikation der genomischen Bibliothek

Eine Amplifikation ist notwendig, um eine größere, stabile Menge einer genomischen Bibliothek mit hohem Titer herzustellen.

Für die Amplifikation wurde diejenige genomische Bibliothek, für die die genomische DNA 5 min mit *Sau 3AI* verdaut worden war, verwendet. Etwa $1,5 \times 10^6$ Phagen wurden eingesetzt. Wie unter 2.13.6.1 beschrieben, wurde eine Kultur von *E. coli XLI-Blue MRA (P2)* angesetzt. 600 μ l der so vorbereiteten Bakteriensuspension wurden mit je ca. 125.000 Phagen versetzt und 15 min bei 37°C präinkubiert. Diese Ansätze wurden mit je 7 ml 50°C warmen Top-Agar gemischt und auf vorgewärmte 150 mm LB-Agarplatten ausgegossen. Nach dem Erstarren des Top-Agars wurden die Platten solange im Brutofen bei 37°C inkubiert, bis die Plaques einen Durchmesser von 1-2 mm erreicht hatten. Die Platten wurden mit jeweils 10 ml SM-Puffer überschichtet und über Nacht bei 4°C sanft geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde das Phageneluat von den Platten abgenommen und in 50 ml Polypropylen-Gefäße überführt. Nach Zugabe von Chloroform bis zu einem Endvolumen von 5% wurde 15 min bei RT inkubiert, um die restlichen Bakterien abzutöten. Durch 10minütige Zentrifugation bei 500 x g wurden Zelltrümmer und Agarreste entfernt. Die so hergestellte Phagensuspension wurde aliquotiert und nach Zugabe von einigen Tropfen Chloroform bei 4°C bzw. nach Zugabe von 7% DMSO bei -80°C gelagert. Der Phagentiter der amplifizierten Bibliothek wurde wie in 2.13.6.2 beschrieben, bestimmt.

2.14 Screening der genomischen Bank mit homologen Sonden

Eine geläufige Methode, einen gesuchten rekombinanten Klon in einer genomischen Bibliothek aufzuspüren, stellt die Hybridisierung mit einer markierten DNA-Sonde dar (BENTON und DAVIS, 1977). Dieses sogenannte Homologie- oder Plaquescreening wurde hier angewandt.

2.14.1 DIG-Markierung der DNA-Sonden

Die Markierung der DNA-Sonden wurde mit Hilfe des *PCR-DIG Probe Synthesis Kit* der Firma ROCHE DIAGNOSTICS durchgeführt. Dieses System beruht auf dem Einbau von DIG gekoppelten Nukleotiden während einer PCR-Reaktion (2.12.1).

Für die Markierungsreaktion wurden folgende Reagenzien in einem PCR-Gefäß zusammenpipettiert:

5	μl	10x PCR-Puffer
5	μl	PCR-DIG-Probe Synthesis Mix
je 1	μl	10 pmol/μl Primer
0,75	μl	Enzym-Mix (<i>Pwo-/Taq</i> -Polymerase)
1	μl	<i>template</i> DNA
<u>36,25</u>	<u>μl</u>	<i>Aqua bidest.</i>
50	μl	

Der Ansatz wurde gut durchmischt und im Thermocycler unter folgenden Bedingungen amplifiziert: eine initiale Denaturierung für 3 min bei 95°C, dann 10 Zyklen 20 sec bei 95°C, 30 sec bei 54°C und 3 min bei 72°C. Danach 20 Zyklen mit den gleichen Bedingungen wie oben angegeben, jedoch wurde die Elongationszeit bei jedem Zyklus um 20 sec erhöht. Abschließend folgte ein Elongationsschritt bei 72°C für 7 min.

5 μl des Ansatzes wurden durch Agarosegel Elektrophorese (2.12.2) analysiert. Der restliche Ansatz wurde über eine Säule gereinigt (2.12.3).

2.14.2 Ausplattieren der Phagen, Transfer auf die Membran und Denaturierung der DNA

In der ersten Screening-Runde wurden 100.000 pfu der nicht amplifizierten genomischen Bibliothek auf einer großen Screening Platte (22 x 22 cm) wie unter 2.13.6 beschrieben ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei der zweiten und dritten Screening-Runde wurden 15 cm Ø Petrischalen verwendet. Die Anzahl der ausplattierten pfu wurde dabei vor allem beim dritten Screening so gewählt, daß vereinzelte Plaques im geschlossenen Bakterienrasen vorlagen.

Vor dem Transfer der Plaques auf die Nylon- bzw. Nitrocellulosemembranen, wurden die Platten bei 4°C etwa 1 h vorgekühlt. Anschließend wurden die Membranen vorsichtig auf die Plattenoberfläche gelegt und die Lage mit Hilfe einer Kanüle markiert, um positive Plaques nach der Detektion identifizieren zu können. Nach ca. 1 min wurden die Membranen vorsichtig abgezogen und mit der Plaquesseite nach oben 5 min auf mit Denaturierungslösung vollgesogene Whatman 3MM Papiere plaziert. Es folgten eine 10minütige Inkubation auf Papieren, vollgesogen mit Neutralisierungslösung 2, und eine 10minütige Inkubation auf solchen mit 2x SSC-Lösung. Danach wurden die Membranen gut angetrocknet und bei 120 mJ gecrosslinkt (Nylon) bzw. 1h bei 80°C gebacken, um die DNA zu fixieren.

Denaturierungslösung

0,5 N NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung 2

0,5 mol/l Tris-HCl, pH 7,5
1,5 mol/l NaCl

20x SSC

3 M NaCl, pH 7,0
300 mM Natriumcitrat

2.14.3 Prähybridisierung, Hybridisierung und Stringenzwaschschritte

Für die Prähybridisierung wurden die Membranen in Plastikfolie eingeschweißt und als Hybridisierungslösung 40 bzw. 15 ml *DIG Easy Hyb*, ROCHE DIAGNOSTICS zugegeben. Die Beutel wurden luftblasenfrei verschlossen und in einem Wasserbad bei 42°C unter leichtem Schütteln 1 h lang inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Sonde 10 min in kochendem Wasser denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Sonde wurde in 6 ml *DIG Easy Hyb* verdünnt und dann zu den restlichen 40 ml im Beutel gegeben. Nachdem die Membranen wieder luftblasenfrei eingeschweißt worden waren, wurden sie über Nacht im Wasserbad bei 42°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die Beutel wieder geöffnet. Das *DIG Easy Hyb* wurde abgegossen und bei -20°C für darauf folgende Screening-Runden aufbewahrt (vor nochmaliger Benutzung wurde die DNA durch 10minütiges Erhitzen auf 68°C denaturiert). Nun folgten Waschschritte, die dazu dienten, unspezifisch hybridisierte DNA-Sonden von den Membranen zu entfernen. Zuerst wurden die Membranen unter leichtem Schütteln zweimal je 5 min in Waschlösung 1 bei RT, dann zweimal je 15 min in Waschlösung 2 bei 68°C gewaschen.

Waschlösung 1

2 x SSC
0,1 % SDS

Waschlösung 2

0,5 x SSC
0,1 % SDS

2.14.4 Detektion der DIG-markierten Nukleinsäuren

Die Detektion von DIG-markierten Nukleinsäuren beruht auf der Bindung von Antikörpern, die gegen Digoxigenin gerichtet sind. An diese Antikörper ist das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt, das eine Farbsubstratlösung, bestehend aus NBT- und BCIP-Lösung, zu einem dunkelblauen Farbkomplex umsetzt (BLAKE *et al.*, 1984). Dort, wo DIG-markierte Sonden hybridisiert haben, bilden sich also dem Plaque entsprechende, farbige Signale.

Alle folgenden Waschschr tte und Inkubationen wurden bei *RT* durchgeführt. Nach den Stringenzwaschschr tten wurden die Membranen 1 min in 1x P1  quibriert. Danach wurden sie 30 min oder länger in 1x P2 blockiert. Im Anschluß daran wurde der Anti-DIG-AP-Ak 1:7500 in 1x P2 verdünnt und die Membranen 30 min mit dieser Lösung inkubiert. Es folgten zwei Waschschr tte von 15 min mit 1x P1. Dann wurden die Membranen 2 min in 1x P3  quibriert. Anschließend wurde je nach Filtergr e eine entsprechende Menge Farbsubstratl sung auf die Membranen gegeben und mehrere Minuten, teilweise auch Stunden, inkubiert. Um die Farbreaktion abzustoppen, wurden die Membranen für einige Minuten in Wasser gewaschen.

<u>5x P1</u>		<u>P2</u>	
750 mmol/l	NaCl, pH 7,5	Blocking-Lösung 1:10 verdünnt in P1	
500 mmol/l	Maleinsäure		
<u>5x P3</u>		<u>Blocking-Lösung</u>	
500 mmol/l	Tris-HCl, pH 9,5	10 % (w/v) Blockierungsreagenz in 1x P1	
500 mmol/l	NaCl		
<u>NBT-Stammlösung</u>			
75 mg/ml	NBT in 70% (v/v) N,N-Dimethylformamid		
<u>BCIP-Stammlösung</u>			
50 mg/ml	BCIP Toluidinsalz in 100% N,N-Dimethylformamid		
<u>Farbsubstratl�sung</u>			
45 µl NBT-Stammlösung und 35 µl BCIP-Stammlösung in je 10 ml P3			

2.14.5 Isolierung positiv hybridisierter Plaques

Diejenigen Regionen der Originalplatte, denen nach Vergleich mit den positiven Signalen auf den Membranen, Plaques zugeordnet werden konnten, wurden großräumig mit einer umgedrehten blauen Pipettenspitze ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer überführt. Nach Zusatz von 20 µl Chloroform wurde gevortext und die Phagen über Nacht bei 4°C eluiert. Die Titer der so hergestellten Phagensuspensionen wurden bestimmt (2.13.8) und die Suspensionen für weitere Screeningrunden eingesetzt. Nachdem beim zweiten oder dritten Screening einzelne positive Plaques lokalisiert worden waren, wurden diese mit der Spitze einer Pasteurpipette ausgestochen und wie oben beschrieben behandelt.

2.14.6 Anlegen eines Phagenstocks

Um auf unbegrenzte Mengen der positiv hybridisierten λ-Phagen zurückgreifen zu können, wurden sogenannte Phagenstocks angelegt, die einen hohen Phagentiter besitzen und bei 4°C über mehrere Jahre hinweg lagerbar sind.

Das experimentelle Vorgehen entsprach dem unter (2.13.7) Beschriebenen, jedoch wurde der Bakterienstamm KW251 für die Infektion eingesetzt. Der so hergestellte Phagenstock wurde mit einigen Tropfen Chloroform versetzt, der Phagentiter bestimmt (2.13.6.1) und der Stock anschließend bei 4°C gelagert.

2.15 RNA-Techniken

2.15.1 DEPC-Behandlung von Lösungen und Verbrauchsmaterialien

Bei Arbeiten mit RNA ist eine Vorbehandlung aller beteiligten Lösungen und Materialien mit einem RNase-Inhibitor wie z. B. Diethylpyrocarbonat (DEPC) unumgänglich. DEPC bindet kovalent an die Tyrosin- und Histidinreste der RNasen und zerstört dadurch deren Struktur (LEONARD *et al.*, 1970).

Zur Herstellung von RNase-freiem Wasser wurde *Aqua bidest.* mit 0,1% DEPC versetzt und ½ h lang gerührt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit diesem Wasser hergestellt und die Verbrauchsmaterialien über Nacht damit behandelt. Zur Inaktivierung des DEPC wurde 1 h lang autoklaviert.

2.15.2 RNA-Isolation mit Hilfe von TRIZOL[®]-Reagenz

TRIZOL[®] der Firma GIBCO BRL ist ein fertiges Reagenz, bestehend aus einer monophasischen Lösung von Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, für die Isolation von Total-RNA aus Zellen und Gewebe. Die Methode beruht auf einem Verfahren von CHOMCZYNSKI und SACCHI (1987). Während der Homogenisierung und Lyse der Proben stellt das TRIZOL[®]-Reagenz die Integrität der RNA sicher. Die Zugabe von Chloroform, gefolgt von einer Zentrifugation, trennt die Lösung in eine wäßrige und eine organische Phase, wobei die RNA ausschließlich in der wäßrigen Phase verbleibt. Durch Präzipitation mit Isopropanol kann die Total-RNA dann isoliert werden.

Etwa 1 g schweres tiefgefrorenes Schwammgewebe wurde mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben, in 6 ml TRIZOL[®]-Reagenz überführt, sofort gevortext und 5 min bei *RT* inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine 10minütige Zentrifugation bei 12.000 x *g* und 4°C abgetrennt, der Überstand in 6 Reaktionsgefäße überführt und pro 1 ml verwendeten TRIZOL[®]-Reagenz 200 µl Chloroform zupipettiert. Nach 15 sec Vortexen und 3minütiger Inkubation bei *RT* wurde 15 min bei 12.000 x *g* und 4°C zentrifugiert und die obere wäßrige Phase abgenommen. Der auf 6 neue Reaktionsgefäße verteilte Überstand wurde mit jeweils 0,5 ml Isopropanol versetzt, gemischt und die RNA 10 min bei *RT* ausgefällt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 12.000 x *g* und 4°C wurde das RNA Pellet mit 75%igen Ethanol gewaschen und in DEPC-H₂O aufgenommen. Nun konnte die Konzentration der gewonnenen RNA spektrophotometrisch bestimmt (2.12.16) und die Qualität gelelektrophoretisch (2.15.3) überprüft werden.

2.15.3 RNA-Checking-Gel

Die gelelektrophoretische Auftrennung von einzelsträngiger RNA muß aufgrund der Gefahr der Ausbildung von Sekundärstrukturen unter denaturierenden Bedingungen stattfinden. Als denaturierende Substanz kann Formaldehyd verwendet werden (LEHRACH *et al.*, 1977).

0,5 g Agarose, 5 ml 10x MOPS und 42,3 ml *Aqua bidest.* wurden aufgeköcht und nach Abkühlung auf 60°C mit 2,7 ml 37%igen deionisierten Formaldehyd versetzt. Nach dem Ausgießen des Gels wurden 10 µg der Total-RNA mit einer geeigneten Menge an RNA-Probenpuffer versetzt, bei 95°C 10 min lang denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf selbst erfolgte bei 3V/cm in 1x MOPS. Das Gel wurde anschließend in Toluidinblaulösung gefärbt und in *Aqua bidest.* entfärbt.

Toluidinblaulösung

1 % Toluidinblau
40 % Methanol

10x MOPS (pH 7,0)

200 mmol/l MOPS
10 mmol/l EDTA

RNA-Probenpuffer (4x)

250 µl deionisiertes Formamid
83 µl deionisiertes Formaldehyd
50 µl 10 x MOPS
50 µl Glycerol
117 µl DEPC-*Aqua bidest.*
1 Kristall Bromphenolblau

2.15.4 RT-PCR

Um RNA mit Hilfe einer PCR zu vervielfältigen, hybridisiert man einen Primer an die RNA-Matrize und erstellt mittels der Reversen Transkriptase (RT) und einer anschließenden PCR eine cDNA Kopie. Als RT wurde hier Superscript™ II enthalten im *Superscript™ II Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma GIBCO BRL verwendet. Dieses Enzym besitzt keine RNase H-Aktivität. Das führt zu einer erhöhten Ausbeute. Außerdem arbeitet das Enzym auch bei Temperaturen über 50°C noch zuverlässig. Dies trägt zur Verbesserung der Synthese bei, da Sekundärstrukturen reduziert werden. Auch die übrigen hier erwähnten Reagenzien sind im obigen Kit enthalten.

Zu 2,5 µg Total-RNA wurden 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl) oder 1 µl genspezifischer Rückwärts-Primer (10 pmol/µl) pipettiert und der Ansatz mit DEPC-*Aqua bidest.* auf 25 µl aufgefüllt. Es folgte eine 10minütige Inkubation bei 70°C zur Denaturierung der RNA. Der Ansatz wurde sofort in einen auf 50°C vorgeheizten Thermocycler überführt und mit einer auf 42°C vorgewärmten Mischung aus 7,5 µl DEPC-*Aqua bidest.*, 5 µl 10 x PCR-Puffer, 5 µl MgCl₂, 2,5 µl dNTP-Mix und 5 µl 0,1 M DTT versetzt. Nach Zugabe von 1 µl Superscript™ II wurde 50 min bei 50°C inkubiert und danach nochmals 15 min auf 70°C erhitzt, um die Aktivität des Enzyms zu zerstören. Nach Abkühlung auf Eis wurde 1 µl RNase H zugefügt. Die anschließende 20minütige Inkubation bei 37°C diente dem Abbau der RNA. Die so gewonnene cDNA konnte als *Template* in einer Standard PCR eingesetzt werden (2.12.1).

2.16 Konstruktion der pGL2-Fusionsplasmide

Um die Aktivität eines Promotors im homologen oder heterologen System untersuchen zu können, setzt man sogenannte Reporter Gene ein. Diese werden mit der stromaufwärts gelegenen Region (5'-nichtkodierender Bereich) eines Gens fusioniert wodurch dessen Expressionsmuster untersucht werden kann (ROSENTHAL, 1987). Eines dieser Reporter Gene stellt die Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* dar (DE WET *et al.*, 1985). In den meisten Fällen erfüllt Luciferase die Anforderungen, die man im Allgemeinen an ein Reporter Gen stellt:

1. Die Aktivität des Genprodukts, das vom Reporter Gen kodiert wird, sollte sich deutlich von allen anderen intrinsischen Aktivitäten der untersuchten Zellen unterscheiden.
2. Es sollte zu keiner Wechselwirkung mit oder Beeinflussung durch andere Zellaktivitäten kommen.
3. Der Nachweis der kodierten Enzymaktivität sollte schnell, einfach, sensitiv und reproduzierbar sein (NEURATH *et al.*, 1997).

Für die Fusion der unterschiedlichen 5'-Regionen der untersuchten Gene mit dem Luciferase-Gen, wurden Rückwärts- und Vorwärts-Primer konstruiert, die in ihrem 5'-Bereich Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bgl II*, *Xho I*, *Hind III* oder *Kpn I* trugen. Diese Primer wurden in PCR Reaktionen eingesetzt (2.12.1), die entstandenen Produkte aufgereinigt (2.12.3), verdaut (2.12.6) und in die multiple Klonierungsstelle des pGL2-Basis Vektors (Abb. 7) der Firma PROMEGA, der vorher ebenfalls mit den entsprechenden Enzymen verdaut worden war, einligiert (2.12.7.2).

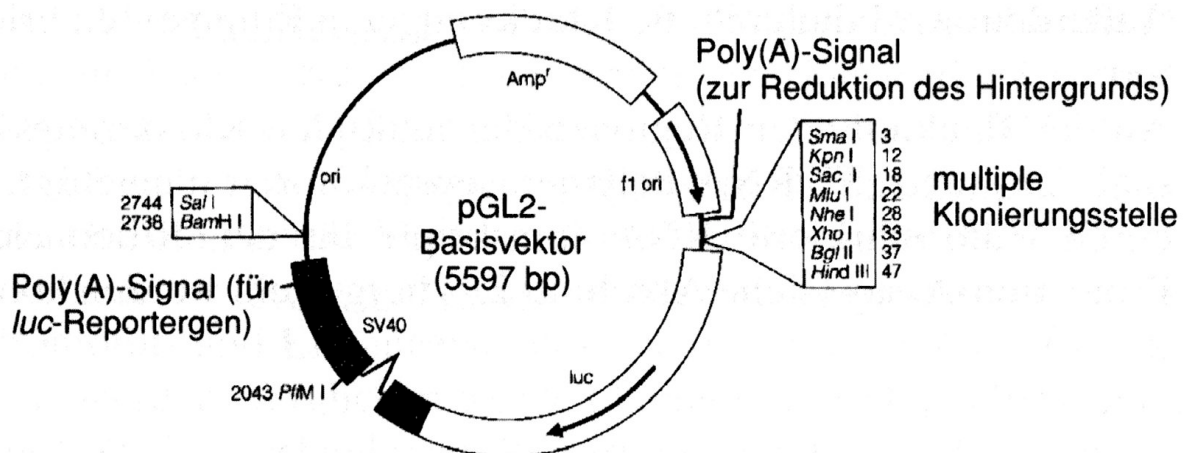


Abb. 7 : Karte des pGL2-Basis Vektors

Die so entstandenen unterschiedlichen Luciferase wurden in *E. coli* transformiert (2.12.8), vermehrt (2.12.11.2), die Plasmid-DNA mittels Midi- bzw. Maxi-Präparation aufgereinigt (2.12.14), zur Überprüfung sequenziert (2.12.20) und in die NIH 3T3 Mäusezellen bzw. Schwammzellen transfiziert (2.18.5 bzw. 2.21.3).

2.17 Konstruktion der pEGFP-Fusionsplasmide

Die Klonierung des von SHIMOMURA *et al.* (1963) in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckten Grünen Fluoreszenzproteins (GFP) durch PRASHER *et al.* (1992) brachte ein neues vielseitig einsetzbares Reporter-gen hervor. Durch CHALFIE *et al.* (1994) konnte erstmals gezeigt werden, daß heterolog exprimiertes GFP artunabhängig und ohne die Notwendigkeit weiterer Kofaktoren, Substrate oder Genprodukte aus *Aequorea victoria* bei Bestrahlung mit kurzzeitigem Licht eine leuchtend grüne Fluoreszenz abgibt. In dieser Arbeit wurde die GFP-Variante EGFP verwendet, deren Anregungsspektrum durch zwei As-Austausche in den roten Bereich verschoben wurde (Spitze bei 490 nm) und gegenüber dem Wildtyp über eine ca. 35fach intensivere Fluoreszenz verfügt (CORMACK *et al.*, 1996).

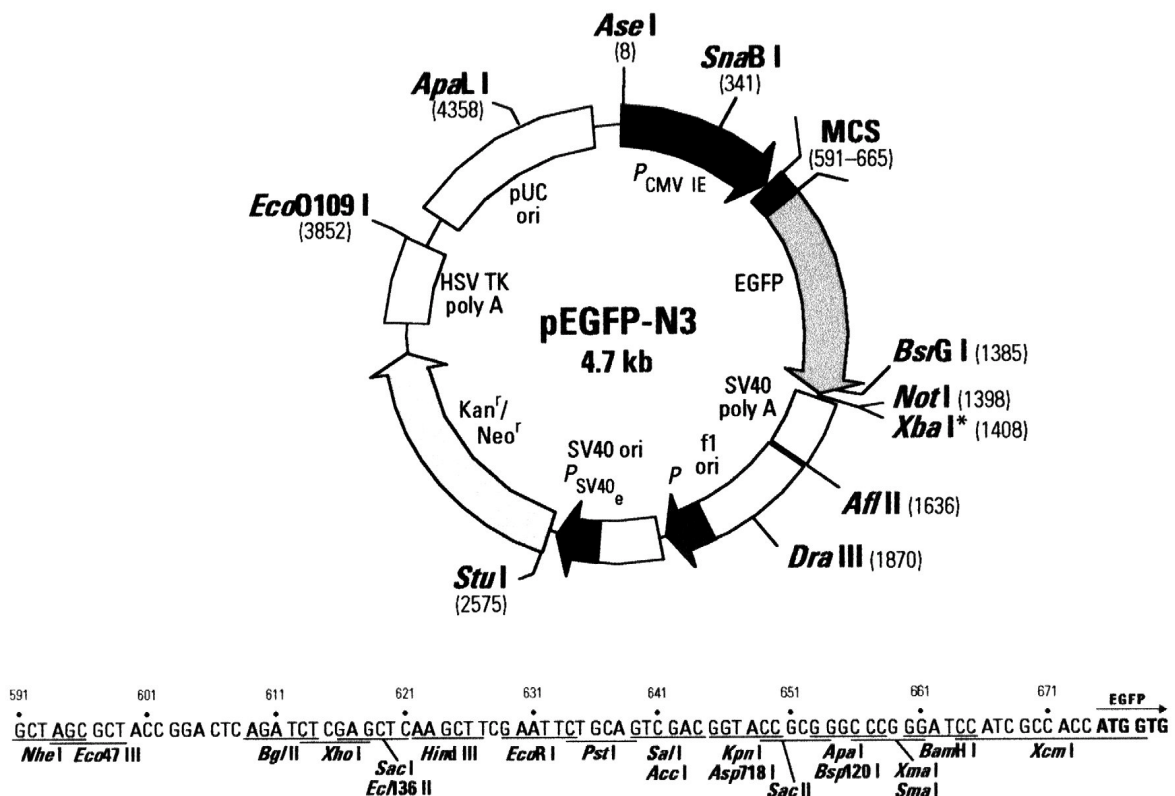


Abb. 8 : Karte und multiple Klonierungsstelle des pEGFP-N3 Vektors.

Damit die in dieser Arbeit getesteten Promotorsequenzen in den pEGFP-N3 Vektor der Firma CLONTECH (**Abb. 8**) eingesetzt werden konnten, mußte zuerst der virale CMV-Promotor, der in dem ursprünglich als Proteininfusionsvektor konzipierten Plasmid enthalten war, entfernt werden. Dazu wurde in zwei aufeinanderfolgenden Restriktionsreaktionen (**2.12.6**) 4 µg pEGFP-N3 mit *Vsp I* (Isoschizomer von *Ase I*) und *Nhe I* geschnitten. Der Ansatz wurde einer Gelelektrophorese unterzogen und so ein 582 bp langes Fragment, das den CMV-Promotor samt TATA-Box umfasste, vom übrigen Vektor getrennt. Der so verkürzte Vektor wurde aus dem Gel eluiert (**2.12.4**) und die durch die Restriktionen entstandenen *sticky ends* aufgefüllt. Hierzu wurde der eluierte Vektor mit 4 µl 10x Klenow Puffer, 1 µl 1 mM dNTP und 1 µl Klenow Enzym (5 U/µl) versetzt und mit *Aqua bidest.* auf 40 µl aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei 37°C. Nach Inaktivierung bei 75°C für 10 min wurde der Ansatz aufgereinigt (**2.12.3**) und die entstandenen Vektor-*blunt ends* durch Ligation miteinander verknüpft (**2.12.5**).

Die jeweils zu testenden genomischen 5'-Regionen konnten nun in ähnlicher Weise wie unter **2.16** beschrieben mit Hilfe der PCR Technik amplifiziert werden und nach einem Restriktionsverdau (**2.12.6**) in die multiple Klonierungsstelle des neuen, promotorlosen pEGFP-Basic Vektors eingesetzt werden.

10x Klenow Puffer

500 mM Tris-HCl; pH 7,2
10 mM DTT
100 mM MgSO₄

2.18 Zellkultur-Techniken

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie handelte es sich um embryonale NIH 3T3 Fibroblasten aus der Maus, die von der *American Type Culture Collection* (ATTC) in ROCKVILLE, MD, USA bezogen wurden.

Die Zellen wurden in DMEM (pH 7,2), das mit 50 Units/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin versetzt war und 10% FCS (im weiteren als Komplettmedium bezeichnet) in einem auf 37°C und 5% CO₂ eingestellten CO₂-Brutschrank der Firma NUNC kultiviert. Im Brutschrank sorgte ein Wasserreservoir mit großer Oberfläche für ausreichende Luftfeuchtigkeit. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer *laminar flow*-Sterilbank der Firma SLEE durchgeführt.

2.18.1 Zellzahlbestimmung

Bevor man Zellen subkultiviert oder z. B. für eine Transfektion einsetzt, muß man ihre Zahl bestimmen. Dazu wurde hier ein Haemocytometer nach Neubauer verwendet. Außerdem wurden die Zellen beim Auszählen gleichzeitig mit Trypanblau gefärbt, um die Vitalität abzuschätzen (Trypanblau kann die Plasmamembran lebender Zellen nicht durchqueren, aber das Cytoplasma toter Zellen färbt sich blau).

Um adhärente Zellen wie die NIH 3T3 Zellen zählen zu können, muß man sie zunächst von der Plastikoberfläche der Kulturflasche ablösen. Dies geschah durch Behandlung mit einer Lösung aus 0,05% 1:250 Trypsin und 0,02% (w/v) EDTA in PBS. Trypsin spaltet bei dieser Behandlung die Adhäsionsproteine, während EDTA alle zweiwertigen Kationen bindet.

Das DMEM und die Trypsin/EDTA Lösung wurden in einem 37°C warmen Wasserbad angewärmt. Das Kulturmedium wurde vorsichtig abgeschüttet und die Zellen kurz mit 2,5/5 ml (25 bzw. 75 cm² Kulturflasche) Trypsin/EDTA-Lösung gewaschen. Nachdem die Lösung mit einer Glaspipette vorsichtig entfernt worden war, wurde erneut 2,5/5 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und kurz bei 37°C inkubiert. Leichtes Schütteln der Kulturflaschen löste die Zellen vom Boden ab. Nach Zugabe von 10 ml Komplettmedium wurden die Zellen dann durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren suspendiert. Um das Trypsin/EDTA wieder aus der Zellsuspension zu entfernen, wurde sie in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 500 x g in einer Haemofuge 10 min abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in einem geeigneten Volumen (6-10 ml) Komplettmedium wieder aufgenommen, durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wiederum suspendiert und waren nun für die Zellzahlbestimmung vorbereitet.

100 µl der Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen 0,5% (w/v) Trypanblau versetzt und kurz gemischt. Die Probe wurde mit Hilfe einer Pipette am Rande des Deckglases der Zählkammer nach Neubauer abgesetzt. Durch Kapillarkräfte wurde die Probe unter das Deckglas gezogen und konnte ausgezählt werden. Die Oberfläche der Zählkammer ist durch eingravierte Linien in ein feines Raster unterteilt. Fünf Quadrate (in den vier Ecken und im Zentrum des Rasters) mit einer Fläche von 1 mm² und einem Abstand zum Deckglas von 0,1 mm dienen der genauen Zellzahlbestimmung. Jeweils vier der nochmals in 16 Quadrate

unterteilten Eckquadrate wurden ausgezählt, der Mittelwert errechnet und mit der folgenden Formel die Zellzahl pro Milliliter bestimmt:

$$\text{Zellzahl} \times 2 \text{ (Verdünnung mit Trypanblau)} \times 10^4 = \text{Anzahl der Zellen/ml}$$

2.18.2 Subkultivierung der NIH 3T3 Zellen

Die Zellen wurden normalerweise in 25 cm² Kulturgefäßen kultiviert und jeden zweiten Tag mit Hilfe eines Umkehrmikroskops mit dem 10fach Objektiv begutachtet. Bei Erreichen fast vollständiger Konfluenz (ca. 10⁶ Zellen) wurden die Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert und in 6 ml Kompletmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt (2.18.1) und 5 x 10⁴ Zellen in eine 25 cm² Kulturflasche, in der 7 ml Kompletmedium vorgelegt waren, ausgesät.

2.18.3 Kryokonservierung der NIH 3T3 Zellen

Kryokonservierung bedeutet, daß die Zellen bei der sehr niedrigen Temperatur von flüssigem Stickstoff (-180°C) in einer Art Kältestarre aufbewahrt werden, bis sie wieder gebraucht werden. Als Gefrierschutzmittel dient DMSO, außerdem trägt eine hohe Serumkonzentration zur Zellstabilität bei.

Die Zellen zweier 75 cm² Kulturflaschen, die zu etwa 80%iger Konfluenz herangewachsen waren, wurden trypsinisiert, durch Zentrifugation (10 min bei 500 x g) pellettiert und die Pelletts vereinigt. Die Zellen wurden in 1,5 ml Einfriermedium, das aus 70% (v/v) DMEM, 20% (v/v) FCS und 10% (v/v) DMSO bestand, resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses Röhrchen wurde mit Papier umwickelt und im -80°C Gefrierschrank langsam abgekühlt. Am nächsten Morgen wurde das Röhrchen in einen Stickstoffaufbewahrungsbehälter überführt und dort bis zum Gebrauch aufbewahrt.

2.18.4 Auftauen der Zellen

Nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff wurden die Zellen so schnell wie möglich in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in 10 ml vorgewärmtes Kompletmedium überführt. Nach Zentrifugation (10 min bei 500 x g) und Resuspension wurden die Zellen in einem 25 cm² Kulturgefäß ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium über den Zellen ersetzt, um die vielen abgestorbenen Zellen zu entfernen. Die weitere Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben.

2.18.5 Transiente Transfektion von NIH 3T3 Zellen mit LIPOFECTAMINE™ bzw. LIPOFECTAMINE PLUS™

Als Transfektion bezeichnet man allgemein das Einbringen fremder DNA in Empfängerzellen. Wird die Fremd-DNA nach Einschleusung nicht in das Genom der Zellen integriert und kann sich nicht extrachromosomal vermehren, so kann die Fremd-DNA nur transient, d. h. vorübergehend exprimiert werden. Gängige Methoden für den Gentransfer in Säugerzellen stellen z. B. die Calciumphosphat-vermittelte Transfektion, die Elektroporation und die Lipofektion dar. Letztere wurde in dieser Arbeit für die Transfektion der NIH 3T3 Zellen eingesetzt. Die Methode beruht auf dem Einsatz eines Gemischs aus kationischen und neutralen Lipiden, die sich mit anionischen Makromolekülen wie DNA zu einem Komplex verbinden und deren Einschleusen (durch Endocytose) in die Zelle ermöglichen (FELGNER *et al.*, 1987; LEDLEY, 1995; ZABNER *et al.*, 1995). Hier kamen die Reagenzien LIPOFECTAMINE™, das auf oben genannten Prinzip beruht und dessen Weiterentwicklung LIPOFECTAMINE PLUS™ (beide GIBCO) zur Anwendung (HAWLEY-NELSON *et al.*, 1993; SHIH *et al.*, 1997).

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen wie gewöhnlich mit Trypsin/EDTA von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst und mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt (**2.18.1**). $2,5 \times 10^4$ Zellen wurden in 6 *well*-Platten ausplattiert und mit Komplettmedium auf 4 ml aufgefüllt. Nach 16 bis 20 h erreichten die Zellen eine ca. 50-80%ige Konfluenz und waren bereit für die Transfektion. Für die Transfektion wurde in zwei Reaktionsgefäßen je 100 µl OPTI-MEM® I bzw. DMEM pipettiert. Das OPTI-MEM® I wurde mit jeweils 1,5 µg der zu transfizierenden DNA, das DMEM mit 6 µl LIPOFECTAMINE™ versetzt. Die beiden Ansätze wurden kombiniert, sanft gemischt und ½ h bei *RT* inkubiert. Während sich in diesem Ansatz die DNA-Komplexe bildeten, wurde das Medium von den vorbereiteten Zellen abpipettiert und durch 2 ml DMEM ersetzt. Die Zellen wurden eine weitere ½ h im CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde 0,8 ml DMEM zu den DNA-Komplexen pipettiert, das DMEM von den Zellen abgenommen und durch das oben erwähnte Gemisch ersetzt. Es folgte eine 5stündige Inkubation im CO₂-Inkubator, dann wurde das Gemisch von den Zellen abgenommen und durch 4 ml Komplettmedium ersetzt.

Die Transfektion mit LIPOFECTAMINE PLUS™ erfolgte nach einem ähnlichen Schema wie oben beschrieben. Die DNA Menge wurde jedoch auf 1 µg reduziert und durch Zugabe von 6 µl PLUS Reagenz 15 min präkomplexiert. Die verwendete LIPOFECTAMINE™ Menge wurde auf 3 µl reduziert. Das in DMEM verdünnte LIPOFECTAMINE™ und die präkomplexierte DNA wurden gemischt und nach weiteren 15 min Inkubation direkt zu den Zellen pipettiert. Diese waren vorher ½ h mit 0,8 ml DMEM inkubiert worden. Nach 3 h im CO₂-Inkubator wurden, ohne das Transfektionsgemisch von den Zellen zu entfernen, 3 ml Komplettmedium (mit 20% (v/v) FCS) zugegeben.

2.18.6 Reporter-Gen-Assays

Nachdem man die Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte in die Zellen eingeschleust hat, kann der zu untersuchende Promotor die Transkription des Reporter-Genes steuern. Voraussetzung hierfür ist natürlich die generelle Eignung der gewählten Zelllinie und das Vorhandensein der notwendigen Transkriptionsfaktoren. Grundsätzlich kann die Reporter-Gen-Aktivität über die Menge an vorhandener Reporter-mRNA oder über die Bestimmung der Reporter-Protein-Expression gemessen werden. Der quantitative Nachweis des Reporter-Proteins ist jedoch meist viel einfacher zu handhaben und hat sich deshalb auf breiter Basis etabliert. Sowohl beim β -Galaktosidase-, als auch beim Luciferase-Assay erfolgt der Nachweis über die enzymatische Aktivität dieser beiden Proteine. GFP weist man wie bereits erwähnt durch Anregung mit kurzwelliger Strahlung direkt nach.

2.18.6.1 Lyse der Zellen

Um die enzymatische Aktivität der beiden Reporter-Proteine β -Galaktosidase und Luciferase messen zu können, müssen sie zuerst aus den Zellen isoliert werden. Dies geschah hier durch aktive Lyse der Zellen mit dem Reporter Lyse Puffer (RLB) der Firma PROMEGA.

42 h nach Ende der Transfektion (2.18.5) wurden die Zellen aus dem CO₂-Inkubator entnommen, das Medium entfernt und zweimal mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden 250 μ l 1x RLB auf die Zellen pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit einem Zellschaber zusammengekratzt, das Lysat mehrmals auf- und abpipettiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Zelltrümmer durch eine kurze Zentrifugation (5 min bei 5000 rpm) pelletiert. Der Überstand konnte für die Reporter-Gen-Assays (2.18.6.2 und 2.18.6.3) eingesetzt werden.

10x PBS	
2 g	KCl
80 g	NaCl
2 g	KH ₂ PO ₄
11,5 g	Na ₂ HPO ₄

pH auf 7,4 eingestellt und sterilfiltriert

2.18.6.2 β -Galaktosidase-Assay

β -Galaktosidase hydrolysiert das farblose Substrat ONPG zum gelben o-Nitrophenol, dessen Absorption bei 420 nm in einem Spektralphotometer gemessen werden kann (ROSENTHAL, 1987).

2-10 μ l des Zellysats wurden zu einem Gemisch aus 490 μ l β -Galaktosidase-Puffer und 100 μ l ONPG-Lösung pipettiert, gut durchmischt und 5-10 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 250 μ l Stopppuffer wurde die Reaktion beendet und die Absorption der gelben Lösung in

einem Spektralphotometer der Firma BECKMANN bei 420 nm gemessen. Als Referenz diente ein ebenso behandelter Zellextrakt von nicht transfizierten Zellen.

β-Galaktosidase-Puffer

60	mM	Na ₂ HPO ₄
40	mM	NaH ₂ PO ₄
10	mM	KCl
1	mM	MgCl ₂
50	mM	Mercaptoethanol

ONPG-Lösung

60	mM	Na ₂ HPO ₄
40	mM	NaH ₂ PO ₄
2	mg/ml	ONPG

Stoppuffer

1	M	Na ₂ CO ₃
---	---	---------------------------------

2.18.6.3 Luciferase-Assay

Die *Photinus pyralis*-Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Freisetzung eines Photons. Diese Lichtproduktion kann mit Hilfe eines Luminometers quantitativ erfasst werden. Bei dem hier verwendeten *Luciferase Assay System* der Firma PROMEGA, ist in Gegenwart von CoA Luciferyl-CoA das Substrat für die Luciferase. Diese Reaktion zeigt eine günstigere Kinetik mit einer größeren Lichtintensität, die über mehrere Minuten hinweg nahezu konstant bleibt (WOOD, 1991).

Alle benötigten Reagenzien (im Kit enthalten) und das Zellysat (2.18.6.1) wurden auf RT äquilibriert und das lyophilisierte Luciferase-Assay-Reagenz durch Zugabe von 10 ml Luciferase-Assay-Puffer gelöst. Nicht genutzte Substratlösung wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die eigentlichen Messungen wurden in einem Luminometer der Firma BERTHOLD durchgeführt. Dieses Gerät war so programmiert, daß zu den vorgelegten 20 µl Zellysat automatisch 100 µl Luciferasesubstrat injiziert wurden. Nach einer Verzögerung von 2 sec wurde die Lichtemission für 20 sec gemessen. Der gemessene Wert wurde in RLU (*Relative Light Units*) mittels eines eingebauten Druckers ausgegeben. Als Referenzen dienten die Zellysate nicht transfizierter Zellen, sowie die Lysate von Zellen, die mit den Vektoren pGL2-Basic, pGL2-Promoter und pGL2-Control transfiziert worden waren.

2.18.6.4 EGFP-Detektion

Die Detektion der mit pEGFP-Vektoren transfizierten Zellen erfolgte mit Hilfe eines Umkehrmikroskops mit Fluoreszenzbeleuchtung der Firma OLYMPUS. Als Filtersatz kam eine Standard-FITC-Optik zum Einsatz. Die Dokumentation der Bilder erfolgte entweder über einen am Mikroskop montierten Fotoapparat (OLYMPUS) mit 400 ASA Diafilmen (KODAK), oder über eine SONY Digitalkamera (Color View 12), die an einen Computer angeschlossen war, auf dem die Auswertungssoftware analySIS[®] 3.0 (Soft Imaging System GmbH, Münster) installiert war.

2.19 Hälterung der Schwämme

Die Schwämme der Spezies *S. domuncula* (Demospongiae, Hadromerida) wurden in der nördlichen Adria in der Nähe von Rovinj (Kroatien) gesammelt und in einer mit Meerwasser gefüllten Kühlbox nach Mainz transportiert. Dort wurden sie sofort in ein etwa 130 l fassendes Aquarium überführt und teilweise zusammen mit anderen Schwämmen der Spezies *G. cydonium* (Demospongiae, Astrophorida) in artifiziellem Seewasser (hergestellt aus dem Meeressalz "Tropic Marine" der Firma Dr. Binder GmbH, WARTENBERG) bei 16°C gehalten. Das Wasser des Aquariums zirkulierte ständig und wurde vor dem Wiedereinleiten zweifach filtriert.

