

**Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie aus dem
marinen Schwamm *Geodia cydonium*:
Klonierung, Charakterisierung und Funktionsstudien**

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Barbara Blumbach
geb. in Wiesbaden

Mainz 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2000

Meinen Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG	1
1 Evolution des Immunsystems	1
1.1 Immunsystem der Vertebraten	1
1.2 Evolution des Immunsystems der Vertebraten	2
1.3 Immunsystem der Invertebraten	4
2 Die Immunglobulin-Superfamilie	5
2.1 Charakteristika der Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie	6
2.2 Funktion der Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie	9
3 Schwämme	10
3.1 Allgemeines	10
3.2 Immunreaktionen bei Schwämmen	12
II ZIELSETZUNG DER ARBEIT	14
III MATERIAL UND METHODEN	15
A MATERIAL	15
1 Chemikalien	15
2 Geräte	15
3 Verbrauchsmaterialien	16
4 Vektoren	17
5 Bakterienstämme	18
6 Primer	18
7 Enzyme	19
8 Restriktionsendonukleasen	19
9 Antibiotika	20
10 Antikörper und Peptide	20

11 Molekulargewichtsstandards	20
12 Kits	21
13 Online-Dienste und Computerprogramme	22
13.1 Internetadressen	22
13.2 Computerprogramme	22
14 Schwämme	23
B METHODEN	23
1 Präparation und enzymatische Manipulation von DNA	23
1.1 Bakterien-Übernachtskultur	23
1.2 Plasmidpräparation	24
1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	24
1.3.1 PCR mit dem Expand-High Fidelity PCR System	25
1.4 Reinigung von PCR-Produkten	26
1.5 Fällung von Nukleinsäuren	27
1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	27
1.7 Agarosegele	28
1.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	29
1.9 Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen	29
1.10 Ligation von DNA-Fragmenten	30
1.11 Herstellung kompetenter Bakterien	30
1.12 Transformation der TSS-kompetenten Zellen	31
1.13 Kontroll-PCR	32
1.14 Extraktion genomischer DNA	32
1.15 Homologiescreening der cDNA-Bibliothek	33
1.15.1 DIG-Markierung von DNA-Sonden	33
1.15.2 Kultivierung der Bakterien für die Phageninfektion	34
1.15.3 Bestimmung des Phagentiters	35
1.15.4 Ausplattieren des Bakterien/Phagengemisches	35
1.15.5 Transfer der Plaques auf Membranen	36
1.15.6 Hybridisierung der Sonde	37
1.15.7 Entwicklung der Membranen	37
1.15.8 Ausstechen der Plaques	38
1.15.9 Sekundäres und tertiäres Screening	38

1.15.10 In vivo Excision	39
1.15.11 Identifikation der Screening-Klone	41
1.16 Sequenzierung	41
1.16.1 Sequenzierreaktion	42
1.16.2 Herstellung des Gels und Elektrophorese	42
2 Präparation und enzymatische Manipulation von RNA	44
2.1 Behandlung von Lösungen mit Dymethylpyrocarbonat (DMPC)	44
2.2 Extraktion von Total-RNA	44
2.3 RNA-Gel	45
2.4 Northern Blot-Analyse	45
2.4.1 Gel	46
2.4.2 Transfer	46
2.4.3 Hybridisierung	46
2.4.4 Entwicklung	47
3 Proteinchemische Methoden	48
3.1 Expression eines rekombinanten Proteines	48
3.2 Transplantationsversuche	50
3.2.1 Autotransplantation	50
3.2.2 Allotransplantation	51
3.3 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus <i>Geodia cydonium</i>	51
3.4 Proteinbestimmung nach Bradford	52
3.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
3.6 Coomassie-Färbung	53
3.7 Western Blot-Analyse	54
3.7.1 Immunodetektion transferierter Proteine	55
3.7.2 Absättigung freier Bindungsstellen	55
3.7.3 Immunodetektion	56
3.7.4 Färbung mit India Ink	56
3.8 Immunfluoreszenzmikroskopie	57
3.9 Messung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration	58
3.9.1 Beschichtung der Kulturgefäße mit Poly-L-Lysin	59
3.9.2 Isolierung von Schwammzellen	59
3.9.3 Bestimmung der Zellzahl	59
3.9.4 Beladung der Zellen mit Fura-2/AM	59

3.9.5	Messung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration	60
-------	--	----

IV ERGEBNISSE

1	Herstellung des Expressionskonstruktes	61
2	Charakterisierung des anti-TKlg-Antikörpers	62
3	Screening nach Molekülen mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen	63
4	Sequenzen der isolierten cDNAs aus <i>Geodia cydonium</i>	64
5	Northern Blot-Analysen	66
6	Phylogenetische Analysen der Sequenzen	67
6.1	Vergleich der SAM-Sequenzen mit der RTK-Sequenz	67
6.2	Vergleich der SAM-Sequenzen mit Sequenzen aus der Datenbank	70
7	Aufklärung der Exon/Intron-Struktur zwischen den Immunglobulin-ähnlichen Domänen	72
8	Genomische PCR über das Intron zwischen den Immunglobulin-ähnlichen Domänen	73
9	Ergebnisse der Transplantationsversuche	76
9.1	Autotransplantation	76
9.2	Allotransplantation	76
10	Untersuchung der Transplantationsprozesse im Zusammenhang mit GCSAML	77
10.1	Immunhistochemische Analysen	77
10.2	Northern Blot-Analysen	78
10.3	Western Blot-Analysen	79
11	Immunhistochemische Analyse von <i>Suberites domuncula</i> -Gewebeschnitten..	81
12	Ligandensuche für das ITIM-Motiv von GCSAML	83
13	Effekte des anti-TKlg-Antikörpers auf den intrazellulären Calciumspiegel	84

V DISKUSSION

1	Analyse der Sequenzen	86
2	Vorgänge bei der Gewebetransplantation	92
3	Inhibitorische Rezeptoren	96

VI ZUSAMMENFASSUNG	99
VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	100
1 Abkürzungen	101
2 Abkürzungen für Aminosäuren und Basen	104
VIII LITERATURVERZEICHNIS.....	105

I EINLEITUNG

1 Evolution des Immunsystems

Das Immunsystem ist für die Unterscheidung von Selbst und Fremd (Nicht-Selbst) zuständig. Es besitzt also die Fähigkeit, Zellen, Gewebe und Organe des eigenen Körpers von fremden Zellen zu unterscheiden. Außerdem sorgt das Immunsystem im weiteren dafür, daß die erkannten Fremdkörper unschädlich gemacht werden. Die Vertebraten besitzen das am weitesten entwickelte Immunsystem.

1.1 Immunsystem der Vertebraten

Das Immunsystem der Vertebraten zeichnet sich durch Spezifität, Adaptation und ein immunologisches Gedächtnis aus. Man unterscheidet zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität. Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems zählen Makrophagen, Cytokine und das Komplementsystem. Die Mechanismen der unspezifischen Immunität dienen den höheren Lebewesen als erste Abwehrfront gegenüber Eindringlingen. Darüberhinaus tragen sie aber auch wesentlich zum Zustandekommen und zur Manifestation der spezifischen Immunreaktion bei. Die Mehrzahl der vom Immunsystem erbrachten Leistungen beruhen auf enger Zusammenarbeit zwischen spezifischen und unspezifischen Mechanismen (KELLER 1987).