Die Schwämme fütterte man zweimal in der Woche mit je 4 ml Phytoplankton ("Marin Niedere Tiere Futter" der Firma Amtra Aquaristik, RODGAU), außerdem wurden dem Wasser zweimal im Monat Vitamine und Spurenelemente zugefügt ("Vitamine & Mineral Supplement" der Firma Kent Marine, MARIETTA, GA). Zusätzlich wurden die Einsiedlerkrebse der Spezies *Paguristes oculatus*, die in der Schale bestimmter Molluskenarten (z. B. *Trunculariopsis trunculus*) leben, die wiederum von *S. domuncula* bewachsen sind, ebenfalls zweimal die Woche mit 5 g Krill gefüttert. Die Salinität des Wassers wurde ebenfalls zweimal pro Woche kontrolliert und gegebenenfalls eingestellt (Spezifische Dichte ca. 1,028).

2.20 Herstellung von Schwamm-Einzelzellsuspensionen

Die Einzelzellsuspension der Schwammzellen gewann man durch Vereinzelung der Zellen mit Hilfe von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem artifiziellem Seewasser (CMFSW) + EDTA (2,5 mM). Dazu wurden etwa 1-2 cm^3 große Gewebestücke aus den Schwämmen geschnitten, in CMFSW-E überführt und in einer sterilen Petrischale zerkleinert. Die etwa 1 mm^3 großen Stückchen wurden nun in 40 ml frisches CMFSW-E überführt und ca. 15 min bei RT gerollert. Der Überstand wurde abgegossen und erneut 40 ml CMFSW-E zugegeben. Nach 1 h auf dem Rollinkubator wurde die Lösung durch ein Nylonnetz mit 40 μm Maschenweite filtriert. Im Filtrat befanden sich nun die vereinzelt Zellen, die durch 10minütige Zentrifugation bei 500 x g pellettiert wurden. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit CMFSW-E, dann wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen CMFSW-E aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer bestimmt (2.18.1).

<u>CMFSW</u>		
460	mM	NaCl
7	mM	Na_2SO_4
10	mM	KCl
10	mM	Hepes
4	ml/l	Penicillin
4	ml/l	Streptomycin
		pH 8,5

2.21 Ballistischer Transfer von Plasmid-DNA in Schwammzellen

Eine physikalische Methode um DNA in lebende Zellen einzubringen, ist der sogenannte ballistische Transfer von DNA mittels einer Genkanone. Hierbei werden Partikel von subzellulärer Größe (meist aus Gold oder Wolfram, auch Mikrocarrier genannt), die mit DNA beschichtet sind mittels Gasdruck stark beschleunigt und auf die zu transformierenden Zellen bzw. Gewebe abgeschossen. Diese Technik wurde zuerst als eine Methode für den Gentransfer in Pflanzenzellen beschrieben (KLEIN *et al.*, 1987, 1988; MCCABE *et al.*, 1988), wurde kurz darauf aber auch für Säugetiersysteme angewendet (ZELENIN *et al.*, 1989; YANG *et al.*, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1991).



Abb. 9 : Die Helios Genkanone der Firma BIORAD.

Da der Erfolg dieser Methode nicht auf spezifische Liganden/Rezeptor Wechselwirkungen und/oder spezielle biochemische Eigenschaften der strukturellen Zelloberflächenkomponenten beruht, kann der ballistische Gentransfer bei einer Variation unterschiedlichster biologischer Systeme angewendet werden. So wurden solch unterschiedliche Ziele wie Bakterien (SHARK *et al.*, 1991; SMITH *et al.*, 1992), Pilze (ARMALEO *et al.*, 1990) intrazelluläre Organellen (JOHNSTON *et al.*, 1991; BOYNTON *et al.*, 1988) und auch marine Invertebraten (GENDREAU *et al.*, 1995; CADORET *et al.*, 1997) mit dieser Methode

erfolgreich transfiziert. Das *Helios Gene Gun System* der Firma BIORAD beinhaltet alle Komponenten, die benötigt wurden um DNA beschichtete Mikrocarrier herzustellen und um die innere Oberfläche des Gold-Coat™ Schlauches mit den DNA-Mikrocarriern zu beschichten (*Tubing Prep Station*). Außerdem eine Vorrichtung um den Schlauch in kleine Patronen zu zerschneiden (*Tubing Cutter*), die in die Genkanone passen, und schließlich die Genkanone selbst (Abb. 9).

2.21.1 Präzipitation der DNA auf die Gold-Mikrocarrier

Bevor man mit dem Beschichten der Mikrocarrier beginnt, sollte die Menge an Goldpartikeln und DNA, die ihr Ziel finden sollen, berechnet werden. Die Menge an Mikrocarriern, die pro Schuß abgefeuert werden, bezeichnet man als *Microcarrier Loading Quantity* (MLQ), die Menge an DNA, die pro mg Mikrocarrier aufgetragen

wird, als *DNA Loading Ratio* (DLR). Diese zwei Parameter, der verwendete Heliumdruck beim Schuß, sowie die Konzentration an PVP, das als Adhäsivum während der Präparation des Gold-Coat™ Schlauches dient, sind im Verlauf eines Experiments zu optimieren. Begonnen wurde mit einer DLR von 2 µg DNA/mg Gold, einer MLQ von 0,5 mg Gold/Schuß, was einer Menge von 1 µg DNA/Schuß entspricht, und einer PVP Konzentration von 0,01 mg/ml.

Für die Präparation von 25 inch Gold-Coat™-Schlauch wurden 25 mg Goldcarrier mit 0,6 bzw. 1 µm Durchmesser in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingewogen und in 100 µl einer 0,05 M Spermidin-Lösung durch kurzes Eintauchen in ein Ultraschallbad sowie Vortexen suspendiert. 50 µg des jeweiligen Plasmids wurde in geeignetem Volumen (50-100 µl) zugegeben und gevortext. Während des Vortexens wurden 100 µl einer 1 M CaCl₂ Lösung tropfenweise dazupipettiert. Das bewirkte eine Präzipitation der DNA auf die Goldpartikel. Nach 10minütiger Inkubation bei *RT* wurden die Mikrocarrier 1 min bei 10.000 x *g* abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Danach wurde 3x mit 1 ml absolutem Ethanol gewaschen und die Goldpartikel in 3 ml Ethanol + 0,01/0,1 mg/ml PVP durch Vortexen und kurzes Eintauchen in ein Ultraschallbad resuspendiert. Für andere MLQ bzw. DLR Werte wurde die Menge an eingesetzten Mikrocarrier und Plasmid-DNA entsprechend verändert.

2.21.2 Beschichten des Gold-Coat™-Schlauches mit DNA-Mikrocarrier Suspension mit Hilfe der *Tubing Prep Station* und Zuschneiden der Patronen

Die *Tubing Prep Station* wurde wie in der Betriebsanleitung beschrieben an eine Stickstoffflasche mit Gas des Reinheitsgrades 5.0 der Firma MESSER, Griesheim angeschlossen. Eine angemessene Länge (ca. 60 cm) des Gold-Coat™-Schlauches wurde abgeschnitten und so in den dafür vorgesehenen Zylinder der *Prep Station* plaziert, daß das N₂-Gas hindurchströmen konnte. Dann ließ man den Schlauch 15 min lang mit einer Rate von 0,3-0,4 LPM mit Gas durchströmen, um ihn vollkommen zu trocknen. Anschließend nahm man den Schlauch wieder aus dem Zylinder und saugte mit Hilfe einer Spritze, an die ein Drei-Wege-Hahn angeschlossen war, der wiederum an einem Ende des Schlauchs befestigt war, die DNA-Mikrocarrier-Suspension (2.21.1) in den Schlauch. Der Drei-Wege-Hahn wurde verschlossen, der Schlauch wieder in die *Prep Station* eingeführt und 3-5 min belassen, bis sich die Goldpartikel abgesetzt hatten. Nach abermaligem Öffnen des Hahns wurde der Ethanol so vorsichtig abgesaugt, daß die Mikrocarrier im Schlauch zurückblieben. Die Spritze samt Drei-Wege-Hahn wurde nun entfernt, der Schlauch in Rotation versetzt und 3-5 min mit N₂-Gas (0,4 LPM) durchströmt, um das Innere des Schlauchs zu trocknen. Im Anschluß daran wurde der Schlauch mit Hilfe des *Tubing Cutter* in kleine Patronen von jeweils 0,5 inch zerschnitten und diese in verschraubten Plastikgefäßen bei 4°C trocken gelagert. Die so gelagerten Patronen waren mindestens 8 Monate verwendbar.

2.21.3 Partikelbombardement mit der Genkanone

Die Genkanone wurde durch Einsetzen einer Blockbatterie betriebsbereit gemacht und wie in der Anleitung beschrieben an eine Flasche mit Heliumgas (MESSER, Griesheim) des Reinheitsgrades 4.5 angeschlossen. Um beim ersten Schuß direkt mit dem korrekten Heliumdruck arbeiten zu können, wurde ein leerer Patronenhalter (*Cartridge Holder*) eingesetzt und die Kanone auf vorgeschriebene Art und Weise abgefeuert.

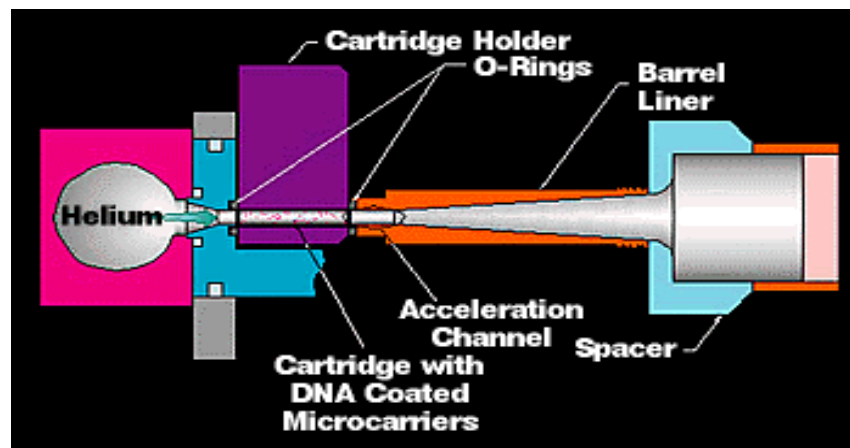


Abb. 10: Weg der Partikel durch die Helios Genkanone. Heliumgas wird mit hohem Druck durch eine Patrone (*Cartridge*), die mit DNA beschichteten Goldpartikeln beladen ist, geleitet. Dabei werden die Mikrocarrier von der Innenwand der Patrone gefegt und nehmen im ersten Teil des Laufs (*Barrel Liner*), dem Beschleunigungskanal (*Acceleration Chanel*), Geschwindigkeit auf. Der Lauf wird nach vorn immer breiter, was dazu führt, daß die Partikel sich verteilen und die Helium-Schockwelle sich abschwächt. Die O-Ringe an beiden Seiten des Patronenhalters (*Cartridge Holder*) dirigieren den Heliumfluß durch die Patrone und den Beschleunigungskanal. Die *Spacer* sorgen für einen optimalen Abstand zum Ziel und erlauben einen Abzug des Heliumgases.

So wurde sowohl im Heliumschlauch als auch in den internen Reservoirs der Genkanone der korrekte Heliumdruck (50–600 psi), der am Regulator einzustellen war, hergestellt. Nun konnten die mit den jeweiligen DNA-Mikrocarriern beschichteten Patronen in den Patronenhalter eingeführt und ein steriler Lauf auf die *Gene Gun* aufgeschraubt werden. Zuvor war eine Einzelzellsuspension von Schwammzellen hergestellt (2.20) und 30 µl dieser ca. 10^8 Zellen/ml Suspension in die Mitte einer 35 mm Kulturschale aufgetragen worden. Die Genkanone wurde jetzt so über den Tropfen aufgesetzt, daß die *Spacer* (Abb. 10) die Kulturschale berührten und mit dem jeweils eingestellten Druck abgefeuert. Im Anschluß daran gab man artifizielles Seewasser der Firma SIGMA oder sterilfiltriertes Seewasser aus den Aquarien zu den Zellen. Innerhalb weniger Minuten bildeten sich Zellaggregate. Das Seewasser wurde nun täglich erneuert und der Zustand der Zellen im Umkehrmikroskop gecheckt.

2.22 Computerprogramme und *Online*-Dienste zur Auswertung der Daten

2.22.1 Computerprogramme

CLUSTALW 1.7 (THOMPSON *et al.*, 1994):
Sequenzvergleiche von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen
Freeware. Zu beziehen über: <ftp.ebi.ac.uk>

GENEDOC 2.4 (NICHOLAS und NICHOLAS, 1997):
Grafische Umsetzung von Sequenzvergleichen
Freeware. Zu beziehen über: <http://www.cris.com/~Ketchup/genedoc.shtml>

PC/Gene (PC/GENE, 1995):
Translation von Nukleotidsequenzen, Identifizierung von Proteindomänen und Struktur-
motiven
IntelliGenetics Inc., Mountain View, USA.

2.22.2 Internet-Adressen

Online-Sequenzvergleiche mit Nukleotid- und Protein-Datenbanken:
BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990; 1997): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>
FASTA (PEARSON und LIPMAN, 1988): <http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>

Online-Identifizierung von Protein-Domänen und Strukturmotiven:
PROSITE (BAIROCH, 1992): <http://www.ebi.ac.uk/searches/prosite.input.html>
BLOCKS (HENIKOFF und HENIKOFF, 1994): <http://blocks.fhcrc.org/>
PROFILE (BUCHER *et al.*, 1996): http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html

Online-Zugriff auf Nukleotid- und Aminosäure-Datenbanken (z. B. Genbank):
ENTREZ (BENSON *et al.*, 1999) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>

Online-Identifizierung von *cis* und *trans* wirksamen Elementen:
TATA-Box/poly(A)-Scan (MILANESI *et al.*, 1996): <http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/>
Promoter Prediction by Neural Network (REESE und EECKMAN, 1995): http://www.fruitfly.org/cgi_bin/seq_tools/promoter.pl
TESS (SCHUG und OVERTON, 1997): <http://www.cbil.upenn.edu/tess/>
TRANSFAC (HEINEMEYER *et al.*, 1998; 1999): <http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/index.html>; <http://pdap1.trc.rwcp.or.jp/research/db/TFSEARCH.html>
TRRD (KOLCHANOV *et al.*, 1999): <http://www.mgs.bionet.nsc.ru/mgs/>

3 ERGEBNISSE

3.1 Konstruktion der genomischen Bibliotheken von *S. domuncula*



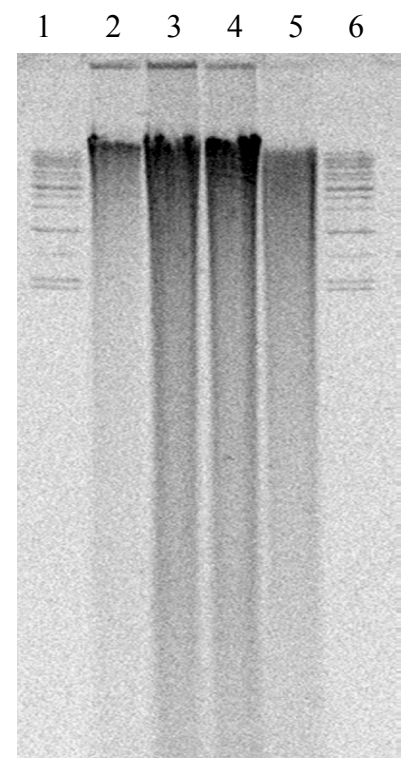
Abb. 11: *Suberites domuncula*.

Drei etwas unterschiedlich gefärbte Exemplare von *Suberites domuncula*. Deutlich ist beim ersten Exemplar der Einsiedlerkrebs zu erkennen.

Foto: Prof. W.E.G. Müller

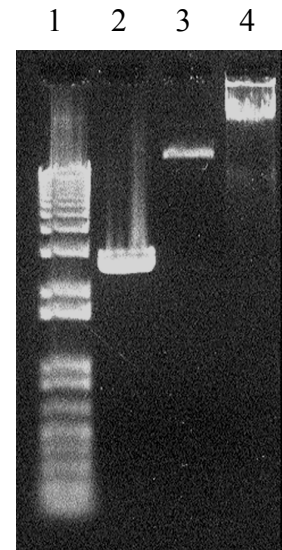
Die DNA für die Herstellung der genomischen Bibliotheken von *S. domuncula* (**Abb. 11**) wurde aus verschiedenen Individuen dieser Schwämme, die aus den Mainzer Aquarien stammten, gewonnen (**2.13.1**). Diese DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Sau 3AI* partiell verdaut (**2.13.2**). Dabei erwiesen sich nach Auftrennung in einem 0,5%igen Agarosegel diejenigen Verdauungen für die Präparation genomischer Bibliotheken am besten geeignet, die 5 bzw. 10 min lang mit dem verdünnten Enzym inkubiert worden waren (**Abb. 12**).

Abb. 12: Partiieller Verdau genomischer *S. domuncula* DNA. Bei diesem 0,5%igen Agarosegel ist in den Spuren 1 und 6 der *High Molecular Weight Marker* der Firma GIBCO aufgetragen. Dessen oberste Bande entspricht einem DNA-Fragment der Länge von ca. 48 kb. In Spur 2 ist 0,5 µg unverdaute genomische DNA von *S. domuncula*, in den Spuren 3, 4 und 5 sind jeweils ca. 2 µg genomische DNA aufgetragen, die 5, 10 bzw. 15 min mit einer 1:10 Verdünnung des Restriktionsenzym *Sau 3AI* inkubiert worden war.



Diese beiden Ansätze wurden nun mit Hilfe des Klenow Enzyms partiell aufgefüllt (2.13.3). Zur Kontrolle, ob dies auch effektiv erfolgt war, wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam* *HI* geschnittene pUC19 DNA ebenfalls partiell aufgefüllt und anschließend ligiert (Abb. 13).

Abb. 13: Kontrolle des partiellen Auffüllens der Restriktionsenden. Bei diesem 1%igen Agarosegel ist in Spur 1 die *1 Kb Plus DNA Ladder* der Firma GIBCO als Marker aufgetragen. Spur 2 zeigt 1 µg unligierte, mit *Bam* *HI* geschnittene pUC19 DNA, Spur 3 ligierte, vorher mit Klenow partiell aufgefüllte pUC19 DNA und als weitere Kontrolle in Spur 4 pUC19 DNA, die ohne vorheriges Auffüllen ligiert worden war. Der Unterschied zwischen den Spuren 3 und 4 beweist, daß das partielle Auffüllen der *Bam* *HI* Enden gelungen ist. In Spur 3 hat sichtlich keine Ligation mehr stattgefunden.



Als klar war, daß das partielle Auffüllen gut funktioniert hatte, wurde getestet, ob der Ligationskit sowie der *Packaging Extract* ebenfalls in Ordnung waren. Erst dann wurden die beiden Ansätze mit den λ FIX[®] II Armen ligiert (2.13.4) und anschließend verpackt (2.13.5). Die folgende Titerbestimmung (2.13.6) ergab eine Konzentration von ca. 3×10^6 pfu/ml für beide Ansätze, was einer absoluten Menge von $1,5 \times 10^6$ pfu entsprach. Dies waren bei weitem genügend Klone, um sicher zu sein, daß die gesamte genomische DNA von *S. domuncula* mit 99%iger Wahrscheinlichkeit vertreten war. Denn die Frage, wieviele Klone eine genomische Bibliothek mindestens enthalten muß, läßt sich mit der folgenden Formel nach CLARKE und CARBON (1976) berechnen:

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - a/b)}$$

Dabei ist N die Zahl der erforderlichen Klone, P die Wahrscheinlichkeit, daß jedes einzelne Gen vorhanden ist, a die Durchschnittslänge der in den Vektor eingebauten DNA Fragmente und b die Gesamtgröße des Genoms.

Wie IMSIECKE *et al.* (1995a) anhand cytofluorometrischer Daten bestimmt haben, liegt die Genomgröße von *S. domuncula* bei etwa $1,67 \times 10^6$ kb. Die Durchschnittslänge der in den Vektor λ FIX[®] II eingebauten DNA Fragmente wurde mit 16 kb angenommen. Die Wahrscheinlichkeit, mit der jedes einzelne Gen in der Bibliothek vorhanden ist,

wurde mit 99% beziffert. Das Einsetzen dieser Werte in die obige Formel ergab, daß ca. 480.000 Klone erforderlich sind, um das komplette Genom abzudecken. Mit $1,5 \times 10^6$ Klonen war diese Forderung also mehr als erfüllt.

Diejenige Bibliothek, bei der die verwendete DNA 5 min partiell verdaut worden war, wurde für eine Amplifikation benutzt (2.13.7). Der resultierende Titer dieser amplifizierten Genbibliothek betrug $1,7 \times 10^9$ pfu/ml.

3.2 Screening der genomischen Bibliothek

Je ca. 100.000 pfu der genomische Bibliothek von *S. domuncula*, die aus der 10 min lang mit dem Restriktionsenzym *Sau 3AI* inkubierten DNA präpariert worden war, wurden mit *E. coli* XL1-Blue MRA (P2) auf große Screeningplatten ausplattiert. Daraufhin wurde ein Homologiescreening (2.14 und Abb. 14) durchgeführt. Als Matrize für die PCR zur Herstellung der DIG gelabelten Sonden dienten cDNA-Klone, die für die cPKC (KRUSE *et al.*, 1997) aus *S. domuncula* und für ein Schwammhomologon eines Ethylen induzierbaren Gens (*HEVER*) von *Hevea brasiliensis* (SIVASUBRAMANIAM *et al.*, 1995), ebenfalls aus *S. domuncula* (ERR_SUBDO; Acc. No. Y19159 KRASKO *et al.*, 1999), kodierten. Die cDNA-Klone lagen im Vektor pBK-CMV vor.

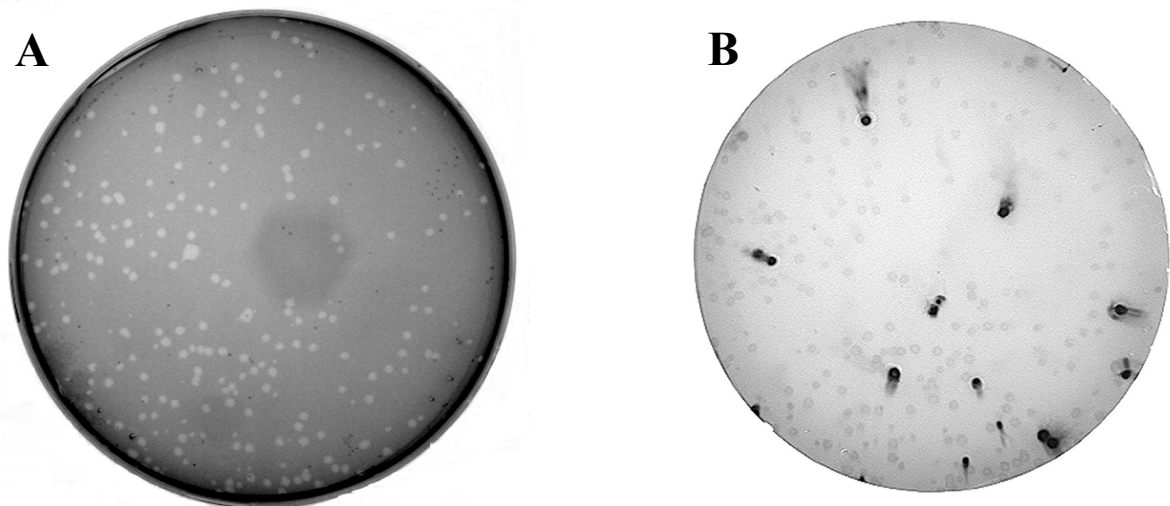


Abb. 14: Screeningplatte und korrespondierender Nitrocellulosefilter. (A) Petrischale mit vereinzelt liegenden Phagenplaques (helle Punkte) wie sie für ein Screening der dritten Runde typisch war. (B) Korrespondierender Nitrocellulosefilter mit deutlich als dunkle Flecken zu erkennenden Hybridisierungssignalen. Einzeln liegende positive Plaques konnten so auf der Originalplatte identifiziert und ausgestochen werden.

Die DIG-markierten Sonden wurden mit Hilfe der Primerpaare SubcPKCF1/SubcPKCR1 (2.11.2) bzw. EthylenF1/EthylenR1 (2.11.1) amplifiziert und waren 832 bzw. 467 bp lang.

Auf den beiden großen Screeningplatten konnten je ca. 15 mit der entsprechenden Sonde hybridisierende Plaques identifiziert werden. Jeweils 10 davon wurden großräumig ausgestochen, in SM-Puffer + Chloroform überführt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Mit je 4 dieser positive Phagen enthaltenden Gemische wurden nun weitere Screeningrunden durchgeführt, bis in der dritten Runde von 2 (PKC) bzw. 3 (Ethylen) Gemischen einzelne positive Plaques isoliert werden konnten (**Abb. 14**). Beim "PKC-Screening" waren dies die Klone λ PKC B und λ PKC C, beim "Ethylen-Screening" die Klone λ EB, λ EC und λ ED.

3.3 Charakterisierung der "Ethylen"-Klone

3.3.1 Analyse der Primärstruktur

Nach Vermehrung der Phagen und Aufreinigung der λ -DNA (2.12.15) wurde eine Restriktionsanalyse (2.12.6) der einzelnen Klone durchgeführt. Mit den Agarosegelen dieser Restriktionsanalysen wurden außerdem Southern Blots durchgeführt (2.12.19.1 und **Abb. 15**), um die positive Reaktion der Plaques zu bestätigen und um diejenigen Restriktionsfragmente zu bestimmen, die für die Sequenzanalyse subkloniert werden sollten. Nachdem die λ "Ethylen"-Klone mit dem Restriktionsenzym *Sac I* geschnitten worden waren, konnte anhand der entstandenen Fragmente auf deren Gesamtlänge zurückgeschlossen werden. Sie beträgt bei λ EB ca. 12,1 kb, bei λ EC ca. 16,7 kb und bei λ ED ca. 14,6 kb (**Abb. 15**). Im Southern Blot hybridisierten die 1,0 kb Fragmente aller drei λ -Klone, die 1,8 kb Fragmente von λ EC und λ ED und das 0,9 kb Fragment von λ EB mit der spezifischen DIG-markierten Sonde. Anhand dieser Daten konnte eine Karte mit der Reihenfolge der *Sac I*-Fragmente innerhalb der drei Klone erstellt werden (**Abb. 16**). Die positiv hybridisierenden Fragmente wurden isoliert, in den Vektor pBluescript SK II subkloniert (2.12.7.2) und anschließend sequenziert (2.12.20).

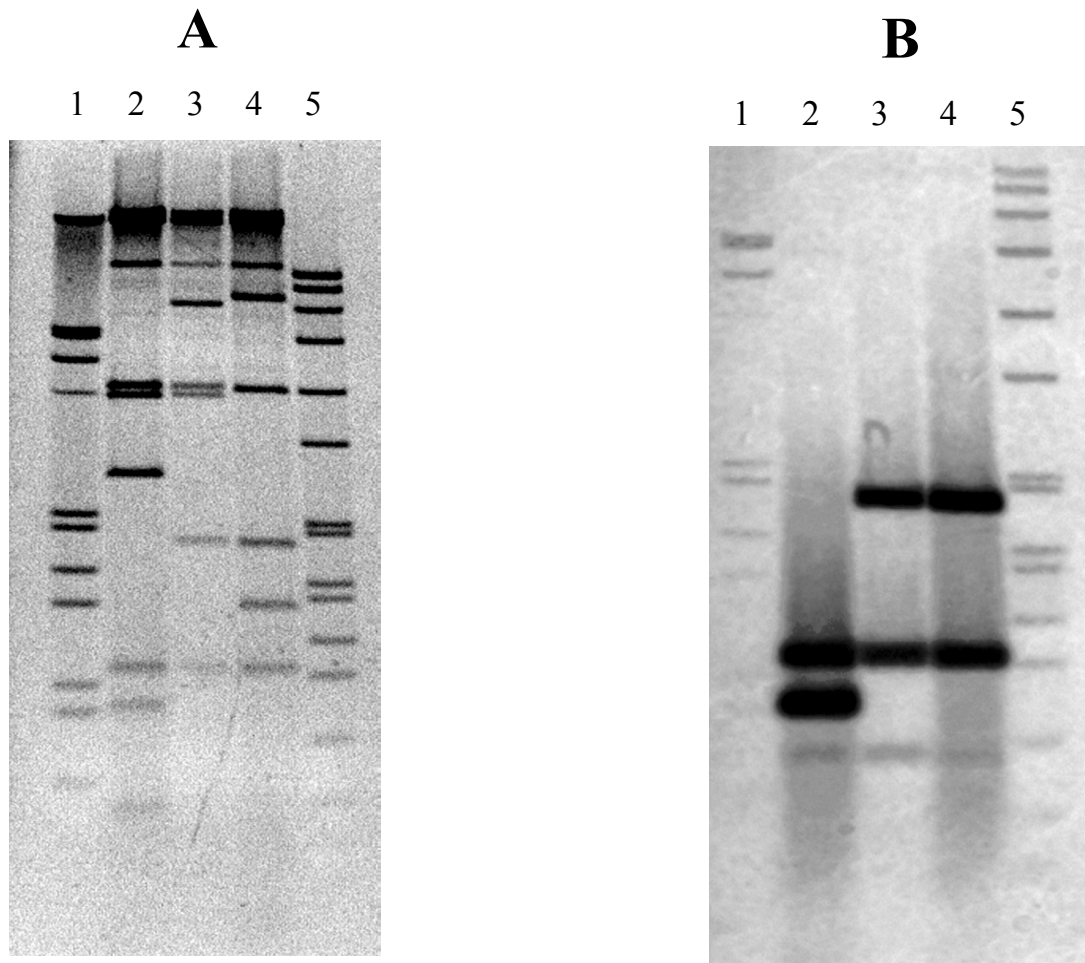


Abb. 15: Southern Blot der Eλ-Klone. Bild 15 A zeigt den *Sac I* Verdau der 3 isolierten "Ethylen" λ-Klone. 15 B zeigt den entsprechenden Southern Blot.

Spur 1: *DNA Molecular Weight Marker III DIG-labeled*

Spur 2: *Sac I* Verdau von λEB.

Die Fragmentlängen betragen ca. 3,7, 3,5, 2,5, 1,0, 0,9 und 0,5 kb, was einer Gesamtlänge von ca. 12,1 kb entspricht. Mit der spezifischen Sonde hybridisierten die Fragmente 1,0 und 0,9 kb.

Spur 3: *Sac I* Verdau von λEC.

Die Fragmentlängen betragen ca. 6,3, 3,7, 3,5, 1,8, 1,0 und 0,4 kb, was einer Gesamtlänge von ca. 16,7 kb entspricht. Die Fragmente 1,8 und 1,0 kb hybridisierten mit der spezifischen Sonde.

Spur 4: *Sac I* Verdau von λED.

Die Fragmentlängen betragen ca. 6,8, 3,7, 1,8, 1,3 und 1,0 kb, was einer Gesamtlänge von ca. 14,6 kb entspricht. Die Fragmente 1,8 und 1,0 kb hybridisierten mit der spezifischen Sonde.

Spur 5: *DNA Molecular Weight Marker VII DIG-labeled*

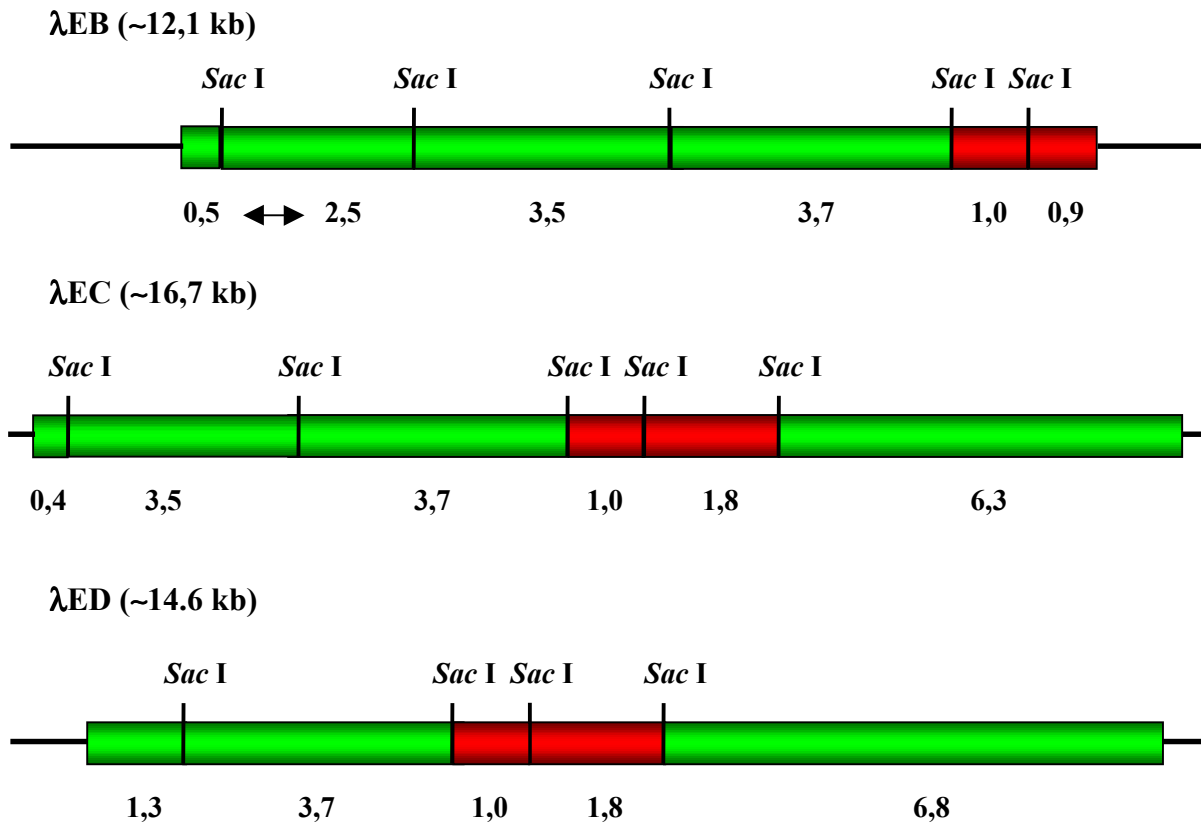


Abb. 16: Restriktionskarten der drei "Ethylen" λ -Klone. *Sac I*-Restriktionskarten der drei isolierten positiven "Ethylen" λ -Klone. Die Länge der einzelnen *Sac I*-Fragmente ist unterhalb der Zeichnungen angegeben. Rot dargestellt sind diejenigen Fragmente, die im Southern Blot mit der spezifischen DIG-gelabelten Sonde hybridisierten.

Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe der IRD800 gelabelten Vektorprimer und den spezifischen Primern C18F1ir und C18R1ir (2.11.8) durchgeführt. Die anschließende Datenbankanalyse mit Hilfe des BLAST Algorithmus ergab, daß es sich bei allen drei isolierten Klonen um mögliche Sequenzhomologe des "Ethylen induzierbaren Gens" *HEVER* aus *Hevea brasiliensis* handelt. Die Sequenz von λ EB 1,0/0,9 (1829 bp) bricht allerdings innerhalb des ersten Introns ab. Das komplette Gen und die 5'-Region konnten hier nicht charakterisiert werden. Die Klone λ EC 1,0/1,8 (2804 bp) und λ ED 1,0/1,8 (2799 bp) decken die komplette kodierende Sequenz, einen Teil der 5'-Region und die 3'-Region ab.

Die Primärsequenzen der drei Klone weisen sowohl untereinander als auch im Vergleich zur cDNA (ERR_SUBDO) kleine Unterschiede auf. Innerhalb des kodierenden Bereichs konnten Punktmutationen, innerhalb der Introns und in der 3'-nichtkodierenden Region ebenfalls Punktmutationen und Deletionen bzw. Insertionen festgestellt werden. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da für die Konstruktion der genomischen

Bibliothek sowie der cDNA-Bibliothek unterschiedliche Individuen verwendet wurden. Im weiteren werden nur noch die Sequenzen der λ EC 1,0/1,8-Klone behandelt, ab hier mit SD_SNZG (*Suberites domuncula* SNZ Gen) bezeichnet (**Abb. 17**).

SD_SNZG besteht aus 939 bp 5'-Bereich, auf den unter **3.4** noch näher eingegangen wird. Es folgen 921 bp kodierender Bereich, der für ein 306 As langes putatives Protein (*sd_snz*) kodiert. Das Molekulargewicht dieses Proteins wurde mit 32,7 kDa berechnet. Der theoretische isoelektrische Punkt liegt bei 6,13 (DELÉAGE und ROUX, 1987). Die kodierende Region ist von 5 Introns unterbrochen, die alle der GT-AG Regel folgen (MANIATIS und REED, 1987) und von relativ geringer Länge sind (zwischen 60 und 131 bp; Positionen: nt 20 bis 87; nt 415 bis 496; nt 644 bis 774; nt 958 bis 1044 und nt 1224 bis 1283; **Abb. 17**). Der 3'-nichtkodierende Bereich umfaßt 527 bp. Der Startpunkt des poly(A)-Schwanzes der cDNA liegt 146 bp vom Stop-Kodon entfernt (**Abb. 17**).

Die das Start-ATG umgebende Sequenz entspricht nicht vollständig dem für viele Vertebraten mRNA's optimalen Kontext für die Translationsinitiation (Konsensussequenz GCCA/GCCATGG; KOZAK, 1991). Die wichtige Purinbase in Position -3 (A) ist zwar vorhanden, das ebenso wichtige G in Position +4 jedoch fehlt. Untersuchungen an Translationsstartpunkten primitiver Eukaryonten haben gezeigt, daß ein A in Position -3 stark konserviert zu sein scheint (YAMAUCHI, 1991). Dies ist auch in dieser Sequenz der Fall. Das typische Polyadenylierungssignal AATAAA (ZARKOWER *et al.*, 1986) fehlt, ein bei cDNAs aus Schwämmen schon häufiger beobachtetes Phänomen (PFEIFER *et al.*, 1993).