Die Hauptkomponenten des erworbenen Immunsystems sind Lymphozyten, die durch die Blut- und Lymphbahnen zirkulieren und sich normalerweise im Ruhezustand befinden. Man unterscheidet zwei Klassen von Lymphozyten, die T-Zellen (nach ihrem Reifungsort Thymus benannt) und die B-Zellen (Knochenmark, *bone marrow*). Im Menschen sind gewöhnlich mehr als 100 Milliarden B-Zellen vorhanden und jede davon produziert einen bestimmten eigenen Antikörper. Antikörper binden an nichtprozessierte Antigene in Partikeln und Makromolekülen und entfernen diese. T-Zellen haben verschiedene Aufgaben. T-Zellrezeptoren und Rezeptoren des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility*

complex - MHC) erkennen gemeinsam prozessierte Peptidprodukte von Proteinantigenen. Eine Subpopulation (cytotoxische T-Zellen) führt den destruktiven Effektormechanismus aus, der viral infizierte oder neoplastisch transformierte Zellen zerstört. Eine andere Subpopulation (T-Helferzellen) erleichtert die Differenzierung der B-Zellen und die T-Zellantwort. Alle drei Arten der Immunrezeptoren gehören zu der Immunglobulin-Superfamilie und sind jeweils Heterodimere. Die Antikörper bestehen aus leichten und schweren Ketten mit jeweils konstanten und variablen Domänen. Die T-Zellrezeptoren (TCR) werden aus α - und β -Ketten mit ebenfalls konstanten und variablen Domänen zusammengesetzt. Die MHC-Klasse II-Moleküle bestehen auch aus α und β Ketten mit einer konstanten Domäne, die MHC-Klasse I-Moleküle aus einer schweren Kette mit einer konstanten Domäne und dem β 2-Mikroglobulin mit ebenfalls einer konstanten Domäne. Die beiden Zellsysteme wenden jedoch sehr unterschiedliche Strategien bei der Erkennung der Antigene an. Antikörper erkennen die native dreidimensionale Oberfläche ihres entsprechenden Antigens über direkte molekulare Komplementarität. T-Zellrezeptoren dagegen erkennen ein Peptidfragment ihres entsprechenden Antigens, das in einer molekularen Tasche auf der Oberfläche der MHC-Moleküle präsentiert wird. Klasse I MHC-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) bieten im Allgemeinen den cytotoxischen T-Zellen Peptidfragmente an. T-Helferzellen erkennen Peptide, die durch die Klasse II MHC-Moleküle präsentiert werden.

Eine charakteristische Besonderheit und essentieller Bestandteil der erworbenen, spezifischen Immunität ist der Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses. Auf diese Weise verkürzt sich bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen die Anlaufzeit der Immunantwort.

1.2 Evolution des Immunsystems der Vertebraten

Die Evolution des Immunsystems der Vertebraten war wahrscheinlich ein explosives Ereignis, daß direkt vor dem phylogenetischen Auftreten der Gnathostomata stattfand (MARCHALONIS UND SCHLUTER 1990a). Die Vertebraten-Immunantwort ist opportunistisch, sie baut auf primordialen Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität und Entzündung auf, die weit verbreitet im ganzen Tierreich sind (Acoelomata, Protostomia, Deuterostomia). Schon in den niedrigsten Stämmen

der Vertebraten findet man die Hauptcharakteristika des spezifischen Immunsystems - Gedächtnis und Selbst/Fremd-Unterscheidung. Die Etablierung des spezifischen Immunsystems vor ungefähr 450 Millionen Jahren wird sowohl durch die Anwesenheit der leichten (GREENBERG *et al.* 1993, HOHMAN *et al.* 1992, SCHLUTER *et al.* 1989) und schweren Ketten (LITMAN *et al.* 1985) der Immunglobuline, durch TCR α -, β -, γ - und δ -Ketten (RAST *et al.* 1997, RAST UND LITMAN 1994) als auch durch die Moleküle des MHC (BARTL UND WEISSMAN 1994, HASHIMOTO *et al.* 1992, KASAHARA *et al.* 1992, 1993) in einer großen Vielzahl bei Elasmobranchia - den primitivsten, lebenden Gnatostomia dokumentiert (siehe Tabelle 1).

Bis jetzt wurden die Gene für die Immunrezeptoren in primitiven agnathen Vertebraten - wie dem Neunauge und dem Schleimaal – noch nicht nachgewiesen.

Taxonomische Gruppe	Angeborene Immunität	Erworbene Immunität	Invasions-induzierte protektive Enzyme und Enzymkaskaden	Phagozytose	Antimikrobielle Peptide	Muster-erkennungs-Rezeptoren	Transplantat abstoßung	T- und B-Zellen	Antikörper
Höhere Pflanzen	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Porifera	+	-	?	+	?	?	+	-	-
Annelida	+	-	?	+	?	?	+	-	-
Arthropoda	+	-	+	+	+	+	?	-	-
Vertebrata									
Elasmobranchia	+	+	+	+	Equivalente Agenzien	+	+	+	+
Teleostia	+	+	+	+	möglich	+	+	+	+
Amphibia	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reptilia	+	+	+	+	?	+	+	+	+
Aves	+	+	+	+	?	+	+	+	+
Mammalia	+	+	+	+	?	+	+	+	+

Tabelle 1: Immunität bei multizellulären Organismen. + = definitive Demonstration, - = konnte bis jetzt nicht gezeigt werden, ? = Vorhandensein muß noch geklärt werden. (DUPASQUIER 1993, FRITIG 1998, SÖDERHALL UND CERENIUS 1998).

1.3 Immunsystem der Invertebraten

Mechanismen zur Verteidigung des Wirtes gegen fremde Eindringlinge und zur Heilung verletzter, eigener Gewebe existieren in allen Mitgliedern der enorm großen und diversen Anzahl der Invertebratenstämme. Diese Mechanismen bilden die natürliche Immunität. Lange galt das Paradigma, daß die Verteidigung der Invertebraten, oft gleichgesetzt mit Phagozytose und Einkapselung fremder Lebewesen, keine deutliche Diskriminierung zeigt. Es ist allgemein anerkannt, daß den niederen Deuterostomia - wie Seesternen und Seeigeln - als auch den typischen Invertebraten-Protostomia - wie Insekten und Crustacea - und den Acoelomata - wie Nematoden - definitive Elemente der spezifischen Immunantwort fehlen (KLEIN 1989, MARCHALONIS UND SCHLUTER 1990 b).

Lektine könnten möglicherweise die Vorläufer der Antikörper sein (BECK UND HABICHT 1997). Lektin-ähnliche Proteine, zahlreiche lytische und antimikrobielle Faktoren, wie z.B. Lysozym, binden an Fremdkörper und lysieren diese. Antikörper, auch als Immunglobuline bezeichnet, gehören zu einer sehr großen und sehr alten Proteingruppe: der Immunglobulin-Superfamilie. Ein Beispiel für ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie bei Invertebraten ist das Hämolin aus der Hämolymphe von Nachtfaltern. Es heftet sich an die Oberfläche von Mikroben und unterstützt deren Beseitigung. Auch für das Komplementsystem gibt es bei einigen Invertebraten einen Ersatz in Form des Pro-Phenol-Oxidase-System. Dies ist eine Kaskade enzymatischer Reaktionen, an deren Ende die inaktive Vorstufe Pro-Phenol-Oxidase in das aktive Enzym Phenol-Oxidase überführt wird. Die Phenol-Oxidase ist an der Einkapselung von Fremdkörpern durch Melanin beteiligt (JOHANSSON UND SÖDERHALL 1996).

Phagozyten einiger Invertebraten sind in der Lage, Cytokine zu sezernieren, die den Makrophagen-abstammenden Cytokinen der Vertebraten ähneln. So verhält sich z.B. ein Protein aus der Coelomflüssigkeit des atlantischen Seesternes *Asterias forbesi* in vieler Hinsicht wie Interleukin (IL)-1. Ein weiteres Beispiel für Cytokin-ähnliche Moleküle in Invertebraten sind Substanzen aus Annelida und Tunicata, die sich ähnlich wie IL-1 und TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) verhalten (BECK UND HABICHT 1997). Die Invertebraten verteidigen sich also durch Zellen und Moleküle, die den Effektormechanismen der natürlichen Immunität bei höheren Organismen ähneln.

2 Die Immunglobulin-Superfamilie

Das explosive Auftreten der Immunglobulin-Superfamilie fiel vermutlich mit der Evolution der Metazoa an der Grenze zwischen Präkambrium und Kambrium – also vor mehr als 600 Millionen Jahren - zusammen (HOOD UND HUNKAPILLER 1991). Während der frühen Evolution vielzelliger Tiere wurde es für spezialisierte Zellen aus vielzelligen Verbänden notwendig, einander zu erkennen. Molekulare Untersuchungen der Immunantwort bei Vertebraten und ihrer drei Zelloberflächen-Antigen-Erkennungsfamilien, führten zur Entdeckung der Immunglobulin-Superfamilie.