BiPromF0/EthylenGFPf1	
<u>GAGCTCGTATAAAAATGCCATGACATTTCATCGTCAGCCAAGGAAAAGGAGGTGGGGCCGAGGTGGGTTGGGCTGCATGC</u>	-860
AACGGTGGATGGTGCAGTTTGTAGCTGACTCAAAGCTCTTGTCTGTGCGACCATAACATGTTCCCTTGTACATTGGATGTT	-780
CAGGCCCCCGATCTATTAAGTGGACAGAAACCGAATTATAATGCTATCACTTTATATAAAGCATTACTAACAGCAATGT	-700
GTGTACAAGTAGTTACCGTCACTTGTCTCCTAAATTTCTGTCCAACCATCATCAGCCAGTATTATAAGACCAGCACAC	-620
GTGCCCATACCACCCAGGCCCTCTGTTGTGAGATAATGCCTTTAATGTCTGCTCAAACCTATTCTTTCTCAGGAA	-540
CACACTGAGAGTGGTACTCTCCCTCCAGGGATGATCAGACCATCTAAATCAGAGAGTTGGCCCTGGTTACGAACCTCAA	-460
CAATTGTTATAGTTAAATCACGATGTTTATCGGTGCTTGAGAGGGTAGTGAGTTTGTGTATGTGTTCAATGAATGCTCCT	-380
BiPromF1	
TGGATGCACAGGACACCCACAGTAATAGTATTGCTGTCCATCTCTGAATAGAGAACATGAAGGAGTTCACAACAGATCA	-300
TGTTGATGATTAGATATACAGCCAAACAACAAAACATACCCCTCACTATTAAGATACTCAGGCTCTGCACTGTGTCTAGC	-220
GTCTCAGTTGTAGCTGGTTAACATGTGGTTAAGTTGTAGACAACAAATTATGATTGACTATTATACAATAGTCAGATCAG	-140
ACTGATGCAATCTGAGGTGGACCACGCCCACTGAGGCTCTAGAAATGAACCAGTGGCTATATAAATAGCTATGTAACAA	-60
• G CG A	
<u>CCGTTAATCAACAGGTGGTTTCATCATTCTACTTCATGTGAAGCAAGCAGATCTCAACATGTCTGAACAAAAACCTGT</u>	21
BiPromR0/1/EthylenGFPPr1 MetSerGluProLysThr	6
<u>AAGTTTATTTGACACTATACACTTTGATCTATCATTGAAACATCTCCTATCACCCCTCTCCCCAGCAGCCACCAGTGAG</u>	101
[1] SerAlaThrSerGlu	11
A	
ACCCAGACTGGGACGATGACAGTCAAGACTGGCCTTGCTCAAATGCTCAAAGGAGGTATTATAATGGATGTCATTAATGC	181
ThrGlnThrGlyThrMetThrValLysThrGlyLeuAlaGlnMetLeuLysGlyGlyIleIleMetAspValIleAsnAl	38
TGACCAGGCAAGAATAGCTGAGGAAGCTGGTGCATGTGCTGTAATGGCATTGGAGAAGGTAACCTGCTGATATTCGTAAAG	261
aAspGlnAlaArgIleAlaGluGluAlaGlyAlaCysAlaValMetAlaLeuGluLysValProAlaAspIleArgLysA	64
ATGGTGGGGTGGCTAGAATGGCTGACCCACGTAAGATCAAGGAGATTATGGACACAGTGACAGTACCTGTCATGGCTAAA	341
spGlyGlyValAlaArgMetAlaAspProArgLysIleLysGluIleMetAspThrValThrValProValMetAlaLys	91
TGTCGTATTGGGCACCTTTCAGAGGCACAGATTTTACAGAACTGGGTGGACTTTTATTGATGAGTCTGAAGGTAAGT	421
CysArgIleGlyHisPheAlaGluAlaGlnIleLeuGlnAsnLeuGlyValAspPheIleAspGluSerGlu [2]	115
<u>CAAGTAGGATATACATTGTACGCTGCCAATGATCTGTGTGCTGTTAAACCTCATATTTCCCTCTGTTTTAGTGTTA</u>	501
ValLeu	117
T	
TCTCTGCTGATGATGAGAATCATGTGCAAAACAACCATTCATGTTCCGTTTGTATGTGGAGCAAGAACCCTTGAGAGA	581
SerProAlaAspAspGluAsnHisValAspLysGlnProPheAsnValProPheValCysGlyAlaArgThrLeuGlyGl	144
Ser	
C A	
AGCTTTACGTCGGATCTCTGAGGGAGCTGCTATGATCCGAACTAAAGGAGAGGCAGGCACTGGTGAAGTAGACTGCATGGA	661
uAlaLeuArgArgIleSerGluGlyAlaAlaMetIleArgThrLysGlyGluAlaGlyThr [3]	164
<u>GTGACAGTTAGCATGACTGTAGTAGTTGTGTGGGATCTTACTACATAGGTTGGCCTAATAAGCTAACTAGGTTATGACTA</u>	741
G	
<u>TGTCATGATAAAAAGCAATTTGTGTTTTGTTAG</u> GCAATGTGGTAGAGGCTGTTCTGTCATGCCCGCCAGATCAATCATGAG	821
GlyAsnValValGluAlaValArgHisAlaArgGlnIleAsnHisGlu	180
T Arg	
ATACGTGTTGCTCAGTGTATGAGCTCAGCTGAGTTGTATGGTTATGCCAAACAGCTAGGGGTGCCACTGGATCTACTGCA	901
IleArgValAlaGlnCysMetSerSerAlaGluLeuTyrGlyTyrAlaLysGlnLeuGlyValProLeuAspLeuLeuGl	207
Leu	
AAAGACAGCTAAGCTTGGTTCGGTTGCCCTGTGGTCAATTTTGCAGCTGGAGGATTAGGTAATAGAAACTTACTGATTGTTT	981
nLysThrAlaLysLeuGlyArgLeuProValValAsnPheAlaAlaGlyGlyLeu [4]	225
<u>GTCCACTGAGACTGGATAATGCATAAGGTACGACTTACAACTTTTACTTCCCTCCCTAG</u> CCACCCCTGCAGATGTG	1061
AlaThrProAlaAspVal	231
TCCTTGCTCATGCAACTTGGAGTTGATGGTGTGTTTGTGGTTCGGGGATCTTCAAGAGTGGGAACCCCGAGAAGAGAGC	1141
SerLeuLeuMetGlnLeuGlyValAspGlyValPheValGlySerGlyIlePheLysSerGlyAsnProGluLysArgAl	258
CAAGGCTATGGTACAAGCTGTACGCATTACAATGATCCAAAGGTGCTTGCTGATGTCAAGTGAAGACTTAGGAGACCCTA	1221
aLysAlaMetValGlnAlaValThrHisTyrAsnAspProLysValLeuAlaAspValSerGluAspLeuGlyAspProm	284
TG <u>GTAGGACAATATTATTGAAATTGATGACACACTTGTGACTTATGTTTTGTCCATATGCAG</u> GTTGGGCTCAACTGTGAG	1301
et [5] ValGlyLeuAsnCysGlu	291
CACTTGTCTGAGAAATGGGCTCAAAGAGAGAGTGTTCACAAGTCTTAAACTAAGTGGGCTTTAATACAAACTATCATTAA	1381
HisLeuSerGluLysTrpAlaGlnArgGluSerValHisLysSer *	306
A	
<u>TATGGTCATCGTCTAGCTACATGTATACATAAATTATGTCATGAGTGTGTTGTATTATACTGTACTATACTGGGCCGTGT</u>	1461
E poly(A) - Start	
CCTCGCCCTTTTCCATTTTCGAGGGCGACTTGAATCGAGGTGAAATCGTAGTATTGGCTACTTGATACTTCTAAGTGGG	1541
CGTGGTGTGCGACCGTGAAGGGCTGATTTGTGAGTGTTCGCTATTATAGTACGGTATACTTGATCAATGTATACAGTAT	1621
ACAAACTTTTGTACTGACATAAATAAGACATCTCTGCTGAGCTAGTTGCTGGCCCTTGTGTAACGACAAGAAAGGATTAACAG	1701
AGAGACCAACAACCTATAAAGTGAAGCTGTGTTTTGTAAAGCTAGTCGAGTCTAGTCCGACCAGACATGGGTAACAACC	1781
GGCCACCCAGCGGTATCTGGCTCAGCAACTACTGCTGCTGATAGACGGGGTTCTAGGGCCGTGAAGAAGAACACTATGA	1861
<u>GCTC</u>	1865

Abb. 17 : Nukleotidsequenz von SD_SNZG. Die fünf Intronsequenzen sind **rot unterstrichen** und durchnummeriert [x]. Die 5'-Region ist in **blauen**, die kodierende Region in **schwarzen** und die 3'-Region in **grünen** Lettern dargestellt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Exons ist im Drei-Letter Kode unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben. Kursiv oberhalb der genomischen Sequenz sind Abweichungen der cDNA-Sequenz (ERR_SUBDO) gegenüber dieser genomischen Sequenz eingefügt. Diese führen teilweise zu Aminosäureaustauschen, die unterhalb der Aminosäuresequenz angegeben sind. Die Numerierung der Nukleotide der kodierenden Region und Introns sowie der 3'-Region beginnt mit +1 am Start-Kodon, die Numerierung der 5'-Region beginnt mit -1 unmittelbar nach dem Start-Kodon und geht bis -939 (der ersten *Sac I* Schnittstelle). Der Startpunkt der längsten sequenzierten cDNA ist mit einem Punkt (●) markiert und auch der Startpunkt des poly(A)-Schwanzes ist gekennzeichnet (⊖). Die *Sac I* (GAGCTC), *Bgl II* (AGATCT) und *Kpn I* (GGTACC) Schnittstellen sind **doppelt unterstrichen**. Das Start-Kodon des SNO-Gens (3.4.1) ist **fett unterstrichen**. Die Positionen der Primer für die Klonierung der 5'-Fragmente in die Reportervektoren sind **einfach unterstrichen** und ihre Bezeichnung ist oberhalb bzw. unterhalb der Sequenz angegeben.

3.3.2 Genomischer Southern Blot von SD_SNZG

Anhand der Ergebnisse von "Zoo"-Blots mit der genomischen DNA von diversen Organismen und der Isolierung von 3 SNZ-Genen aus *S. cerevisiae* postulierten BRAUN *et al.* (1996), daß die SNZ-Gene häufig zu Multigen-Familien gehören. Eine ähnliche Vermutung hat auch SIVASUBRAMANIAM *et al.* (1995) für das Ethylen induzierbare Gen *HEVER* aufgestellt. Um herauszufinden, ob auch SD_SNZG von einer Multigen-Familie kodiert wird, wurde ein genomischer Southern Blot durchgeführt (2.12.19.2). Als Sonde diente ein 943 bp langes DIG gelabeltes Amplifikat, das durch PCR mit dem Primerpaar EthylenF1/R2 (2.11.1) und ERR_SUBDO in pBK-CMV als Matrize hergestellt wurde.

Der genomische Southern Blot von *S. domuncula* DNA (**Abb. 18 B**) zeigt deutlich, daß SD_SNZG in diesem Schwamm mit höchster Wahrscheinlichkeit als *single-copy* Gen vorliegt. Bei den Verdau mit den drei Restriktionsenzymen *Nco I*, *Pae I* und *Xba I* ist jeweils nur eine einzelne Bande, die mit der spezifischen DIG-markierten Sonde hybridisiert hat, zu erkennen. Bei den Verdau mit *Bgl II* und *Kpn I* sind zwar zwei Signale zu erkennen, dies ist aber damit erklärbar, daß diese beiden Enzyme innerhalb des offenen Leserahmens von SD_SNZG schneiden (zur Position der Erkennungssequenzen dieser Enzyme siehe **Abb. 17**). Der Verdau mit *Xho I* schließlich zeigt keine Signale. Dies kann daran liegen, daß das *Xho I* Fragment, das SD_SNZG enthält, ein ziemlich langes Fragment sein könnte. Lange Fragmente werden beim Blotten nicht so effektiv auf die Membran transferiert wie vergleichbar Kürzere und sind damit nicht so gut erkennbar (siehe auch die unterschiedliche Signalstärke bei den Verdau mit *Pae I* bzw. *Xba I*).

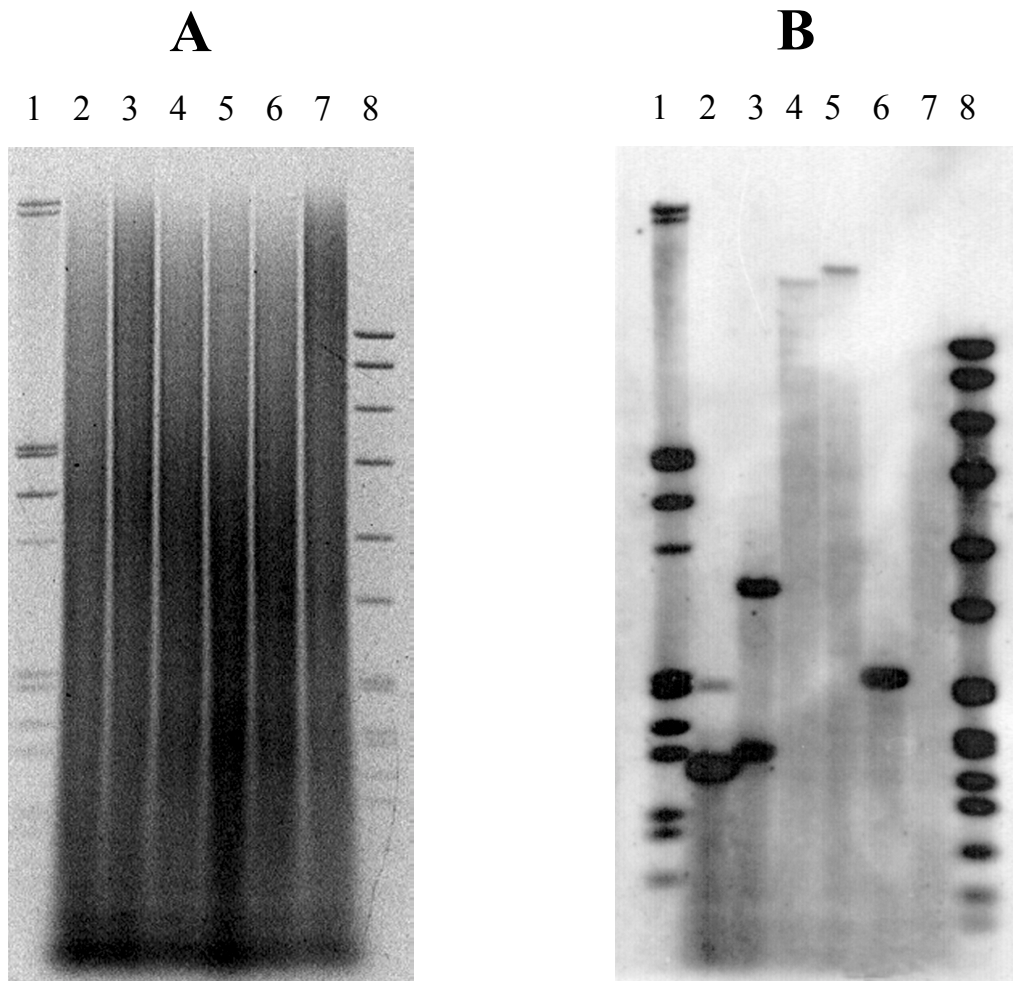


Abb. 18: Genomischer Southern Blot von SD_SNZG. **18 A** zeigt das Gel eines kompletten Verdau der genomischen DNA von *S. domuncula* mit verschiedenen Restriktionsenzymen. **18 B** zeigt den genomischen Southern Blot.

Spur 1: *DNA Molecular Weight Marker III DIG-labeled*

Spur 2: *Bgl II* Verdau. Im Blot sind positive Signale bei ca. 1,9 und 1,2 kb zu erkennen.

Spur 3: *Kpn I* Verdau. Im Blot sind positive Signale bei ca. 1,4 und 3 kb zu erkennen.

Spur 4: *Nco I* Verdau. Im Blot ist ein positives Signal bei ca. 14 kb zu erkennen.

Spur 5: *Pae I* Verdau. Im Blot ist ein positives Signal bei ca. 15 kb zu erkennen.

Spur 6: *Xba I* Verdau. Im Blot ist ein positives Signal bei ca. 2,0 kb zu erkennen.

Spur 7: *Xho I* Verdau. Kein positives Signal.

Spur 8: *DNA Molecular Weight Marker VII DIG-labeled*

3.3.3 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von SD_SNZG

Wie bereits erwähnt, ergab eine BLAST-Suche, daß das Genprodukt (*sd_snz*) von SD_SNZG die größte Similarität zu einem durch Ethylen induzierbaren Protein aus dem Gummibaum *Hevea brasiliensis* aufweist (SIVASUBRAMANIAM *et al.*, 1995). Dessen Nukleotidsequenz wiederum ist Mitglied einer bis jetzt wenig charakterisierten Familie von Genen, die von BRAUN *et al.* (1996) als SNZ-Genfamilie bezeichnet wurde.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von *sd_snz* mit der PROSITE-Datenbank ergab eine hohe Übereinstimmung mit einem Proteinstück, das typisch für die Proteinfamilie mit UPF0019 Signatur ist (Acc. No. PS01235). Die Konsensussequenz dieses Proteinstücks zur Identifizierung der Familie lautet: L-P-V-[VT]-[NQL]-F-[AT]-A-G-G-[LIV]-A-T-P-A-D-A-A-[LM]. Bis auf die 17. und 18. As dieser Konsensussequenz stimmt der entsprechende Abschnitt von *sd_snz* (As 215 bis 233) mit dieser Sequenz überein. Durch einen Vergleich mit der BLOCKS-Datenbank konnte die Einordnung von *sd_snz* in die oben erwähnte Proteinfamilie bestätigt werden. In der BLOCKS-Datenbank sind konservierte Proteinregionen als *ungapped multiple alignments (blocks)* gespeichert (HENIKOFF *et al.*, 1999). Vier solcher konservierten *blocks* konnten für die UPF0019/*Snz*-Proteinfamilie identifiziert werden. Wie in **Abb. 19** zu erkennen ist, besteht besonders innerhalb dieser 4 *blocks* eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen der Schwammsequenz und Sequenzen von Mitgliedern der anderen taxonomischen Hauptgruppen. Sequenzhomologe finden sich bei Archaeobakterien, Eubakterien, Pilzen und Pflanzen. SD_SNZG ist die erste Sequenz, die bis dato aus einem vielzelligen, tierischen Organismus (Metazoa) isoliert worden ist. Mit ausgewählten Organismen der oben erwähnten Gruppen teilt *sd_snz* eine Sequenzidentität von 56-60%. In **Abb. 19** sind dies das Archaeobakterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* (SMITH *et al.*, 1997; Acc. No. O26762; 60% Identität), das Eubakterium *Bacillus subtilis* (MITCHELL *et al.*, 1992; Acc. No. P37527; 58% Identität), die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (BRAUN *et al.*, 1996; Acc. No. 6323743; 56% Identität) und der Gummibaum *Hevea brasiliensis* (SIVASUBRAMANIAM *et al.*, 1995; Acc. No. Q39963; 60% Identität). Im Übrigen sind Mitglieder der *Snz*-Proteinfamilie noch bei 4 weiteren Pilzarten, 8 Eubakterienarten, 5 Archaeobakterienarten und 5 Pflanzenarten identifiziert. Die *Snz*-Proteinfamilie kann als eine der evolutiv am stärksten konservierten Proteinfamilie bezeichnet werden. Eine ähnliche Verteilung über alle drei phylogenetischen Domänen (Archea, Bacteria, Eucarya; WOESE *et al.*, 1990) mit vergleichbar hoher Sequenzidentität wurde bis jetzt nur von sehr wenigen Proteinfamilien wie z. B. den Hitzeschockproteinen (HSP70) berichtet (GUPTA und GOLDING, 1993; GUPTA *et al.*, 1994).

BLOCK 1

Suberites	: (19)	VKTGLAQM LKGGIIMDVINA DQARIAEEAGACAVMALEKVPADIRK DGGVARMAD	(73)
Hevea	: (25)	VKVGLAQM LRGVIMDVVNP EQARIAEEAGACAVMALEKVPADIRAGGGVARMAD	(79)
Yeast	: (8)	IKSGLAQM LKGGVIMDVVTP EQAKIAEKSGACAVMALESIPADMRKSGKVCRMAD	(62)
Methanobac.	: (8)	LKKGFAKMTKGGVIMDVVNAEQAAIAEDSGAVAVMALEKVPADIRASGGVARMAD	(62)
Bacillus	: (9)	VKRGMAEMQKGGVIMDVINA EQAKIAEEAGAVAVMALEKVPADIRAGGGVARMAD	(63)

BLOCK 2

Suberites	: (88)	VMAKCRIGHFAEAQILQNLGVDFIDESEVLSPADDEENH	(125)
Hevea	: (94)	VMAKARIGHFVEAQILEAIGIDYVDESEVLTPADEENH	(131)
Yeast	: (77)	VMAKVRIGHFVEAQIIEALEVDYIDESEVLTPADWTHH	(114)
Methanobac.	: (77)	VMAKVRIGHFVEAQVLEALGVDIDESEVLTPADERFH	(114)
Bacillus	: (78)	VMAKARIGHIVEARVLEAMGVYIDESEVLTPADEEFH	(115)

BLOCK 3

		(PS01235)	
Suberites	: (203)	PIDLLQKTAKLGRLPVVNFAAGGLATPADVSLLMQLGVDGVFVSGGIFK	(250)
Hevea	: (208)	PYDLVMQTKQLGRLPVVQFAAGGVATPADAALMMQLGCDGVFVSGGVFK	(256)
Yeast	: (192)	PVSLKLDVLEKGLKLPVVNFAAGGVATPADAALMMQLGCDGVFVSGGIFK	(240)
Methanobac.	: (191)	PIELVRETAKLGLKLPVVNFAAGGVATPADAALMMQLGADGVFVSGGIFK	(239)
Bacillus	: (191)	PYELLLQIKKDGLKLPVVNFAAGGVATPADAALMMQLGADGVFVSGGIFK	(239)

BLOCK 4

Suberites	: (251)	SGNPEKRAKAMVQAVTHYNDPKVLADVSEDLGDPMVGLNC	(290)
Hevea	: (257)	SGDPARRARATVQAVTHYSDPDLAEVSCGLEAMVGINL	(296)
Yeast	: (241)	SSNPVRLATAVVEATTHFDNPSKLEEVSSDLGELMGGVSI	(280)
Methanobac.	: (240)	SDNPEGYARATVEATAHYDDPEVLAEVSRGLGTAMRGLEI	(279)
Bacillus	: (240)	SDNPAKFAKATVEATTHFTDYKLLAELSKELGTAMKGIET	(279)

Abb. 19: Vergleich der vier hochkonservierten Proteinblocks der abgeleiteten Aminosäuresequenz von SD_SNZG (*sd_snz*) mit Sequenzhomologen aus anderen taxonomischen Hauptgruppen. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von *S. domuncula* (Suberites), *Hevea brasiliensis* (Hevea; Acc. No. Q39963; SIVASUBRAMANIAM *et al.*, 1995), *S. cerevisiae* (Yeast; Acc. No. 6323743; BRAUN *et al.*, 1996), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Methanobac.; Acc. No. O26762; SMITH *et al.*, 1997) und *Bacillus subtilis* (Bacillus; Acc. No. P37527; MITCHELL *et al.*, 1992). Die nach der BLOSUM 62 Matrix (HENIKOFF und HENIKOFF, 1992) zu 100% konservierten Aminosäurereste sind violett, die zu 80% konservierten grün und die zu 60% konservierten blau dargestellt. Die für diese Proteinfamilie charakteristische PROSITE-Signatur (PS01235) ist fett markiert.

Trotz der weiten Verbreitung der *Snz*-Proteine war bis kürzlich wenig über die spezifische Funktion dieser Proteine bekannt. Schon früh jedoch wurde einigen von ihnen eine wichtige Rolle bei der Streßantwort zugewiesen. So wird z. B. im Gummi- baum *Hevea brasiliensis* ein SNZ homologes Gen als Reaktion auf die Behandlung mit Ethylen und Acetylsalicylsäure induziert (SIVASUBRAMANIAM *et al.*, 1995). Beim Bakterium *Bacillus subtilis* wird ein zu *Snz* homologes Protein als Reaktion auf oxidativen Streß induziert (ANTELMANN *et al.*, 1997) und wird während der Sporulation guanyliert (MITCHELL *et al.*, 1992). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* wird die Synthese des *Snz1p*-Proteins hochreguliert, wenn das Wachstum einer Kultur in die stationäre Phase eintritt (FUGE *et al.*, 1994; BRAUN *et al.*, 1996). Beim Ascomyceten *Cercospora nicitiana* wird das *Snz* verwandte Protein *Sor1* für die Resistenz gegen Photosensibi-

lisatoren, die Singulett-Sauerstoff erzeugen, benötigt (EHRENSHAFT *et al.*, 1998; EHRENSHAFT *et al.*, 1999a).

GALPERIN und KOONIN (1997) vermuteten aufgrund der starken Konservierung eine wichtige physiologische Rolle der *Snz*-Proteinfamilie und unterzogen sie deshalb einer detaillierten, computergestützten Sequenzanalyse. Ihre Studie ließ vermuten, daß die *Snz*-Proteine eine konservierte Phosphatbindestelle enthalten, die typisch für Proteine der β/γ -barrel Superfamilie (BORK *et al.*, 1995) ist. Anhand dieser Daten schlossen sie auf eine enzymatische Aktivität der *Snz*-Proteine im Rahmen von bis jetzt unbekanntem Konversionen innerhalb bestimmter Aminosäuren und/oder Nukleotiden. Eine experimentell abgesicherte physiologische Rolle wurde den *Snz*-Proteinen erstmals bei den einzelligen Pilzen *Cercospora nicitiana*e und *Aspergillus nidulans* nachgewiesen. Ihnen wurde die Beteiligung an einem neuen Weg der *de novo* Biosynthese von Pyridoxin (Vitamin B₆) zugeschrieben (EHRENSHAFT *et al.*, 1999b; OSMANI *et al.*, 1999). Dieser Syntheseweg unterscheidet sich von dem bisher für *E. coli* beschriebenen Weg an dem die bakteriellen Gene *pdxA*, *pdxB* und *pdxJ* beteiligt sind. Sequenzvergleiche mit Genomen von bis zum jetzigen Zeitpunkt komplett durchsequenzierten Organismen deuten darauf hin, daß zur *de novo* Synthese von Pyridoxin entweder der "*E. coli*-Weg" oder der "SNZ-Weg" verwendet wird. Die sieben Genome, in denen keine der Komponenten der beiden Wege gefunden wurden, stammen von mikrobiellen, obligat parasitischen Organismen bzw. dem bisher einzigen komplett durchsequenzierten tierischen Organismus *Caenorhabditis elegans*. Pyridoxin und biologisch aktive Mitglieder der Vitamin B₆-Gruppe (Pyridoxal, Pyridoxamin und Pyridoxal 5-Phosphat) stellten sich experimentell als effektive "Löschsubstanzen" (*Quencher*) - vergleichbar mit der Effektivität von Vitamin C und E - von Singulett-Sauerstoff heraus (BILSKI *et al.*, 2000). Die *Snz*-Proteine scheinen damit indirekt am Schutz der Zelle vor dieser reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt zu sein (EHRENSHAFT *et al.*, 1999b).

3.4 Charakterisierung der *S. domuncula* SD_SNZG 5'-flankierenden Region

3.4.1 Das SNO-Gen

3.4.1.1 Analyse der Primärstruktur

Eine weitere BLAST-Suche, ausschließlich mit der 5'-Region von SD_SNZG, führte zu einer überraschenden Entdeckung. Ähnlich wie bei den SNZ-Genen von *S. cerevisiae* fand sich auch in der 5'-Region von SD_SNZG ein weiteres hochkonserviertes Gen (PADILLA *et al.*, 1998), das analog zu den Genen der Hefe SD_SNO (*S. domuncula* SNZ proximal open reading frame) genannt wurde. Wie diese befindet sich das Schwammgen stromaufwärts auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang, d. h. in einer "Kopf an Kopf"-Anordnung zum SNZ-ORF. Zwischen den beiden Start-ATGs befindet sich lediglich eine 338 bp lange Zwischenregion (Abb. 20).

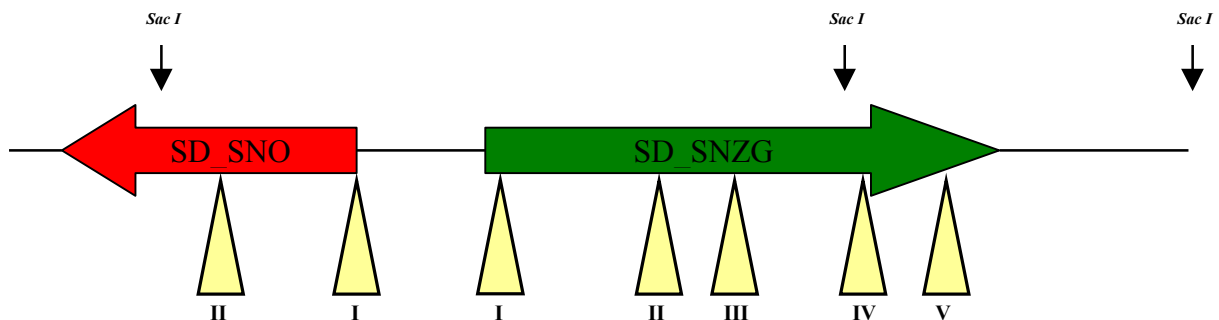


Abb. 20: Organisation des SNZ/SNO-Genclusters. Die beiden Gene SD_SNZG (grüner Pfeil) und SD_SNO (roter Pfeil) liegen in einer "Kopf an Kopf" Anordnung zueinander. Die Gesamtlänge der sequenzierten genomischen Sequenz beträgt 3127 bp. SD_SNZG ist mit Introns 1348 bp, SD_SNO einschließlich Intron II 786 bp lang. Zwischen den Start-Kodons der beiden Genen befindet sich eine 338 bp lange Region, die Intron I des SNO-Gens und den bidirektionalen Promotor beider Gene enthält. Die Position der Introns ist mit gelben Dreiecken gekennzeichnet. Das SD_SNO Intron I (nt -78 bis -4; Numerierung nach Abb. 21) befindet sich im 5'-Bereich des Gens und ist 75 bp lang, Intron II (nt 347 bis 430) ist 84 bp lang. Die SD_SNZG Introns I-V sind 68 (nt 20 bis 87; Numerierung nach Abb. 17), 82 (nt 415 bis 496), 131 (nt 644 bis 774), 87 (nt 958 bis 1044) und 60 bp (nt 1224 bis 1283) lang. Die Positionen der *Sac I* Schnittstellen ist mit Pfeilen markiert.

Da die λ EC 1,0/1,8 Klone nicht den kompletten offenen Leserahmen des SNO-Gens abdeckten, wurden jeweils zwei *Forward* (SNO_f1, nt 44 bis 66; SNO_f2, nt 157 bis 177; Abb. 21 und 2.11.4) und zwei *Reverse* Primer (SNO_r1, nt 177 bis 157; SNO_r2, nt 66 bis 44; Abb. 21 und 2.11.4) konstruiert, die in Kombination mit den Vektorprimern

T7 und T3 eingesetzt wurden, die entsprechende cDNA aus der cDNA-Bibliothek von *S. domuncula* (KRUSE, 1998b) zu amplifizieren. Die Amplifikationsprodukte der vier PCR-Ansätze wurden aufgereinigt (2.12.3) und in den *pGEM[®]-T* Vektor subkloniert (2.12.7.1). Nach der Sequenzierung (2.12.20) von sechs unabhängigen Klonen, konnte eine Konsensussequenz der kompletten cDNA zusammengefügt werden. Diese wurde SNOC_SD (SNZ ORF cDNA *S. domuncula*) benannt. Die drei Klone, die den 3'-Bereich der cDNA repräsentierten, wiesen unterschiedliche Längen auf. Es konnten drei differierende Startpunkte für den poly(A)-Schwanz lokalisiert werden, die 73, 98 bzw. 138 bp vom Stop-Codon entfernt liegen (Abb. 21). Die längste cDNA war 970 bp lang.

Anhand der cDNA-Sequenz wurden zwei weitere Primer (SNO_f3, nt 884 bis 906 und SNO_r3, nt 257 bis 234; Abb. 21 und 2.11.4) konstruiert, die für die Amplifikation der fehlenden genomischen Sequenz eingesetzt wurden. Als *Template* diente λEC. Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes resultierte in der kompletten genomischen Sequenz von SD_SNO (Abb. 21).

Abgesehen von drei Nukleotidaustauschen ergab ein Vergleich der Nukleotidsequenzen von SD_SNO und SNOC_SD eine 100%ige Übereinstimmung in der kodierenden Region und im 3'-Bereich. Keiner dieser Nukleotidaustausche führt zum Austausch einer Aminosäure. Im 5'-Bereich dagegen sind außer drei Nukleotidaustauschen auch fünf Insertionen bzw. Deletionen (zwischen 1 und 7 bp / nicht abgebildet) vorhanden. Erklärbar ist dies durch die Verwendung unterschiedlicher Schwammindividuen bei der Konstruktion der beiden Bibliotheken. Auch die unterschiedlichen Allele könnten etwas voneinander differieren.

Die kodierende Region von SNOC_SD bzw. SD_SNO umfaßt 702 bzw. 786 bp, wobei die genomische Sequenz von einem mit 84 bp recht kurzem Intron (nt 347 bis 430) unterbrochen ist. Ein weiteres kurzes (75 bp) Intron (nt -78 bis -4) findet sich im 5'-nichtkodierenden Bereich der genomischen Sequenz. Beide Introns folgen der GT-AG Regel (MANIATIS und REED, 1987). Das von den beiden Sequenzen abgeleitete Protein (*sd_sno*) ist 233 As lang, sein Molekulargewicht liegt bei 25,7 kDa, sein theoretischer isoelektrischer Punkt bei 6,39 (DELÉAGE und ROUX, 1987).

Die das Start-ATG umgebende Sequenz entspricht mit einer Purinbase (A) in Position -3 und einem Guanin in Position +4 dem optimalen Kontext für die Translationsinitiation (KOZAK, 1991). Das Polyadenylierungssignal AATAAA (ZARKOWER *et al.*, 1986) ist wiederum vor keinem der drei poly(A)-Startpunkte vorhanden.

CACTGTGTCCATAATCTCCTTGATCTTACGTGGGTCAGCCATTCTAGCCACCCACCATCTTTACGAATATCAGCAGGTA	-579
BiPromF3	
CCTTCTCCAATGCCATTACAGCACATGCACCAGCTTCCTCAGCTATTCTTGCCTGGTCAGCATTAAATGACATCCATTATA	-499
ATACCTCCTTTGAGCATTGAGCAAGGCCAGTCTTACTGTCATCGTCCCAGTCTGGGTCTCACTGGTGGCTGCTGGGGA	-419
AGAGGGGTGATAGGAGATGTTTCAATGATAGATCAAAGTGTATAGTGTCAAATAAACTTACAGGTTTTTGGTTCCAGACAT	-339
BiPromF2	
GTTGAGATCTGCCTTGCTTCACATGAAGTAGAATGATGAAACCACCTGTTGATTAAACGGTTGTTACATAGCTATTTATAT	-259
• T G	
AGCCACGTGGTTCATTTCTAGAGCCTCAGTGGGCGTGGTCCACCTCAGATTGCATCAGTCTGATCTGACTATTGTATAAT	-179
AGTCAATCATAAATTTGTTGTCTACAACCTAACCCATGTTAACCCAGCTACAACCTGAGACGCTAGACACAGTGCAGACCTG	-99
A	
BiPromR2	
AGTATCTTTTAATAGTGAGGGTATGTTTTGTTGTTGGCTGTATATCTAATCATCAACATGATCTGTTGTGAACCTCTTC	-19
[1]	
C	
SNO1/r2	
ATGTTCTCTATTTCAGAGAATGGACAGCAATACTATTACTGTGGGTGTCTGTGCATCCAAGGAGCATTGATTGAACACAT	62
MetAspSerAsnThrIleThrValGlyValLeuCysIleGlnGlyAlaPheIleGluHisI1	21
ACACAAACTCACTACCTCTCAAGCACCGATAAACATCGTGATTTAACTATAACAATTGTTGAGGTTTCGTGAACCAGGCC	142
eHisLysLeuThrThrLeuSerSerThrAspLysHisArgAspLeuThrIleThrIleValGluValArgGluProGlyG	47
SNO2/r1	
AACTCTCTGATTAGTGGTCTGATCATCCCTGGAGGGGAGAGTACCCTCTCAGTGTGTTCCCTGAGAAAGAAAGTGGTTT	222
lnLeuSerAspLeuAspGlyLeuIleIleProGlyGlyGluSerThrThrLeuSerValPheLeuArgLysAsnGluPhe	74
SNO3	
GAGCAGACATTAAGGCATGGATATCTGACAAAACAGAGCCCTGGGGTGGTATGGGGCACGTGTGCTGGTCTTTATAATACT	302
GluGlnThrLeuLysAlaTrpIleSerAspLysGlnArgProGlyValValTrpGlyThrCysAlaGlyLeuIleIleLe	101
GGCTGATGATGTGGTTGGACAGAAATTAGGAGGACAAGTGACGGTAACTACTTGTACACACATTGCTGTTAGTAATGCTT	382
uAlaAspAspValValGlyGlnLysLeuGlyGlnValThr [2]	115
TATATAAAGTGATAGCATTATAATTCTGTTTCTGTCCACTTAATAGATCGGGGGCCTGAACATCCAATGTACAAGGAAC	462
IleGlyGlyLeuAsnIleGlnCysThrArgAsn	126
ATGTATGGTCGACAGAACAAAGAGCTTTGAGTCAGCTATCAAACCTGCACCATCCACCGTTGCATGCAGCCCAACCCACCTC	542
MetTyrGlyArgGlnAsnLysSerPheGluSerAlaIleLysLeuHisHisProProLeuHisAlaAlaGlnProThrSe	153
C	
GGCCCCACCTCCTTTTCTCCTTGCTGACGATGAATGTATGGCATTGTTTATACGAGCTCCAGGTATTCTCAAAGTGAAC	622
rAlaProProPheProLeuAlaAspAspGluCysHisGlyIlePheIleArgAlaProGlyIleLeuLysValAsnS	179
CACCAGATGTTAAAGTGTAGCTAGTGTAAATGATGATAACATTGTAGCTGTTCAACAGGACCATCTCATAGCAACAGT	702
erProAspValLysValLeuAlaSerValAsnAspAspAsnIleValAlaValGlnGlnAspHisLeuIleAlaThrSer	206
TTCCACCTGAACCTACTAGTACTTTAGATGGCATTGCTACTTTGTTGATCAGATTAACAACATAGGTACCCCAATA	782
PheHisProGluLeuThrSerAspPheArgTrpHisSerTyrPheValAspGlnIleLysGlnHisArgTyrProGlnTy	232
E	
CTAGTTAAACAATCAATGTGTGTATGTGCATATATCATCTATGAGTCATTCTCAAATGTAACCTGATTTTTCGTCCACTAGT	862
r *	233
T	
E	
SNO3	
E	
ATTTGAATCATTCACTGTCTGTACTTTACTGCGTTCTATTCCAACTGTTTTCTTTGAGCCTT	924

Abb. 21: Nukleotidsequenz von SD_SNO. Die zwei Intronsequenzen sind **rot unterstrichen** und durchnummeriert [x]. Die 5'-Region, die unmittelbar bis zum Start-ATG des SNZ-Gens reicht, ist in **blauen**, die kodierende Region in **schwarzen** und die 3'-Region in **grünen** Lettern dargestellt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Exons ist im Drei-Letter Kode unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben. Kursiv oberhalb der genomischen Sequenz sind Abweichungen der cDNA-Sequenz gegenüber dieser genomischen Sequenz eingefügt. Diese Abweichungen führen jedoch nicht zu Aminosäureaustauschen. Die Numerierung der Nukleotide der kodierenden Region und Introns sowie der 3'-Region beginnt mit +1 am Start-Kodon, die Numerierung der 5'-Region beginnt mit -1 unmittelbar nach dem Start-Kodon. Der Startpunkt der längsten sequenzierten cDNA ist mit einem Punkt (•) markiert. Die drei unterschiedlichen Startpunkte des poly(A)-Schwanzes sind gekennzeichnet (E). Das Start-Kodon des SNZ-Gens (Abb. 17) ist **fett unterstrichen**. Die *Sac I* Schnittstelle ist **doppelt unterstrichen**. Die Positionen der Primer, die für die Amplifikation der cDNA und der genomischen Restsequenz verwendet wurden, sind **punktiert unterstrichen** und der Name des Primers oberhalb der Sequenz angegeben. Die Positionen der Primer, die für die Klonierung der 5'-Fragmente in den pGL2-Basic Vektor verwendet wurden, sind **einfach unterstrichen** und die Namen der Primer sind oberhalb der Sequenz angegeben.

3.4.1.2 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *SD_SNO*

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von *sd_sno* mit der PROSITE-Datenbank ergab eine hohe Übereinstimmung mit einem Proteinmuster, das typisch für die uncharakterisierte Proteinfamilie mit UPF0030 Signatur ist (Acc. No. PS01236). Die Konsensussequenz dieser Signatur lautet: [GA]-L-I-[LIV]-P-G-G-E-S-T-[STA]. Der entsprechende Abschnitt von *sd_sno* (As 54 bis 64) stimmt zu 100% mit dieser Sequenz überein. Eine Suche in der BLOCKS-Datenbank bestätigte die Einordnung in die UPF0030/*Sno*-Proteinfamilie. Für diese Proteinfamilie sind in der BLOCKS-Datenbank fünf konservierte Proteinregionen definiert (**Abb. 22**).

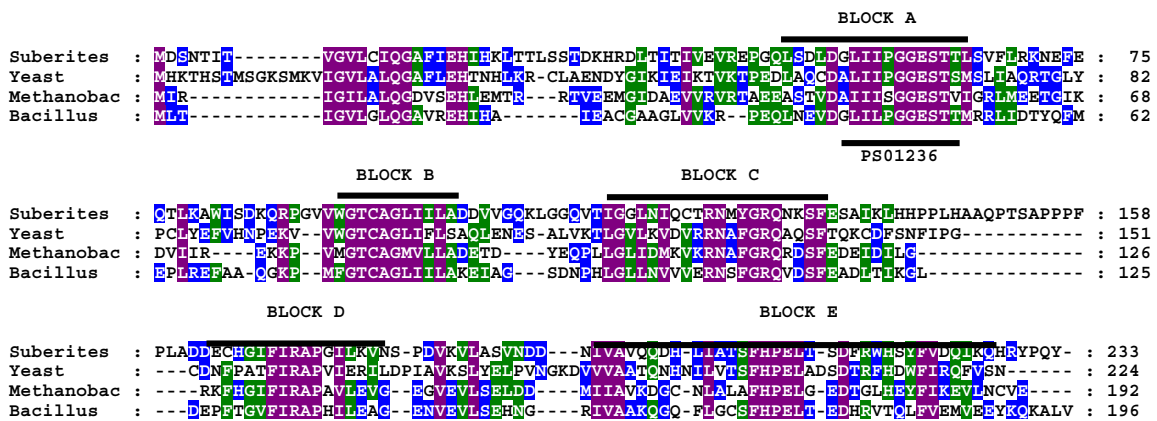


Abb. 22: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von *SD_SNO/SNOC_SD* (*sd_sno*) mit Sequenzhomologen aus anderen taxonomischen Hauptgruppen. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von *S. domuncula* (Suberites), *S. cerevisiae* (Yeast; Acc. No. NP_013813; GOFFEAU *et al.*, 1996; 30% Sequenzidentität), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Methanobac.; Acc. No. F69120; SMITH *et al.*, 1997; 29% Sequenzidentität) und *Bacillus subtilis* (Bacillus; Acc. No. P37528; OGASWARA *et al.*, 1994; 33% Sequenzidentität). Die nach der BLOSUM 62 Matrix (HENIKOFF und HENIKOFF, 1992) zu 100% konservierten Aminosäurereste sind violett, die zu 80% konservierten grün und die zu 60% konservierten blau dargestellt. Die in der BLOCKS-Datenbank definierten hochkonservierten Regionen der UPF0030-Proteinfamilie sind oberhalb der Sequenz markiert (BLOCK A-E). Die für diese Proteinfamilie charakteristische PROSITE-Signatur (PS01236) ist unterhalb der Sequenz markiert.