Alle Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie enthalten mindestens einen, zum Teil auch mehrere Abschnitte mit einer charakteristischen Faltstruktur. Diese Faltstruktur stellt die Immunglobulin-Domäne dar. Proteine mit solchen Domänen erfüllen verschiedene Funktionen. Im Allgemeinen sind sie an der Erkennung eigener und fremder Moleküle insbesondere auf Zelloberflächen beteiligt. Auch Zelladhäsionsmoleküle sind Mitglieder dieser Superfamilie. Die Domäne könnte ursprünglich ein eigenständiges Molekül gewesen sein, das bestimmte Muster zur Identifikation körpereigener Strukturen registrierte (BECK UND HABICHT 1997). In der weiteren Entwicklung entstand aus der Immunglobulin-Domäne dann ein Element, das auch körperfremde Strukturen (Antigene) zu erkennen vermochte und sich im weiteren Verlauf der Evolution zu den eigentlichen Immunglobulinen entwickelte.

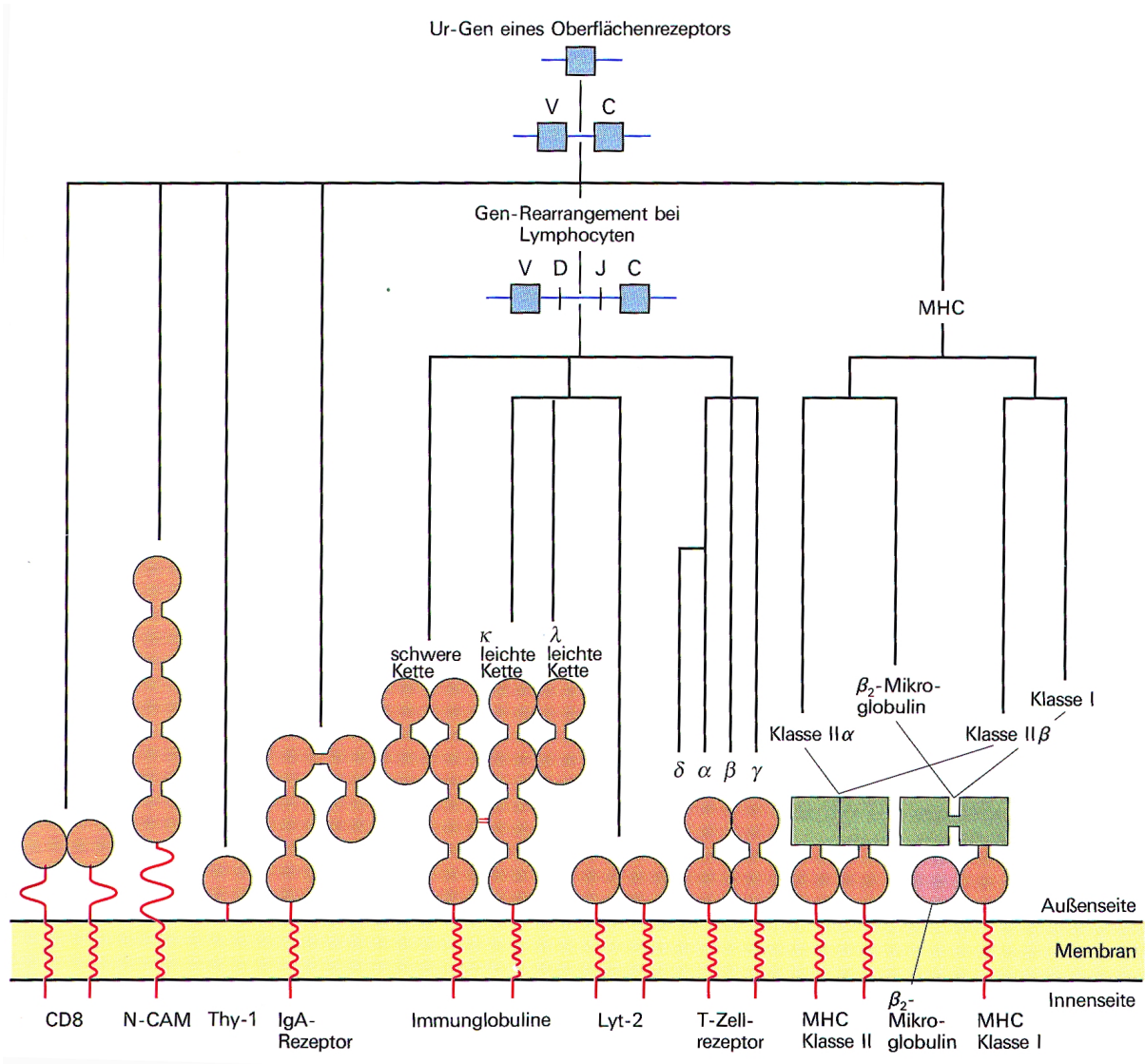


Abbildung 1: Evolution der Immunglobulin-Superfamilie. Die einzelnen Kreise entsprechen jeweils einer Immunglobulin-Domäne. Die quadratischen Symbole entsprechen bestimmten Domänen von MHC-Proteinen, die keine Immunglobulin-Faltung enthalten. Nach HOOD *et al.* (1985).

2.1 Charakteristika der Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie

Moleküle werden dann zur Immunglobulin-Superfamilie gerechnet, wenn sie eine oder mehrere der homologen Immunglobulin-Einheiten aufweisen. Schätzungen gehen davon aus, daß 40 % aller zellassoziierten Proteine Immunglobulin-Einheiten enthalten könnten (DOOLITTLE 1995). Diese Homologieeinheiten sind meist zwischen 70 und 100 Aminosäuren lang und werden durch eine Serie von nichtparallelen β -Strängen gekennzeichnet, die ein kompaktes „Sandwich“ aus zwei β -Faltblättern

bilden (AMZEL UND POLJAK 1979). Diese Struktur wird durch eine Folge konservierter Aminosäuren stabilisiert. Besonders zwei Cysteine, die eine Disulfidbrücke bilden, welche die Seiten der β -Faltblatt-Sandwiches zusammenhält, sind stark konserviert. Die Schleifensequenzen, welche die β -Stränge verbinden, sind weniger signifikant für die grundlegende Homologieeinheitsstruktur und können eine starke Variabilität aufweisen.

Die β -Stränge, aufgeteilt in zwei Blätter, sind in einer typischen Art verbunden, ABCDEFG (jeder Buchstabe steht für einen Strang in der Reihenfolge seines Erscheinens in der Sequenz). Der Kern der Faltung besteht aus den β -Strängen ABE in einem β -Faltblatt und GFC im zweiten β -Faltblatt (Abbildung 2). Basierend auf der Anzahl und der Lokalisierung der Stränge wurden zwei Arten von Domänen definiert. Die variable (*variable*, V-) Domäne (ABCC'C"DEFG) und die konstante (*constant*, C-) Domäne (ABCDEFG). Ein großer struktureller Unterschied zwischen den V- und C-Domänen ist eine Extraschleife in der V-Domäne zwischen den Strängen C und D. Weiterhin gibt es eine konservierte Disulfidbindung, deren Cysteine in den beiden Domänen unterschiedlich weit auseinander liegen. In einer V- oder V-verwandten Domäne, liegen 65-75 Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen. In einer C-Domäne enthält dieses Segment 55-60 Aminosäuren (WILLIAMS UND BARCLAY 1988). Die Analyse der steigenden Zahl identifizierter Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie ergab neue Subtypen der Immunglobulin-Domänen. So gliedert sich die C-Domäne in einen C1-Typ und einen C2-Typ (WILLIAMS UND BARCLAY 1988) oder einen H-Typ (HUNKAPILLER UND HOOD 1989). Der C1-Typ findet sich in den Immunglobulinen, den T-Zellrezeptoren und den MHC-Molekülen. Der C2- (oder H-) Typ dagegen tritt bei Nicht-Immunglobulin-verwandten Molekülen, wie den Zelladhäsionsproteinen, den Zelloberflächenrezeptoren und den Muskelproteinen, auf (SMITH UND XUE 1997). Mit der Struktur des Muskelproteins Telokin (HOLDEN *et al.* 1992) wurde von HARPAZ und CHOTHIA 1994 ein neuer Typ charakterisiert, der sogenannte I-Typ (*intermediate*). Der I-Typ hat Sequenzmerkmale der V-Domäne, hat aber einen wesentlich kürzeren Abstand zwischen den Cysteinen im Strang B und F. Später wurden auch die Strukturen von Titin (PFUHL UND PASTORE 1995), VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule*, JONES *et al.* 1995) und NCAM1 (*neural cell adhesion molecule*, THOMSEN *et al.* 1996) zum I-Typ gerechnet.

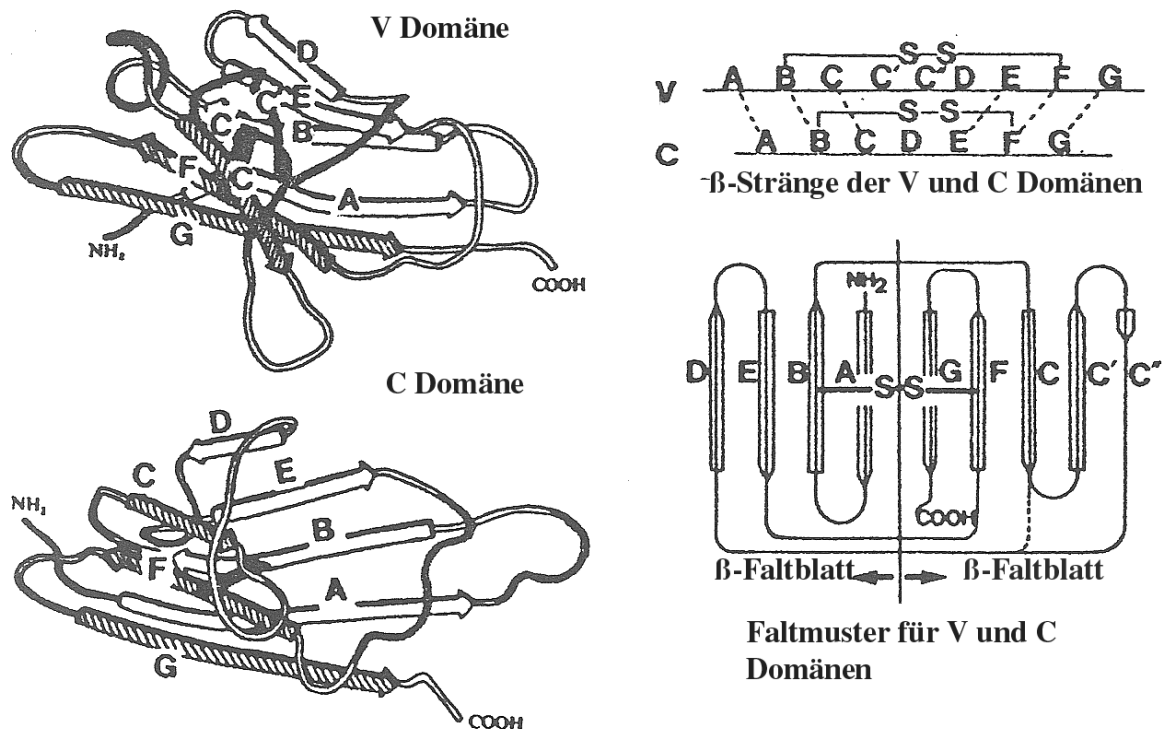


Abbildung 2: Faltmuster der V- und C-Domänen, verändert nach WILLIAMS UND BARCLAY 1988. A,B,C,C',C'', D,E,F und G bezeichnen die β -Stränge.

Das Ligandenspektrum der Immunglobulin-Domänen reicht von kleinen Molekülen (Antigene, Chromophore) über Hormone (z.B. Wachstumsfaktoren, Interferone, Prolactin) bis zu Makromolekülen (Muskelproteine). Die Interaktion zwischen Ligand und Immunglobulin-Domäne kann sowohl homophil (NCAM bei Vertebraten, Fascilin II und III bei Invertebraten) als auch heterophil sein. Die Ligandenbindungsstelle befindet sich entweder in den Schleifenregionen (den hoch variablen Stellen der Immunglobuline) oder in den Strängen selbst. Jeweils nur ein Domäne ist z.B. bei CD8, P0 und einem antibiotisches Protein an der biologischen Funktion beteiligt. Dahingegen sind es bei z.B einigen Cytokinrezeptoren und bakteriellen Proteinen jeweils zwei Domänen und bei z.B. Zelladhäsionsmolekülen und Makroproteinen können mehrere Domänen an der biologischen Funktionen beteiligt sein (HALABY UND MORNON 1998).

2.2 Funktion der Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie

Die Immunglobulin-Domänen wurden erstmals 1966 von ROBERT HILL beschrieben. In den folgenden Jahren wurden stetig neue Mitglieder der Superfamilie identifiziert (HUNKAPILLER UND HOOD 1986, WILLIAMS *et al.* 1987 und 1989). Dieser Schritt wurde durch die Entwicklung besserer Techniken der Computeranalyse von Ähnlichkeiten in Gen- (und Protein-) Sequenzen deutlich erleichtert. Im Jahr 1991 waren mehr als 100 verschiedene genetische Loci als codierende Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie bekannt (HOOD UND HUNKAPILLER 1991).

Die im folgenden aufgelisteten Eigenschaften erlauben die Einteilung der Immunglobulin-Superfamilie in sieben Gruppen (HALABY und MORNON 1998):

1. Molekularer Transport: Antibiotisch wirkende Proteine transportieren aktiv Chromophore durch unterschiedliche zelluläre Kompartimente. In Vertebraten transportieren Hämocyane Sauerstoffmoleküle. Der Immunglobulin-Rezeptor (Poly IgR) transportiert Immunglobuline durch Epithelien.
2. Morphoregulation: Die Proteine der extrazellulären Matrix sind an der Organisation und der Elastizität einer großen Anzahl von Geweben beteiligt. Fibronectin z.B. ermöglicht die Gewebeintegrität. Zelladhäsionsmoleküle, die auf embryonalen Zelloberflächen exprimiert werden (wie z.B. Cadherine) fördern die Organisation dieser Zellen in differenzierte Gewebe.
3. Zellphänotypenmarker: Hierzu gehören z.B. Tumorzell-Marker und Oberflächenmoleküle der hämatopoietischen Zellen. Die Oberflächenmarker ermöglichen die Bestimmung der Zelltypen (B- und T-Zellen des Immunsystems). Auch der Status der Zelldifferenzierung (B- oder prä B- Zelle, aktivierte T-Zelle, transformierte Zelle) lässt sich mittels der Oberflächenmarker bestimmen.
4. Zelladhäsionsmoleküle: Die zelluläre Immunantwort benötigt viele Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie, wie z.B. CD2, CD4, CD8 und MHC. Auch manche Zellphänotypenmarker sind an der Zelladhäsion beteiligt, wie z. B. CD19 und CD3.
5. Virusrezeptoren: Z.B. PVR (Poliovirus-Rezeptor), CD4 (HIV-Rezeptor) und ICAM-1 (Rhinovirus-Rezeptor).
6. Formerkennung und Toxinneutralisierung: Die Eigenschaft des Sequenzpolymorphismus und der strukturellen Variabilität der Immunglobulinmoleküle

erlauben es dem Immunsystem, verschiedene Antigene zu erkennen und so Toxine zu neutralisieren.

7. Virale und bakterielle Moleküle: Auch Bakterien besitzen Immunglobulin-Domänen. Diese sind Bausteine von Enzymen, die auch am Pili-Aufbau oder der Pili-Synthese beteiligt sind. Bei viralen Infektionen wirken Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie als Rezeptoren für zelluläre Mediatoren (z.B. Interferone und Interleukine) oder zur Zelltodmarkierung (PD-1).