Die UPF0030/*Sno*-Proteine finden sich ebenso wie die *Snz*-Proteine in Mitgliedern aller drei phylogenetischer Domänen (GALPERIN und KOONIN, 1997; PADILLA *et al.*, 1998). Die Genome aller bisher komplett sequenzierten einzelligen Organismen, die ein SNZ-Gen enthalten, besitzen auch ein SNO-Gen. Sogar die proximale Lage der SNZ- und SNO-Gene untereinander scheint relativ konserviert zu sein. Allein die Orientierung der Gene zueinander unterscheidet sich zwischen einzelligen Eukaryoten, bei denen man eine "Kopf an Kopf"-Anordnung vorfindet (*S. cerevisiae*), und Pro-

karyoten (z. B. *Bacillus subtilis*), bei denen die Gene meist aufeinanderfolgend in Operons organisiert vorliegen (Ausnahmen: *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Methanococcus jannaschii*) (PADILLA *et al.*, 1998). Bei Pflanzen, in denen das SNZ-Gen gefunden wurde, konnte noch kein SNO-Homologon in einer "Kopf an Kopf"-Anordnung entdeckt werden. So verhält es sich auch bei *Arabidopsis thaliana*, obwohl der in Frage kommende Genabschnitt bereits sequenziert wurde (ÖKRÉSZ *et al.*, 1998). Eventuell liegen die beiden Gene bei höheren Pflanzen getrennt voneinander vor. Hinweise auf das Vorhandensein von *Sno*-Proteinen in Pflanzen gibt es für *Oryza sativa*. GALPERIN und KOONIN (1997) konnten die Teilsequenz für ein *Sno* ähnliches Protein aus einer EST (*Expressed Sequence Tags*) Datenbank ableiten. SD_SNO ist also wiederum das erste aus einem vielzelligen tierischen Organismus isolierte Gen. Die Anordnung des SNZ- und SNO-Genpaares entspricht beim Schwamm der Anordnung, wie sie in *S. cerevisiae* für die drei Kopien der dortigen Genpaare (SNZ1-3/SNO1-3) gefunden wurde. Die Schwammgene sind jedoch beide im Gegensatz zu den Hefegenen von Introns unterbrochen.

Untereinander sind die *Sno*-Proteine insgesamt weniger stark konserviert als die *Snz*-Proteine. Zu ausgesuchten Sequenzhomologen weist die Schwammsequenz zwischen 29% und 33% Sequenzidentität auf (**Abb. 22**). Dies legt nahe, daß an die Struktur und Sequenz der *Sno*-Proteine weniger spezifische Anforderungen gestellt werden als an die der *Snz*-Proteine.

Über die Funktion der *Sno*-Proteine ist ebenso wie über die der *Snz*-Proteine noch relativ wenig bekannt. Auch hier kamen GALPERIN und KOONIN (1997) anhand von Computeranalysen zu dem Schluß, daß die *Sno*-Proteine aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu anderen Proteinen (GuaA und HisH) eine Glutamin-Amidotransferaseaktivität besitzen. PADILLA *et al.* (1998) konnten mit Hilfe von *Two-Hybrid*-Analysen feststellen, daß *Sno*- und *Snz*-Proteine in der Hefe interagieren und Teil eines 230 kDa Proteinkomplexes sind. Da mehrere Glutamin-Amidotransferasereaktionen im Verlauf der Biosynthesewege von Purinen und Pyrimidinen stattfinden, hielten sie es für möglich, daß der oben erwähnte Proteinkomplex im Nukleotidmetabolismus eine Rolle spielt. Dieser Komplex wäre durch Streß, der zu einem Ungleichgewicht oder einer Abnahme von Nukleotiden führt, induzierbar.

Neuere Untersuchungen durch OSMANI *et al.* (1999) und EHRENSHAFT *et al.* (1999b) weisen außer den *Snz*-Proteinen (**3.3.3**) auch den *Sno*-Proteinen eine enzymatische Aktivität innerhalb eines alternativen Weges ("SNZ-Weg") der Pyridoxin-Biosynthese zu. Dieser Weg unterscheidet sich vom "*E. coli*-Weg" auch dadurch, daß das Stickstoffatom des Pyridoxins aus der As Glutamin und nicht aus der As Glutamin-

säure stammt (TAZUYA *et al.*, 1995). Die putative Glutamin-Amidotransferaseaktivität der *Sno*-Proteine steht mit dieser Vorstellung im Einklang.

3.4.2 Analyse der 5'-flankierenden Region von SD_SNZG und SD_SNO

SD_SNZG und SD_SNO liegen wie erwähnt eng miteinander verknüpft in einer "Kopf an Kopf"-Anordnung auf gegenüberliegenden Strängen. Sie teilen eine gemeinsame 5'-flankierende Region, die von Start-Kodon zu Start-Kodon 338 bp umfaßt. Das Start-Kodon des SNZ-Gens befindet sich im ersten Exon, während sich das Start-Kodon des SNO-Gens im zweiten Exon befindet. Intron I des SNO-Gens liegt in der 5'-flankierenden Region (**Abb. 20** und **23**).

Außer bei den bereits erwähnten SNZ/SNO-Genpaaren in *S. cerevisiae* (PADILLA *et al.*, 1998) finden sich auch bei Metazoen Genpaare, die in ähnlicher Art und Weise angeordnet sind. So beispielsweise der Actin-Gencluster HrMA1 der Ascidie *Halocynthia roretzi* (KUSAKABE, 1997), die Surf-1 und Surf-2 Gene der Maus und des Menschen (LENNARD *et al.*, 1994), die Chaperonin 60 und Chaperonin 10 Gene der Ratte (RYAN *et al.*, 1997), die menschlichen HADHA und HADHB Gene (ORII *et al.*, 1999) und einige andere mehr. Für die meisten dieser Genpaare konnte eine bidirektionale Promotoraktivität der mit 200-400 bp meist recht kurzen gemeinsamen 5'-Region nachgewiesen werden. Eine bidirektionale Promotoraktivität war also auch für die SNZ/SNO 5'-flankierende Region zu vermuten. Computergestützte Analysen und später auch funktionelle Analysen (**3.7.2**) unterstützten diese Vermutung. So wurde mit allen verwendeten Computerprogrammen (**2.22**) für beide Gene jeweils eine TATA-Box vorausgesagt (nt -79 bis -74 für das SNZ-Gen (TATAAA); nt -76 bis -81 für das SNO-Gen (TATATA)), die der Konsensussequenz für eukaryotische TATA-Boxen gut entsprechen. Die beiden TATA-Boxen überlappen sich und liegen jeweils 24 bp vom putativen Transkriptionsstartpunkt entfernt. Für das SNZ-Gen wurde der Transkriptionsstartpunkt (nt -50; **Abb. 23** und **24 A**) experimentell und mit Hilfe des Computers ermittelt (**2.22**). Er liegt 11 bp vom Start (nt -38; **Abb. 17, 23** und **24 A**) der längsten sequenzierten cDNA entfernt. Für das SNO-Gen wurde der Transkriptionsstartpunkt nur mit Hilfe des Computers ermittelt. Er liegt wahrscheinlich bei nt -105, 7 bp vom Start (nt -113; **Abb. 23**) der längsten sequenzierten cDNA entfernt. Desweiteren wurden zwei nicht ganz perfekte "klassische" Promotorelemente gefunden, eine CCAAT-Box (nt -133 bis -129) und eine GC-Box (nt -118 bis -111) (BUCHER, 1990).

Auffälligstes Merkmal dieser 5'-flankierenden Region ist jedoch die große Anzahl von E-Boxen (nt -25 bis -20; nt -58 bis -43; nt -89 bis -84; nt -199 bis -194 und nt -216 bis

-211). E-Boxen wurden als Sequenzen mit der Kern-Konsensussequenz CANNTG definiert (LEONARDO *et al.*, 1987). Dieses E-Box Motiv wird mit unterschiedlicher Affinität und Spezifität von der Familie der bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) Transkriptionsfaktoren gebunden. Das *Helix-Loop-Helix* Motiv dient innerhalb dieser Familie (tlw. zusammen mit einem zusätzlichen Leucin-Zipper Motiv) der Dimerisierung bestimmter Mitglieder untereinander (entweder als Homo- oder Heterodimere). An die DNA binden diese Transkriptionsfaktoren über eine Domäne mit einem hohen Gehalt an basischen Aminosäuren. Familienmitglieder sind, um nur einige der wichtigsten zu nennen, z. B. USF-1 und USF-2 (*Upstream Stimulatory Factor*), Mitglieder des Myc-Netzwerks von Proteinen (u. a. *c-myc*, *N-myc*, *L-myc*, *max* und *mad*; Übersichtsartikel: LÜSCHER *et al.*, 1997), AP4, MyoD, E12, E47 und weitere mehr. In Säugetieren spielen die bHLH Proteine in diversen zellulären Prozessen eine essentielle Rolle, so z. B. bei der Regulation der Zellproliferation (USF-1 und USF-2), bei der Aktivierung von Immunglobulinen (E12 und E47), der Differenzierung von Muskelzellen (MyoD), dem Fortschritt des Zellzyklus, der Transformation, der Apoptose und der Inhibierung der Differenzierung (Myc/Max/Mad) (LATCHMAN, 1995).

```

CATTCTCTGAATAGAGAACATGAAGGAGTTCACAACAGATCATGTTGATGATTAGATATA -282
←-SNO-Start

CAGCCAAAACAACAAAACATACCCTCACTATTTAAAAGATACTTCAGGTCTGCACTGTGTCTA -222

GCGTCTCAGTTGTAGCTGGTTAACATGTGGTTAAGTTGTAGACAACAAATTATGATTGAC -162

TATTATACAATAGTCAGATCAGACTGATGCAATCTGAGGTGGACCCAGCCCACTGAGGCT -102
• ←

CTAGAAATGAACCACGTGGCTTATATAAATAGCTATGTAACAACCGTTAATCAACAGGTGG -42
→

•
TTTCATCATTCTACTTCATGTGAAGCAAGGCAGATCTCAACATG 3
Start-SNZ→

```

Abb. 23: Sequenz des bidirektionalen Promotors zwischen SD_SNZG und SD_SNO. Die Numerierung der 5'-Region beginnt mit -1 unmittelbar nach dem Start-ATG von SD_SNZG. Die Start-Kodons der beiden Gene sind groß, kursiv hervorgehoben und die Richtung der Transkription ist jeweils mit einem entsprechenden Pfeil markiert. Die Startpunkte der cDNAs sind mit einem fetten Punkt (•) kenntlich gemacht. Die Transkriptionsstartpunkte sind einfach unterstrichen und ebenfalls mit einem Richtungspfeil oberhalb der Sequenz gekennzeichnet. Der Anfang und das Ende des ersten Introns von SD_SNO sind rosa unterstrichen. Die durch die Online-Programme (2.22) bestimmten *cis* wirksamen Elemente sind in verschiedenen Farben dargestellt. Die TATA-Boxen sind **violett**, die GC-Box **blau**, die CCAAT-Box **blaugrün** und die E-Boxen **grün** dargestellt.

3.4.3 Kartierung des Transkriptionsstartpunktes von SD_SNZG

Die längste cDNA von SD_SNZG (ERR_SUBDO), die aus der *S. domuncula* cDNA-Bibliothek isoliert wurde, beginnt bei nt -38 relativ zum Start-Kodon (KRASKO *et al.*, 1999). Um die Lage des Transkriptionsstartpunktes zu ermitteln, wurde die RT-PCR Technik angewandt. Ein *Reverse* Primer (TiEthylenR1; nt 110 bis 93) und drei *Forward* Primer (TiEthylenF1 - F3; nt -51 bis -33; nt -76 bis -57 und nt -99 bis -82) wurden anhand der genomischen Sequenz konstruiert (**Abb. 24 A**). Die Position des *Reverse* Primers wurde dabei so gewählt, daß ein Intron miteingeschlossen war. Eine mögliche Kontamination durch genomische DNA, ist durch diese Maßnahme aufgrund der unterschiedlichen Länge der amplifizierten Fragmente sofort zu erkennen. Die verschiedenen Primerkombinationen wurden zunächst in einer Standard PCR-Reaktion (2.12.1) mit λ EC als *Template* auf ihre Funktionsfähigkeit getestet.

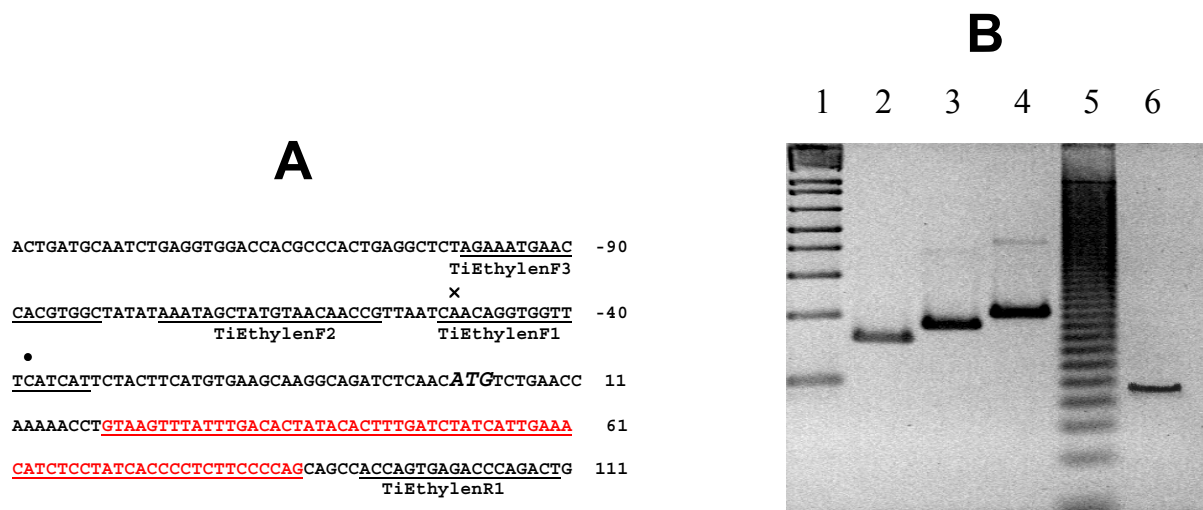


Abb. 24: Kartierung des Transkriptionsstartpunktes des *S. domuncula* SNZ-Gens. Um das 5'-Ende und somit den Transkriptionsstartpunkt der *S. domuncula* ERR_SUBDO cDNA zu bestimmen, wurde die RT-PCR Technik angewendet.

(A) zeigt die genomische Nukleotidsequenz von SD_SNZG. Die Primer, die für die RT-PCR Reaktion verwendet wurden, sind unterstrichen und benannt (TiEthylenR1 und TiEthylenF1-3). Das Start-Kodon ist in großen kursiven Lettern hervorgehoben. Das Intron ist rot unterstrichen. Das Ende der längsten sequenzierten cDNA ist mit (•), der putative Transkriptionsstartpunkt mit (×) markiert.

(B) zeigt ein 3,5%iges Metaphor[®]-Agarosegel. In den Spuren 1 und 5 sind die 1 Kb Plus DNA ladder (GIBCO) bzw. die 20 bp Super ladder (MBI) aufgetragen. In den Spuren 2 - 4 sind die Amplifikationsprodukte der Primerpaare TiEthylenR1/F1 (160 bp), TiEthylenR1/F2 (185 bp) und TiEthylenR1/F3 (208 bp) aufgetragen. Als *Template* für diese Positivkontrolle diente hier λ EC. In Spur 6 wurde das RT-PCR Produkt des Primerpaares TiEthylenR1/F1 aufgetragen. Es ist 92 bp lang, da Intron I (68 bp) fehlt. Die anderen Primerkombinationen ergaben kein Produkt der korrekten Größe.

Anschließend wurde aus *S. domuncula* Gewebe Total-RNA isoliert (2.15.2). Es folgte eine reverse Transkription mit TiEthylenR1 als Primer (2.15.4). Die entstandene cDNA wurde mit den drei oben genannten Primerpaaren in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Die RT-PCR Produkte wurden in den *pGEM[®]-T* Vektor subkloniert (2.12.7.1) und zur Kontrolle sequenziert (2.12.20).

Bei der PCR-Positivkontrolle mit λ EC konnten mit allen drei Primerkombinationen einzelne PCR-Produkte der erwarteten Größe (160, 185 und 208 bp) im Elektrophoresegel sichtbar gemacht werden (Abb. 24 B). Die RT-PCR-Produkte der richtigen Größe konnten nur für die Primerkombination TiEthylenR1/F1 (92 bp ohne Intron) nachgewiesen werden (Abb. 24 B). Die Verifizierung erfolgte durch anschließende Sequenzierung dieses Amplifikats. Die übrigen Primerkombinationen zeigten im Elektrophoresegel ausnahmslos unspezifische Amplifikationsprodukte. Daraus konnte geschlossen werden, daß der Transkriptionsstartpunkt der cDNA zwischen den Positionen der Primer TiEthylenF1 und -F2 lokalisiert ist. Computergestützte Analysen (2.22), die auch die Position der TATA-Box berücksichtigen, machen einen Transkriptionsstartpunkt bei nt -50 wahrscheinlich (Abb. 24 A).

3.4.4 Konstruktion der SNZ/SNO 5'-Luciferase- und EGFP-Fusionsplasmide

Die Anordnung von SD_SNZG und SD_SNO ließ vermuten, daß die zwischen diesen beiden Genen liegende 5'-Region eine bidirektionale Promotoraktivität aufweisen würde. Aus diesem Grund wurde diese Region in beiden Orientierungen in die multiple Klonierungstelle des pGL2-Basic Vektors eingefügt. Da sich auch innerhalb von Intronsequenzen regulative Elemente befinden können, wurde auch jeweils eine längere Sequenz, die die beiden Introns des SNO-Gens bzw. das erste Intron des SNZ-Gens umfassten, in die multiple Klonierungsstelle von pGL2-Basic eingesetzt (Abb. 7 und 2.16). Die längere 5'-Sequenz, die die beiden Introns des SNO-Gens beinhaltete, wurde auch in den pEGFP-Basic Vektor (Abb. 8 und 2.17) inkloniert.

Die Klonierung erfolgte wie unter 2.16 und 2.17 beschrieben. Die *Reverse* Primer für die Klonierung in pGL2/pEGFP-Basic trugen in ihren 5'-Enden Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bgl II* bzw. *Hind III* und wurden in Kombination mit *Forward* Primern eingesetzt, die Erkennungssequenzen für *Kpn I* bzw. *Xho I* trugen. Folgende Primerpaare wurden für die Amplifikation der SNZ-5'-Fragmente verwendet (2.11.7.2 und Abb. 17): BiPromR0/EthylenGFPr1 (nt -4 bis -24) mit BiPromF0/EthylenGFPf1 (nt -908 bis -888) mit einer Fragmentlänge von 905 bp (Plasmidname:

pGL2-SNZ1/pEGFP-SNZ1); BiPromR1 (nt -4 bis -24) mit BiPromF1 (nt -320 bis -301) mit einer Fragmentlänge von 317 bp (Plasmidname: pGL2-SNZ2). Folgende Primerpaare wurden für die Amplifikation der SNO-5'-Region benutzt (**2.11.7.2** und **Abb. 21**): BiPromR2 (nt -19 bis nt -38) mit BiPromF2 (nt -335 bis -315) mit einer Fragmentlänge von 317 bp (Plasmidname: pGL2-SNO1); BiPromR2 (nt -19 bis -38) mit BiPromF3 (nt -584 bis -560) mit einer Fragmentlänge von 566 bp (Plasmidname: pGL2-SNO2). Eine schematische Übersicht der konstruierten Plasmide ist in **Abb. 32** dargestellt.

3.5 Charakterisierung der *S. domuncula* cPKC-Klone

3.5.1 Analyse der Primärstruktur

Von den beiden einzeln vorliegenden λ PKC-Klonen wurde nur λ PKC B weiterbearbeitet. Nachdem von diesem Klon die λ -DNA isoliert worden war (2.12.15), wurde eine Restriktionsanalyse (2.12.6) mit den drei Enzymen *Sal I*, *Sac I* und *Xba I*, deren Erkennungssequenzen in der MCS des λ FIX[®] II Vektor (Abb. 6) doppelt vorhanden und somit geeignet sind, das komplette Insert auszuschneiden, durchgeführt (Abb 25). Ein Southern Blot (2.12.19.1) des Agarosegels dieser Restriktionsanalyse zeigte, daß von den 5 λ PKC B *Sac I* Fragmenten (4,3, 3,5, 2,3 und 2 x 2,0 kb) diejenigen der Länge 4,3 und 2,3 kb (Abb. 25) mit der DIG-markierten Sonde, die auch zum Screening verwendet worden war, hybridisierten. Diese beiden Fragmente wurden in den Vektor pBluescript SK II subkloniert (2.12.7.2) und mit Standardsequenzierprimern (2.11.8) ansequenziert (2.12.20). Hierbei stellte sich heraus, daß Klon λ PKC B2,3 die 5'-flankierende Region des PKC-Gens enthielt. Dieser Klon wurde nun mit Hilfe von IRD800 markierten internen Primern (SubPKCf1/f2/f3/r1; 2.11.8) komplett sequenziert.

Die 2214 bp lange Sequenz von λ PKC B2,3 (Abb. 26) enthält die ersten beiden Exons (143 bzw. 35 bp) des *S. domuncula* cPKC-Gens. Diese stimmen in der Abfolge ihrer Nukleotide zu 100% mit der entsprechenden cDNA (cPKC1Sub; KRUSE, 1998b) überein. Die beiden Exons werden von einem 194 bp langen Intron (nt 144 bis 337) unterbrochen. Das zweite Intron umfasst bis zur *Sac I* Schnittstelle 62 bp. Die übrigen 1780 bp der Sequenz stellen 5'-flankierende Region des cPKC-Gens dar.

Die Primärstruktur und die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses Gens bzw. der cDNA sind bei KRUSE (1998b) ausführlich besprochen.

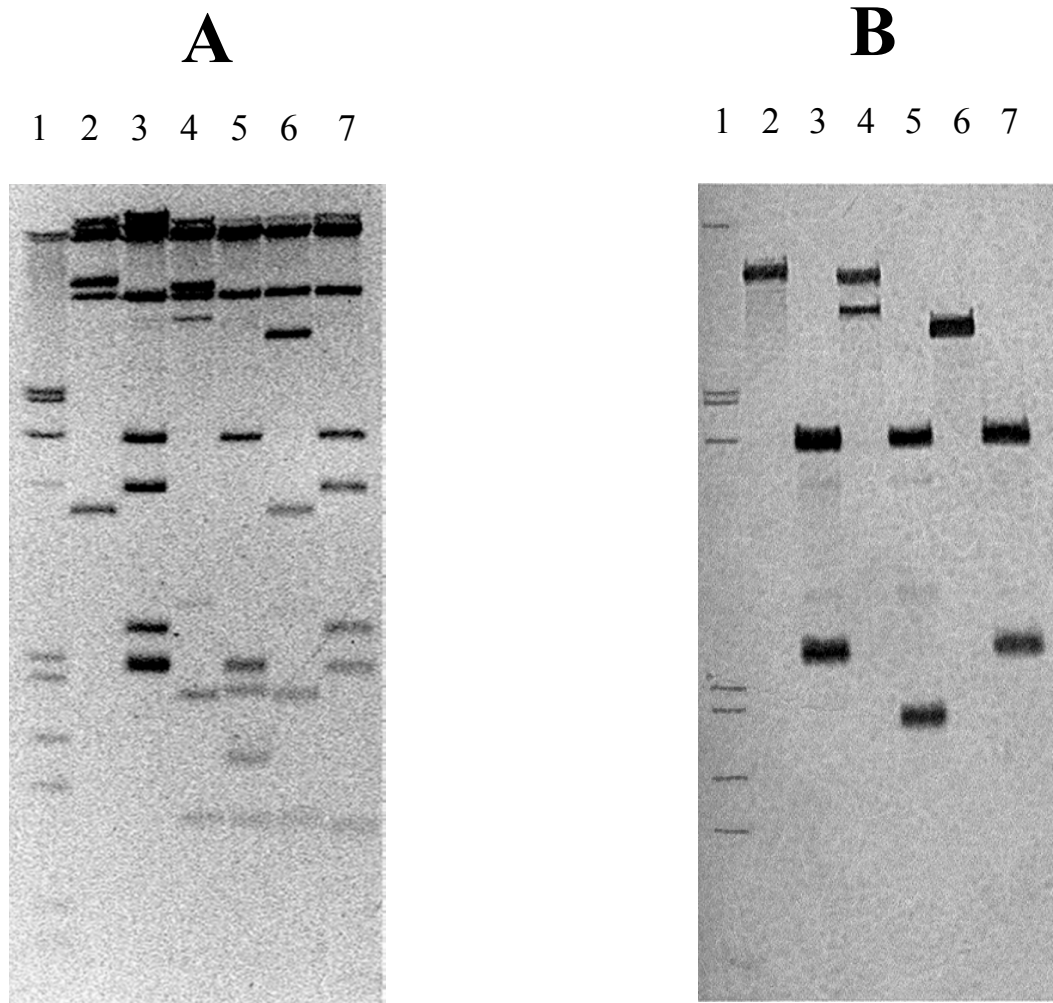


Abb. 25: Southern Blot des λ PKC B-Klons. Bild 25 A zeigt den Verdau des ~14 kB langen λ PKC B-Klons mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen. 25 B zeigt den entsprechenden Southern Blot.

- Spur 1:** *DNA Molecular Weight Marker III DIG-labeled*
- Spur 2:** *Sal I* Verdau von λ PKC B.
Die Fragmentlängen betragen ca. 11,7 und 3,3 kb, was einer Gesamtlänge von ca. 15 kb entspricht. Mit der spezifischen Sonde hybridisierte das Fragment bei 11,7 kb.
- Spur 3:** *Sac I* Verdau von λ PKC B.
Die Fragmentlängen betragen ca. 4,3, 3,5, 2,3 und 2 x 2,0 kb. Die Fragmente 4,3 und 2,3 kb hybridisierten mit der spezifischen Sonde.
- Spur 4:** *Xba I* Verdau von λ PKC B.
Die Fragmentlängen betragen ca. 8,0, 2,4, 1,8, 1,2 und 0,6 kb. Bei 10,4 kb befindet sich ein unvollständig verdautes Fragment. Positive Signale sieht man bei 8,0 und 10,4 kb (10,4 kb unvollständig verdaut).
- Spur 5:** *Sac I/Xba I* Doppelverdau von λ PKC B.
Die Fragmentlängen betragen ca. 4,3, 2x 2,0, 1,9, 1,5, 1,2 und 0,6 kb. Positive Signale erkennt man bei 4,3 und 1,9 kb.
- Spur 6:** *Sal I/Xba I* Doppelverdau von λ PKC B.
Die Fragmentlängen betragen ca. 6,0, 3,3, 1,9, 1,2 und 0,6 kb. Positive Signale erkennt man bei 6,0 kb.
- Spur 7:** *Sal I/Sac I* Doppelverdau von λ PKC B.
Die Fragmentlängen betragen ca. 4,3, 3,5, 2,3, 2,0, 1,2 und 0,8 kb. Positive Signale erkennt man bei 4,3 und 2,3 kb.

<u>GAGCTCACATCTAGTTGTTCCACTAGTTGCATTTCCACTCTCATCAAGTCATGTTCCAGAGTGTCAATAGCTTTGGCAAT</u>	-1701
CTCCTTGGCGACACCCTCCCCTCCCTGGGCCGATCTAATTGCTACTCTAGGGAGTAACTGGATGCAAAAACAACTTAGA	-1621
AAGAGTAATGATTTAGTCATTTGTACAAAACCTCTTGTGTTGAGTGCCTCAAACCTTGAAACCTCTCAACCGATTGTTGCT	-1541
GGTTCCTAGCACAGGCCAGTTGATGAGCATGTTGGTAGTCTGTCTTCTCCTTCAACCTTTTTCTCTTCTCTAGACCA	-1461
ACCTTGACCAGATGGTTACAACATTGAACAACTCAGTCTCATATCTAGAAAATGACAAGAGAGACTAACTGAGTGTAAAC	-1381
ACGAGTGGAGTCAAAAACACTATTTCTTACTTGTCCAACATTTCTGGGACTTCTGGTAAATGTATAAACTTGGCCGCTC	-1301
ATTGCTCTTCAAAGAGCTTCTCAAACAACAACCTCTCCTCAAACCATCAACATAAGCAGACTGCAGAGGCATTGAAC	-1221
AATTCTCAAATGATTATAGTCCATACATAACTTTGACTCAGTTTGTAGAGCTGGTCTTCTCTCCAACCTCTTTTTTTT	-1141
TCTCCTCCCTCCGTTCAACTTCTCTCTCTAAGTGTCTCACTTCCCTCAATTCCTCCATAAACTTTCTTTGGCTGCTTCT	-1061
CTCTGTGGACATAGCAAACATACTTACTTGTGTGTTAATTAACATTTGATGTAGTTACCTTTCATCCATGACCATTC	-981
TAAAGTCAAAGTAGACCAAGGTGGGGAGGTATGAAATGACAAAAGGATGAAATGACTCGCTGGAAAAGTGGGGGTTTCCC	-901
TTAAGGAAAGTGTCTGTAGTTTCTGAACTGACGTAGGTATTTGACCTGAGACACAACATAAGATCATGGATGTGATT	-821
pGL2PkcSubf2	
<u>AGTGCTAGGATACCCCAACCTACGTTTTCCAGGTCCTCAAGAGGTTGTTAGCTAATGAAAGGACTTGGAGATTGACCCAG</u>	-741
AGTATCCATGTTTTCTACTCTTGTGATGCGATTGTGAGCTAAACTGAGATCTCTCAAATGGTCAGTTTCTCTAAGCCAG	-661
TGATATTAGCTACATTGTTGAAAGACAGATCCAACCATTCCAAATGAACTAAGTGTGAGACCCAGCTACGCTCCTCAATA	-581
ATGTTGTTATCCAGTTGAAGTTTGACAAGCCCTGTGAATTGCCAGAGGTTCTCTATACGAAGGATGTCTGAAAAAGGGAA	-501
AGAGTACTAACATGACACTATATTAATGAGTAAAGGATTTCTCACTCTGAAAGTCAAGACGAATCTGGGTGCTTCTC	-421
CAAAATCAATTCCTTCTTCTTTAGCAATTCTCCCGCCTCTCCGCTGGGCCCTTGCTCGAGGACACACTTCTTGAGGAGG	-341
GCCTCGCGATCACATTAGGCTCGATAGTGTGTACAAATGAGTCATCTTCACTGACTTACTTAACTTGGCTTTGAGATT	-261
ACAAGTTTCTATAGCAACAGACACAGAGTCGATTGGTAAGGATCGTCCATTTGATTTCCACTCAATAAATTTAATAATG	-181
CGTCATTAGGCCTACCTAATTTACATTTCTATAGGTTTGGAAATGCAGCCCTTGAGAGGAAATACATCCTATCTCAATG	-101
TAACGACCCACCACATATTAACAAAACCTTGCCACTAACACCCTCATTTCAATTGCTTCCAAGCACAAAGTCTAAGA	-21
•	
<u>GTTAGTGGAAAGATAGTTAA</u> CAATGTCTGATAGCGGACAAGTACGACGCCCGAAGCGTAGAAATGCCGTGAGGCAGCGTCAA	60
pGL2PkcSubr2 MetSerAspSerGlyGlnValArgArgProLysArgArgAsnAlaValArgGlnArgGln	20
GTGGTCGAGATTCGTGGACACAAGTTTGTGCTCAACTATTTCAAGCAGTTTACCTTCTGTGGACTGCACAAGATTTTT	140
ValValGluIleArgGlyHisLysPheValLeuAsnTyrPheLysGlnPheThrPheCysGlyHisCysThrArgPheLe	47
ATG <u>GTCAGTTTATTGACAGTGCATGCCCTTGCATTGTTCAATTCAGTGTCTCTTTGTTTATCACCATTGTATGTTCTT</u>	220
uTrp [1]	48
<u>GTTACAATAACTAAGTATGAACTTGTCTACAAATTTGTGCATTTGTATGAAAACAAGCTTGGCCTGTTGATTAC</u>	300
<u>CATCTATTGTTTCTCTCCTCTCCGTGACCGACCCAG</u> GGGTGTGACAGGACCTCAAGGTTACAAATGCTTGTGTGAGTTT	380
GlyValThrGlyProGlnGlyTyrLysCysLeu [2]	59
<u>AGTTTGTGTTGCCCTGTCAAAGTGAATTGTATGTTGTTGAAACAATGTGAGCTC</u>	434

Abb. 26: Nukleotidsequenz von λ PKC B2,3. Die Intronsequenzen sind rot unterstrichen, die kodierende Region ist in schwarzen und die 5'-Region in blauen Lettern dargestellt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Exons ist im Drei-Letter Kode unterhalb der Nukleotidsequenz angegeben. Die Numerierung der Nukleotide der kodierenden Region und Introns sowie der 3'-Region beginnt mit +1 am Start-Kodon, die Numerierung der 5'-Region beginnt mit -1 unmittelbar nach dem Start-Kodon und geht bis -1780 (der *Sac I* Schnittstelle). Der Startpunkt der längsten sequenzierten cDNA (KRUSE, 1998b) ist mit einem Punkt (•) markiert, die *Sac I* Schnittstellen sind doppelt unterstrichen. Die Positionen der Primer, die für die Klonierung in den pGL2-Basic Vektor verwendet wurden, sind einfach unterstrichen und die Namen der Primer sind unterhalb der Sequenz angegeben.

3.5.2 Analyse der 5'-flankierenden Region des *S. domuncula* cPKC-Klons

Bei Untersuchung der 1780 bp langen 5'-flankierenden Region des *S. domuncula* cPKC-Gens (cPKCG1Sub) mit Hilfe der unter 2.22 aufgelisteten Computer- und Online-Programme konnte mit keinem dieser Programme eine TATA-Box ähnliche Struktur aufgespürt werden. Dies legt nahe, daß cPKCG1Sub wie viele Haushaltsgene, aber auch einige gewebespezifische Gene, einen TATA-losen proximalen Promotor besitzt (Übersichtsartikel: WEIS und REINBERG, 1992). Dies wird auch durch den Vergleich mit den bisher untersuchten 5'-Regionen von PKC-Genen der γ Isoform, mit

denen cPKCG1Sub die stärkste Identität auf Aminosäureebene teilt (KRUSE, 1998b), unterstützt. Weder in der 5'-flankierenden Region des entsprechenden Gens der Ratte (CHEN *et al.*, 1990; CHEN *et al.*, 1993), der Maus (TAKANAGA *et al.*, 1995) noch der des Menschen (MAHAJNA *et al.*, 1995) konnten klassische Kontrollelemente wie eine TATA- oder CCAAT-Box gefunden werden, die in geeignetem Abstand zum Transkriptionsstartpunkt liegen. Ansonsten weisen die 5'-Regionen dieser Gene nur wenig Gemeinsamkeiten mit der 5'-Region von cPKCG1Sub auf.

Eine putative CCAAT-Box in invertierter Form und eine GC-Box mit den Positionen nt -225 bis -229 bzw. nt -389 bis -381 konnten als "klassische" Promotorelemente (BUCHER, 1990) identifiziert werden. Desweiteren ein E-Box Motiv von nt -569 bis -564 (**Abb. 27**).

Zwei Konsensussequenzen der *cis*-wirksamen Elemente TRE (*TPA-Responsive Element*; nt -301 bis -295) und CRE (*cAMP-Responsive Element*; nt -183 bis -176) konnten ebenfalls lokalisiert werden. Die Konsensussequenzen dieser zwei Proteinbindenden Motive sind sich sehr ähnlich. Das TRE-Element (Konsensus: TGANTCA) wird bevorzugt von AP-1 Transkriptionsfaktoren, die ursprünglich als Homo- bzw. Heterodimere bestehend aus c-Fos und c-Jun definiert wurden, gebunden (Übersichtsartikel: ANGEL und KARIN, 1991; GÖTTLICHER *et al.*, 1997). Das CRE-Element (Konsensus: TGANNTCA) wird bevorzugt von der Familie von *cAMP-responsive nuclear* Faktoren gebunden, zu denen beispielsweise CREB, CREM, ATF und deren Spleißvarianten gehören (Übersichtsartikel: FOULKES und SASSONE-CORSI, 1996; LAMAS und SASSONE-CORSI, 1997). Beide Familien von Transkriptionsfaktoren gehören gemeinsam der Superfamilie der bZIP-Proteine (*basic leucine zipper proteins*) an. Die Leucin-Zipper Domäne dient der Dimerisierung der Proteine untereinander. An die DNA binden diese Dimere über eine gemeinsam gebildete Domäne mit einem hohen Anteil basischer Aminosäuren (ähnlich wie die bHLH-Transkriptionsfaktoren). Neueste Untersuchungen zeigen, daß nicht nur innerhalb der beiden Subfamilien Dimere gebildet werden können. Auch Mitglieder der Subfamilien untereinander können nach einem spezifischen "Dimerisationskode" funktionelle Heterodimere bilden. Die Spezifität wird dabei wahrscheinlich über die Leucin-Zipper Struktur der einzelnen Faktoren bestimmt (LAMAS und SASSONE-CORSI, 1997). Insgesamt ergibt sich hieraus ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren, die sich hinsichtlich ihrer DNA-Bindungsfähigkeit und Transaktivierungsfähigkeit stark unterscheiden.

Die ubiquitären AP-1 Transkriptionsfaktoren spielen bei vielen zellulären Funktionen eine wichtige Rolle. So nehmen sie beispielsweise bei der onkogenen Zelltransformation, der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und der Apoptose eine Schlüsselposition ein. Außerdem sind sie an der zellulären Antwort auf äußere Reize wie physikalischen und chemischen Streß beteiligt (GÖTTLICHER *et al.*, 1997).

Mitglieder der Familie der *cAMP-Responsive nuclear* Faktoren werden in Eukaryoten durch die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, deren Funktion durch cAMP gesteuert wird. Die Menge von cAMP in der Zelle wird primär durch die Tätigkeit des Enzyms Adenylatzyklase reguliert. Die Tätigkeit der Adenylatzyklase wiederum wird über verschiedene extrazelluläre Stimuli moduliert, die ihre Aktivität über G-Proteingekoppelte Rezeptoren vermitteln. Gene mit einem CRE-Element im Promotor sind damit direkt an einen wichtigen und phylogenetisch sehr alten Signaltransduktionsweg angekoppelt, der zumindest bei höheren Eukaryoten eine große Rolle in der Physiologie einer Reihe von neuroendokrinen Prozessen spielt (LAMAS und SASSONE-CORSI, 1997).

```

CATGGATGTGATTTAGTGCTAGGATACCCCAACCTACGTTTTCCAGGTCCTCCAAGAGGTTGTTAGCTAATGAAAGGACT -755
TGGAGATTGACCAGAGTATCCATGTTTTCTACTCTTTGTGATGCGATTGTGAGCTAAACTGAGATCTCTCAAATTGGTCAG -675
TTTCTCTAAGCCAGTGATATTAGCTACATTGTTGAAAGACAGATCCAACCATTCCAAATGAACTAACGTGTCGAGACCAG -595
CTACGTCCTCAATAATGTTGTTATCCAGTTGAAGTTTGACAAGCCCTGTGAATTGCCAGAGGTTCTCTATACGAAGGATG -515
TCTGGAAAAGGGAAAGAGTACTAACTAACTGCACTATATTAATGAGTAAAGGATTCTCACTCTGAAAGTCAAGACGAAT -435
CTGGGTGACTTCTCAAATAATTCCTTCTTTTGAACAATCTCCCGCCTCTCCGTCCTGGGCCTTGCTCGAGGACAC -355
ACTTCTTGAGGAGGGCCTCGCCGATCATTAGGCTCGATAGTGTGTACAAATGAGTCATCTTCATGTACTTACTTAAC -275
TTGGCTTTGAGATTACAAGTTTCTATAGCAACAGACACAGAGTCGATTGGTAAAGGATCGTCCATTGTATTTCCACTCAAT -195
AAATTTAATAATGACGCTCATTAGGCCTACCTAATTTACATTTCTATAGGTTTGGAAATGCAGCCCTTGAGAGGAAATTAC -115
ATCCTATCTCAATGTAACGACCCACCCACCATATTATCAAACTTGCCACTAACAACCCTCATTTCATTTGCTTCCAAG -35
      •
CACAAAGGTCTAAGAGTTAGTGGGAAGATAGTTAACATG 3

```

Abb. 27: 5'-flankierende Nukleotidsequenz von λ PKC B2,3, die für die Subklonierung in den pGL2-Basic Vektor verwendet wurde. Die Numerierung der 5'-Region beginnt mit -1 unmittelbar nach dem Start-ATG, das Start-ATG selbst ist groß, kursiv hervorgehoben. Der Startpunkt der längsten sequenzierten cDNA ist mit einem fetten Punkt markiert (•). Die putativen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind farbig hervorgehoben. Die CCAAT-Box ist **blaugrün**, die GC-Box **blau** und die E-Box **grün** markiert. Die beiden TRE- (TGANTCA) bzw. CRE-Elemente (TGANN**TCA**) sind **rot** hervorgehoben.

3.5.3 Konstruktion des *S. domuncula* cPKC 5'-Luciferase-Fusionsplasmids

Um die Aktivität des proximalen Promotors von cPKCG1Sub zu bestimmen, wurde wie unter 2.16 beschrieben, ein 834 bp langes 5'-flankierendes Fragment in den pGL2-Basic Vektor eingesetzt. Als *Forward* Primer diente pGL2PkcSubf2 (nt -834 bis -814; **Abb. 26** und **2.11.7.3**), der eine *Kpn I* Schnittstelle in seinem 5'-Ende enthielt. Als *Reverse* Primer diente pGL2PkcSubr2 (nt -1 bis -21; **Abb. 26** und **2.11.7.3**), der eine Schnittstelle für *Hind III* beinhaltete (Plasmidname: pGL2-PkcSub).