3 Schwämme

3.1 Allgemeines

Der Stamm Porifera, Schwämme, gruppiert eine große Zahl an polymorphen Lebewesen. Schwämme existieren in allen Meeren und im Süßwasser. Seit der Präkambriumära, d.h. seit mehr als 600 Millionen Jahren existieren Schwämme von der Uferlinie bis zu den Abyssalzonen (MEHL *et al.* 1998). Schwämme strudeln ihre Nahrung in Form kleinster Zellen (Pico- und Nanoplankton) und organischer kolloidaler Makromoleküle ein (WESTHEIDE UND RIEGER 1996). Durch ihr oft massenhaftes Auftreten am Meeresboden bilden sie einen wesentlichen Bestandteil mariner Nahrungsketten.

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise und des relativ ungegliederten Körpers wurden Schwämme erst 1825 als Tiere anerkannt (WEHNER UND GEHRING 1990). Porifera stellen die niedrigste multizelluläre Organisationsform aller Eukaryoten dar und gehören so zu den ältesten mehrzelligen Organismen. Durch das Fehlen eines echten Nervensystems, speziell differenzierter Muskelzellen und Sinnesorganen unterscheiden sie sich von allen anderen tierischen Metazoa. Allen Schwämmen gemeinsam ist eine äußere Körperbedeckung durch Epithelzellen (Pinacozyten), eine gesamte oder teilweise Auskleidung des zentralen Hohlraumes mit Kragengeißelzellen (Choanozyten) sowie ein zwischen beiden Zelltypen liegendes Mesohyl, das von einem Skelett gestützt wird (KAESTNER 1993). Ein wichtiger Unterschied zu den Epithelien der Metazoa sind zum einen die andersartigen Zell-Zell-Verbindungen und zum anderen das weitgehende Fehlen einer basalen Matrix (WESTHEIDE UND RIEGER 1996). Der ganze Schwamm-Körper wird von einem

Kanalsystem durchzogen, das außen mit einer Vielzahl kleiner Poren (Ostien) beginnt, in größere Hohlräume oder spezielle Geißelkammern führt und schließlich durch eine Ausströmöffnung (Osculum) wieder nach außen mündet. In das Mesohyl sind zahlreiche Zelltypen eingelagert. Neben den Archaeozyten, aus denen alle anderen Zelltypen hervorgehen können, treten Amoebozyten auf, die phagozytotisch tätig sind. Die Skleroblasten sezernieren Skelettnadeln und bilden mit den sternförmig verzweigten und möglicherweise kontraktile Collenzymen eine Art Mesohylgerüst. Plattenförmige Pinacozyten begrenzen epithelartig die Kanalwände. Geschlechtszellen liegen diffus im Mesohyl, also nicht in Gonaden. Einen hoch spezialisierten Zelltyp stellen die Choanozyten (Kragengeißelzellen) dar, die - wie die Choanoflagellaten unter den Protozoa - zur Nahrungsaufnahme einen von Mikrotubuli gebildeten Cytoplasmakragen besitzen.

Der Stamm Porifera wird in zwei Unterstämme unterteilt: Cellularia mit den Klassen *Calcarea* (Kalkschwämme), *Demospongiae* (Gemeinschwämme) und Symplasma mit einer Klasse, den *Hexactinellida* (Glasschwämme) (REISWIG UND MACKIE 1983). Cellularia bestehen aus uninuklearen Zellen, während Symplasma synzytiale Gewebe besitzen (MACKIE UND SINGLA 1983). Der hier untersuchte Schwamm *Geodia cydonium* gehört zu den *Demospongiae* und dort zu der Unterklasse der *Tetractinomorpha*.

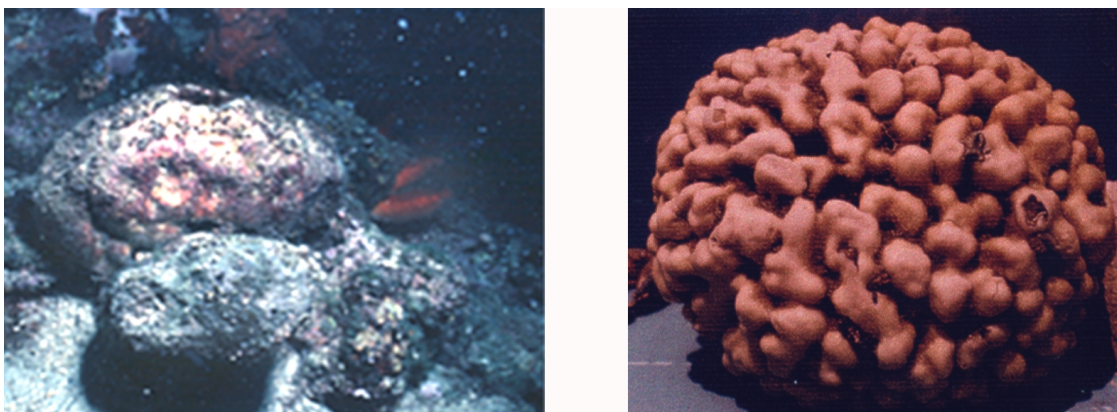


Abbildung 3: Links: *Geodia cydonium* in 25 m Tiefe, ungefähr 45 cm Durchmesser. Rechts: *Geodia cydonium* gereinigt. Fotos von PROF. DR. W.E.G. MÜLLER.

3.2 Immunreaktionen bei Schwämmen

Schwämme besitzen eine hohe Regenerationsfähigkeit. Sie sind die ersten Metazoen, bei denen die Rekonstitution dissoziierter Zellen gezeigt wurde (WILSON 1907). Seither sind sie das klassische Modell, um Mechanismen zu untersuchen, die zwischen Selbst und Fremd unterscheiden. Die meisten Ergebnisse stammen aus Transplantationsversuchen (HILDEMANN *et al.* 1979). Unter Autotransplantation versteht man die Transplantation von Gewebe des gleichen Individuums, Allotransplantation ist die Verpflanzung von Gewebe eines anderen Individuums der gleichen Art. Die Fähigkeit der Schwämme, mit Autotransplantaten zu fusionieren und Allotransplantate abzustößen, wurde durch PARIS (1961) und MOSCONA (1968) entdeckt. Die Identifizierung der ersten Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle in Schwämmen, nämlich des interzellulären Aggregationsfaktors (AF) und des Zelloberflächen-assoziierten Aggregationsrezeptors (AR), an den der AF bindet, inspirierte zur Suche nach Molekülen auf zellulärer Ebene, die an der Immunantwort beteiligt sind (PANCER *et al.* 1996). Seit der kürzlich aufgestellten Hypothese, daß alle Metazoa monophyletischen Ursprunges sind (MÜLLER 1995 und 1998), ist es noch interessanter, die evolutionäre Herkunft des Immunsystems der Metazoa zu erforschen.

Bei den Schwämmen *Geodia cydonium* und *Suberites domuncula* wurden schon einige Komponenten des Immunsystems identifiziert. Diese molekularen Komponenten lassen sich in die verschiedenen Bereiche des angeborenen Immunsystem einordnen.

1) Phagozytose:

Makrophagen, die Effektorzellen der Phagozytose bei Mammalia, exprimieren eine Reihe von Rezeptoren, wie den *Scavenger*-Rezeptor, der an Bakterien bindet. Dazu zählt auch der Typ-I-Makrophagen *Scavenger*-Rezeptor. Dessen konservierte SRCR (*scavenger receptor cysteine rich*)-Domäne wurde in hoher Komplexität bereits bei Schwämmen nachgewiesen (MÜLLER *et al.* 1973, BENGTON 1994, BLUMBACH *et al.* 1998).

2) Komplementsystem

Die meisten Moleküle des Komplementsystems der Mammalia weisen SCR (*short consensus repeat*)-Motive auf. Auch bei Schwämmen konnten Moleküle mit SCR-Motiven der Klasse II nachgewiesen werden (CONWAY 1993, BENGTON 1994). Ein

potentielles Enzym der Melaninbildungskaskade, die Phenylalanin-Hydroxylase, wurde ebenfalls im Schwamm identifiziert (WIENS *et al.* 1998). Diese Kaskade - das Prophenoloxidase-System - tritt bei einigen Invertebraten an die Stelle des Komplementsystems. Melanin und/oder dessen reaktive Intermediate zeigen fungistatische, bakteriostatische und antivirale Aktivität (JOHANSSON UND SÖDERHALL 1996).

3) Cytokine

In Schwämmen wurden z.B. folgende Cytokine identifiziert:

- Allograft-inflammatory-Factor 1 (AIF-1): Der AIF-1 ist bei Vertebraten in solchen Allotransplantaten hoch exprimiert, die abgestoßen werden (UTANS *et al.* 1995). Später wurde gezeigt, daß AIF-1 bei der inflammatorischen Antwort, die mit humanen Herztransplantat-Abstoßungen assoziiert ist, eine Rolle spielen könnte (UTANS *et al.* 1996). Dieses Cytokin wurde bei *Suberites domuncula* identifiziert (KRUSE *et al.* 1999). Die Homologie zu dem humanen AIF-1 ist hoch.
- Endotheliales Monozyten-aktivierendes Polypeptid (EMAP): EMAP II bewirkt z.B. eine Zellaktivierung durch den Anstieg der freien Calciumionen-Konzentration im Zytoplasma, die Freisetzung von Gewebefaktoren, die Änderung der Zellmigration und die Expression von Adhäsionsmolekülen in endothelialen Zellen, Monozyten und Granulozyten der Maus und des Menschen (KAO *et al.* 1994). Auch aus den beiden Schwämmen *Geodia cydonium* und *Suberites domuncula* wurde dieses Polypeptid bereits isoliert (PAHLER *et al.* 1998).
- Glutathion-Peroxidase (GPX): Die GPX wird in der Frühphase entzündlicher Reaktionen als Folge von Allotransplantationen zur Eliminierung von Sauerstoff-Radikalen verstärkt exprimiert (CIKRYT 1982). Durch PCR-Klonierung wurde die für GPX codierende cDNA aus *Suberites domuncula* isoliert (KRUSE *et al.* 1999).
- (2'-5') Oligoadenylat-Synthetase-System: Bei Säugetieren kommt dem Cytokin Interferon eine bedeutende Rolle als antivirales Agens im Rahmen des angeborenen Immunsystems zu. Ein Schlüsselmolekül des Interferon-induzierten Signalweges stellt die (2'-5') Oligoadenylat-Synthetase dar. Dieses Enzym, das bisher unter den Invertebraten nur bei *Geodia cydonium* nachgewiesen werden konnte, wurde zunächst enzymatisch bestimmt, konnte aber jüngst auch kloniert werden (WIENS *et al.* 1999).

II ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Im Verlauf der Evolution von einzelligen zu mehrzelligen Tieren wurde es notwendig zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden. Porifera stehen an der Basis der Metazoa und bieten sich so als Modell zur Untersuchung der evolutionären Herkunft des Immunsystems an.

Transplantationen an Schwämmen werden schon längere Zeit durchgeführt. Durch die Existenz einer etablierten Technik erleichtert sich die Identifikation der Moleküle, die an den Fusionierungs- und Abstoßungsreaktionen beteiligt sind. Komponenten, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden können, wurden bereits in den marinen Schwämmen *Geodia cydonium* und *Suberites domuncula* charakterisiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Identifizierung von Molekülen mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen aus dem Schwamm *Geodia cydonium*. Es sollte gezeigt werden, daß diese Moleküle an der Immunantwort beteiligt sind und so eine Vorstufe der Effektormoleküle des erworbenen Immunsystems der Vertebraten darstellen könnten. Die Moleküle sollten mittels eines niedrig stringentem Homologiescreenings mit einer Sonde, die den Immunglobulin-ähnlichen Domänen der Rezeptortyrosinkinase entspricht, identifiziert werden. Desweiteren sollte mit Hilfe von Northern Blot-Analysen und Immunfluoreszenzuntersuchungen die Beteiligung der isolierten Moleküle an Transplantationsprozessen gezeigt werden.

III MATERIAL UND METHODEN

A Material

1 Chemikalien

Standard-Laborchemikalien in p.A.-Qualität wurden von folgenden Firmen bezogen:

FLUKA	(Neu-Ulm)
MERCK	(Hohenbrunn)
ROTH	(Karlsruhe)
SERVA	(Heidelberg)
SIGMA	(Deisenhofen)

2 Geräte

Agarose-Gelelektrophorese-Einheit	BIO-RAD(München)
Brutschrank BE 400	SAUR (Reutlingen)
Drigalsky-Spatel	Glaswerkstatt (im Hause)
ELISA-Reader Titertek Multiscan Plus	FLOW LABORATORIES (Finnland)
Filmkassette	AMERSHAM (Braunschweig)
Fluoreszenzmikroskop AH3-RFCA	OLYMPUS (Planegg)
Geldokumentationssystem Imagestore 5000	UVP (Cambridge, UK)
Gefrierschrank -20°C	LIEBHERR (Ochsenhausen)
Gefrierschrank - 80°C	NUNC (Wiesbaden)
Heizblock mit Magnetrührer	HEIDOLPH (Kelheim)
Inkubator Certomat H	HEIDOLPH (Kelheim)
Kühlschrank 4°C	LIEBHERR (Ochsenhausen)
Mikroliterpipetten	EPPENDORF (Hamburg)
Mikrotom	CAMBRIDGE INSTR. (Nußloch)
Mörser und Pistill	BENDER & HOBEIN (Bruchsal)
Molecular Imager GS-525	BIO-RAD (München)

Ofen Typ VTR 5022	HERAEUS (Hanau)
Photometer Gene Quant II	PHARMACIA (Freiburg)
Proteinelektrophoreseeinheit Protean Mini	BIO-RAD (München)
pH-Meter CG 840	HERAEUS (Hanau)
Rotoren GSA, HB6 und SS34	DU PONT (Bad Homburg)
Rotor SW41	BECKMAN (München)
Schüttelwasserbad 3047	KÖTTERMANN (Uetze-Hänigsen)
SemiDry Blotting-Kammer Transblot SD	BIO-RAD (München)
Sequenzierautomat LI-COR 4000 S	MWG-BIOTECH (Ebersberg)
Spannungsgerät 200/2.0	BIO-RAD (München)
Speed-Vac SVC100/RH40-11	SAVANT (Farmingdale, USA)
Sterilisator TK/L7	W. EHRET (Emmendingen)
Thermalcycler 9600	PERKIN ELMER (Langen)
Touch Down Thermalcycler	HYBAID (Teddington, UK)
Thermomixer 5436	EPPENDORF (Hamburg)
Thermoblock 5320	EPPENDORF (Hamburg)
Tischzentrifuge 5415 C	EPPENDORF (Hamburg)
Ultrazentrifuge L5-50	BECKMAN (München)
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	STRATAGENE (Heidelberg)
Vortexer Reax 2000	LABOTEC (Wiesbaden)
Waage PT 120	SARTORIUS (Göttingen)
Waage R6	METTLER (Gießen)
Zählkammer nach Neubauer	RENNER (Darmstadt)
Zentrifuge Sorvall RC2B	DU PONT (Bad Homburg)

3 Verbrauchsmaterialien

Einwegspritzen	BRAUN (Melsungen)
Mikrotiterplatten	NUNC (Wiesbaden)
Nitrozellulosefilter	BOEHRINGER (Mannheim)
Nylonmembran Hybond –NX	AMERSHAM (Braunschweig)
Reaktionsgefäße	BECTON & DICKINSON (N. Jersey, USA)

Parafilm	AMERICAN NATIONAL CAN (Greenwich USA)
PCR-Reaktionsgefäße und Deckel	DIANOVA (Hamburg)
Petrischalen	GREINER (Frickenhausen)
Pipettenspitzen (nukleasefrei)	GIBCO (Eggenstein)
Plastikspitzen für Mikroliterpipetten	ROTH (Karlsruhe)
PVDF-Membran	ROTH (Karlsruhe)
Reaktionsgefäße	EPPENDORF (Hamburg)
Röntgenfilm FUJI New RX	FUJI, über BECHTHOLD (Kelkheim)
Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme	KODAK (Stuttgart)
Sterilfilter	MILLIPORE (Bedford, USA)
Ultrazentrifugenröhrchen	BECKMAN (München)
Videoprinterpapier	ROTHHAAR & SCHRÖDER (Heidelberg)
Zahnstocher	FACKELMANN (Hersbruck)
Zellkammern (Lab-Tek ®)	NUNC (Wiesbaden)
Zentrifugenröhrchen	DU PONT (Bad Homburg)