3.6 Charakterisierung der *G. cydonium* cPKC 5'-flankierenden Region

3.6.1 Analyse der 5'-flankierenden Region

Das Plasmid Prom1, das die 5'-Region (**Abb. 28**) des cPKC-Gens (*GCPKC2Ge*, Acc. No. Y17882) aus *G. cydonium* enthält, wurde mir von Hr. Dr. Michael Kruse zur Verfügung gestellt. Durch inverse PCR (TRIGLIA *et al.*, 1988) mit *Nco I* geschnittener genomischer DNA war ein 1,1 kb langes Fragment amplifiziert und in den *pGEM[®]-T* Vektor inkloniert worden (**2.12.7.1**). Nach anschließender Sequenzanalyse konnte die das Start-Kodon 5'-flankierende Region des Gens um 489 nt gegenüber der bis zu diesem Zeitpunkt längsten sequenzierten cDNA ergänzt werden.

Die insgesamt 555 bp lange 5'-Sequenz (**Abb. 28**) wurde mit Hilfe diverser *Online*-Programme zur Identifikation *cis*- und *trans*-wirksamer Elemente analysiert (**2.22**). So konnte mit einem Programm (MILANESI *et al.*, 1996) ein TATA-Box ähnliches Motiv in Position nt -101 bis -92 lokalisiert werden. Andere Programme konnten dies nicht verifizieren. Außerdem weisen experimentelle Daten (**3.6.2** und **Abb. 29**) darauf hin, daß diese 5'-flankierende Region wie die der *S. domuncula* cPKC einen TATA-losen Promotor beinhaltet. Wie in den 5'-flankierenden Regionen der übrigen bis jetzt charakterisierten cPKC-Gene (CHEN *et al.*, 1993; TAKANAGA *et al.*, 1995; MAHAJNA *et al.*, 1995) konnte auch hier keine CCAAT-Box identifiziert werden. An "klassischen" Promotorelementen (BUCHER, 1990) konnten lediglich drei GC-Boxen (nt -159 bis -150; nt -306 bis -297 und nt -386 bis -377) lokalisiert werden.

Auch drei mögliche TRE/CRE-Elemente (nt -345 bis -338; nt -253 bis -239 und nt -217 bis -211; GÖTTLICHER *et al.*, 1997; LAMAS und SASSONE-CORSI, 1997), die allerdings nicht perfekt mit der Konsensussequenz übereinstimmen, wurden mit Hilfe der *Online*-Programme aufgespürt.

Desweiteren wurden eine E-Box (nt -480 bis -475) und eine nicht ganz perfekte inverse NF- κ B Bindestelle (nt -330 bis -321; Übersichtsartikel: BAEUERLE und BALTIMORE, 1996; SCHRECK *et al.*, 1997; DELFINO und WALKER, 1999) vorhergesagt. NF- κ B ist der Prototyp einer ubiquitären Familie von weit verbreiteten dimeren Transkriptionsfaktoren, die über die ca. 300 As umfassende RHD-Domäne (*Rel homology domain*) an die DNA binden, dimerisieren und an I κ B Inhibitoren binden. In Säugetierzellen wurden bis jetzt fünf NF- κ B Untereinheiten, die Dimere bilden können, identifiziert: RelA, RelB, c-Rel, p50 und p52. Ähnlich wie bei der Familie der Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren unterscheiden sich die einzelnen Heterodimere hinsichtlich ihrer DNA-Bindungs- und Transaktivierungsfähigkeit. Das p50/RelA

Heterodimer bindet beispielsweise bevorzugt das Konsensusmotif GGGRNNYYCC, während das RelA/c-Rel Heterodimer bevorzugt das Konsensusmotiv G/TGGARNYYCC bindet. Die Aktivität der NF- κ B Faktoren wird durch einen zweiten strukturell verwandten Satz von Proteinen reguliert, die als I κ B (*inhibitors of NF- κ B*) zusammengefaßt werden. Diese Proteine besitzen fünf bis sieben Wiederholungen des Ankyrin *repeats*, über die sie mit der RHD-Domäne interagieren. In Säugetierzellen wird NF- κ B durch Wachstumsfaktoren, Cytokine, bakterielle und virale Produkte und Umweltstreß aktiviert. Bindestellen für NF- κ B wurden in den Promotoren und Enhancern einer großen Anzahl von Genen gefunden (SCHRECK *et al.*, 1997).

Ein *inverted repeat* (nt -474 bis -468 und nt -457 bis -451), der als Bindestelle für einen bisher nicht charakterisierten Transkriptionsfaktor dienen könnte, wurde ebenfalls entdeckt.

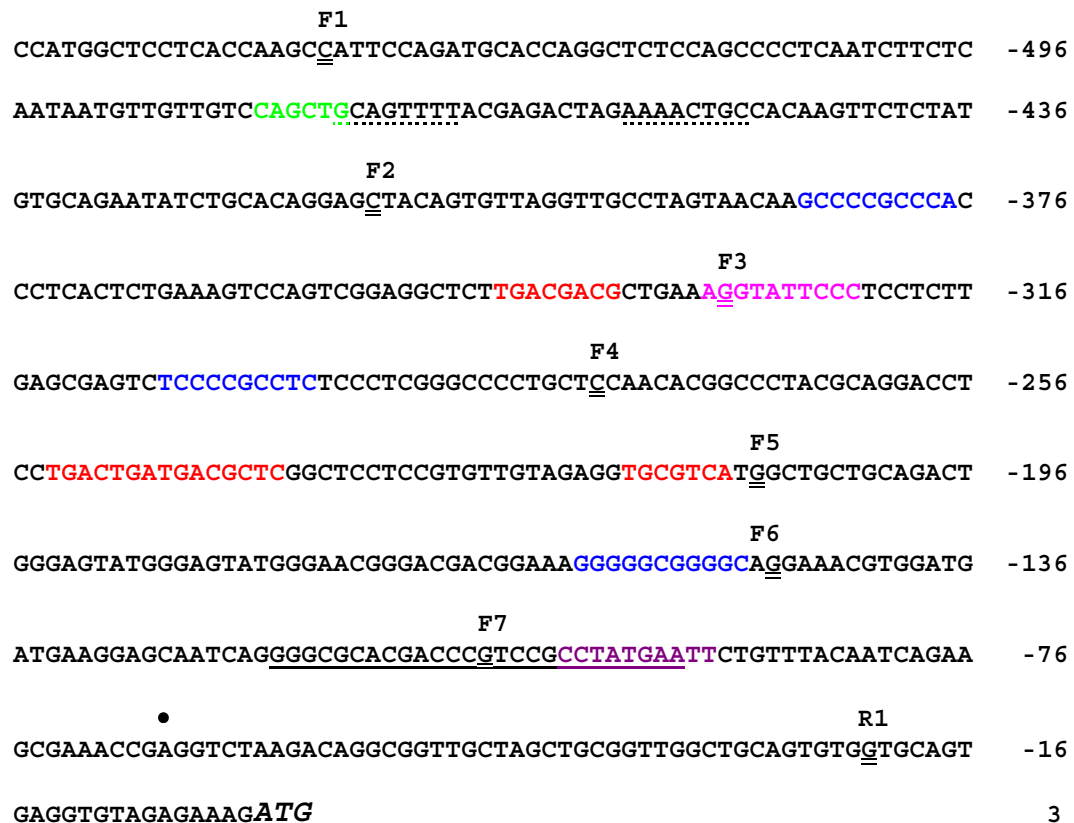


Abb. 28: Nukleotidsequenz *upstream* des Start-Kodons von GCPKC2Ge. Die Numerierung der 5'-Region beginnt mit -1 unmittelbar nach dem Start-ATG, das Start-ATG selbst ist groß, kursiv hervorgehoben. Der Startpunkt der längsten sequenzierten cDNA ist mit einem fetten Punkt markiert (•). Die Region, in der sich der kartierte Transkriptionsstartpunkt befindet, ist einfach unterstrichen. Die 5'-Enden der für die Konstruktion der Luciferase-Fusionsplasmide verwendeten *Forward* Primer sind mit einer doppelten Unterstreichung und mit darüber stehenden Numerierungen (F1-F7) gekennzeichnet. Das 3'-Ende des *Reverse* Primers ist ebenfalls doppelt unterstrichen und gekennzeichnet (R1). Die durch die *Online*-Programme vorausgesagten *cis* wirksamen Elemente sind in verschiedenen Farben dargestellt. Das TATA-Box ähnliche Motiv ist **violett**, die drei GC-Boxen sind **blau**, die drei putativen TRE/CRE Elemente sind **rot**, die NF- κ B Bindestelle ist **rosa** und die E-Box ist **grün** gekennzeichnet. Der auffällige *inverted repeat* ist punktiert unterstrichen.

3.6.2 Kartierung des Transkriptionsstartpunktes von *GCPKC2Ge*

Die längste cDNA von *GCPKC2Ge*, die aus der *G. cydonium* cDNA-Bibliothek isoliert wurde, beginnt bei nt -66 relativ zum Start-Kodon (KRUSE *et al.*, 1996). Um die ungefähre Lage des Transkriptionsstartpunktes zu ermitteln, wurde wiederum die RT-PCR Technik angewendet. Dazu wurden ein *Reverse* Primer (PKCTir1; nt -1 bis 18) und mehrere *Forward* Primer (PKCTif1/f2/f3/f4; nt -65 bis -46; nt -105 bis -84; nt -129 bis -110; nt -163 bis -145) anhand der genomischen Sequenz konstruiert (**Abb. 29 A**). Diese wurden zuerst in einer normalen PCR mit dem Plasmid Prom1 als *Template* auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Danach wurde aus *G. cydonium* Gewebe Total-RNA isoliert (**2.15.2**) und mit einem oligo(dT) Primer bzw. mit PKCTir1 revers transkribiert (**2.15.4**). Die so synthetisierte einzelsträngige cDNA wurde in anschließenden PCR-Reaktionen mit den oben aufgeführten Primerpaaren als *Template* eingesetzt. Die resultierenden RT-PCR-Produkte wurden in den *pGEM[®]-T* Vektor subkloniert (**2.12.7.1**) und anschließend zur Kontrolle sequenziert (**2.12.20**). Als Negativkontrolle wurden die PCR-Reaktionen ausschließlich mit RNA als *Template* durchgeführt, um eventuelle Kontaminationen durch genomische DNA auszuschließen.

Bei der Positivkontrolle mit klonierter genomischer DNA konnte mit allen vier Primerkombinationen einzelne PCR-Produkte der erwarteten Größe (83, 133, 144 bzw. 181 bp) sichtbar gemacht werden (**Abb. 29 B**). Die RT-PCR-Produkte der richtigen Größe konnten auch mit den Primerkombinationen PKCTir1/f1 und PKCTir1/f2 nachgewiesen werden (**Abb. 29 C**). Im Gegensatz dazu wurde bei den beiden anderen Primerpaaren (PKCTir1/f3 und PKCTir1/f4) kein RT-PCR-Produkt der korrekten Länge festgestellt. Das bedeutet, daß der Transkriptionsstartpunkt zwischen den Primern PKCTir3 und PKCTir2 lokalisiert sein muß. Er konnte mit dieser Methode auf den Bereich zwischen den Nukleotiden -119 und -94 eingegrenzt werden (**Abb. 29 A**). Das TATA-Box ähnliche Motiv in Position nt -101 bis -92 kommt damit nicht mehr als Bindestelle für die RNA-Polymerase II in Frage.

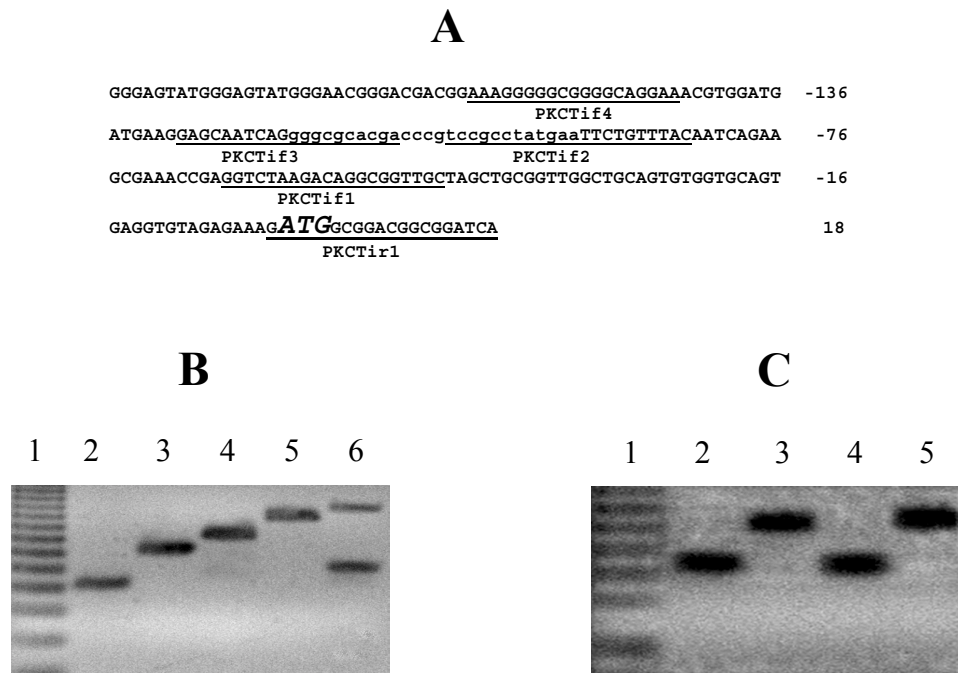


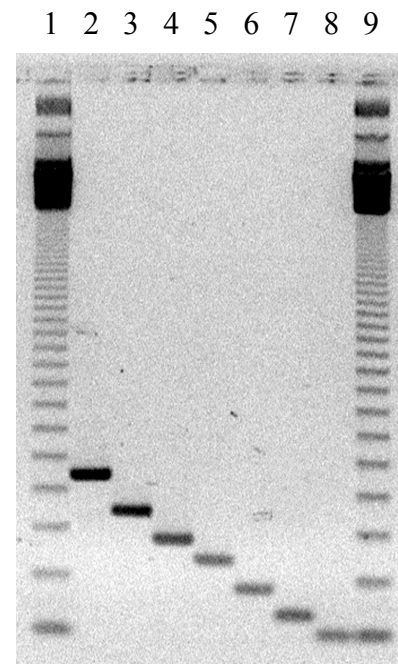
Abb. 29: Kartierung des Transkriptionsstartpunkt des *G. cydonium* cPKC-Gens. Um das 5'-Ende und somit den Transkriptionsstartpunkt der *G. cydonium* cPKC cDNA zu bestimmen, wurde die RT-PCR Technik (2.15.4) angewendet.

- (A) zeigt einen Teil der 5'-flankierenden genomischen Nukleotidsequenz des *G. cydonium* cPKC-Gens (*GCPKC2Ge*). Die Primer, die für die RT-PCR Reaktion verwendet wurden, sind unterstrichen und benannt (PKCTif1-4 und PKCTir1). Das Start-Kodon ist in großen, kursiven Lettern hervorgehoben. Die Region, die den Startpunkt der Transkription enthält, ist in kleinen Lettern dargestellt.
- (B) zeigt ein 3,5%iges Metaphor[®]-Agarosegel mit den Positivkontrollen der PCR-Reaktion. In Spur 1 ist die *20 bp Super ladder* (MBI), in Spur 6 die *1 Kb Plus DNA ladder* (GIBCO) aufgetragen (nur die untersten zwei Banden (100 und 200 bp) sind hier zu sehen). In den Spuren 2 - 5 sind die Amplifikationsprodukte der Primerpaare PKCTir1/f1-f4, bei denen das Plasmid Prom1 als *Template* diente, aufgetragen. Die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente beträgt 83, 133, 144 und 181 bp. Dieses Gel diente als Positivkontrolle für die Funktionsfähigkeit der Primerpaare.
- (C) zeigt ein 3,5%iges Nusieve[®]-Agarosegel mit den RT-PCR Produkten der Primerpaare PKCTir1/f1 und PKCTir1/f2. Dabei wurde in den Spuren 2 und 3 ein oligo(dT)-Primer als *Reverse* Primer während der RT-Reaktion eingesetzt, in den Spuren 4 und 5 diente PKCTir1 als *Reverse* Primer. In Spur 1 ist wiederum die *20 bp Super ladder* als Marker aufgetragen. Mit den Primerpaaren PKCTir1/f3 und PKCTir1/f2 war kein Amplifikationsprodukt der richtigen Größe zu erkennen (nicht abgebildet).

3.6.3 Konstruktion der cPKC 5'-Luciferasedeletionsklone und des cPKC 5'-EGFP-Fusionsplasmids

Um den proximalen Promotor des *G. cydonium* cPKC-Gens und dessen Aktivität zu analysieren, wurden eine Reihe von Luciferasefusionsplasmiden konstruiert, bei denen unterschiedlich lange Fragmente der cPKC 5'-flankierenden Region in die multiple Klonierungsstelle des pGL2-Basic Vektors einkloniert wurden (2.16). Außerdem wurde das längste dieser Fragmente in den pEGFP-Basic Vektor einkloniert (2.17).

Abb. 30: Deletionsklone des *G. cydonium* cPKC-5'-Bereichs. Bei diesem 1%igen Agarosegel sind in den Spuren 1 und 9 der 123 bp Marker der Firma GIBCO aufgetragen. In den Spuren 2 - 8 sind die Amplifikationsprodukte der Primerpaare PKCr1/f1-f7 zu sehen. Diese PCR-Produkte wurden über die Restriktionsschnittstellen *Bgl II* und *Kpn I* in den pGL2-Basic Vektor eingefügt.



Die Klonierung in die Vektoren erfolgte wie in 2.16 beschrieben über Primer, die in ihren 5'-Enden die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bgl II*, *Kpn I* bzw. *Xho I* trugen (2.11.7.1). Für die Klonierung in den pGL2-Basic Vektor wurde PKCr1 (nt -22 bis -1; Abb. 28) als *Reverse* Primer, die Oligonukleotide PKCf1 (nt -538 bis -520) PKCf2, (nt -413 bis -392), PKCf3 (nt -331 bis -301), PKCf4 (nt -279 bis -262), PKCf5 (nt -279 bis -262), PKCf6 (-148 bis -129) und PKCf7 (nt -106 bis -86; alle Abb. 28) als *Forward* Primer eingesetzt (Plasmidnamen: pGL2-PKC1-7). Die Position der *Forward* Primer wurde dabei so gewählt, daß die durch die *Online*-Programme vorhergesagten, putativen *cis*-wirksamen Elemente nach und nach wegfielen (Abb. 28 und Abb. 30). Dies bezeichnet man auch als Deletionsanalyse. Mit den einzelnen Primerkombinationen wurden so sieben verschiedene Fragmente absteigender Größe (538, 413, 331, 279, 209, 148 und 106 bp; Abb. 30) amplifiziert. Für die Klonierung in den pEGFP-Basic Vektor wurde das Primerpaar PKCf1-EGFP (nt -538 bis -520) und PKCr1-EGFP (nt -22 bis -1) eingesetzt (2.11.7.1) (Plasmidname: pEGFP-PKC).

3.7 Funktionelle Analyse von 5'-flankierenden Regionen der Schwammgene in NIH 3T3 Zellen

Die funktionelle Analyse der 5'-Regionen von Schwammgenen ist problematisch, da bis jetzt noch von keiner Schwammspezies eine kontinuierliche Zelllinie etabliert wurde (1.3.4.2). Kürzlich ist es zwar gelungen eine primäre Zellkultur, die über einen längeren Zeitraum hinweg stabil bleibt, in Form von Primmorphen für *S. domuncula* zu etablieren (CUSTODIO *et al.*, 1998; MÜLLER *et al.*, 1999a). Für funktionelle Promotorstudien sind diese Kulturen dennoch ungeeignet, da die Formierung dieser Primmorphe ca. 1 Woche in Anspruch nimmt und die Proliferationsrate sehr niedrig ist (1.3.4.2). Auch die Techniken, Schwämme zu transfizieren, befinden sich noch im Anfangsstadium (3.8). Da die vorhergesagten *cis*-wirksamen Elemente jedoch große Übereinstimmungen mit den Konsensussequenzen höherer Organismen aufweisen, wurde die NIH 3T3 Mäusefibroblasten Zelllinie ausgewählt, um die Aktivitäten der putativen Schwamm promotoren zu testen.

3.7.1 Analyse der *G. cydonium* cPKC 5'-Luciferasedeletionsklone

Die Transfektionen der Luciferasedeletionsklone in die NIH 3T3 Zellen wurde wie unter 2.18.5 beschrieben als Kotransfektion mit dem pCMV- β -Gal Vektor, der als interner Standard für die Transfektionseffektivität diente, durchgeführt. Als Negativkontrolle diente der pGL2-Basic Vektor, als Positivkontrolle der pGL2-Promoter Vektor, der den SV40 Promotor enthält. Ca. 42 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert (2.18.6.1) und sowohl die Luciferase- (2.18.6.3) als auch β -Galaktosidaseaktivität (2.18.6.2) bestimmt. Anschließend wurden die Werte der Luciferaseaktivität (gemessen in RLU) mittels der Werte der β -Galaktosidaseaktivität (gemessen als Extinktion bei 420 nm) normalisiert (RLU/E₄₂₀). Die Luciferaseaktivität wurde dann im Verhältnis zur Positivkontrolle (pGL2-Promoter) in Prozent angegeben. Die in Abb. 31 und im weiteren Text angegebenen Aktivitäten sind das Resultat von mindestens drei unabhängigen Transfektionsexperimenten, die wenigstens doppelt für jedes einzelne Konstrukt durchgeführt wurden.

Die durchschnittlichen Luciferaseaktivitäten der einzelnen Konstrukte (3.6.3) sind in Abb. 31 zusammengefaßt. Die höchste Luciferaseaktivität von $50 \pm 15\%$ in Relation zum SV40 Promotor zeigte das längste Konstrukt (pGL2-PKC1), welches die Nukleotide -538 bis -1 umfaßt. Eine Deletion von 124 bp (pGL2-PKC2) reduzierte die Luciferaseaktivität um knapp 30%. Dies deutet auf eine wichtige Rolle des E-Box

Motivs bzw. des *inverted repeats* (Abb. 28) hin. Die folgenden Deletionen von 81 bzw. 51 bp (pGL2-PKC3 und 4) reduzierten die Promotoraktivität nicht weiter. Sie war im Vergleich zu pGL2-PKC2 sogar um etwa 10% stärker. pGL2-PKC5 zeigt eine im Vergleich zu pGL2-PKC3 und 4 um 10% reduzierte Aktivität. Möglicherweise hängt dies mit der Deletion der zwei putativen TRE/CRE-Elemente zusammen. pGL2-PKC6 und 7 schließlich zeigten keine signifikante Promotoraktivität mehr. Dies machte auch ein Vergleich mit der Aktivität des pGL2-Basic Vektors (Negativkontrolle) deutlich. Für beide Konstrukte sowie für den pGL2-Basic Vektor wurden nur noch Aktivitäten von $3 \pm 1,5\%$ gemessen. Für den Verlust der Promotoraktivität ist wohl die Deletion der GC-Box in Position -159 bis -150 verantwortlich. Das TATA-ähnliche Motiv in Position nt -101 bis -92 allein konnte keine Transkription initiieren.

G. cydonium cPKC Promotor-Konstrukte

Luciferaseaktivität in %

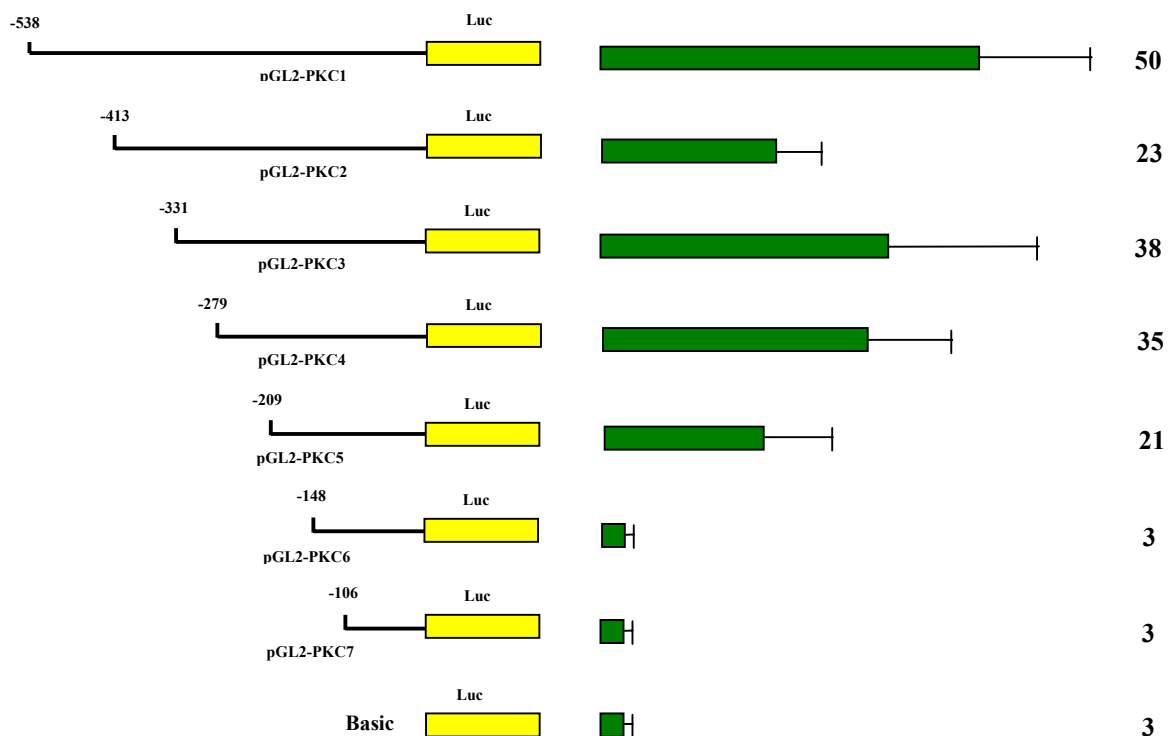


Abb. 31: Luciferaseaktivität der 5'-flankierenden Region des *G. cydonium* cPKC-Gens. Im Bild links sind schematisch die sieben unterschiedlich langen 5'-flankierenden Regionen des cPKC-Gens, die mit dem Luciferasereporter gen fusioniert wurden (3.6.3), dargestellt. Rechts sind die durchschnittlichen mit Hilfe der β -Galaktosidaseaktivitäten normalisierten Luciferaseaktivitäten der einzelnen Konstrukte mit Standardabweichungen graphisch dargestellt und in Prozent angegeben. Die Luciferaseaktivitäten, die aus mindestens drei jeweils zumindest doppelt durchgeführten, unabhängigen Transfektions-experimenten bestimmt wurden, berechnete man in Relation zu der Luciferaseaktivität, die mit dem Vektor pGL2-Promoter gemessen wurde. Dieser Vektor enthält den SV40 Promotor. Der ebenfalls transfizierte pGL2-Basic Vektor diente als Negativkontrolle.

3.7.1.1 Effekte des physiologischen Zustands der NIH 3T3 Zellen auf die Promotoraktivität des cPKC-Gens

Mitglieder der Gruppe der *conventional* PKCs (PKC α , PKC β I/ β II und PKC γ), zu der auch *GCPKC2Ge* gehört, stellen zusammen mit der Gruppe der *novel* PKCs die zellulären Rezeptoren für DAG und tumorfördernde Phorbolster wie PMA (=TPA) dar (Übersichtartikel: NEWTON, 1995). Die durch die Bindung dieser Substanzen ausgelöste Aktivierung der PKCs wirkt sich auf die Regulation verschiedener zellulärer Vorgänge wie Genexpression, Zellproliferation und -differenzierung und vieles weitere mehr aus (NISHIZUKA, 1984). So wird unter anderem auch die Expression und die mRNA Konzentration der humanen PKC β Isozyme in HL-60 Zellen nach Behandlung mit PMA bis zu fünfmal gesteigert (MCSWINE-KENNICK *et al.*, 1991). Auch die Expression von Reportergenen, die unter der Kontrolle der 5'-Regionen der humanen PKC β und γ Gene standen, erhöht sich nach Applikation von PMA tlw. erheblich (OBEID *et al.*, 1992; MAHAJNA *et al.*, 1995). Es liegt eine klassische Form der Autoregulation vor. Für eine Modulation der Transkription etlicher Gene als Antwort auf Phorbolsterbehandlung wird unter anderem auch der Transkriptionsfaktorkomplex AP-1 verantwortlich gemacht, der an das TRE bindet (ANGEL *et al.*, 1987). Da in der 5'-Region der Schwamm cPKC drei putative Bindestellen für diesen Faktor vorhanden waren, sollte getestet werden, ob sich die Luciferaseaktivität in Zellen, die mit pGL2-PKC1 bis 7 (3.6.3) transfiziert worden waren, nach Behandlung mit PMA signifikant erhöhen würde. Für diesen Versuch wurde weiterhin mit NIH 3T3 Zellen gearbeitet, denn für diese Zelllinie ist eine Erhöhung des AP-1 Levels nach Phorbolsterbehandlung bekannt (HOPE und STRUHL, 1985).

Die Zellen wurden mit allen sieben Konstrukten transfiziert und 24 h nach der Transfektion für 16 h mit 50 ng/ml PMA inkubiert, eine Konzentration, die die Promotoraktivität der humanen PKC β und γ deutlich hochregulieren konnte (OBEID *et al.*, 1992; MAHAJNA *et al.*, 1995). Die Hochregulierung der Promotoraktivität erfolgte bei diesen Experimenten allerdings in AP-1 unabhängiger Art und Weise, da die Steigerung der Luciferaseaktivität auch dann erfolgte, als das putative TRE deletiert worden war. Die benötigten *trans*-Faktoren bzw. *cis*-Elemente für diese Aktivierung konnten noch nicht identifiziert werden.

Eine Steigerung der Promotoraktivität in Form von erhöhter Luciferaseaktivität konnte für keines der sieben transfizierten Konstrukte festgestellt werden. Die Aktivitäten blieben alle auf einem ähnlichen Level, wie sie zuvor für unbehandelte Zellen erreicht worden war (z. B. $53 \pm 15\%$ für Konstrukt 1). Dies könnte erstens bedeuten, daß die

putativen TRE im Schwammpromotor nicht in der Lage sind, den AP-1 Faktor der Säugerzellen zu binden und zweitens, daß der Schwammpromotor nicht über diejenigen *cis*-Elemente verfügt, wie sie für die gesteigerte Aktivität der humanen Promotoren als Reaktion auf die PMA-Behandlung verantwortlich sind.

Weiterhin wurden die Auswirkungen der Zugabe von Serum auf die Aktivität des Schwamm cPKC-Promotors bestimmt. Die Begründung für die Durchführung dieses Experiments stammt aus der Beobachtung, daß die Aktivität von PKCs bzw. deren Promotoren in Zellen, die unter Serumangel gehalten werden, schwächer ist als bei solchen, die unter normalen Bedingungen gehalten werden (MAHAJNA *et al.*, 1995; GOPALAKRISHNA *et al.*, 1997). Doch im Gegensatz zur PKC Regulation in Säugerzellen ist die Aktivität des Schwammpromotors nicht von der Anwesenheit von Serum abhängig. Zellen, die mit pGL2-PKC1 (3.6.3) transfiziert worden waren, zeigten eine Luciferaseaktivität von ca. 50% sowohl dann, wenn sie unter Standardbedingungen gehalten wurden, als auch, wenn man ihnen nach der Transfektion kein Serum mehr zuführte.

3.7.2 Analyse der *S. domuncula* SD_SNZG/SD_SNO Luciferasefusionsplasmide

Die Transfektionen der vier unterschiedlichen Luciferasefusionsplasmide mit den 5'-flankierenden Regionen der SNZ- und SNO-Gene aus *S. domuncula* (3.4.4 und Abb. 32) in die NIH 3T3 Zellen wurde auch hier wie unter 2.18.5 beschrieben als Kotransfektion mit dem pCMV- β -Gal Vektor durchgeführt. Wiederum diente pGL2-Basic als Negativ- und pGL2-Promoter als Positivkontrolle.

pGL2-SNZ2 der Vektor, der 317 bp der 5'-flankierenden Region von SD_SNZG enthält, zeigte die höchste Promotoraktivität in Relation zum SV40-Promotor des Kontrollvektors. Mit $207 \pm 19\%$ war die Luciferaseaktivität mehr als doppelt so hoch. pGL2-SNZ1 enthält 905 bp der 5'-flankierenden Region von SD_SNZG und damit auch die zwei Introns des SNO-Gens. Dieses Konstrukt hatte mit $127 \pm 28\%$ die 1,3fache Aktivität des Kontrollvektors. Die beiden unterschiedlich langen 5'-Fragmente des SNO-Gens konnten die Transkription des Luciferasegens nicht mit der gleichen Effektivität wie die 5'-Fragmente des SNZ-Gens initiieren. Das 566 bp lange 5'-Fragment (pGL2-SNO1), das ein Intron des SNZ-Gens enthielt, hatte $29 \pm 3\%$, das 317 bp lange 5'-Fragment (pGL2-SNO2) sogar nur $18 \pm 6\%$ der Aktivität des SV40-Promotors. Der pGL2-Basic Vektor als Negativkontrolle besaß $1,5 \pm 1\%$ Aktivität.

Diese Experimente belegen eindeutig, daß die 338 bp lange 5'-Region, die von SD_SNZG und SD_SNO geteilt wird, die Transkription sowohl in Richtung des SNZ- als auch in Richtung des SNO-Gens initiieren kann. Dies geschieht in der Orientierung zum SNZ-Gen hin zwar wesentlich effizienter, doch auch für die Orientierung in Richtung des SNO-Gens ist eine deutliche Aktivität feststellbar. Die Vermutung, daß diese Region eine bidirektionale Promotoraktivität aufweist (3.4.2), konnte also bewiesen werden.

S. domuncula SNZ/SNO-Promotor-Konstrukte

Luciferaseaktivität in %

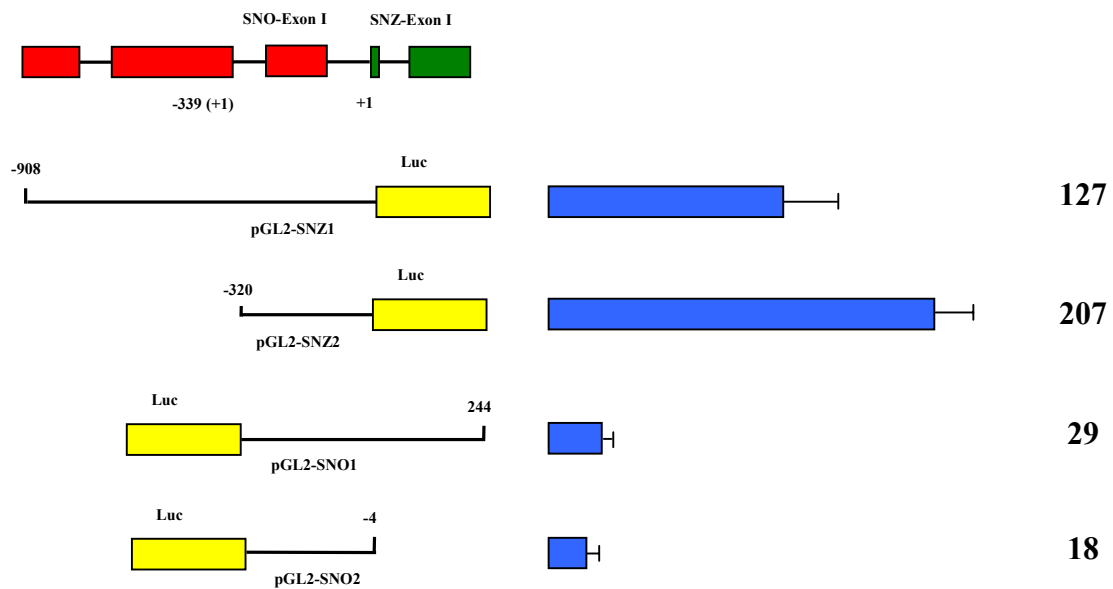


Abb. 32: Luciferaseaktivität der 5'-flankierenden Regionen der *S. domuncula* SNZ- und SNO-Gene. Im Bild links oben ist ein Schema der SNZ- und SNO-Gene dargestellt, die in einer "Kopf-an-Kopf" Anordnung zueinander liegen. Die Exons des SNO-Gens sind rot, die des SNZ-Gens grün dargestellt. Die jeweiligen Start-Kondons sind mit -339(+1) (SNO) bzw. mit +1 (SNZ) gekennzeichnet. Links darunter sind schematisch die vier verschiedenen Luciferasefusionsplasmide (3.4.4) dargestellt und benannt. Die Numerierung bezieht sich auf die des SNZ-Gens (Abb. 17). Im Bild rechts sind die durchschnittlichen mit Hilfe der β -Galaktosidaseaktivitäten normalisierten Luciferaseaktivitäten der einzelnen Konstrukte mit Standardabweichungen graphisch dargestellt und in Prozent angegeben. Die Luciferaseaktivitäten, die aus mindestens drei jeweils zumindest doppelt durchgeführten, unabhängigen Transfektionsexperimenten bestimmt wurden, berechnete man in Relation zu der Luciferaseaktivität, die mit dem Vektor pGL2-Promoter gemessen wurde.

3.7.2.1 Effekte von Ethylen und reaktiven Sauerstoffspezies auf die Promotoraktivität des SNZ-Promotors in NIH 3T3 Zellen

Ethephon

Das SNZ-homologe Gen *HEVER* aus dem Gummibaum *Hevea brasiliensis* wird durch Streß, in Form der Applikation von Ethylen und Salicylsäure, induziert (SIVASUBRAMANIAM, 1995). Auch die Transkription des *S. domuncula* SNZ-Gens wird durch Inkubation mit Ethylen, wie in quantitativen Northern Blot Versuchen nachgewiesen wurde, moduliert (KRASKO *et al.*, 1999). Wie erst neulich gezeigt wurde, reagieren NIH 3T3 Zellen bei Behandlung mit Ethephon (2-Chlorethyl Phosphorsäure), einer Ethylen-freisetzenden Chemikalie (WARNER und LEOPOLD, 1969; YANG, 1969), mit einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels (SEACK *et al.*, 2000). Es war deshalb interessant zu testen, wie sich die Ethephonbehandlung von mit pGL2-SNZ1 transfizierten NIH 3T3 Zellen auf die Expression des Reportergens auswirken würde.

Die NIH 3T3 Zellen wurden wie gewöhnlich mit pGL2-SNZ1 und pCMV- β -Gal kotransfiziert, nach 40 h mit 1 mM Ethephon (Endkonzentration) versetzt und 2 h weiterinkubiert. 1 mM Ethephon entsprach einer Menge, die bei der Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels eine deutliche Reaktion bewirkte. Als Negativkontrolle wurden ebenso transfizierte Zellen mit 1 mM H_3PO_4 versetzt (da Ethephon im wäßrigen Milieu zu Ethylen und Phosphorsäure zerfällt; YANG, 1969) und ebenfalls 2 h inkubiert.

Eine Modulation der Expression des Reportergens konnte bei diesen Versuchen jedoch nicht festgestellt werden. Sowohl die mit Ethephon als auch die mit Phosphorsäure behandelten Zellen wiesen nach wie vor eine Luciferaseaktivität von $132 \pm 32\%$ bzw. $120 \pm 14\%$ auf (Abb. 33). Werte, die im Bereich von unbehandelten Zellen lagen.

Methylenblau und H_2O_2

SOR1 das SNZ-Homologon aus *Cercospora nicotianae* wurde ursprünglich als Gen isoliert, das diesen einzelligen Pilz resistent gegenüber Photosensibilisatoren und Singulett-Sauerstoff macht (EHRENSHAFT *et al.*, 1998). Später wurde nachgewiesen, daß dieses Gen an einem neuen *de novo* Syntheseweg für Vitamin B₆ beteiligt ist, wobei Vitamin B₆ eine potente "Löschsubstanz" für Singulett-Sauerstoff darstellt (EHRENSHAFT *et al.*, 1999b). Es stellte sich also die Frage, ob die Transkription von SD_SNZG durch die Aktivität reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) moduliert werden

könnte. Reaktive Sauerstoffspezies sind das Superoxidradikal (O_2^-), das Hydroxylradikal (OH^\cdot), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und der Singulett-Sauerstoff (1O_2). Sie alle können durch Photooxidationen durch Behandlung mit einem Photosensibilisator in einer Typ I- (Elektronentransfer) oder Typ II-Reaktion (Energietransfer) entstehen (BRIVIBA *et al.*, 1997). ROS verursachen oxidativen Streß, der sich bei eukaryotischen Zellen in einer Steigerung der Transkription bestimmter Gene (PIRET *et al.*, 1995) aber auch in einer Repression der Transkription anderer Gene, äußern kann (Übersichtsartikel: MOREL und BAROUKI, 1999). In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob durch die Zugabe des Photosensibilisators Methylenblau (Übersichtsartikel: TUIE und KELLY, 1993) bzw. durch Applikation von H_2O_2 , die Expression des Reportergens moduliert würde.

Die Transfektion der NIH 3T3 Zellen erfolgte wie oben erwähnt. 40 h nach der Transfektion wurden 10 μM bzw. 0,5 μM Methylenblau in wäßriger Lösung zu den Zellen gegeben und diese $\frac{1}{2}$ h bei RT in einen beleuchteten Flow gestellt. Danach wurden sie noch weitere $1\frac{1}{2}$ h im Brutschrank inkubiert. Die Applikation von 10 μM H_2O_2 erfolgte ebenfalls 40 h nach der Transfektion mit nachfolgender 2stündiger Inkubation im Brutschrank.

Nach der Behandlung mit 10 μM Methylenblau kam es zu einer deutlichen Hemmung der Luciferaseaktivität. Sie betrug nur noch $77 \pm 30\%$. Die Zugabe von 0,5 μM Methylenblau verursachte keine Änderung der Luciferaseaktivität ($137 \pm 20\%$; **Abb. 33**).

Die Behandlung mit 10 μM H_2O_2 hatte keine Auswirkungen auf die Aktivität des Reportergens; sie betrug hier $128 \pm 23\%$.