4 Vektoren

pGEM®-T	STRATAGENE (Heidelberg) als PCR-Klonierungsvektor
pQE 32	QIAGEN (Hilden) als Expressionsvektor
λ-ZAP-Express/pBK-CMV	STRATAGENE (Heidelberg) als cDNA Vektor

5 Bakterienstämme

XL1-Blue MRF' (STRATAGENE, Heidelberg)

$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$
[F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

XL1-Blue (STRATAGENE, Heidelberg)

$\text{endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 recA1 relA1 lac}$ [F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

XLOLR (STRATAGENE, Heidelberg)

$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$
[F' proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tet^r)] Su⁻, (λ^r)

XPORT (STRATAGENE, Heidelberg)

$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac}$
[F' proAB lacI^qZ Δ M15]

6 Primer

Die Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG BIOTECH bestellt. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

Sowohl IR-markiert als auch nicht markiert:

<i>T3:</i>	CGG AAT TAA CCC TCA CTA AAG
<i>T7:</i>	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
<i>SP6:</i>	TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C
<i>pQE-F:</i>	GGC GTA TCA CGA GGC CCT TTC G
<i>pQE-R:</i>	CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG G
<i>IGINT.R:</i>	GAG TCC ACC TCC ACT ATC AC

nicht markierte Primer:

<i>GClg.F:</i>	TGG ATC CTC GCT CTC TCC TCT CCT
<i>GClg.R:</i>	AAA GCT TGA GTT GGA GCC ACC TAG
<i>GCTK2.F:</i>	NNN GAA TTC CTC GCT CTC TCC TCT CCT
<i>GCTK2.R:</i>	NNN CTC GAG T GCT TGA GTT GGA GCC ACC
<i>IGINT.F:</i>	GTC ATA CAT CTT GAC CTC CCA
<i>IgP1.F:</i>	GTA GTC TAG TCA TAT CTG GTC TC
<i>IgP2.F:</i>	AAC TCA CCA TAT TCA ACG TCA CT
<i>ITIM.F:</i>	AGA CTG AGG TGG TCT ATG AG
<i>JM.R1:</i>	TTA GCT GGC AAC TAT GAA CCA T
<i>JM.R2:</i>	TAC CAA ATT AAC AAC ATA TCT CAT
<i>Pig.F:</i>	ACC CAC TGG ACT ACC AGT GA
<i>SAMS.F:</i>	TGC CAG ACA CAT GTA CGA AGA
<i>SAM.F1:</i>	CAT AGT TCT TGT GGG CTT TCT T

7 Enzyme

Expand-Polymerase (U/μl)	BOEHRINGER (Mannheim)
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/μl)	BOEHRINGER (Mannheim)
<i>T4</i> -DNA-Ligase (1 U/μl)	BOEHRINGER (Mannheim)
Proteinase K	BOEHRINGER (Mannheim)
RNase A	BOEHRINGER (Mannheim)

8 Restriktionsendonukleasen

<i>BamH I</i> (10 U/μl)	PHARMACIA (Freiburg)
<i>Hind III</i> (10 U/μl)	PHARMACIA (Freiburg)
<i>EcoR I</i> (10 U/μl)	MBI FERMENTAS (Leon-Rot)
<i>Xho I</i> (15 U/μl)	MBI FERMENTAS (Leon-Rot)

9 Antibiotika

Ampicillin: 50 mg/ml in *Aqua bidest.*, Vorratslösung

Kanamycin: 10 mg/ml in *Aqua bidest.*, Vorratslösung

Tetrazyklin: 5 mg/ml in Ethanol, Vorratslösung

10 Antikörper und Peptide

Anti-*rabbit* FITC DIANOVA (Hamburg)

Anti-TKlg Antikörper eigene Herstellung des Institutes für
Physiologische Chemie, Frau Dr. Diehl-Seifert

Anti-Maus IgG (whole molecule) DIANOVA (Hamburg)

POD-Konjugat

Anti-Dig- AP (Fab-Fragments) BOEHRINGER (Mannheim)

ITIM-Peptid Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Müller-Esterl, Institut für
Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Mainz

Streptavidin-POD DIANOVA (Hamburg)

11 Molekulargewichtstandards

123 bp DNA *Ladder* (GIBCO, Eggenstein)

DNA-Ketten der Längen 123 bp x n (n=1, 2, 3 u.s.w.).

1 kb Marker (MBI-Fermentas, Leon-Rot)

DNA-Ketten der Längen 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 2500, 2000,
1500, 1000, 750, 500 und 250 bp.

RNA-Marker I (BOEHRINGER, Mannheim)

RNA-Ketten der Längen 7400, 5300, 2800, 1900, 1600, 1000, 600, 400 und
300 bp.

Proteinmarker *BroadRange* (BIO-RAD, München)

Proteine der Größen 200, 116, 97,4, 66, 45, 31, 21,5, 14,5 und 6,5 kDa.

DIG-markierte RNA-Marker (BOEHRINGER, Mannheim)

I: RNA-Ketten der Längen 7400, 5300, 2800, 1900, 1600, 1000, 600,400 und 300 bp.

II: RNA-Ketten der Längen 7400, 5300, 2800, 1900 und 1600 bp.

III: RNA-Ketten der Längen 1600, 1000, 600, 400 und 300 bp.

12 Kits

BM Chemilumineszenz Blotting Substrat Kit	BOEHRINGER (Mannheim)
DIG-Probe Synthesis Kit	BOEHRINGER (Mannheim)
Expand High Fidelity PCR System	BOEHRINGER (Mannheim)
Fura-2 Calcium Imaging Calibration Kit	MOLECULAR PROBES (Leiden, Niederlande)
High Pure PCR Product Purification Kit	BOEHRINGER (Mannheim)
High Pure Plasmid Isolation Kit	BOEHRINGER (Mannheim)
Ni-NTA Spin Kit	QIAGEN (Hilden)
Nucleo Spin Extract 2 in 1 Kits	MACHEREY UND NAGEL (Düren)
pGEM [®] -T Ligation Kit	PROMEGA (Heidelberg)
Preamplification Superscript II Kit	GIBCO (Eggenstein)
QIAGEN Genomic Tip 100	QIAGEN (Hilden)
Thermosequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	AMERSHAM (Braunschweig)

13 *online*-Dienste und Computerprogramme

13.1 Internet-Adressen

Online-Sequenzvergleiche mit Nukleotid- und Protein-Datenbanken:

BLAST (ALTSCHUL *et al.* 1990):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

FASTA (PEARSON UND LIPMAN 1988):

<http://www.ebi.ac.uk/htbin/fasta.py?request>

Online-Identifizierung von Protein-Domänen und Strukturmotiven:

PROSITE (BAIROCH 1992):

<http://www.ebi.ac.uk/searches/prosite.input.html>

Online-Zugriff auf Nukleotid- und Aminosäure-Datenbanken:

ENTREZ (vom *National Center for Biotechnology Information* bereitgestellt):

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>

13.2 Computerprogramme

GENEDOC (NICHOLAS UND NICHOLAS 1996):

Grafische Umsetzung von Sequenzvergleichen.

Freeware. Zu beziehen über: [ftp.uam.ed/pub/mirror/molbio/ibmpc](ftp://uam.ed/pub/mirror/molbio/ibmpc)

CLUSTALW 1.6 (THOMPSON ET AL. 1994):

Sequenzvergleiche und phylogenetische Analysen (*Neighbour joining*).

Freeware. Zu beziehen über: [ftp.ebi.ac.uk](ftp://ebi.ac.uk)

MOLECULAR ANALYST (BIORAD Laboratories, Molecular Science Group)

Densitometrische Auswertung von Blots.