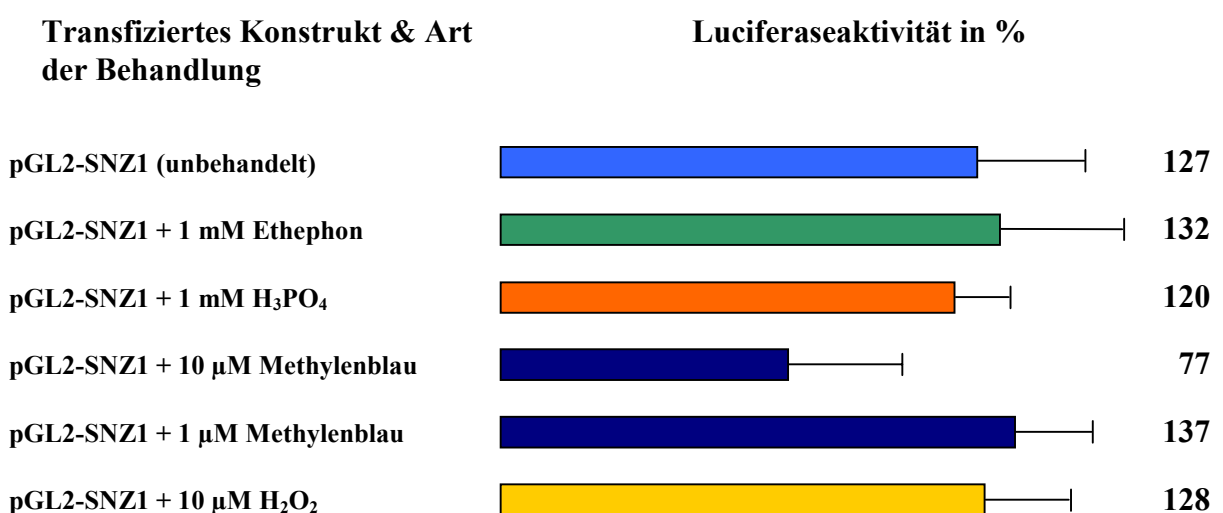


Abb. 33: Luciferaseaktivität der 905 bp umfassenden 5'-flankierenden Region von SD_SNZG nach Behandlung mit unterschiedlichen Reagenzien. Links sind das transfizierte Konstrukt und die jeweilige Behandlung angegeben. Rechts die Luciferaseaktivität bezogen auf den SV40-Promotor in Prozent.

3.7.3 Analyse des *S. domuncula* cPKC Luciferasefusionsplasmids

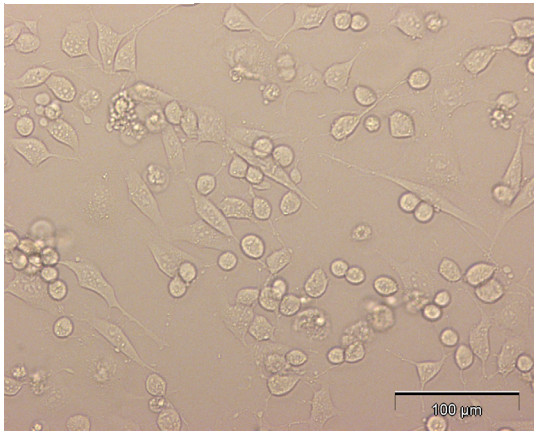
Wie es bereits für die anderen Luciferasefusionsplasmide beschrieben wurde, wurde auch pGL2-PkcSub zusammen mit pCMV- β -Gal in die NIH 3T3 Zellen kotransfiziert. In Relation zum SV40-Promotor wies dieses Konstrukt eine Promotoraktivität von $8 \pm 1,5\%$ auf und lag somit nur etwa 6,5% über der Aktivität des pGL2-Basic Vektors (Negativkontrolle).

Da die Aktivität des *S. domuncula* cPKC-Promotors in den NIH 3T3 Zellen sehr gering war, wurde die Chance, daß dieser Promotor in den Schwammzellen eine starke Transkriptionstätigkeit initiiert, als relativ gering eingeschätzt. Aus diesem Grund wurde dieser Promotor nicht vor das EGFP-Gen fusioniert. EGFP war als Reportergen ausgesucht worden, um eine erfolgreiche Transfektion der pEGFP-Fusionsplasmide in *S. domuncula* Zellen zu dokumentieren (3.7.4 und 3.8).

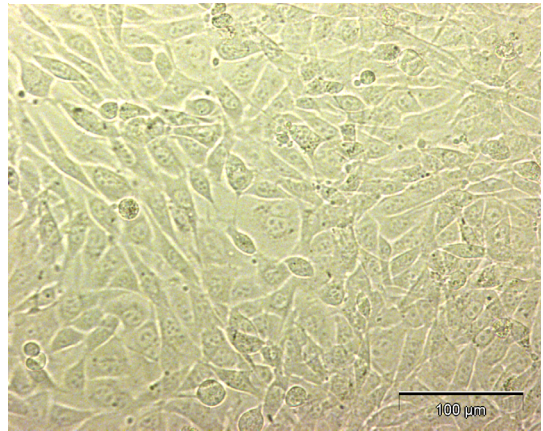
3.7.4 Expression der EGFP-Fusionsplasmide in NIH 3T3 Zellen

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) und seine mit 35fach verstärkter Leuchtkraft ausgestattete Variation EGFP ist in den letzten Jahren zu einem der am häufigsten verwendeten Reportergene geworden. Vorteile dieses Reportergens sind unter anderem seine einfache Nachweisbarkeit direkt innerhalb der lebenden Zelle, des Gewebes oder sogar des kompletten Organismus sowie seine von der Spezies und von Kofaktoren unabhängige, stabile Fluoreszenz. GFP/EGFP konnte sowohl in Prokaryoten (z. B. *E. coli*; CHALFIE *et al.*, 1994) als auch in Eukaryoten, darunter auch marinen Invertebraten (z. B. *Lytechinus pictus*; SEID *et al.*, 1996), erfolgreich zur Expression gebracht werden. Zur Testung der transgenen Expression von Proteinen in Schwammzellen, schien dieses Reportergen also prädestiniert zu sein. Zuvor sollten die EGFP-Konstrukte (pEGFP-SNZ1 und pEGFP-PKC) sowie das Kontrollplasmid pEGFP-N3, das den CMV-Promotor enthält, in den NIH 3T3 Zellen getestet werden. Dazu wurden die Plasmide wie in 2.18.5 beschrieben per Lipofektion in die Zellen eingeschleust und die Fluoreszenz des EGFP mit Hilfe eines entsprechend ausgestatteten Umkehrmikroskops detektiert und dokumentiert (2.18.6.4 und Abb. 34).

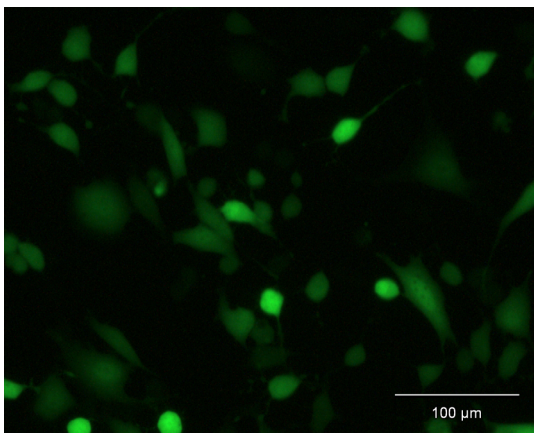
A-1



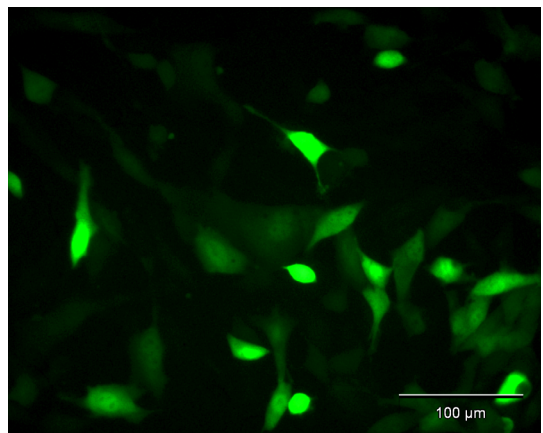
B-1



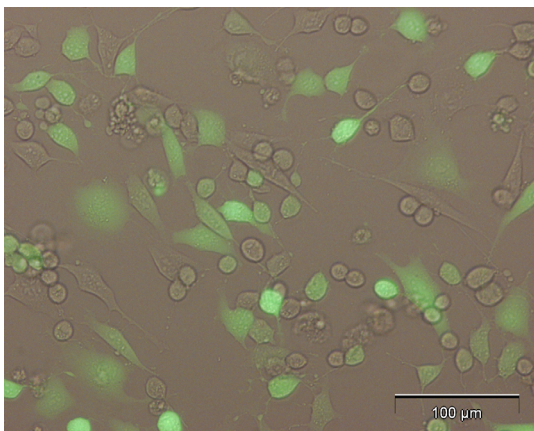
A-2



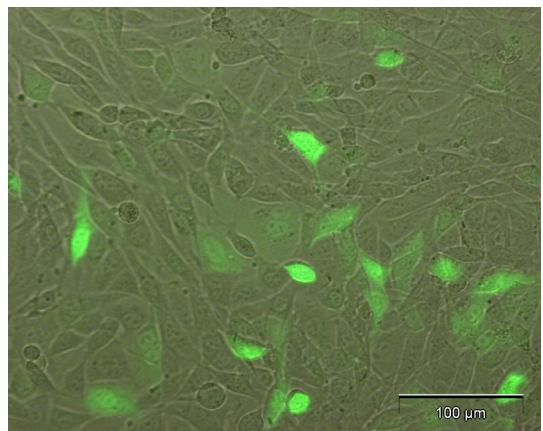
B-2



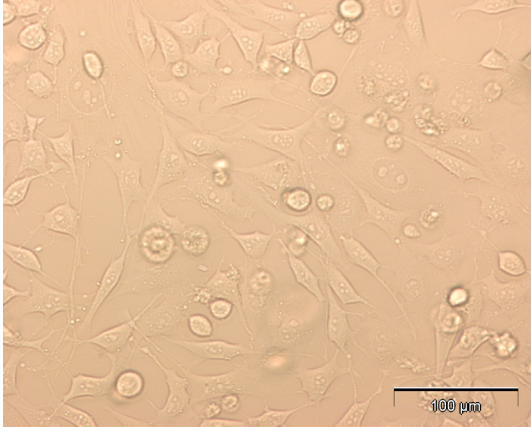
A-3



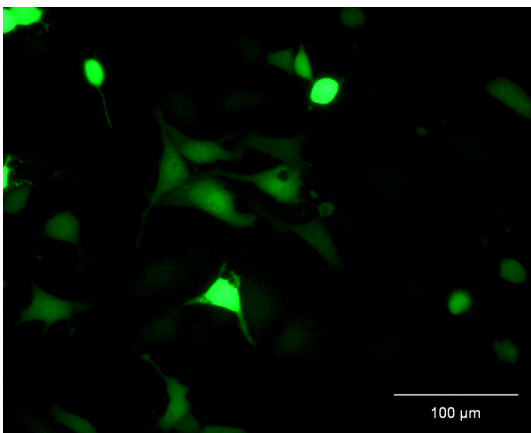
B-3



C-1



C-2



C-3

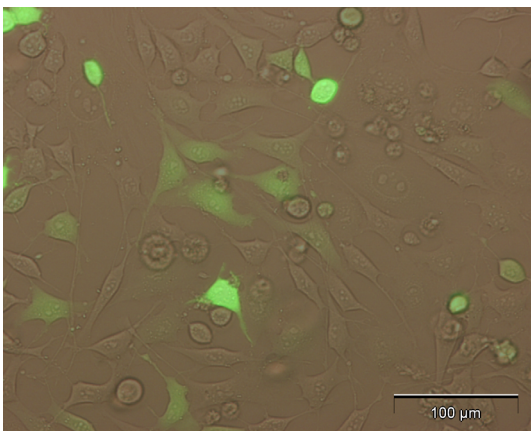


Abb. 34: Expression der EGFP-Fusionsplasmide in NIH 3T3 Zellen. Die Aufnahmen wurden mit 200facher Vergrößerung an einem Umkehrmikroskop inklusive Fluoreszenzbeleuchtung der Firma OLYMPUS (IX70 mit AH2-RX) angefertigt. Als Kamera diente eine SONY ColorView 12 Digitalkamera, deren Bilder mit der Software analySIS® 3.0 (Soft Imaging GmbH) weiterverarbeitet wurden.

A-1 zeigt eine Lichtbildaufnahme von NIH 3T3 Zellen, die mit dem als Positivkontrolle dienenden Vektor pEGFP-N3, transfiziert wurden.

A-2 zeigt eine Fluoreszenzaufnahme der entsprechenden Zellen. Deutlich sind die positiv transfizierten Zellen an der grün leuchtenden Fluoreszenz zu erkennen.

A-3 zeigt eine Addition der Licht- und Fluoreszenzaufnahme. Hier sind nochmals deutlich die positiv transfizierten Zellen zu erkennen.

B-1 bis B-3 zeigen die entsprechenden Aufnahmen von NIH 3T3 Zellen, die mit dem pEGFP-PKC Vektor transfiziert wurden.

C-1 bis C-3 zeigen die entsprechenden Aufnahmen von NIH 3T3 Zellen, die mit dem pEGFP-SNZ1 Vektor transfiziert wurden.

3.8 Expression der EGFP-Fusionsplasmide in *S. domuncula* Zellen

Beim Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen unterscheidet man zwischen nichtviralen und viralen Gentransfersystemen. Da im Fall der Schwämme keinerlei Viren bekannt sind, die als Vehikel für das Einschleusen von DNA in die Zelle dienen könnten, wurden virale Gentransfersysteme nicht in Betracht gezogen. Bei den nicht-viralen Gentransfermethoden sind die Elektroporation, die Mikroinjektion, der ballistische Transfer, die calciumphosphatvermittelte Transfektion, die Transfektion über Liposomen und Virosomen bzw. kationische Lipide und der ligandenvermittelte Transfer zu erwähnen (Übersicht: GÜNZBURG und SALMONS, 1997; KOCH-BRAND, 1993).

Die Elektroporation ist eine Technik, bei der die Zellen einem elektrischen Feld hoher Spannung ausgesetzt werden, wodurch sich Poren in der Zellmembran bilden, durch die sich die DNA bewegen kann (Übersichtsartikel: POTTER, 1993). Diese Methode wurde auch für den DNA-Transfer in die Schwammzellen in Betracht gezogen. Doch Vorversuche ergaben, daß die Überlebensrate der Schwammzellen zu gering war. Da nur begrenzte Mengen an Schwammmaterial zur Verfügung stand, wurde auf die Fortsetzung dieser Versuche verzichtet.

Die zweite Methode, die für die Transfektion der Schwammzellen in Betracht gezogen wurde, war die Verwendung kationischer Lipide, von denen ca. 20-30 verschiedene kommerziell erwerblich sind. Sie werden äußerst erfolgreich für die Transfektion der unterschiedlichsten eukaryotischen Zelllinien und primären Zellkulturen eingesetzt (Lipofektion). So wurden beispielsweise primäre Zellkulturen der Auster *Crassostrea gigas* erfolgreich mit DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)]-N,N,N-trimethylammonium Propan Methylsulfat) transient transfiziert (BOULO *et al.*, 1996). Mit diesem und weiteren Lipiden (LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE™, CELLFECTIN, DMRIE-C (GIBCO), FuGENE™ 6 (ROCHE DIAGNOSTICS)) wurden intensive Versuche unternommen, die Schwammzellen zu transfizieren. Doch auch diese Experimente waren nicht erfolgreich.

Die Methode des ballistischen Gentransfers in die jeweiligen Zielzellen beruht nicht auf spezifischen Liganden/Rezeptor Wechselwirkungen oder speziellen biochemischen Eigenschaften von Zelloberflächenkomponenten. So konnten mit Hilfe dieser Technik wie unter 2.21 erwähnt eine breit gefächerte Auswahl prokaryotischer und eukaryotischer Organismen erfolgreich transfiziert werden. Aus diesem Grund schien das

Beschießen der Schwammzellen mit DNA beschichteten Goldpartikeln, eine erfolgversprechende Methode zu sein.

Die drei Vektoren pEGFP-N3, pEGFP-SNZ1 und pEGFP-PKC wurden wie in **2.21.1** beschrieben mit den dort angegebenen Standardbedingungen auf 1 und 0,6 μm durchmessende Gold-Mikrocarrier präzipitiert und nachfolgend Patronen für die Genkanone hergestellt (**2.21.2**). Von den in Mainzer Aquarien gehaltenen Schwämmen (**2.19**) der Spezies *S. domuncula* wurden wie unter **2.20** beschriebenen Einzellzellsuspensionen hergestellt. Je 30 μl einer solchen ca. $10^8/\text{ml}$ Zellen enthaltenden Zellsuspension wurden in die Mitte eines *six-wells* aufgetragen. Das Partikelbombardement dieser Zellen erfolgte dann wie in **2.21.3** dargestellt mit unterschiedlichen Heliumdrücken. Nachdem artifizielles Seewasser zu den Zellen gegeben worden war, bildeten sich sofort Zellaggregate, die mehrere Tage mit täglichem Wasserwechsel bei 16°C inkubiert wurden. Der Zustand der Zellen wurde ebenfalls täglich am Umkehrmikroskop mit Fluoreszenzbeleuchtung überprüft.

Nach 3-4 Tagen Inkubation zeigten überraschenderweise nur diejenigen Zellaggregate, die mit dem pEGFP-N3 Vektor beschossen worden waren, eine leuchtend grüne Fluoreszenz als Zeichen der Expression des EGFPs. Um Zellen zu erhalten, die das EGFP exprimierten, mußten sie mit einem Heliumdruck von 200 oder 300 psi und 1 μm durchmessenden Goldpartikeln bombardiert werden. Bei einem Beschuß mit niedrigerem (50 und 100 psi) und höherem Heliumdruck (400 psi) sowie bei Verwendung der nur 0,6 μm durchmessenden Microcarrier konnten keine grün leuchtenden Zellen entdeckt werden. Die typische Morphologie der vielzelligen Aggregate zeigen die **Abb. 35 A-1** und **B-1**. Selbst unter dem Mikroskop bei 400facher Vergrößerung ist es sehr schwierig, einzelne Zellen bzw. sich morphologisch unterscheidende Zelltypen innerhalb des Aggregats zu erkennen. Die **Abb. 35 A-2** und **B-2** zeigen die entsprechenden Zellaggregate bei Anregung mit UV-Licht durch eine FITC-Optik betrachtet. Die positiv transfizierten Zellen sind als grün leuchtende Agglomerate, innerhalb der Aggregate zu erkennen. Die helle grüne Fluoreszenz des EGFP hebt sich dabei deutlich von der schwach grünen Eigenfluoreszenz der Schwammzellen ab. Aus den oben genannten Gründen war es unmöglich auszuzählen, wieviele Zellen das EGFP exprimierten. Die Transfektionseffizienz konnte also nicht exakt bestimmt werden. Sie war allerdings relativ gering, denn nur ca. 2% der Zellaggregate, die sich nach dem Beschuß gebildet hatten, zeigten mehr oder weniger große Agglomerate grün fluoreszierender Zellen.

Die beiden Konstrukte, die die Schwammpromotoren enthielten, konnten das EGFP nicht zur Expression bringen. Die für den ballistischen Transfer gewählten Versuchsbedingungen waren, zieht man die positiven Ergebnisse mit dem Kontrollvektor in Betracht, prinzipiell geeignet, Schwammzellen zu transfizieren. Daraus kann nur geschlossen werden, daß die hohe Aktivität der beiden Schwammpromotoren im heterologen System (in den NIH 3T3 Zellen), nicht ohne weiteres auf die Aktivität im homologen System übertragen werden kann. Ihre Aktivität ist dort offensichtlich wesentlich geringer ausgeprägt.

Festzuhalten bleibt, daß es möglich ist, DNA mit Hilfe der ballistischen Gentransfermethode in die Zellen des Schwamms *S. domuncula* zu übertragen. Nachzuweisen war dies allerdings nur mit Hilfe des heterologen CMV-Promotors, der die Transkription des Reportergens EGFP erfolgreicher initiieren konnte als die Promotoren der Schwammgene SD_SNZG und GCPKC2*Ge*.

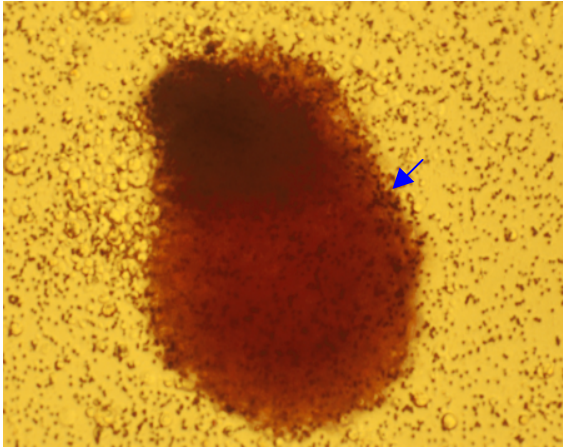
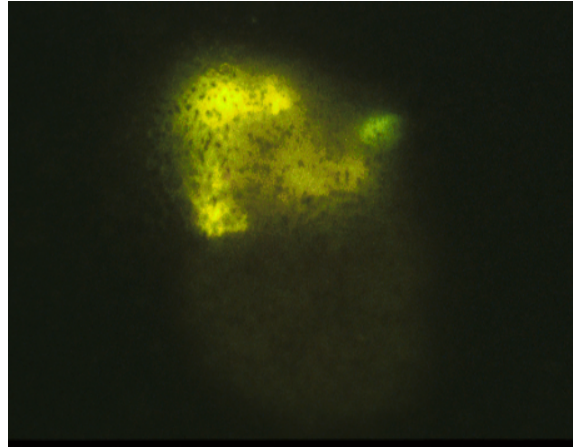
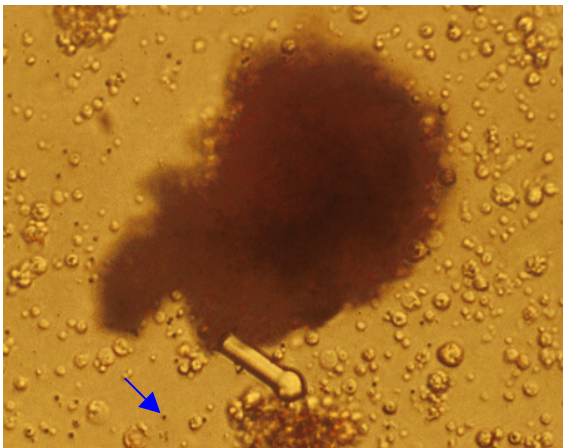
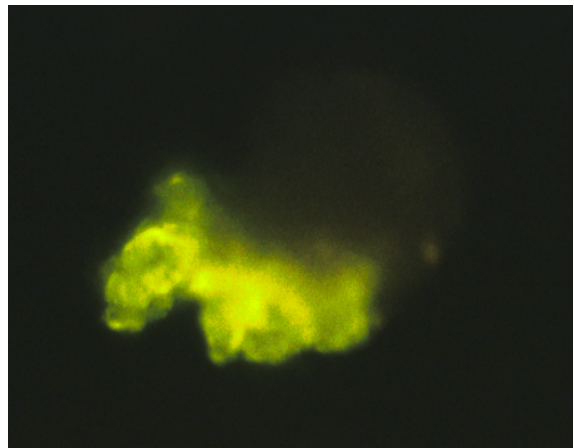
A-1**A-2****B-1****B-2**

Abb. 35: Expression des pEGFP-N3 Vektors in Zellaggregaten von *S. domuncula*. Die Aufnahmen wurden mit 400facher Vergrößerung am Umkehrmikroskop der Firma OLYMPUS mit einer Kleinbildkamera ebendieser Firma angefertigt. Als Filmmaterial wurde ein 400ASA Diafilm der Firma KODAK verwendet. **A-1** und **B-1** zeigen ein jeweils 4 Tage altes Zellaggregat, dessen Zellen vor der Aggregation mit der *Gene Gun* beschossen worden waren. In diesem Fall wurde der ballistische Gentransfer mit 300 psi Heliumdruck mit 1 μm großen Goldpartikeln, die mit dem Plasmid pEGFP-N3 beschichtet waren, durchgeführt. Die Goldpartikel sind als kleine schwarze Punkte innerhalb des Aggregats aber auch auf dem Boden der Kulturschale zu erkennen (Blaue Pfeile). **A-2** und **B-2** zeigen die gleichen Zellaggregate unter UV-Beleuchtung mit einer FITC-Optik aufgenommen. Deutlich sind die grün fluoreszierenden Bereiche zu erkennen, die auf die Expression des EGFP-Gens zurückzuführen sind. Diese Fluoreszenz hebt sich deutlich von der schwachen grünen Eigenfluoreszenz der Schwammzellen ab.

4 DISKUSSION

4.1 Die *G. cydonium* und *S. domuncula* cPKC Promotoren

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine effiziente Methode für den Gentransfer in Schwammzellen zu evaluieren. Bevor diese Vorgabe zu verwirklichen war, mußten allerdings zuerst Promotoren gefunden werden, die eine hohe Genexpression im homologen System gewährleisten würden. Daß virale Promotoren (z. B. der des Cytomegalovirus (CMV) oder des Simian-Virus-40 (SV40)), wie sie für die konstitutive Genexpression in vielen Säugetierzelllinien eingesetzt werden, diese Aufgabe auch in Schwammzellen erfüllen würden, war nicht unbedingt zu erwarten gewesen. Aus diesem Grund fiel die Wahl auf den Promotor des bis dahin wohl am besten charakterisierten Schwammgens, des cPKC-Gens aus *G. cydonium*. Bei diesem Gen handelt es sich um ein sogenanntes "Haushaltsgen", da es ubiquitär relativ stark exprimiert wird. Dies bewiesen Immunfluoreszenzfärbungen von *G. cydonium* Zellen, bei denen eine gleichmäßige Verteilung der cPKC im Cytoplasma beobachtet wurde. Nach Aktivierung der cPKC konnte sie an der Zell- und der Kernmembran lokalisiert werden (KRUSE *et al.*, 1996; 1997; 1998a; KRUSE, 1998b).

Aus gegebenen Gründen konnte dieser Promotor zunächst nur im heterologen System der NIH 3T3 Mäusezelllinie auf seine Funktion hin untersucht werden. Ein Grund für die Auswahl dieser Zellen war das Vorhandensein bereits etablierter Transfektionsmethoden. Überdies wiesen die vorhergesagten *cis*-Elemente des putativen Schwamm-promotors eine hohe Übereinstimmung mit den von Säugetierpromotoren und -enhancern bekannten Elementen auf (3.6.1). Ein weiteres Argument, das für die Durchführung der Experimente mit Säugetierzellen sprach, war die Tatsache, daß bei früheren Vergleichen vieler Schwammproteine mit Hilfe des BLAST-Algorithmus häufig die stärksten Homologien zu Sequenzen "höherer" Organismen bestanden. Nach intensiven Sequenzvergleichen in jüngster Zeit wurde diese Beobachtung bestätigt: Schwammproteine weisen zu den orthologen Proteinen von Deuterostomiern (konkret: *Homo sapiens*) eine größere Ähnlichkeit auf als zu denen von Protostomiern (konkret: *Caenorhabditis elegans*) (GAMULIN *et al.*, 2000).

4.1.1 Die 5'-flankierende Region von *GCPKC2Ge* weist eine starke Promotoraktivität in NIH 3T3 Zellen auf und verfügt über einen TATA-losen Promotor

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden mit 5'-flankierenden Regionen von Schwammgenen - mit Ausnahme der 5'-Region des *EmH-3* Gens aus *Ephydatia muelleri* (COUTINHO *et al.*, 1998) - noch keine funktionellen Studien durchgeführt. Um mehr über mögliche *cis*-Elemente und deren Position in Schwammgenen herauszufinden, wurden unterschiedlich lange Fragmente der 5'-flankierenden Region des *G. cydonium* cPKC-Gens auf ihre Promotoraktivität hin untersucht. Diese Deletionsanalyse bewies, daß zumindest das längste Fragment (538 bp) in der Lage war, eine relativ starke Expression des Reportergens Luciferase in den NIH 3T3 Zellen zu bewirken. Die Promotoraktivität dieses Fragments war etwa halb so stark wie die des SV40-Promotors, der als Positivkontrolle herangezogen wurde (**3.7.1** und **Abb. 31**). Die Promotoraktivität des cPKC-Promotors konnte jedoch, anders als vermutet, weder durch Zugabe eines Phorbol-esters (PMA) noch durch unterlassene Zugabe von Serum moduliert werden (**3.7.1.1**). Dies könnte daran liegen, daß im heterologen System der NIH 3T3 Zellen eine andere Auswahl von Transkriptionsfaktoren an den cPKC-Promotor bindet, als dies im homologen System der Fall ist. Möglich ist aber auch, daß die *cis*-Elemente, die für die Modulation der cPKC-Expression in höheren Tieren verantwortlich sind (OBEID *et al.*, 1992; MAHAJNA *et al.*, 1995), weiter *upstream* in der 5'-flankierenden Region des Schwammgens zu finden sind. Denn auf Proteinebene ist nachgewiesen, daß *G. cydonium* auf Phorbol-esterbehandlung mit der Hochregulierung des cPKC-Levels reagiert (MÜLLER *et al.*, 1987).

Desweiteren konnte festgestellt werden, daß im heterologen System die E-Box in Position nt -480 bis -475 und die GC-Box in Position nt -159 bis -150 (**Abb. 28**) wohl die entscheidenden *cis*-Elemente für die maximale Promotoraktivität sind. Die Deletion dieser Elemente reduzierte die Promotoraktivität jeweils stark bzw. brachte sie komplett zum Erliegen (**3.7.1**). Das TATA-Box ähnliche Motiv in Position nt -101 bis -92 konnte die Expression der Luciferase nicht gewährleisten. Dies und die Tatsache, daß der Transkriptionsstartpunkt mit Hilfe der RT-PCR Technik auf die Region zwischen nt -119 und -94 eingegrenzt wurde (**3.6.2** und **Abb. 29**), beweist auch, daß es sich beim *G. cydonium* cPKC-Promotor um einen TATA-losen Promotor handelt.

4.1.2 Die erste GC-Box des *G. cydonium* cPKC-Promotors könnte an der Positionierung des Präinitiationskomplexes beteiligt sein

Bis vor etwa 15 Jahren nahm man an, daß alle Gene, die von der RNA-Polymerase II transkribiert werden, als zwingendes Sequenzelement eine TATA-Box enthalten, die zwischen 25 und 35 bp vom Startpunkt der Transkription entfernt liegt. Doch mittlerweile ist bekannt, daß sehr viele Klasse II-Promotoren keine TATA-Box besitzen (z. B. ungefähr 50% der Promotoren aus *Drosophila melanogaster* (ARKHIPOVA, 1995)). Diese allgemein als TATA-los bezeichneten Promotoren unterscheiden sich stark in Bezug auf die Spezifität ihres Transkriptionsstartpunkts. Einige verfügen über die Fähigkeit - ähnlich wie TATA-Box enthaltende Promotoren - den Start der Transkription an ein spezifisches Nukleotid zu dirigieren, andere besitzen multiple (bis zu einigen dutzend) Transkriptionsstartpunkte (Übersicht: SMALE, 1997). An welche Position der allgemeine Faktor TFIID, der maßgeblich an der Formierung des Präinitiationskomplexes und somit indirekt an der Festlegung des Transkriptionsstartpunktes beteiligt ist, bindet, kann bei diesen Promotoren von mehreren unterschiedlichen Kontrollelementen abhängen. Es können sogenannte Initiator-Elemente (Inr), die mit der Transkriptionsstartstelle überlappen (SMALE *et al.*, 1997), Sp1-Bindestellen/GC-Boxen (LU *et al.*, 1994; HUBER *et al.*, 1998) und *Downstream*-Promotor-Elemente (DPE), die ca. 30 nt *downstream* des RNA-Startpunktes lokalisiert sind (BURKE und KADONAGA, 1996), an der Positionierung beteiligt sein.

Ob die Transkription des *G. cydonium* cPKC-Gens an einem spezifischen oder mehreren Nukleotiden beginnt, konnte im Lauf dieser Experimente nicht endgültig geklärt werden. Mit Hilfe der RT-PCR-Technik (3.6.2 und Abb. 29) konnte lediglich eine ca. 30 bp umfassende Region (nt -119 bis -94) lokalisiert werden, in der sich aller Wahrscheinlichkeit nach der Hauptinitiationsstartpunkt befindet. Für die homologen Gene (PKC γ) des Menschen (MAHAJNA *et al.*, 1995) und der Ratte (CHEN *et al.*, 1990) wurde jeweils nur ein Transkriptionsstartpunkt kartiert. Es ist jedoch bekannt, daß andere PKC-Gene über mehrere Initiationsstartpunkte verfügen (z. B. das PKC β Gen des Menschen und das PKC α Gen der Maus; MAHAJNA *et al.*, 1995; DESAI *et al.*, 1999).

An der Positionierung des Präinitiationskomplexes könnte die erste der drei identifizierten GC-Boxen in Position nt -159 bis -150 beteiligt sein (3.6.1 und Abb. 28). Die Entfernung dieser GC-Box (30 bis 40 bp) vom putativen Transkriptionsstartpunkt stimmt mit der überein, die bei anderen TATA-losen Promotoren gefunden wurde, deren Startnukleotid durch den Transkriptionsfaktor Sp1 festgelegt wird (LU *et al.*, 1994; HUBER *et al.*, 1998). Im Bereich des Transkriptionsstartpunktes dieser Gene wurde allerdings ein Inr gefunden. Dies ist, soweit ersichtlich, im Bereich des putati-

ven Transkriptionsstartpunktes des cPKC-Gens nicht der Fall. Dazu ist allerdings anzumerken, daß die Konsensussequenz für das Inr mit Py Py A N T/A Py Py relativ wenig stringent ist. Pyrimidine an den vier angegebenen Positionen werden zwar bevorzugt, sind aber nicht alle zwangsläufig notwendig für die Funktion (SMALE, 1997).

4.1.3 Die 5'-flankierende Region des *S. domuncula* cPKC Gens weist eine schwache Promotoraktivität in NIH 3T3 Zellen auf

Die relativ niedrige Abundanz von *G. cydonium* in der Adria vor Rovinj machte die Beschaffung dieser Schwammspezies und die Hälterung in den Mainzer Aquarien immer schwieriger. Ein in dieser Region viel häufiger anzutreffender Schwamm ist die Spezies *S. domuncula*. Auch die Hälterung dieser Schwämme gestaltet sich um einiges unproblematischer als die von *G. cydonium* (2.19). Schon nach kurzer Zeit stellten sich erste Erfolge bei der Arbeit mit diesem Schwamm ein. So konnte beispielsweise eine primäre Zellkultur mit Teilungsfähigkeit in Form von Primmorphen (multizelluläre Aggregate) etabliert werden (CUSTODIO *et al.*, 1998; MÜLLER *et al.*, 1999a). Dies machte für diese Arbeit den Umstieg auf *S. domuncula* als Quelle homologer Promotoren notwendig. Zuerst wurde eine genomische Bibliothek dieses Schwammes hergestellt (2.13 und 3.1). Anschließend wurde diese Bibliothek mit Hilfe einer Sonde, die anhand der bereits bekannten cDNA-Sequenz der *S. domuncula* cPKC (KRUSE, 1998b) hergestellt worden war, durchsucht (2.14 und 3.2). Die daraufhin isolierte 5'-flankierende Region dieses Gens wurde dann ebenfalls in NIH 3T3 Zellen auf ihre Promotoraktivität hin getestet.

Die Promotoraktivität des 834 bp umfassenden 5'-flankierenden Fragments des *S. domuncula* cPKC-Gens, das in den pGL2-Basic Reporter-genvektor kloniert worden war, erwies sich als äußerst gering. Sie lag nur 4% über dem Wert, der für die Negativkontrolle (pGL2-Basic) ermittelt wurde (3.7.3). Die geringe Aktivität dieses Promotors ist möglicherweise auf das Fehlen von zwei GC-Boxen zurückzuführen, die in der 5'-flankierenden Region des *G. cydonium* cPKC-Gens vorhanden sind. Besonders die erste GC-Box scheint bei *GCPKC2Ge* für die effektive Positionierung des Präinitiationskomplexes benötigt zu werden (4.1.2). Diese fehlt beim *S. domuncula* cPKC-Gen. Insgesamt findet man nur drei putative *cis*-Elemente, die bei beiden Genen in etwa vergleichbaren Positionen liegen: die E-Box, ein CRE-Element und eine GC-Box (Abb. 36). Darüberhinaus erkennt man bei einem Vergleich der 5'-flankierenden Regionen beider cPKC-Gene fünf hochkonservierte Sequenzbereiche (schwarz umrahmt in Abb. 36). Man sollte annehmen, daß proteinbindende DNA-Abschnitte in

5'-Regionen homologer Gene bei nahe verwandten Arten relativ wenige Substitutionen aufweisen. Dies legt den Schluß nahe, daß diese konservierten Abschnitte bei der Transkriptionsregulation im Schwamm eine Rolle spielen. Trotz intensiver Datenbanksuche konnten jedoch nur sehr schwache Übereinstimmungen mit Konsensussequenzen bekannter *cis*-Elemente gefunden werden. Nichtsdestotrotz könnten bisher unbekannte Transkriptionsfaktoren an diese Sequenzabschnitte binden.

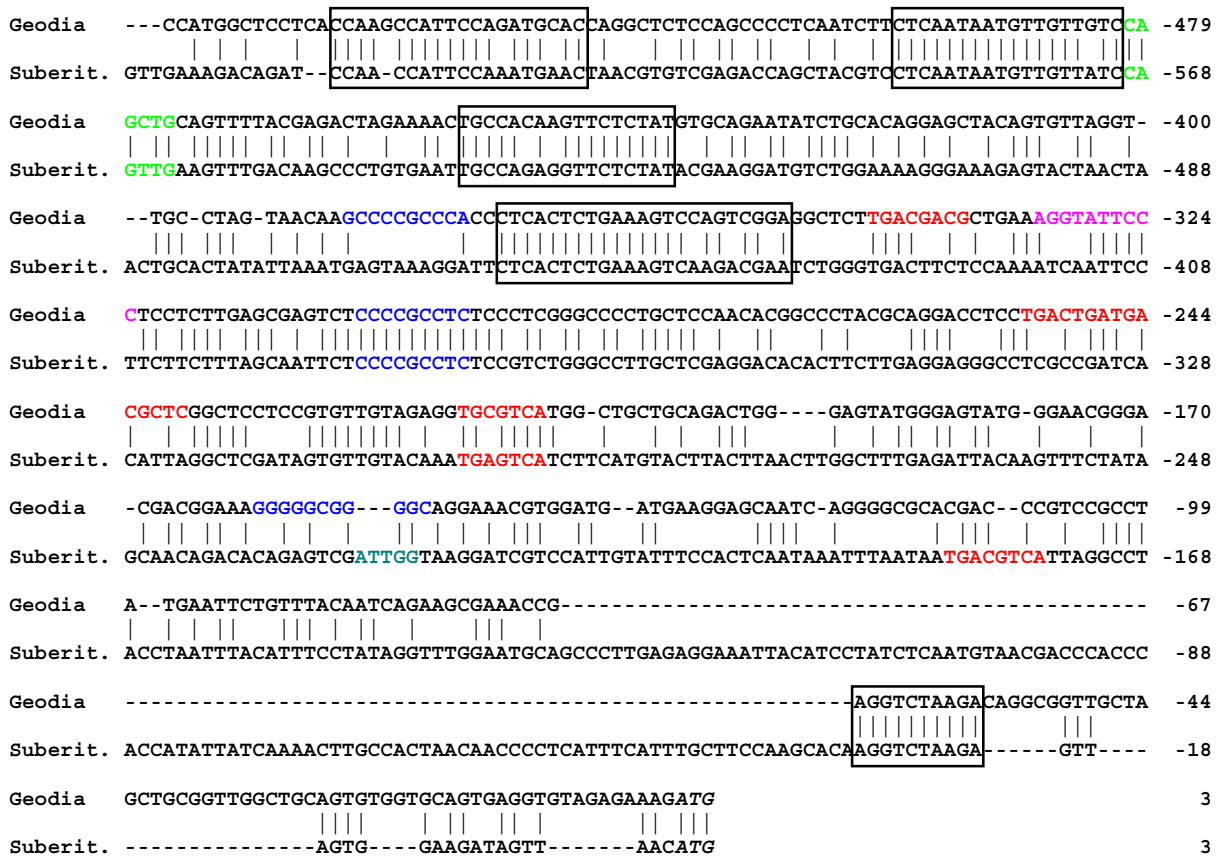


Abb. 36: Vergleich der 5'-flankierenden Regionen der cPKC-Gene aus *G. cydonium* und *S. domuncula*. Die komplette bekannte 5'-flankierende Sequenz des *G. cydonium* cPKC-Gens wurde mit der entsprechenden Region des *S. domuncula* cPKC-Gens mit Hilfe einer kombinierten Methode nach MARTINEZ (1983) und NEEDLEMAN und WUNSCH (1970) verglichen. Die mit Hilfe der Computerprogramme (2.22) identifizierten *cis*-Elemente der beiden Sequenzen sind farbig gekennzeichnet, die E-Box grün, die GC-Boxen blau, die CCAAT-Box blaugrün, die putative NF- κ B Bindestelle rosa und die möglichen TRE/CRE-Elemente rot. Die hochkonservierten Regionen wurden mit einem schwarzen Rahmen versehen.

4.1.4 Perspektiven

Mit Hilfe von *Primer Extension*- bzw. *S1-Nuclease Protection*-Assays könnte man die Lage der Transkriptionsstartpunkte noch genauer lokalisieren. Weitergehend könnten *Bandshift*- (EMSA) und *DNase I in vitro-Footprinting*-Assays durchgeführt werden,

um die *cis*-wirksamen Elemente dieser Promotoren und die daran bindenden Faktoren näher zu charakterisieren.

4.2 Die SNZ/SNO-Gene aus *S. domuncula*

Um nicht nur einen konstitutiven Promotor für die Transfektionsstudien zur Verfügung zu haben, wurde parallel auch nach einem induzierbaren Promotor gesucht. Die Wahl fiel dabei auf ein Gen, das die höchste Übereinstimmung mit einem durch Ethylen induzierbaren Gen aus dem Gummibaum *Hevea brasiliensis* aufweist (SIVASUBRAMANIAM, 1995) und der SNZ-Genfamilie angehört (BRAUN *et al.*, 1996). Wie mit Northern Blot Analysen nachgewiesen wurde, wird die Expression dieses Gens auch im Schwamm durch die Applikation von Ethylen moduliert (KRASKO *et al.*, 1999).

Die Isolierung und Sequenzierung zweier insgesamt ca. 2,8 kb langen *Sac I* Fragmente, die im Southern Blot mit der spezifischen Sonde hybridisierten (3.3.1), führte zu einer Überraschung. Nicht nur das komplette SNZ-Gen (SD_SNZG) aus *S. domuncula* und dessen 5'-flankierende Region wurden isoliert. Bei genauerer Analyse der 5'-Region stellte sich nämlich heraus, daß diese ein weiteres Gen enthielt, welches der SNO-Genfamilie (SD_SNO) angehört (PADILLA *et al.*, 1998). SD_SNO und SD_SNZG sind in einer "Kopf an Kopf"-Anordnung miteinander verbunden und teilen sich eine gemeinsame 338 bp lange 5'-flankierende Region. Mit Hilfe der PCR-Technik wurde sowohl die cDNA als auch die restliche genomische Sequenz dieses Gens bestimmt (3.4.1). Um herauszufinden, ob SD_SNZG und SD_SNO einer Multi-gen-Familie angehören, wie dies bei der Hefe ist und auch bei einigen anderen Organismen der Fall zu sein scheint (BRAUN *et al.*, 1996), wurde ein genomischer Southern Blot mit etwas niedrigerer Stringenz durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Blots legen nahe, daß das Gencluster aus SD_SNZG und SD_SNO in einer einzigen Kopie im Schwammgenom vorliegt (3.3.2).

4.2.1 SD_SNZG und SD_SNO sind Mitglieder hochkonservierter Genfamilien

Das erste Mitglied der SNZ-Genfamilie wurde von FUGE *et al.* (1994) beschrieben. Sie identifizierten ein Protein von 35 kDa (p35), das beim Eintritt von Hefekulturen in die stationäre Phase und somit als Reaktion auf Nährstoffmangel verstärkt exprimiert wird. Sie nannten das Protein *Snz1p* ("SNooZe"). Zwei Jahre später gelang BRAUN *et al.* (1996) die Klonierung des SNZ1-Gens. Mit Publikation des kompletten Hefe-

genoms konnten kurz darauf zwei weitere homologe Gene (SNZ2 und SNZ3) identifiziert werden (GOFFEAU *et al.*, 1996). Der Verdacht bestätigte sich, daß SNZ-Gene oft Mitglieder einer Multigenfamilie sind. In der gleichen Zeit gelang SIVASUBRAMANIAM *et al.* (1995) die Isolation eines weiteren SNZ-Gens (*HEVER*) aus *Hevea brasiliensis*. Auch die Expression dieses Gens ist durch Streß in Form von Ethylen und Salicylsäure induzierbar. Im Rahmen der Sequenzierprojekte vieler Eu- und Archaeobakterien Mitte und Ende der neunziger Jahre wurden mehr und mehr Mitglieder der Genfamilie identifiziert (z. B. aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* oder *Haemophilus influenza*: SMITH *et al.*, 1997; FLEISCHMANN *et al.*, 1995). Durch Datenbanksuche und Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen dieser Gene stellte sich heraus, daß die *Snz*-Proteine in allen drei phylogenetischen Domänen (Eucarya, Bacteria und Archaea; WOESE *et al.*, 1990) präsent sind und untereinander eine sehr hohe Identität aufweisen. Die Identität der Proteine untereinander beträgt mindestens 45% und ist meist größer als 55%. Dieser hohe Grad der Konservierung über alle drei Domänen des Lebens hinweg ist in ähnlicher Art und Weise beispielsweise nur beim HSP70 (DnaK) oder der Enolase anzutreffen (BRAUN *et al.*, 1996) und deutet auf eine wichtige physiologische Rolle dieser Proteinfamilie hin.

In mehrzelligen eukaryotischen Lebewesen wurden Mitglieder der SNZ-Genfamilie bisher nur bei Pflanzen nachgewiesen (z. B. *Arabidopsis thaliana*; ÖKRÉSZ *et al.*, 1998). Es gibt zwar Hinweise in Form von "Zoo"-Blots, daß auch mehrzellige Tiere (Metazoa) eine Kopie des SNZ-Gens enthalten könnten (BRAUN *et al.*, 1996), doch eine Isolation dieses Gens aus einem ebensolchen Organismus gelang bisher noch nicht. Die BLAST-Suche in den Datenbanken der zwei bis dato komplett durchsequenzierten Metazoen *Caenorhabditis elegans* (100% sequenziert; AINSCOUGH *et al.*, 1998) und *Drosophila melanogaster* (97% sequenziert; ADAMS *et al.*, 2000) ergab keine positive Identifizierung. Somit ist SD_SNZG das erste aus einem Metazoen isolierte Mitglied der SNZ-Genfamilie. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Schwammgens konnte eindeutig der *Snz*-Proteinfamilie zugewiesen werden und weist zu ausgewählten Sequenzen anderer Organismen eine zumindest 56%ige Identität auf (3.3.3 und Abb. 19).

Eine ähnliche Situation begegnet uns bei den SNO-Genen. GALPERIN und KOONIN (1997) fiel zuerst auf, daß alle Organismen, die ein SNZ-Gen besitzen, auch eine Kopie des SNO-Gens aufweisen. Diese Gene unterscheiden sich zwar in ihrer Lage zueinander (3.4.1.2), sind jedoch ebenfalls über alle drei Domänen des Lebens hinweg stark konserviert. SD_SNO stellt wiederum die erste Metazoensequenz dieser Genfamilie dar.

Die größte Identität nicht in Bezug auf die Aminosäureabfolge jedoch in Bezug auf ihre Anordnung zueinander teilen die beiden Schwammgene mit den drei Genclustern der Hefe. Dort befinden sich die SNZ- und SNO-Gene ebenfalls in einer "Kopf an Kopf"-Anordnung auf gegenüberliegenden DNA-Strängen (PADILLA *et al.*, 1998). Diese Anordnung ließ die Autoren vermuten, daß die beiden Gene koreguliert werden und eine gemeinsame Funktion ausüben. Das ist auch tatsächlich der Fall: die mRNAs beider Gene weisen das gleiche Expressionsmuster in Zellen auf, die bis zur stationären Phase gezogen werden, und die Proteine interagieren in der *Two-Hybrid*-Analyse. Auch die beiden Schwammgene sind vermutlich koreguliert. Es konnte nachgewiesen werden, daß die intergenische Region in NIH 3T3 Zellen bidirektionale Promotoraktivität besitzt (3.7.2).

4.2.2 Mögliche Funktion von SD_SNZG und SD_SNO in Schwämmen

Wie unter 3.3.3 und 3.4.1.2 bereits erwähnt, sind sowohl die *Snz*- als auch die *Sno*-Proteine höchstwahrscheinlich an einem sich vom "*E. coli*-Weg" (mit den beteiligten Proteinen *pdxA*, *pdxB* und *pdxJ*) unterscheidenden Pyridoxin-Biosyntheseweg beteiligt (EHRENSHAFT *et al.*, 1999b; OSMANI *et al.*, 1999). Pyridoxin (Vitamin B₆) ist eine unmittelbare Vorstufe von Pyridoxal-5-Phosphat, einem wichtigen Kofaktor enzymatischer Reaktionen wie beispielsweise Transaminierungen, die hauptsächlich im Aminosäurestoffwechsel eine Rolle spielen. Desweiteren wird dem Vitamin B₆-Komplex seit kurzer Zeit eine Rolle als Antioxidans und als "Löschsubstanz" (*Quencher*) von Singulett-Sauerstoff zugeschrieben (BILSKI *et al.*, 2000).

Aufgrund der großen Sequenzidentität der *Snz*- und *Sno*-Proteine besteht die Möglichkeit, daß auch deren Funktion bei Schwämmen konserviert ist und die beiden Proteine an der Synthese von Vitamin B₆ beteiligt sind. Allerdings ist noch nicht abgeklärt, ob Schwämme das von ihnen benötigte Pyridoxin selbst synthetisieren. Vom jetzigen Wissensstand aus gesehen, scheint das bei anderen Metazoen nicht der Fall zu sein. Doch wie ist dann die Anwesenheit der entsprechenden Gene in Schwämmen zu erklären?

Die Antwort könnte sein, daß die Porifera den vermutlich ältesten und primitivsten Stamm der Metazoen darstellen (MÜLLER, 1998). In diesem Zusammenhang wird angenommen, daß Pilze (Fungi) und Metazoen unmittelbare Schwestergruppen sind und damit über einen gemeinsamen Vorfahren verfügen (BALDAUF und PALMER, 1993). Bis jetzt wurde in allen komplett oder teilweise sequenzierten Pilzen zu SNZ homologe Gene gefunden. Daher ist zu vermuten, daß der gemeinsame Vorfahre die Gene für die Pyridoxin-Biosynthese bereits besaß und sowohl an die Metazoen als

auch an die Pilze weitergab. Die Schwämme besitzen diese Gene noch, wohingegen sie in anderen Metazoen sekundär verlorengegangen sein könnten.

4.3 Der bidirektionaler Promotor von SD_SNZ und SD_SNO

4.3.1 Abhängig von der Orientierung ist die Aktivität des SNZ/SNO-Promotors unterschiedlich stark

In der Orientierung zum SNZ-Gen hin weist die gemeinsame 5'-flankierende Region von SD_SNZG und SD_SNO eine im Vergleich zum SV40-Promotor recht starke Promotoraktivität auf. Diese reduziert sich, wenn Teile des kodierenden Bereichs des SNO-Gens und dessen zweites Intron miteingeschlossen werden (**3.7.2** und **Abb. 32**). Dies deutet auf ein Element (Silencer) innerhalb des Sequenzabschnitts von nt -321 bis -908 (**Abb.17**) hin, das die Aktivität des Promotors in den NIH 3T3 Zellen deutlich mindert. Per Datenbanksuche konnte zwar kein konkreter Sequenzabschnitt eingegrenzt werden, doch könnte dieser innerhalb von Intron II liegen. *Cis*-wirkende Elemente innerhalb von Introns wurden schon bei etlichen Genen gefunden so auch beispielsweise beim COX4/NOC4-Genpaar des Menschen, das ebenfalls einen bidirektionalen Promotor besitzt (BACHMAN *et al.*, 1999).

In der Orientierung zum SNO-Gen hin weist die gemeinsame 5'-flankierende Region eine weitaus geringere Promotoraktivität auf, an der sich auch bei Hinzunahme eines Teils der kodierenden Region von SD_SNZG und eines Introns nichts wesentlich ändert (**3.7.2** und **Abb. 32**).

Die meisten bis heute beschriebenen eukaryotischen, bidirektionalen Promotoren besitzen im Gegensatz zum SNZ/SNO-Promotor keine TATA-Box/-en. Es sind häufig TATA-lose Promotoren, in denen meist eine oder mehrere GC-Boxen zu finden sind, ohne deren Anwesenheit keine Transkription stattfindet (Übersichtsartikel: AZIZKHAN *et al.*, 1993). Weiterhin sind oftmals E-Boxen anzutreffen, die möglicherweise sogar alleinverantwortlich die basale Transkription steuern können (LI und SEETHARAM, 1998). Eine Ausnahme stellt der bidirektionale Promotor des HrMA1-Genclusters der Ascidie *Halocynthia roretzi* dar (KUSAKABE, 1997). Dieser verfügt über zwei getrennte TATA-Boxen, die jeweils 30 bp vom Transkriptionsstartpunkt entfernt sind. Auch der SNZ/SNO-Promotor verfügt über zwei TATA-Boxen, die laut RT-PCR und computergetützter Analysen jeweils 24 bp vom Transkriptionsstartpunkt entfernt liegen. Im Falle des SD_SNZ- und SD_SNO-Genpaars überschneiden sich diese beiden TATA-Boxen, so daß wahrscheinlich weitere Faktoren benötigt werden,

welche die Orientierung des Polymerasekomplexes bestimmen und festlegen, in welche Richtung die Transkription fortschreitet. In Frage hierfür kämen unter Umständen Faktoren, die an E-Boxen binden, denn eine E-Box (Nr. 3) befindet sich in unmittelbarer Nähe zur TATA-Box. Eine Tatsache ist jedoch klar ersichtlich: die Transkription in Richtung SNZ-Gen verläuft - zumindest in diesem transienten Transfektionssystem - wesentlich effizienter.

4.3.2 Die Aktivität des SNZ-Promotors wird durch Applikation von Methylenblau moduliert

Methylenblau ist ein Photosensibilisator, der bei Bestrahlung mit Licht des sichtbaren Wellenlängenbereichs in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ermöglicht. Vorzugsweise Singulett-Sauerstoff wird in einer Typ II-Reaktion produziert (TUIE und KELLY, 1993; BRIVIBA *et al.*, 1997). Wie Transfektionsversuche mit pGL2-SNZ1 zeigten, wird die Expression des Reportergens Luciferase bei Behandlung der NIH 3T3 Zellen mit Methylenblau moduliert (3.7.2.1).

Auf welcher Ebene diese Modulation stattfindet, konnte durch diese Versuche nicht abschließend geklärt werden. Denkbar ist eine direkte Hemmung der Luciferase durch Oxidation bestimmter für die Enzymfunktion notwendiger Aminosäuren (in der Regel Cysteine). Eine indirekte Modulation könnte auf Ebene der Modifikation bestimmter Mitglieder in Signaltransduktionskaskaden stattfinden. So weiß man, daß beispielsweise der JAK/STAT-Signalweg durch ROS aktiviert wird (SIMON *et al.*, 1998). Die Aktivierung bzw. Modulation eines Signaltransduktionsweges kann indirekt auch für eine Veränderung der Genexpression verantwortlich sein. Weiterhin ist bekannt, daß eine große Anzahl eukaryotischer Transkriptionsfaktoren empfindlich auf durch ROS verursachte Änderungen des Redoxzustands innerhalb der Zelle reagieren. Dies kann sich in einer positiven oder negativen Modulation der Expression bestimmter Gene äußern (Übersichtsartikel: SEN und PACKER, 1996; MOREL und BAROUKI, 1999). Wenn nun ein bestimmter Transkriptionsfaktor eine dominante Rolle bei der Transaktivierung eines Genpromotors spielt, kann seine Hemmung durch eine Redoxmodifikation zu einer starken Reduktion der Promotoraktivität und damit auch der darauffolgenden Genexpression führen. Transkriptionsfaktoren, für die ein solches Verhalten bekannt ist, sind beispielsweise auch die Faktoren Sp1 und USF (WU *et al.*, 1996; POGNONEC *et al.*, 1992). Für beide sind potentielle Bindungssequenzen im SNZ/SNO-Promotor vorhanden (3.4.2 und Abb. 23).

4.3.3 Perspektiven

Ähnlich wie bei den cPKC-Promotoren könnten hier *Primer Extension*- und *SI-Nuclease Protection*-Assays für eine genauere Aufklärung der Lage des Transkriptionsstartpunktes sorgen. Außerdem wären wiederum EMSAs und *Footprint*-Analysen hilfreich, die *cis*-wirkenden Elemente zu kartieren und die daran bindenden Transkriptionsfaktoren zu typisieren. Die gezielte Klonierung von Transkriptionsfaktoren aus der cDNA-Bibliothek von *S. domuncula* mit Hilfe der Methode nach SINGH (1988) wäre eine weitere denkbare Vorgehensweise.

4.4 Die Transfektion der *S. domuncula* Zellen

4.4.1 Der ballistische Gentransfer ist eine geeignete Methode, um Fremd-DNA in Schwammzellen einzubringen

Beim Versuch DNA in die Zellen des Schwamms *S. domuncula* einzubringen, führte als einzige der durchgeführten Gentransfermethoden wie Elektroporation und Lipofektion (3.8) der Beschuß mit Goldpartikeln, der sogenannte ballistische Gentransfer, zum Erfolg.

Die Elektroporation könnte prinzipbedingt zwar ebenfalls funktionieren, besitzt aber den Nachteil, daß eine große Menge Ausgangsmaterial benötigt wird, welches im Falle der Schwämme meist nicht zur Verfügung steht.

Die Lipofektion beruht darauf, daß kationische Lipide mit der DNA durch ionische Wechselwirkungen kondensieren und Partikel bilden (LEDLEY, 1995). Diese Komplexe werden dann durch Endocytose in die Zelle aufgenommen und dissoziieren zum Zellkern (ZABNER *et al.*, 1995). Bei Schwammzellen funktioniert diese Methode nicht. Ein Grund hierfür könnte die ineffektive Bildung der Komplexe in Salzwasser mit seinem hohen Gehalt an NaCl sein (ca. 0,5 M). Wie WITT (1997) fand, können geringere Konzentrationen von NaCl (150 mM) die Transfektionseffizienz sogar steigern. Doch ab einer Konzentration von 300 mM kehrt sich dieser Effekt wieder ins Gegenteil um. Ein weiterer Grund für das Scheitern dieser Versuche könnte sein, daß die Endocytose der Lipid/DNA-Komplexe in die Schwammzellen bzw. deren Dissoziation in den Zellkern weniger erfolgreich verläuft, als dies bei anderen eukaryotischen Zellen der Fall ist.

4.4.2 Nur der heterologe CMV-Promotor bewirkt eine sichtbare Expression von EGFP in Schwammzellen

Die Expression des Reportergens EGFP in den Schwammzellen gelang, nicht wie gewünscht und erwartet, mit den homologen cPKC- und SNZ-Promotoren sondern mit dem heterologen CMV-Promotor, der eigentlich als Kontrolle dienen sollte.

Der CMV-Promotor und sein *upstream* liegender ca. 450 bp umfassender Enhancer ist seit ca. 15 Jahren für seine extrem hohe Transkriptionsaktivität bekannt (THOMSEN *et al.*, 1984; BOSHART *et al.*, 1985). Der proximale Promoter enthält eine TATA- und eine CCAAT-Box, der Enhancer eine ganze Reihe *cis*-wirkender Elemente, wie z. B. Bindungsstellen für CREB oder ATF, NF- κ B, Sp1 usw. (Übersichtsartikel: STINSKI *et al.*, 1993). Wegen seiner starken Transkriptionsaktivität wird er in vielen kommerziellen Expressionsvektoren eingesetzt und ist in einer ganzen Reihe von primären und stabilen Zelllinien aktiv. So wurden verschiedene Reportergene mit vorgeschaltetem CMV-Promotor nicht nur in Säugetierzellen sondern beispielsweise auch in Zellen der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*), der Auster (*Crassostrea gigas*) und vieler anderer Vertebraten und Invertebraten erfolgreich zur Expression gebracht (TAKEUCHI *et al.*, 1999; CADORET *et al.*, 1997). Der CMV-Promotor ist, wie in diesen Versuchen gezeigt wurde, in gleicher Weise geeignet, die Expression von EGFP in Schwammzellen zu steuern. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, daß nicht nur viele enzymatisch wirksame Proteine im Verlauf der Evolution ihre Funktion behielten, sondern daß auch DNA-bindende Proteine und deren Bindungsmotive relativ konserviert zu sein scheinen.

4.4.3 EGFP ist ein für Schwammzellen geeignetes Reportergen

Das grün fluoreszierende Protein in Form von EGFP stellte sich in diesen Experimenten als prinzipiell geeignetes Reportergen für die Verwendung in Schwammzellen heraus.

Sein Vorteil ist seine direkte Nachweisbarkeit. Ein Nachteil dieses Reportergens liegt allerdings in seiner relativ geringen Sensitivität. EGFP ist kein Enzym, das katalytisch eine große Menge an Substratmolekülen umsetzt und so seine Nachweisbarkeit potenziert. Diese Eigenschaft verlangt nach starken Promotoren, um eine ausreichende Expression zu gewährleisten. Es wird nämlich geschätzt, daß, selbst um die Fluoreszenz eines verstärkten GFPs wie EGFP nachzuweisen, eine Menge von etwa 0,1 μ M pro Zelle benötigt wird; eine Menge, die die Eigenfluoreszenz einer typischen Säuge-

tierzelle ausgleicht und die Zelle gegen die Hintergrundfärbung sichtbar macht (TSIEN, 1998).

Im heterologen System der NIH 3T3 Zellen waren die Schwamm promotoren stark genug, um die Expression des EGFPs so zu gewährleisten, daß eine Fluoreszenz sichtbar wurde (**3.7.4** und **Abb. 34**). Im homologen System schien das dagegen nicht der Fall zu sein. Dies könnte zum einen darauf zurückzuführen sein, daß die Eigenfluoreszenz der Schwammzellen weitaus stärker ausgeprägt ist als die von Säugetierzellen. Die durch die Schwamm promotoren getriebene Expression reichte wohl nicht aus, die Backgroundschwelle zu überschreiten. Zum anderen könnten die Schwamm promotoren aus ungeklärten Gründen im homologen System eine deutlich schwächere Transkription bewirken als im heterologen System.

4.4.4 Perspektiven

Mit der hier vorgestellten Methode konnte eine transiente Transfektion von Schwammzellen bewerkstelligt werden. Das weitere Vorgehen in dieser Richtung könnte so aussehen, daß Versuche unternommen werden, mit Hilfe eines Markergens stabil transfizierte Zellen zu selektieren. Im Laufe dieser Versuche wäre es vielleicht möglich, durch die Expression bestimmter Gene Schwammzellen so zu transformieren, daß stabile Zelllinien entstehen. Diese könnten zur Produktion wertvoller bioaktiver Substanzen eingesetzt werden (**1.3**).

Die Funktion von EGFP in Schwammzellen macht eine Vielzahl weiterer Applikationen denkbar. So könnte EGFP weiter als Reporter gen und Zellmarker verwendet werden. Nicht nur in Primärkulturen sondern auch bei kompletten Tieren, die ebenfalls mit Partikelbombardement transfiziert werden könnten, wäre der Einsatz dieses hilfreichen Werkzeugs denkbar. Auch dessen Verwendung als sogenanntes "*Fusion Tag*", um die Lokalisierung und das Schicksal eines Proteins innerhalb der Zelle zu überwachen, wäre möglich.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Schwämme (Porifera) sind eine reiche Quelle bioaktiver Naturstoffe. Viele dieser Naturstoffe besitzen das Potential, als Pharmazeutika, molekulare Sonden usw. eingesetzt oder weiterentwickelt zu werden. Die Beschaffung dieser Naturstoffe in ausreichenden Mengen stellt jedoch eines der größten Probleme bei der Testung und Produktion vielversprechender Substanzen dar. Der Transfer von DNA in Schwammzellen bzw. in komplette Organismen wäre ein vielversprechender Ansatz, dieses Problem zu lösen. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Funktion und Struktur homologer Promotoren zu untersuchen und eine Methode des Gentransfers in Schwammzellen auszuarbeiten.

Zu diesem Zweck wurde zusätzlich zu der bereits vorhandenen 5'-flankierenden Region des *conventional* PKC-Gens aus *Geodia cydonium* eine genomische Bibliothek von *Suberites domuncula* konstruiert, um diese mit Hilfe des DNA-Homologiescreenings nach den 5'-flankierenden Regionen des cPKC- und des SNZ (SnooZe)-Gens (SD_SNZG) zu durchsuchen. Die Klonierung und Sequenzierung sowohl des 5'-Bereichs als auch die Charakterisierung der Exon-Intron Struktur beider Gene wurde erfolgreich durchgeführt. In der 5'-Region des SNZ-Gens konnte dabei ein weiteres Gen (SD_SNO; SNZ *proximal Open Reading Frame*) identifiziert werden, das in einer "Kopf an Kopf"-Anordnung zu SD_SNZG orientiert ist. Sowohl SD_SNZG als auch SD_SNO wurden hochkonservierten Genfamilien zugeordnet, deren Vorkommen in Metazoen hier erstmals beschrieben wird.

Funktionelle Studien mit Hilfe der Reportergene Luciferase und *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) im heterologen System der NIH 3T3 Zellen wiesen sowohl dem cPKC-Promotor aus *G. cydonium* als auch dem SNZ-Promotor aus *S. domuncula* eine starke Promotoraktivität im Verhältnis zum SV40-Promotor nach. Die Aktivität des cPKC-Promotors aus *S. domuncula* dagegen war relativ schwach. Darüber hinaus konnte geklärt werden, daß die 5'-flankierende Region des SNZ-Gens bidirektionale Promotoraktivität aufweist und daß der *G. cydonium* cPKC-Promotor keine TATA-Box besitzt, sondern eine GC-Box für die basale Funktion benötigt.

Als geeignete Methode zur Transfektion von Zellen des Schwamms *S. domuncula* erwies sich der ballistische Gentransfer mit Hilfe der *Gene Gun*. Homologe Promotoren konnten die sichtbare Expression des Reportergens EGFP jedoch nicht bewirken. Nur der virale CMV-Promotor erwies sich als hierfür geeignet.

6 ABKÜRZUNGS- UND ABBILDUNGS- VERZEICHNIS

Abkürzungen und Summenformeln des Textes

A		
	Abb.	Abbildung
	Acc. No.	Zugangsnummer (<i>Accession Number</i>)
	Amp	Ampicillin
	Ak	Antikörper
	AP	Alkalische Phosphatase
	AP1	Aktivatorprotein 1 (<i>Activator Protein 1</i>)
	APS	Ammoniumpersulfat
	<i>Aqua bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser
	<i>Aqua dest.</i>	Einfach destilliertes Wasser
	As	Aminosäure
	ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor (<i>Activating Transcription Factor</i>)
	ATP	Adenosin-5'-triphosphat
B		
	bp	Basenpaar
	BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
	bHLH	basische Helix-Schleife-Helix (<i>basic helix-loop-helix</i>)
	BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
	bZIP	basische Leucinzipper (<i>basic leucin-zipper</i>)
C		
	°C	Grad Celsius
	cAMP	zyklischen Adenosinmonophosphat (<i>cyclic Adenosin Mono Phosphate</i>)
	cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
	CIAP	Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>)
	cm	Zentimeter
	CoA	CoenzymA
	CRE	cAMP Responsive Element
	CREB	CRE bindender Faktor (<i>CRE binding factor</i>)
	CREM	CRE Modulator (<i>CRE Modulator</i>)
D		
	DAG	Diacylglycerol
	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
	dCTP	Desoxycytidintriphosphat
	ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
	DEAE	Diethylaminoethanol
	DEPC	Diethylpyrocarbonat
	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
	DIG	Digoxigenin
	DLR	DNA Laderate (<i>DNA Loading Ratio</i>)
	DMEM	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

	DPE	Downstream Promotor Element (<i>Downstream Promoter Element</i>)
	DTT	Dithiothreitol
	dTTP	Didesoxythymidintriphosphat
E		
	E	Extinktion
	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	EGFP	Verstärkt leuchtendes Grünes Fluoreszenzprotein (<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)
	EtBr	Ethidiumbromid
	EtOH	Ethanol
	ETS-Domäne	Konservierte Domäne aus dem <i>v-ets</i> Onkogen, das durch den <i>E Twenty Six avian erythroblastosis</i> Virus kodiert wird
F		
	FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
	FITC	Fluorescein Isothiocyanat
G		
	<i>g</i>	Relative Zentrifugalbeschleunigung
	g	Gramm
	<i>G. cydonium</i>	<i>Geodia cydonium</i>
	GFP	Grünes Fluoreszenzprotein (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
	GuHCl	Guanidinhydrochlorid
H		
	h	Stunde
	HSP70	Hitzeschockprotein mit einem Molekulargewicht von 70 kDa (<i>Heat Shock Protein</i>)
I		
	Inr	Initiator-Element
	IPTG	Isopropylthiogalactosid
K		
	kb	Kilobase
	kDa	Kilodalton
L		
	l	Liter
	LPM	Liter pro Minute (<i>Litres Per Minute</i>)
M		
	M	Mol
	MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>Multiple Cloning Site</i>)
	mg	Milligramm
	min	Minute
	ml	Milliliter
	MLQ	Mikrocarrier Ladequantität (<i>Microcarrier Loading Quantity</i>)
	mM/mmol	Millimol
	MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
	mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
	µg	Mikrogramm
	µl	Mikroliter
N		
	NaAc	Natriumacetat
	NBT	Nitrotetrazoliumblausäure
	NCI	Natinoales Krebsinstitut der USA (<i>National Cancer Institute</i>)
	nt	Nukleotid
O		
	OD	Optische Dichte
	ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid

	ORF	Offener Leserahmen (<i>Open Reading Frame</i>)
P		
	p.a.	Von höchster Reinheit (<i>pro analysi</i>)
	PBS	Phosphatpufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
	PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
	PEG	Polyethylenglycol
	pfu	Plaque formende Einheit (<i>plaque forming unit</i>)
	pg	Picogram
	pH	Wasserstoffionen-Konz. (<i>potentia Hydrogenii</i>)
	PKA	Proteinkinase A
	PKC	Proteinkinase C
	PMA	12-Phorbol-13-Myristat-Acetat
	pmol	Picomol
	psi	Druck pro Quadratinch (<i>pressure per square inch</i>)
	PVP	Polyvinylpyrrolidon
	Py	Nukleotid mit Pyrimidinbase
R		
	rATP	riboATP
	RHD	Rel Homologie Domäne (<i>Rel Homology Domain</i>)
	RLB	Reporter Lyse Puffer (<i>Reporter Lysis Buffer</i>)
	RLU	Relative Lichteinheiten (<i>Relative Light Units</i>)
	RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic Acid</i>)
	RNase A	Ribonuklease A
	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
	rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
	RT	Raumtemperatur
	RT	Reverse Transkriptase
S		
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>S. domuncula</i>	<i>Suberites domuncula</i>
	SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
	sec	Sekunde
	SM	Suspensionsmedium (<i>Suspension Medium</i>)
	SNO	Bezeichnung für die SNO-Genfamilie (<i>SNZ-proximal ORF</i>)
	SNZ	Bezeichnung für die SNZ-Genfamilie (<i>SNooZe</i>)
	STE	Natrium-(<i>sodium</i>)-Tris-EDTA
T		
	TAE	Tris-Acetat-EDTA
	TBE	Tris-Borat-EDTA
	TE	Tris-EDTA
	T _m	Schmelz- oder Hybridisierungstemperatur
	TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
	TRE	TPA <i>Responsive Element</i>
	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	Tween 20	Poly(oxyethylen)20-sorbitan-monolaurat
U		
	U	Einheit der Enzymaktivität (<i>Unit</i>)
	upm	Umdrehungen pro Minute
V		
	V	Volt
	v/v	Volumen per Volumen (<i>volume per volume</i>)
W		
	w/v	Masse per Volumen (<i>weight per volume</i>)
X		
	X-Gal	5-Brom-4-chlor-indolyl-β-D-galactosid

Abkürzungscode für Aminosäuren und Basen

Aminosäure	3er-Code	1er-Code	Aminosäure	3er-Code	1er-Code
Alanin	Ala	A	Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N	Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C	Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q	Glycin	Gly	G
Histidin	His	H	Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L	Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M	Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P	Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T	Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y	Valin	Val	V

Base	Buchstabe
Adenin	A
Cytosin	G
Guanin	C
Thymin	T
Uracil	U

Abbildungen

- Abb. 1 (S. 1):** *Geodia cydonium*
- Abb. 2 (S. 3):** Strukturformel des Arabinofuranosyl-adenin (Ara-A)
- Abb. 3 (S. 4):** Strukturformeln der beiden aus unterschiedlichen Schwammspezies gewonnenen Naturstoffe Okadainsäure und Manoalid
- Abb. 4 (S. 5):** Verteilung der Proben mit signifikanter Cytotoxizität beim vorklinischen Screening des NCI's
- Abb. 5 (S. 6):** Strukturformeln der beiden Sesquiterpene Avarol und Avaron. Darunter abgebildet der Mittelmeerschwamm *Dysidea avara* (Demospongia /Dictyoceratida), aus dem diese beiden Sekundärmetabolite isoliert wurden
- Abb. 6 (S. 38):** Karte des λ FIX[®] II Substitutionsvektors
- Abb. 7 (S. 49):** Karte des pGL2-Basic Vektors
- Abb. 8 (S. 50):** Karte des pEGFP-N3 Vektors
- Abb. 9 (S. 58):** Die Helios Genkanone der Firma BIORAD
- Abb. 10 (S. 60):** Weg der Partikel durch die Helios Genkanone
- Abb. 11 (S. 62):** *Suberites domuncula*
- Abb. 12 (S. 62):** Partieller Verdau genomischer *S. domuncula* DNA
- Abb. 13 (S. 63):** Kontrolle des partiellen Auffüllens der Restriktionsenden
- Abb. 14 (S. 64):** Screeningplatte und korrespondierender Nitrocellulosefilter

- Abb. 15 (S. 66):** Southern Blot der E λ -Klone
- Abb. 16 (S. 67):** Restriktionskarten der drei "Ethylen" λ -Klone
- Abb. 17 (S. 69):** Nukleotidsequenz von SD_SNZG
- Abb. 18 (S. 71):** Genomischer Southern Blot von SD_SNZG
- Abb. 19 (S. 73):** Vergleich der vier hochkonservierten Proteinblocks der abgeleiteten Aminosäuresequenz von SD_SNZG (*sd_snz*) mit Sequenzhomologen aus anderen taxonomischen Hauptgruppen
- Abb. 20 (S. 75):** Organisation des SNZ/SNO-Genclusters
- Abb. 21 (S. 77):** Nukleotidsequenz von SD_SNOG
- Abb. 22 (S. 78):** Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von SD_SNO/SNOC_SD (*sd_sno*) mit Sequenzhomologen aus anderen taxonomischen Hauptgruppen
- Abb. 23 (S. 81):** Sequenz des bidirektionalen Promotors zwischen SD_SNZG und SD_SNO
- Abb. 24 (S. 82):** Kartierung des Transkriptionsstartpunktes des *S. domuncula* SNZ-Gens
- Abb. 25 (S. 86):** Southern Blot des λ PKC B-Klons
- Abb. 26 (S. 87):** Nukleotidsequenz von λ PKC B2,3
- Abb. 27 (S. 89):** 5'-flankierende Nukleotidsequenz von λ PKC B2,3, die für die Subklonierung in den pGL2-Basic Vektor verwendet wurde
- Abb. 28 (S. 91):** Nukleotidsequenz *upstream* des Start-Kodons von GCPKC2*Ge*
- Abb. 29 (S. 93):** Kartierung des Transkriptionsstartpunkt des *G. cydonium* cPKC-Gens
- Abb. 30 (S. 94):** Deletionsklone des *G. cydonium* cPKC-5'-Bereichs
- Abb. 31 (S. 96):** Luciferaseaktivität der 5'-flankierenden Region des *G. cydonium* cPKC-Gens
- Abb. 32 (S. 99):** Luciferaseaktivität der 5'-flankierenden Regionen der *S. domuncula* SNZ- und SNO-Gene
- Abb. 33 (S. 101):** Luciferaseaktivität der 905 bp umfassenden 5'-flankierenden Region von SD_SNZG nach Behandlung mit unterschiedlichen Reagenzien
- Abb. 34 (S. 104):** Expression der EGFP-Fusionsplasmide in NIH 3T3 Zellen
- Abb. 35 (S. 108):** Expression des pEGFP-N3 Vektors in Zellaggregaten von *S. domuncula*
- Abb. 36 (S. 113):** Vergleich der 5'-flankierenden Regionen der cPKC-Gene aus *G. cydonium* und *S. domuncula*

7 LITERATUR

Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M., Venter, J.C., *et al.* (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195

Ainscough, R., Bardill, S., Barlow, K., Basham, V., Baynes, C., Beard, L., Beasley, A., Berks, M., Bonfield, J., Brown, J., Burrows, C., Burton, J., Chui, C., Clark, E., Clark, L., Colville, G., Copley, T., Cottage, A., Coulson, A., Craxton, M., Cummings, A., Cummings, P. *et al.* (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* **282**: 2012-2018

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D. (1994). Molecular Biology Of The Cell. *Garland Publishing, Inc., New York & London*, 3rd edition

Allemand, A. (1906). Étude de physiologie appliquée à la spongiculture sur les côtes de Tunisie. *Unpublished manuscript*.

Althoff, K., Schütt, C., Steffen, R., Batel, R. und Müller, W.E.G. (1988). Evidence for a symbiosis between the bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: harbor also for putative toxic bacteria? *Mar. Biol.* **130**: 529-536

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3389-3402

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. und Karin, M. (1987). Phorbol Ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. *Cell* **49**: 729-739

Angel, P. und Karin, M. (1991). The roel of jun, fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta* **1072**: 129-157

Antelmann, H., Bernhardt, J., Schmid, R., Mach, H., Voelker, U. und Hecker, M. (1997). First steps from a two-dimensional protein index towards a response-regulation map for *Bacillus subtilis*. *Electrophoresis* **18**: 1457-1463

Arkhipova, I.R. (1995). Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis. *Genetics* **139**: 1359-1369

Armaleo, D., Ye, G.N., Shark, K.B., Klein, T.M., Sanford, J.C. und Johnston, S.A. (1990). Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr. Genet.* **17**: 97-103

- Armstrong, E., McKenzie, J.D. und Goldsworthy, G.T. (1999).** Aquaculture of sponges on scallops for natural products research and antifouling. *J. Biotechnol.* **70**: 163-174
- Ausubel, F.M., Brent, R. et al. (ed.) (1987-2000).** Current protocols in molecular biology Vol. 1-3. *Wiley & Sons, Inc., New York*
- Azizkhan, J.C., Jensen, D.E., Pierce, A.J. und Wade, M. (1993).** Transcription from TATA-less promoters: Dihydrofolate reductase as a model. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **3**: 229-254
- Bachman, N.J., Wu, W., Schmidt, T.R., Grossman, L. und Lomax, M.I. (1999).** The 5' region of the COX4 gene contains a novel overlapping gene, NOC4. *Mammalian Genome* **10**: 506-512
- Baeuerle, P.A. und Baltimore, D. (1996).** NF- κ B: Ten years after. *Cell* **87**: 13-20
- Bairoch, A. (1992).** Prosite: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucl. Acids Res.* **20**: 2013-2018
- Baldauf, S.L. und Palmer, J.D. (1993).** Animal and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **90**: 11558-11562
- Battershill, C.N. und Page, M. (1996).** Sponge aquaculture for drug production. *Aquaculture Update* Spring: 5-6.
- Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J., Ouellette, B.F., Rapp, B.A. und Wheeler, D.L. (1999).** GenBank. *Nucl. Acids Res.* **27**: 12-17
- Benton, W.D. und Davis, R.W. (1977).** Screening lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**: 180-182
- Bergman, W. und Feeney, R.J. (1951).** Nucleosides of sponges. Discovery of the arabinose-bases nucleosides - *Tethya crypta*. *J. Org. Chem.* **16**: 981-987
- Bewley, C.A., Holland, N.D. und Faulkner, D.J. (1996).** Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* **52**: 716-722
- Biesalski, H.K., Doepner, G., Tzimas, G., Damulin, V., Schröder, H.C., Batel, R., Nau, H. und Müller, W.E.G. (1992).** Modulation of *myb* gene expression in sponges by retinoic acid. *Oncogene* **7**: 1765-1774
- Bilski, P., Li, M.Y., Ehrenshaft, M., Daub, M.E. und Chignell, C.F. (2000).** Vitamin B₆ (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem. Photobiol.* **71**: 129-134
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1522
- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel-Jone, G.J. und Gotschlich, E.C. (1984).** A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**: 175-179
- Böger, H. (1988).** Versuch über das phylogenetische System der Porifera. *Meyniana* **40**: 143-154
- Bork, P., Gellerich, J., Groth, H., Hooft, R. und Martin, F. (1995).** Divergent evolution of a beta/alpha-barrel subclass: detection of numerous phosphate-binding sites by motif search. *Protein Sci.* **4**: 268-274

- Borowitzka, M.A., Hinde, R. und Pironet, F. (1988).** Carbon Fixation by the sponge *Dysidea herbacea* and its endosymbiont *Oscillatoria spongelliae*. In: Choat, J.H. et al. (Eds.) Proc. 6th int. Coral Reef Symp. *Symposium Executive Committee, Townsville*: 151-155
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K. Fleckenstein, B. und Schaffner, W. (1985).** A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of cytomegalovirus. *Cell* **41**: 521-530
- Boulo, V., Cadoret, J.P., Le Marrec, F., Dorange, G und Mihale, E. (1996).** Transient expression of luciferase reporter gene after lipofection on oyster (*Crassostrea gigas*) primary cell cultures. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **5**: 167-174
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, P.J., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T.M., Shark, K.B., und Sanford J.C. (1988).** Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* **240**: 1534-1538
- Braun, E.L., Fuge, E.K., Padilla, P.A. und Werner-Washburne, M. (1996).** A Stationary-Phase Gene in *Saccharomyces cerevisia* is a member of a novel, highly conserved gene family. *J. Bacteriol.* **23**: 6865-6872
- Briggs, M.R., Kadonaga, J.T., Bell, S.P. und Tjian, R. (1986).** Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor Sp1. *Science* **234**: 47-52
- Briviba, K., Klotz, L.-O. und Sies, H. (1997).** Toxic and signaling effects of photochemically or chemically generated singlet oxygen in biological systems. *Biol. Chem.* **375**: 1259-1265
- Brown, T.A. (1993).** Gentechnologie für Einsteiger. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*
- Bucher, P. (1990).** Weight Matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* **212**: 563-578
- Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N., und Hofmann, K. (1996).** A flexible motif search technique based on generalized profiles. *Comput. Chem.* **20**: 3-24
- Burke, T.W. und Kadonaga, J.T. (1996).** *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-Box-deficient promoters. *Genes & Develop.* **10**: 711-724
- Cadoret, J.P., Boulo, V., Gendreau, S. und Mialhe, E. (1997).** Promoters from *Drosophila* heat shock protein and Cytomegalovirus drive transient expression of luciferase introduced by particle bombardment into embryos of the oyster *Crassostrea gigas*. *J. Biotechnology* **56**: 183-189
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. und Prasher, D.C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802-805
- Chanas, B., Pawlik, J.R., Lindel, T. und Fenical, W. (1996).** Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **208**: 185-196.
- Chen, K-H., Widen, S.G., Wilson, S.H. und Huang, K-P. (1990).** Characterization of the 5'-flanking region of the rat protein kinase C γ gene. *J. Biol. Chem.* **265**: 19961-19965
- Chen, K-H., Widen, S.G., Wilson, S.H. und Huang, K-P. (1993).** Identification of a nuclear protein binding element within the rat brain protein kinase C γ promoter that is related to the developmental control of this gene. *FEBS Letters* **325**: 210-214

- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159
- Clark, J.M. (1988).** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**: 9677-9686
- Clarke, L. und Carbon, J. (1976).** A colony bank containing synthetic ColE1 hybrids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**: 91-99
- Cohen, S., Chang, A.C.Y. und Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2110-2114
- Corey, E.J., Gin, D.Y. und Kania, R.S. (1996).** Enantioselective total synthesis of ecteinascidin 743. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 9202-9203.
- Cormack, B.P., Valdivia, R. und Falkow, S. (1996).** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33-38
- Coutinho, C. C., Seack, J., Van de Vyver, G., Borojevic, R. und Müller, W.E.G. (1998).** Origin of the metazoan bodyplan: Characterization and functional testing of the promoter of the homeobox gene *EmH-3* from the freshwater sponge *Ephydatia muelleri* in mouse 3T3 cells. *Biol. Chem.* **379**: 1243-1251
- Custodio, M.R., Imsiecke, G., Borojevic, M., Rinkevich, B., Rogerson, A. und Müller, W.E.G. (1995).** Evolution of cell adhesion systems: evidence for Arg-Gly-Asp-mediated adhesion in the protozoan *Neoparamoeba aestuarina*. *J. Euk. Microbiol.* **42**: 721-725.
- Custodio, M.R., Prokic, I., Steffen, R., Koziol, C., Borojevic, R., Brümmer, F., Nickel, M. und Müller, W.E.G. (1998).** Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech. Ageing Dev.* **105**: 45-59
- Davis, A.R., Butler, A.J. und Van Altena, I. (1991).** Settlement behaviour of ascidian larvae: preliminary evidence for inhibition by sponge allelochemicals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **72**: 117-123.
- De Silva, E.D. und Scheurer, P.J. (1980).** Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge *Luffariella variabilis*. *Tetrahedron Lett.* **21**: 1611-1644
- De Wet, J.R., Wood, K.V., Helinski, D.R. und DeLuca, M. (1985).** Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7870-7873
- Degnan, B.M., Degnan, S.M., Naganuma, T. und Morse, D.E. (1993).** The *ets* multigene family is conserved throughout the Metazoa. *Nucl. Acids Res.* **21**: 3479-3484
- Degnan, B.M., Degnan, S.M., Giusti, A. und Morse, D.E. (1995).** A *hox/hom* homeobox gene in sponges. *Gene* **155**: 175-177
- Deléage, G. und Roux, B. (1987).** An algorithm for protein secondary structure prediction based on class prediction. *Protein Eng.* **1**: 289-294
- Delfino, F. und Walker, W.H. (1999).** Hormonal regulation of the NF- κ B signaling pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* **157**: 1-9

Desai, D.S., Hirai, S.-I., Karnes, W.E., Jr., Niles, R.M. und Ohno, S.-G. (1999). Cloning and characterization of the murine PKC α promoter: Identification of a retinoic acid response element. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **263**: 28-34

Dumdei, E.J., Blunt, J.W., Munro, M.H.G., Battershill, C.N. und Page, M.J. (1998). The whys and whats of sponge chemistry: why chemists extract sponges and what problems does this cause? In: Watanabe, Y., Fusetani, N. (Eds.), *Sponge Sciences. Multidisciplinary Perspectives.* Springer, Tokyo: 353-364.

Ehrenshaft, M., Jenns, A.E., Chung, K.R. und Daub, M.E. (1998). SOR1, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora* Fungi, is highly conserved in divergent organisms. *Mol. Cell* **1**: 603-609

Ehrenshaft, M., Jenns, A.E., Chung, K.R. und Daub, M.E. (1999a). Functional characterization of SOR1, a gene required for resistance to photosensitizing toxins in the fungus *Cercospora nicotinae*. *Curr. Genet.* **34**: 478-485

Ehrenshaft, M., Bilski, P., Li, M.Y., Chignell, C.F. und Daub, M.E. (1999b). A highly conserved sequence is a novel gene involved in *de novo* vitamin B6 biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **96**: 9374-9378

Eickbush, T.H. und Moudrianakis, E.N. (1978). The compaction of DNA-helices into either continuous supercoils of folded fiber rods and toroids. *Cell* **13**: 295-306

Engler, M.J. und Zimmermann, S.B. (1982). DNA ligases. In: Boyer P.D. *The Enzymes*, Vol 15B. Academic Press, N.Y.: 3-30

Faulkner, D.J. (1995). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **12**: 223-270.

Faulkner, D.J. (1997). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **14**: 259-302.

Felgner, P., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Cahn, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. und Danielsen, M. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7413-7417

Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.-F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G., FitzHugh, W., Fields, C.A., Gocayne, J.D., Scott, J.D., Shirley, R., Liu, L.-I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T.R., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S.M., Gnehm, C.L.C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O. und Venter, J.C. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512

Foulkes, N.S. und Sassone-Corsi, P. (1996). Transcription factors coupled to the cAMP-signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1288**: F101-F121

Friedrich, A.B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P. und Hentschel, U. (1999). Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Mar. Biol.* **134**: 461-470

Frischauf, A.M., Lehrach, H., Poustka, A. und Murray, N. (1983). Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**: 827-842

- Fuge, E.K., Braun, E.L. und Werner-Washburn, M. (1994).** Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **176**: 5802-5813
- Galperin, M. Y. und Koonin, E. V. (1997).** Sequence analysis of an exceptionally conserved operon suggests enzymes for a new link between histidine and purine biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **24**: 443-445
- Gamulin, V., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (2000).** Sponge proteins are more similar to those of *Homo sapiens* than to *Caenorhabditis elegans*. *Biol. J. Linnean Soc.*, In Press
- Garson, M.J. (1994).** The biosynthesis of sponge secondary metabolites: why is it important? In: *Sponges in Time and Space*, Van Soest, R.W.M., Van Kempen, T.M.G. und Braekman, J.D. (Eds.). *A.A. Balkema, Rotterdam*: 427-440.
- Gendreau, S., Lardans, V. Cadoret, J.P. und Mialhe, E. (1995).** Transient expression of luciferase reporter gene after biolistic introduction into *Artemia franciscana* (Crustacea) embryos. *Aquaculture* **133**: 199-205
- Gilbert, J.J. und Allen, H.L. (1973).** Chlorophyll and primary productivity of some green, freshwater sponges. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* **58**: 633-658
- Glaser, K.B. und Jacobs, R.J. (1986).** Molecular pharmacology of manoalide. Inactivation of bee venom phospholipase A₂. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 449-453.
- Göttlicher, M., Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P. (1997).** The AP-1 family of transcription factors: Multi-level control of activity. In: *Transcription Factors in Eucaryotes*, Papavassiliou, A. G. (Ed.). *Springer, Heidelberg*: 67-93
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. und Oliver, S.G. (1996).** Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546
- Gopalakrishna, R., Chen, U. und Gundimeda, U. (1997).** Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion. *Arch. Biochem. Biophys.* **348**: 37-48
- Gragg, G.M., Newman, D.J. und Snader, K.M. (1997).** Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.* **60**: 52-60
- Gupta, R.S. und Golding, G.B. (1993).** Evolution of HSP70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **37**: 573-582
- Gupta, R.S., Golding, G.B. und Singh, B. (1994).** HSP70 phylogeny and the relationship between archaeobacteria, eubacteria and eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **39**: 537-540
- Günzburg, W.H. und Salmons, B. (1997).** Gentransfer in Säugetierzellen. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*
- Gunther, E.J., Murray, N.E. und Glazer, P.M. (1993).** High efficiency, restriction-deficient *in vitro* packaging extracts for bacteriophage lambda DNA using a new *E.coli* lysogen. *Nuc. Acids Res.* **21**: 3903-3904
- Hamuguchi, K. und Geiduschek, E.P. (1962).** The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleate helix. *JACS* **84**: 1329-1337

- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Gebeyehu, G., Jessee, J. und Felgner, P. (1993).** LIPOFECTAMINE™ Reagent: A new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent. *Focus*® **15**: 73-79
- Heinemeyer, T., Wingender, E., Reuter, I., Hermjakob, H., Kel, A. E., Kel, O. V., Ignatieva, E. V., Ananko, E. A., Podkolodnaya, O. A., Kolpakov, F. A., Podkolodny, N. L. und Kolchanov, N. A. (1998).** Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. *Nucl. Acids Res.* **26**: 364-370
- Heinemeyer, T., Chen, X., Karas, H., Kel, A. E., Kel, O. V., Liebich, I., Meinhardt, T., Reuter, I., Schacherer, F. und Wingender, E. (1999).** Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucl. Acids Res.* **27**: 318-322
- Henikoff, S. und Henikoff, J.G. (1992).** Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10915-10919
- Henikoff, S. und Henikoff, J.G. (1994).** Protein family classification based on searching a database of blocks. *Genomics* **19**: 97-107
- Henikoff, S., Henikoff, J.G. und Pietrokovski, S. (1999).** Blocks+: a non-redundant database of protein alignment blocks derived from multiple compilations. *Bioinformatics* **15**: 471-479
- Henrikson, A.A. und Pawlik, J.R. (1995).** A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *J. Exp. Mar. Biol.* **194**: 157-165
- Hohn, B. und Murray, K. (1977).** Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3259-3263
- Hope, I.A. und Struhl, K. (1985).** GCN4 protein, synthesized *in vitro* binds HIS3 regulatory sequences: implications for general control of amino acid biosynthesis genes in yeast. *Cell* **43**: 177-188
- Huber, R., Schlessinger, D. und Pilia, G. (1998).** Multiple Sp1 sites efficiently drive transcription of the TATA-less promoter of the human glypican 3 (GPC3) gene. *Gene* **214**: 25-44
- Ilan, M., Contini, H., Carmeli, S. und Rinkevich, B. (1996).** Progress towards cell cultures from marine sponges that produce bioactive compounds. *J. Mar. Biotechnol.* **4**: 145-149
- Imsiecke, G., Custodio, M., Borojevic, R., Steffen, R., Moustafa, M.A. und Müller, W.E.G. (1995a).** Genome size and chromosomes in marine sponges [*Suberites domuncula*, *Geodia cydonium*]. *Cell Biol. Int.* **19**: 995-1000
- Imsiecke, G., Steffen, R., Custodio, M., Borojevic, R. und Müller, W.E.G. (1995b).** Formation of spicules by sclerocytes from the freshwater sponge *Ephydatia muelleri* in short-term cultures *in vitro*. *Cell. Dev. Biol.* **31**: 528-535
- Ireland, C.M., Copp, B.R., Foster, M.D., McDonald, L.A., Radisky, D.C. und Swersey, J.C. (1993).** Biomedical potential of marine natural products. In: Attaway, D.H., Zaborsky, O.R. (Eds.), Marine Biotechnology. Pharmaceutical and Bioactive Natural Products, Vol. 1. *Plenum Press, New York*: 1-43.

- Johnston, S.A., Anziano, P.Q., Shark, K., Sanford, J.C. und Butow, R.A. (1988).** Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* **240**: 1538-1541
- Kästner, A. (1993).** Lehrbuch der speziellen Zoologie. Band I: Wirbellose Tiere herausgegeben von Gruner, H.-E.: 1. Teil: Einführung Protozoa, Placozoa, Porifera. *Gustav Fischer Verlag, Jena*, 5. Aufl., 251-297
- Kinne, O. (1977).** Cultivation of animals-research cultivation, 3: Porifera. In: Kinne, O. (Ed.), *Marine Ecology, Vol III (Cultivation), part 2. London: Wiley Interscience*, **5.1**: 627-64.
- Kirby, K.S. (1957).** A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: Evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochem. J.* **66**: 495-501
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. und Sanford, J.C. (1987).** High-velocity microprojectiles for delivery of nucleic acids into living cells. *Nature* **327**: 70-73
- Klein, T.M., Fromm, M., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M. und Sanford, J.C. (1988).** Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4305-4309
- Klautau, M., Custodio, M.R. und Borojevic, R. (1993).** Cell culture of sponges (*Clathrina* and *Polymastia*). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **29A**: 97-99.
- Klautau, M., Custodio, M.R. und Borojevic, R. (1994).** *In vitro* culture of primary cell lines from marine sponges. In: van Soest, R.W.U., van Kempen, T.M.G. und Braekman, J.C. (Eds.), *Sponges in Time and Space. Balkema, Rotterdam, The Netherlands*: 401-406.
- Koch-Brandt, C. (1993).** Gentransfer. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*
- Kolchanov, N.A., Ananko, E.A., Podkolodnaya, O.A., Ignatieva, E.V., Stepanenko, I.L., Kel-Margoulis, O.V., Kel, A.E., Merkulova, T.N., Goryachkovskaya, T.N., Busygina, T.V., Kolpakov, F.A., Podkolodny, N.L., Naumochkin, A.N. und Romashchenko, A.G. (1999).** Transcription Regulatory Regions Database (TRRD): its status in 1999. *Nucl. Acids Res.* **27**: 303-306
- Kozak, M. (1991).** Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* **266**: 19867-19870
- Koziol, C., Wagner-Hülsmann, C., Mikoc, A., Gamulin, V., Kruse, M., Pancer, Z., Schäcke, H. und Müller, W.E.G. (1996).** Cloning of a heat-inducible biomarker, the cDNA encoding the 70-kDa heat shock protein, from the marine sponge *Geodia cydonium*: response to natural stressors. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **136**: 153-161
- Koziol, C., Borojevic, R., Steffen, R. und Müller, W.E.G. (1998).** Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech. Ageing Dev.* **100**: 107-120.
- Krasko, A., Schröder, H.C., Perovic, S., Steffen, R., Kruse, M., Reichert, W., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (1999).** Ethylene modulates gene expression in cells of the marine sponge *Suberites domuncula* and reduces the degree of apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**: 31524-31530
- Kruse, M., Gamulin, H., Cetkovic, H., Pancer, Z., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (1996).** Molecular evolution of the metazoan protein kinase C multigene family. *J. Mol. Evol.* **43**: 374-383
- Kruse, M., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (1997).** Early evolution of metazoan serine/threonine- and tyrosine kinases: identification of selected kinases in marine sponges. *J. Mol. Evol.* **43**: 1326-1334

- Kruse, M., Leys, S.P., Müller, I. und Müller, W.E.G. (1998a).** Phylogenetic position of the Hexactinellida within the phylum Porifera based on amino acid sequence of the protein kinase C from *Rhabdocalytus dawsoni*. *J. Mol. Evol.* **46**: 721-728
- Kruse, M. (1998b).** Studien zur Funktion und Phylogenie der Proteinkinase C in marinen Schwämmen. Dissertation, *Institut für Physiologische Chemie, Universität Mainz*
- Kusakabe, T. (1997).** Ascidian actin genes: Developmental regulation of gene expression and molecular evolution. *Zoological Science* **14**: 707-718
- Lamas, M. und Sassone-Corsi, P. (1997).** Coupling transcription to signal transduction: CREM and cAMP. In: *Transcription Factors in Eucaryotes*, Papavassiliou, A. G. (Ed.). *Springer, Heidelberg*: 51-65
- Lania, L., Majello, B. und De Luca, P. (1997).** Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**: 1313-1323
- Latchman, D.E. (1995).** Eucaryotic Transcription Factors. *Academic Press, San Diego*, 2nd edition
- Ledley, F.D. (1995).** Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products. *Human Gene Therapy* **6**: 1129-1144
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. und Boedtker, H. (1977).** RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions: A critical reexamination. *Biochemistry* **16**: 4743-4751
- Lennard A., Gaston, K. und Fried, M. (1994).** The Surf-1 and Surf-2 genes and their essential bidirectional promoter elements are conserved between mouse and human. *DNA & Cell Biol.* **13**: 1117-1126
- Leonard, N.J., McDonald, J.J. und Reichmann, M.E. (1970).** Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic acid components. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**: 93
- Leonardo, M., Pierce, J.W. und Baltimore, D. (1987).** Protein-binding sites in Ig enhancers determine transcriptional activity and inducibility. *Science* **236**: 1573-1577
- Leys, S.P. (1997).** Sponge cell culture: a comparative evaluation of adhesion to a native tissue extract and other culture substrates. *Tissue & Cell* **29**: 77-87
- Li, N. und Seetharam, B. (1998).** A 69-base pair fragment derived from human transcobalamin II promoter is sufficient for high bidirectional activity in the absence of a TATA box and an initiator element in transfected cells. *J. Biol. Chem.* **273**: 28170-28177
- Lozoya, X. (1997).** Pflanzliche Arzneimittel gestern und heute. In: *Spektrum Spezial: Pharmaforschung*, *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*
- Lu, J., Lee, W., Jiang, C. und Keller, E.B. (1994).** Start site selection by Sp1 in the TATA-less human Ha-ras promoter. *J. Biol. Chem.* **269**: 5391-5402
- Lüscher, B., Austen, M., Sommer, A., Hilfenhaus, S. und Henriksson, M. (1987).** Transcriptional regulation by the Myc-Max-Mad network. In: *Transcription Factors in Eucaryotes*, Papavassiliou, A. G. (Ed.). *Springer, Heidelberg*: 235-251
- Mahajna, J., King, P., Parker, P. und Haley, J. (1995).** Autoregulation of cloned human protein kinase C β and γ gene promoters in U937 cells. *DNA & Cell Biol.* **14**: 213-222

- Maniatis, T. und Reed, R. (1987).** The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* **325**: 673-678
- Marmur, J. (1961).** A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218
- Martinez, H.M. (1983).** An efficient method for finding repeats in molecular sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**: 4629-4634
- McCabe, D.E., Swain, W.F., Martinell, B.J. und Christou, P. (1988).** Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technol.* **6**: 923-926
- McSwine-Kennick, R.L., McKeegan, E.M., Johnson, M.D. und Morin, M.J. (1991).** Phorbol Diester-induced alterations in the expression of protein kinase C isozymes and their mRNAs. *J. Biol. Chem.* **266**: 15135-1543
- Mehl, D. und Reiswig, H.M. (1991).** The presence of flagellar vanes in choanomers of Porifera and their possible phylogenetic implications. *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.* **29**: 312-319
- Mehl, D., Müller, I. und Müller, W.E.G. (1998).** Molecular biological and palaeontological evidence that Eumetazoa including Porifera (sponges) are of monophyletic origin. In: Watanabe, Y. Fusetani, N. (Eds.), *Sponge Science - Multidisciplinary Perspectives*. Springer, Tokyo: 152-165
- Miki, W., Kon-ya, K. und Mizobuchi, S. (1996).** Biofouling and marine biotechnology: new antifoulants from marine invertebrates. *J. Mar. Biotechnol.* **4**: 117-120.
- Milanesi, L., Muselli, M. und Arrigo, P. (1996).** Hamming Clustering method for signals prediction in 5' and 3' regions of eukaryotic genes. *Comput. Applic. Biosci.* **12**: 399-404
- Mitchell, C., Morris, P.W. und Vary, J.C. (1992).** Amino acid sequences of several *Bacillus subtilis* proteins modified by apparent guanylation. *Mol. Microbiol.* **6**: 1579-1581
- Moore, H.F. (1910).** A practical method of sponge culture. *Bull. US Bur. Fish* **28**: 545-585.
- Morel, Y. und Barouki, R. (1999).** Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* **342**: 481-496
- Morgan, S.J. und Darling, D.C. (1994).** Kultur tierischer Zellen. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*
- Müller, W.E.G., Zahn, R.K., Beyer, R. und Falke, D. (1977).** 9- β -D-Arabinofuranosyladenine as a tool to study *Herpes simplex* virus DNA replication *in vitro*. *Virology* **76**: 787-796
- Müller, W.E.G., Rottmann, B., Diehl-Seifert, B., Kurelec, B., Uhlenbruck, G. und Schröder, H.C. (1987).** Role of the aggregation factor in the regulation of phosphoinositide metabolism in sponges. Possible consequences on calcium efflux on mitogenesis. *J. Biol. Chem.* **262**: 9850-9858
- Müller, W.E.G. (1995).** Molecular phylogeny of Metazoa (Animals): Monophyletic origin. *Naturwissenschaften* **82**: 321-329
- Müller, W.E.G. und Schröder, H.C. (1997).** Bioaktive Substanzen aus Schwämmen: Gene weisen den Weg bei der Suche nach neuen Arzneimitteln. *BIUZ* **27**: 389-398
- Müller, W.E.G. (1998).** Origin of Metazoa: Sponges as living fossiles. *Naturwissenschaften* **85**: 11-25

- Müller, W.E.G., Wiens, M., Batel, R., Steffen, R., Schröder, H.C., Borojevic, R. und Custodio, M.R. (1999a).** Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **178**: 205-219
- Müller, W.E.G., Wimmer, W., Schatton, W., Böhm, M., Batel, R. und Filic, Z. (1999b).** Initiation of an aquaculture of sponges for the sustainable production of bioactive metabolites in open systems: Example *Geodia cydonium*. *Mar. Biotechnol.* **1**: 569-579
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T. und Ehrlich, H.A. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273
- Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Lake, R.J., Litaudon, M., Battershill, C.N. und Page, M.J. (1994).** From seabed to sickbed: what are the prospects? In: Sponges in Time and Space, Van Soest, R.W.M., Van Kempen, T.M.G., und Braekman, J.C. (Eds.). *A.A. Balkema, Rotterdam*: 473-484.
- Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Dumdei, E.J., Hickford, S.J.H., Lill, R.E., Li, S., Battershill, C.N. und Duckworth, A.R. (1999).** The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.* **70**: 15-25
- Needleman, S.B. und Wunsch, C.D. (1970).** A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**: 443-453
- Neurath, M., Ma, X. und Petterson, S. (1997).** DNA/Protein Interaktionen. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*
- Newton, A.C. (1995).** Protein Kinase C: Structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* **270**: 28495-28498
- Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II. (1997).** GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS* **4**: 14
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. und Sugino, Y. (1990).** A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6169
- Nishizuka, Y. (1984).** Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science* **225**: 1365-1370
- Obeid, L.M., Blobe, G.C., Karolak, L.A. und Hannun, Y.A. (1992).** Cloning and characterization of the major promoter of the human protein kinase C β gene. *J. Biol. Chem.* **267** : 20804-20810
- Ögrész, L., Máthé, C., Horváth, E., Schell, J., Koncz, C. und Szabados, L. (1998).** T-DNA trapping of a cryptic promoter identifies an ortholog of highly conserved SNZ growth arrest response genes in *Arabidopsis*. *Plant Sci.* **138**: 217-228
- Ogasawara, N., Nakai, S. und Yoshikawa, H. (1994).** Systematic sequencing of the 180 kilobase region of the *Bacillus subtilis* chromosome containing the replication origin. *DNA Res.* **1**: 1-14
- Orii, K.E., Orii, K.O., Souri, M., Orii, T., Kondo, N., Hashimoto, T. und Aoyama, T. (1999).** Genes for the human mitochondrial trifunctional protein α - and β -subunits are divergently transcribed from a common promoter region. *J. Biol. Chem.* **274**: 8077-8084

- Osinga, R., Planas Muela, E., Tramper, J. und Wijffels, R.H. (1998).** In vitro cultivation of four marine sponge species: determination of the nutritional demands. In: Marine Microorganisms for Industry. LeGal, Y., und Muller-Feuga, A. (Eds.). *Actes des colloques 21. Plouzané: IFREMER*: 121-127
- Osinga, R., Tramper, J. und Wijffels, R.H. (1999a).** Cultivation of Marine Sponges. *Mar. Biotechnol.* **1**: 509-532
- Osinga, R., De Beukelaer, P.B., Meijer, E.M., Tramper, J., und Wijffels, R.H. (1999b).** Growth of the sponge *Pseudosuberites* (aff.) *andrewsi* in a closed system. *J. Biotechnol.* **70**: 155-161
- Osmani, A.H., May, G.S. und Osmani, S.A. (1999).** The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J. Biol. Chem.* **274**: 23565-23569
- Padilla, P.A., Fuge, E.K., Crawford, M.E., Errett, A. und Werner-Washburne, M. (1998).** The highly conserved, coregulated SNO and SNZ gene families in *Saccharomyces cerevisiae* respond to nutrient limitation. *J. Bacteriol.* **180**: 5718-5726
- Paul, V.J. (Ed.) (1992).** Ecological roles of marine natural products. *Comstock Publishing, Ithaca, New York*
- Pawlik, J.R., Chanas, B., Toonen, R.J. und Fenical, W. (1995).** Defenses of Caribbean sponges against predatory fish, I: chemical deterrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **127**: 183-194.
- PC/Gene (1995).** Data Banks CD-Rom, Release 14.0. *IntelliGenetics Inc., Mountain View, CA*
- Pearson, W.R. und Lipman, D.J. (1988).** Improved Tools for Biological Sequence Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448
- Penman, S. (1966).** RNA metabolism in the HeLa cell nucleus. *J. Mol. Biol.* **17**: 117-130
- Pfeifer, K., Haasemann, M., Gamulin, V., Bretting, H., Fahrenholz, F. und Müller, W.E.G. (1993).** S-type lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiol.* **3**: 179-184
- Piret, B., Legrand-Poels, S., Sappey, C. und Piette, J. (1995).** NF- κ B transcription factor and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activation by methylene blue photosensitisation. *Eur. J. Biochem.* **228**: 447-455
- Pognonec, P., Kato, H. und Roeder, R.G. (1992).** The helix-loop-helix/leucine repeat transcription factor USF can be functionally regulated in a redox-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **267**: 24563-24567
- Pomponi, S.A. und Willoughby, R. (1994).** Sponge cell culture for production of bioactive metabolites. In: van Soest, R.W.M., van Kempen, T.M.G. und Braekman, J.-C. (Eds.), Sponges in Time and Space. *A.A. Balkema, Rotterdam*: 395-400
- Pomponi, S.A., Willoughby, R., Edward Kaighn, M. und Wright, A.E. (1997).** Development of techniques for *in vitro* production of bioactive natural products from marine sponges. In: Maramorosch, K., Mitsuhashi, J. (Eds.), Novel Directions and Biotechnology Applications. *Science Publishers, NH, USA*: 231-237.
- Pomponi, S.A., Willoughby, R., Wright, A.E., Pecorella, C., Sennett, S.H., Lopez, J. und Samples, G. (1998).** *In vitro* production of marine-derived antitumor compounds. In: Le Gal, Y.,

Halvorson, H.O. (Eds.), *New Developments in Marine Biotechnology. Plenum Press, New York*: 73-76

Pomponi, S.A. (1999). The bioprocess-technological potential of the sea. *J. Biotechnol.* **70**: 5-13.

Porter, J.W. und Targett, T.N. (1988). Allelochemical interactions between sponges and coral. *Biol. Bull.* **175**: 230-239

Potter, H. (1993). Application of electroporation in recombinant DNA technology. *Methods Enzymol.* **217**: 461-483

Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Pendergast, F.G. und Cormier, M.J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Gene* **111**: 229-233

Proksch, P. (1994). Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranchs. *Toxicon* **32**: 639-655

Reese, M.G. und Eckman, F.H. (1995). Novel neural network algorithms for improved eukaryotic promoter site recognition. *The seventh international genome sequencing and analysis conference, Hilton Island, South Carolina*

Reuter, M. (1978). Testung und Reinigung eines Zytostatikums in dem Schwamm *Geodia cydonium*. *Diplomarbeit, Institut für Physiologische Chemie, Universität Mainz*

Richelle-Maurer, E., Van De Vyver, G., Vissers, S. und Coutinho, C.C. (1998). Homeobox-containing genes in freshwater sponges: characterization, expression and phylogeny. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **19**: 157-175

Rinkevich, B., Blisko, R. und Ilan, M. (1998). Further steps in the initiation of cell cultures from embryos and adult sponge colonies. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **34**: 753-756.

Rinkevich, B. (1999). Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *J. Biotechnol.* **70**: 133-153

Rosenthal, N. (1987). Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Meth. Enzymol.* **152**: 704-720

Rützler, K. (1985). Associations between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. In: Rützler, K. (Ed.) *New perspectives in sponge biology. Smithsonian Institution Press, Washington DC*: 455-466.

Ryan, M.T., Herd, S.M., Sberna, G., Samuel, M.M., Hoogenraad, N.J. und Hoj, P.B. (1997). The genes encoding mammalian chaperonin 60 and chaperonin 10 are linked head-to-head and share a bidirectional promoter. *Gene* **196**: 9-17

Saiki, R.K., Scharf, S.J., Falloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning I-III. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA*

- Santavy, D.L., Willenz, P. und Colwell, R.R. (1990).** Phenotypic study of bacteria associated with the Caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1750-1762
- Sarin, P.S., Sun, D., Thornton, A. und W.E.G. Müller (1987).** Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus/lymphadenopathy-associated virus) by Avarol and Avarone. *J. National Cancer Inst.* **78**: 663-666
- Sarma, A.S., Daum, T. und Müller, W.E.G. (1993).** Secondary Metabolites from Marine Sponges. *Ullstein-Mosby Verlag, Berlin: Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt.*
- Scharf, S.J., Horn, G.T. und Ehrlich, H.A. (1986).** Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233**: 1076-1078
- Schaufelberger, D.E., Koleck, M.P., Beutler, J.A., Vatakis, A.M., Alvarado, A.B., Andrews, P., Marzo, L.V., Muschik, G.M., Roach, J., Ross, J.T., Leberherz, W.B., Reeves, M.P., Eberwein, R.B., Rodgers, L.L., Testerman, R.P., Snader, K.M. und Forenza, S. (1991).** The large-scale isolation of bryostatin 1 from *Bugula neritina* following good manufacturing practices. *J. Nat. Prod.* **54**: 1265-1270.
- Scheffer, U., Krasko, A., Pancer, Z. und Müller, W.E.G. (1997).** High conservation of the serum response factor within Metazoa: cDNA from the sponge *Geodia cydonium*. *Biol. J. Linnean Soc.* **61**: 127-137
- Schreck, R., Kistler, B. und Wirth, T. (1997).** The NF- κ B/Rel system of transcriptional activators. In: *Transcription Factors in Eucaryotes*, Papavassiliou, A. G. (Ed.). *Springer, Heidelberg*: 153-188
- Schug, J. und Overton, G. C. (1997).** TESS: Transcription Element Search Software on the WWW. *Technical Report CBIL-TR-1997-1001-v0.0, of the Computational Biology and Informatics Laboratory, School of Medicine, University of Pennsylvania, 1997*
- Seack, J., Perovic, S., Gamulin, V., Schröder, H.C., Beutelmann, P., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (2000).** Identification of the highly conserved, and adjacently localized SNZ and SNO genes in the sponge *Suberites domuncula*: Gene structure and promoter activity in mammalian cells. *Zur Veröffentlichung eingereicht*
- Seed, B., Parker, R.C. und Davidson, N. (1982).** Representation of DNA sequences in recombinant DNA libraries prepared by restriction enzyme partial digestion. *Gene* **19**: 201-209
- Seid, C.A., Sater, A.K., Falzone, R.L. und Tomlinson, C.R. (1996).** A tissue-specific repressor in the sea urchin embryo of *Lytechinus pictus* binds the distal G-string element in the LpS1- β promoter. *DNA Cell Biol.* **15**: 511-517
- Seimiya, M., Ishiguro, H., Watanabe, Y. und Kurosawa, Y. (1994).** Homeobox-containing genes in the most primitive metazoa, the sponges. *Eur. J. Biochem.* **221**: 219-225
- Seimiya, M., Watanabe, Y. und Kurosawa, Y. (1995).** Identification of POU-class homeobox genes in a freshwater sponge and the specific expression of these genes during differentiation. *Eur. J. Biochem.* **243**: 27-31
- Sen, C.K. und Packer, L. (1996).** Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J.* **10**: 709-20
- Shark, K.B., Smith, F.D., Harpending, P.R., Rasmussen, J.L. und Sanford, J.C. (1991).** Biolistic transformation of a procaryote, *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 480-485

- Shih, P., Evans, K., Schifferli, K., Ciccarone, V., Lichaa, F., Masoud, M., Lan, J. und Hawley-Nelson, P. (1997).** High efficiency transfection with minimal optimization using the LIPOFECTAMINE PLUS™ reagent. *Focus*® **19**: 52
- Shimomura, O., Johnson, F.H. und Saiga, Y. (1962).** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**: 223-227
- Simon, A. R., Rai, U., Fanburg, B. L. und Cochran, B. H. (1998).** Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am. J. Physiol.* **275**: 1640-1652
- Singh, H., LeBowitz, J.H., Baldwin, A.S., Sharp, P.A. (1988).** Molecular cloning of an enhancer binding protein: isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA. *Cell* **52**: 415-423
- Sivasubramaniam, S., Vanniasingham, V.M., Tan, C.-T. und Chua, N.-H. (1995).** Characterization of HEVER, a novel stress-induced gene from *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol. Biol.* **29**: 173-178
- Smale, S.T. (1997).** Transcription from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1351**: 73-88
- Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Delouchery, C., Lee, H.M., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicare, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Safer, H., Patwell, D., Prabhakar, S., McDougall, S., Shimer, G., Goyal, A., Pietrovki, S., Church, G.M., Daniels, C.J., Mao, J.-I., Rice, P., Nolling, J. und Reeve, J.N. (1997).** Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**: 7135-7155
- Smith, H.M. (1897).** The Florida commercial sponges. *Fish Commission Bull.* **15**: 225-240.
- Smith, F.D., Harpending, P.R. und Sanford, J.C. (1992).** Biolistic transformation of prokaryotes: factors that affect biolistic transformation of very small cells. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 239-248
- Smith, H.O. und Wilcox, K.W. (1970).** A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. *J. Mol. Biol.* **51**: 379-391
- Southern, E.M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517
- Stinski, M.F., Macias, M.P., Malone, C.L., Thrower, A.R. und Huang, L. (1993).** Regulation of transcription from the cytomegalovirus major immediate early promoter by cellular and viral proteins. In: Michelson, S. und Plotkin, S.A. (Eds.), *Multidisciplinary approach to understanding cytomegalovirus disease. Elsevier Science Publishers B.V.*: 3-12
- Sullivan, B., Faulkner, D.J. und Webb, L. (1983).** Siphonodictine, a metabolite of the burrowing sponge *Siphonodictyon* sp. That inhibits coral growth. *Science* **221**: 1175-1176
- Tachibana, K., Scheuer, P.J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y. und Schmitz, F.J. (1981).** Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 2469-2471.

- Takanaga, H., Mukai, H., Shimakawa, M., Konishi, H., Kikkawa, U., Koizumi, T. und Ono, Y. (1995).** Functional characterization of the promoter region of the mouse protein kinase C γ gene. *FEBS Letters* **368**: 276-278
- Takeuchi, Y., Yoshizaki, G. und Takeuchi, T. (1999).** Green fluorescent protein as a cell-labeling tool and a reporter of gene expression in transgenic rainbow trout. *Mar. Biotechnol.* **1**: 448-457
- Tazuya, K., Adachi, Y., Masuda, K., Yamada, K. und Kumaoka, H. (1995).** Origin of the nitrogen atom of pyridoxine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1244**: 113-116
- Thein, S.L. und Wallace, R.B. (1986).** The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In: Human genetic diseases: a practical approach (ed. K. E. Davis), *IRL Press, Herndon, Virginia*, 33-50
- Thomassen, S. und Riisgard, H.U. (1995).** Growth and energetics of the sponge *Halichondria panicea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **128**: 239-246
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994).** CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positive specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680
- Thomsen, D.R., Stenberg, R.M., Goins, W.F. und Stinski, M.F. (1984).** Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **81**: 659-663
- Triglia, T., Peterson M.G. und Kemp, D.J. (1988).** A procedure for *in vitro* amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucl. Acids Res.* **16**: 8186
- Tsien, R.Y. (1998).** The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 509-544
- Tuite, E.M. und Kelly, J.M. (1993).** Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **21**: 103-124
- Unson, M.D., Holland, N.D. und Faulkner, D.J. (1994).** A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* **119**: 1-11
- Vacelet, J. (1971).** Étude en microscopie électronique de l'association entre une cyanophycée chroococcale et une éponge du genre *Verongia*. *J. Microscopie* **12**: 363-380
- Vacelet, J. und Boury-Esnault, N. (1995).** Carnivorous sponges. *Nature* **373**: 333-334.
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619
- Warner, H.L. und Leopold, A.C. (1969).** Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant Physiol.* **44**: 156-158
- Weis, L. und Reinberg, D. (1992).** Transcription by RNA polymerase II initiator directed formation of transcription competent complexes. *FASEB J.* **6**: 3300-3309
- Westheide, W. und Rieger, R. (Hrsg.) (1996).** Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. *Gustav Fischer, Stuttgart*, 75-119
- Wilkinson, C.R. (1984).** Immunological evidence for the Precambrian origin of bacterial symbioses in marine sponges. *Proc. R. Soc. (Ser B)* **220**: 509-517

- Williams, R.S., Johnston, S.A., Riedy, M., DeVit, M.J., McElligot, S.C. und Sanford, J.C. (1991).** Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA coated microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2726-2730
- Witt, O. (1997).** DOTAP-lipofection: Increased transfection efficiency using HEPES buffered saline. *Biochemica Information* **101**: 10-11
- Woese, C., Kandler, O. und Wheelis, M.L. (1990).** Toward a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **87**: 4576-4579
- Wood, K.V. (1991).** In: Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status (ed. Stanley, P.E. und Kricka, L.J.), *John Wiley and Sons, New York*
- Wu, X., Bishopric, N.H., Discher, D.J., Murphy, B.J. und Webster K.A. (1996).** Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 1035-1046
- Yamauchi, K. (1991).** The sequence flanking translational initiation site in protozoa. *Nucl. Acids Res.* **19**: 2715-2720
- Yang S.F. (1969).** Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant Physiol.* **44**: 1203-1204
- Yang, N.S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B., McCabe, D. (1990).** *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 9569-9572
- Zabner, J., Fasbender, A.J., Moninger, T., Poellinger, K.A. und Welsh, M.J. (1995).** Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J. Biol. Chem.* **270**: 18997-19007
- Zarkower, D., Stephenson, P., Sheets, M. und Wickens, M. (1986).** The AAUAAA sequence is required both for cleavage and for polyadenylation of simian virus pre-mRNA *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2317-2323
- Zelenin, A.V., Titomirov, A.V. und Kolesnikov, V.A. (1989).** Genetic transformation of mouse cultured cells with the help of high-velocity mechanical DNA injection. *FEBS Lett.* **244**: 65-67

Publikationsliste

Seack, J., Pancer, Z., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (1997). Molecular cloning and primary structure of a Rhesus (Rh)-like protein from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* **46**: 493-498

Krasko, A., Gamulin, V., Seack, J., Steffen, R., Schröder, H.C. und Müller, W.E.G. (1997). Cathepsin, a major protease of the marine sponge *Geodia cydonium*: purification of the enzyme and molecular cloning of cDNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **6**: 296-307

Seack, J., Kruse, M. und Müller, W.E.G. (1998). Evolutionary analysis of G-proteins in early metazoans: Cloning of α - and β -subunits from the sponge *Geodia cydonium*. *Biochim. Biophys. Acta* **1401**: 93-103

Coutinho, C.C., Seack, J., Van de Vyver, G., Borojevic, R. und Müller, W.E.G. (1998). Origin of the metazoan bodyplan: Characterization and functional testing of the promoter of the homeobox gene *EmH-3* from the freshwater sponge *Ephydatia muelleri* in mouse 3T3 cells. *Biol. Chem.* **379**: 1243-1251

Seack, J., Kruse, M., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (1999). Promoter and exon-intron structure of the protein kinase C gene from the marine sponge *Geodia cydonium*: evolutionary considerations and promoter activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1444**: 241-253

Blumbach, B., Diehl-Seifert, B., Seack, J., Steffen, R., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (1999). Cloning and expression of new receptors belonging to the immunoglobulin superfamily from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* **49**: 751-763

Wiens, M., Seack, J., Koziol, C., Hassanein, H.M.A., Steffen, R., Korzhev, M., Schröder, H.C. und Müller, W.E.G. (1999). 17β -Estradiol-dependent regulation of chaperone expression and telomerase activity in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Marine Biol.* **133**: 1-10

Seack, J., Perovic, S., Gamulin, V., Schröder, H.C., Beutelmann, P., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (2000). Identification of the highly conserved, and adjacently localized SNZ and SNO genes in the sponge *Suberites domuncula*: Gene structure and promoter activity in mammalian cells. *Zur Veröffentlichung eingereicht*