14 Schwämme

Der Schwämme *Geodia cydonium* und *Suberites domuncula* wurden von der Arbeitsgruppe von PROF. DR. W.E.G. MÜLLER in der nördlichen Adria bei Rovinj (Kroatien) in bis zu 20 Meter Tiefe gesammelt. Das Material wurde entweder lebend in das Aquarium des Institutes nach Mainz gebracht und dort gehältert oder direkt in Rovinj in Würfel geschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

B METHODEN

1 Präparation und enzymatische Manipulation von DNA

1.1 Bakterien-Übernachtskulturen

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde über Nacht bei 37 °C und 250 rpm auf einem Bakterenschüttler in 5 ml *Luria Bertani* (LB)-Medium mit entsprechenden Antibiotika angezüchtet. Um Bakterienkulturen dauerhaft zu konservieren, wurden über Nacht kultivierte Bakterienkulturen in einem Verhältnis von 3:1 mit Glycerol versetzt und bei -80 °C eingefroren. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde von einer Übernachtskultur aus einem Glycerolstock ein Ausstreichmuster auf einer LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotika hergestellt und ca. 12 Stunden bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium:

Bacto-Trypton 10 g

Hefeextrakt 5 g

NaCl 5 g

ad 1l *Aqua bidest.*

pH 7,3 autoklavieren

LB-Agar:

LB-Medium 1 l

Agar 15 g

1.2 Plasmidpräparation

Zur Gewinnung der Plasmide aus den Bakterienkulturen wurde das *High Pure Plasmid Isolation Kit* von BOEHRINGER verwendet. Die Bakterienkulturen wurden zunächst bei 5000 x g für 5 Minuten zentrifugiert, um die Zellen zu ernten. Die Bakterienzellen wurden dann in Tris-EDTA (TE)-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) mit RNase A (100 µg/ml Puffer) resuspendiert und anschließend nach der Methode der alkalischen Lyse (BIRNBOIM AND DOLY 1979) in NaOH/SDS (0,2 M NaOH, 1 % SDS) lysiert. Nach mehrmaligen Invertieren des Reaktionsgefäßes und maximaler Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Lysat durch Zugabe von eisgekühltem Bindepuffer (4 M Guanidiniumchlorid, 0,5 M Kaliumacetat, pH 4,3) zugleich neutralisiert und auf Hochsalz-Bindungsbedingungen eingestellt. Durch diese Vorgehensweise wurden gleichzeitig Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und chromosomale DNA ausgefällt. Nach 5 minütiger Inkubation erfolgte eine Zentrifugation für 12 Minuten bei 12000 x g. Der das Plasmid enthaltende Überstand wurde durch den *High Pure Filter Tube* (BOEHRINGER, Mannheim) gereinigt. Nukleinsäuren binden dabei spezifisch an die Oberfläche von Glasfaser- oder Silicamaterialien (VOGELSTEIN AND GILLESPIE 1979). Die gebundene Plasmid-DNA wurde durch einen Waschschrift (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5) von Salzen, Proteinen und anderen zellulären Unreinheiten gereinigt und konnte dann mit *Aqua bidest.* eluiert werden.

1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die PCR-Technik (SAIKI *et al.* 1985; MULLIS *et al.* 1986) läßt sich ein DNA-Fragment auf ein Vielfaches amplifizieren. Nach Denaturierung des doppelsträngigen DNA-Templates bei 95°C für 5 Minuten, erfolgt die eigentliche Kettenreaktion. Diese beginnt mit einem kurzen Denaturierungsschritt für 45 Sekunden bei 95 °C, dann folgt der 45 Sekunden lange sog. „Annealingschritt“, bei dem sich die beiden antiparallelen Oligonukleotide (Primer) an die DNA anlagern. Die Temperatur hängt hier von der Basenzusammensetzung der Primer ab und wird nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 4 \times (G+C) + 2 \times (A + T) - 2 \quad T_m = \text{mittlerer Schmelzwert}$$

Im dritten Schritt der Kettenreaktion erfolgt die Extension der DNA bei 72 °C durch eine DNA-abhängige DNA Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs). Die Dauer des Elongationsschrittes richtet sich nach Länge des gewünschten Fragmentes und wird über folgende Angabe abgeschätzt: Die DNA-Polymerase kann 1 kb DNA/ min produzieren. Dieser gesamte Zyklus von Denaturierung, Annealing und Extension wird 30-35 x wiederholt. Im Anschluß erfolgt noch ein 10 minütiger Extensionsschritt.

In einem 50µl PCR-Ansatz wurden folgende Reagenzien gemischt:

x µl Ausgangs-DNA
5 µl 10 x Puffer
5 µl MgCl₂ (25mM)
1 µl dNTP-Gemisch (je 10 mM)
1 µl Forward (F)-Primer (10 pmol)
1 µl Reverse (R)-Primer (10 pmol)
1 µl *Taq*-DNA Polymerase (1 U/µl)
ad 50 µl *Aqua bidest.*

1.3.1 PCR mit dem Expand-High Fidelity PCR-System

Um größere PCR-Fragmente zu amplifizieren wurde das *Expand High Fidelity PCR-System* von BOEHRINGER (Mannheim) verwendet. Die hier benutzte Polymerase ist ein Gemisch aus der thermostabilen *Taq* DNA- und der *Pwo* DNA-Polymerase. Die *Pwo*-Polymerase besitzt eine 3'-5'-Exonuklease Korrekturlese-Aktivität und deshalb hat das Expand-System eine kleinere Fehlerrate ($8,5 \times 10^{-6}$) als die *Taq*-Polymerase allein ($2,6 \times 10^{-5}$).

Es wurden zwei Reaktionsgemische angesetzt:

Reaktionsgemisch 1:

<i>Aqua bidest.</i>	19 μ l
dNTP	1 μ l
F-Primer	1 μ l
R-Primer	1 μ l
Genomische DNA	3 μ l

Reaktionsgemisch 2:

<i>Aqua bidest.</i>	22,125 μ l
10 x Puffer mit $MgCl_2$	2,5 μ l
Expand Polymerase	0,375 μ l

Die beiden Gemische wurden unter Eiskühlung zusammengegeben.

PCR-Bedingungen:

95 °C 3 Minuten

95 °C 30 Sekunden, T_m 30 Sekunden, 68 °C 2 – 5 Minuten 10x

95 °C 30 Sekunden, T_m 30 Sekunden, 68 °C 2 – 5 Minuten 20x
mit 5 Sekunden Verlängerung /Zyklus

72 °C 7 Minuten

1.4 Reinigung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte von kontaminierenden Primern und Nukleotiden zu befreien, wurden die Produkte mit Hilfe des *High Pure PCR Product Purification Kit* (BOEHRINGER, Mannheim) aufgereinigt. Das PCR-Produkt wurde mit *Aqua bidest.* auf 100 μ l aufgefüllt. Durch Zugabe von 500 μ l Bindungspuffer wurde der pH-Wert des Ansatzes auf unter 7,5 gesenkt und die Konzentration an chaotropen Salzen erhöht. Dadurch binden die Nukleinsäuren an das Glasfaservlies. Nach dem Mischen wurde die Lösung auf eine Säule aufgetragen und 1 Minute bei 16000 x g zentrifugiert. Die an den Filter gebundene DNA wurde mit einem Waschpuffer zweimal gewaschen und anschließend in 50 μ l *Aqua bidest.* aufgenommen.

Bindungspuffer:		Waschpuffer: (Zugabe von 40 ml Ethanol)	
Guanidin-Thiocyanat	3 M	NaCl	20 mM
Tris-HCl	10 mM	Tris-HCl pH	7,52 mM
Ethanol	5 % (v/v)	in <i>Aqua bidest.</i>	
in <i>Aqua bidest.</i>			
pH 6,6			

1.5 Fällung von Nukleinsäuren

Zur Aufkonzentrierung von DNA wendet man die Ethanol-Präzipitation an. In Gegenwart relativ hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen, welche die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäure neutralisieren, induziert das Ethanol eine strukturelle Veränderung der DNA, wodurch sie aggregiert und anschließend ausfällt (EICKBUSCH UND MOUDRIANAKIS 1978).

Zur Ethanolfällung wurde zur DNA-Lösung ein Zehntel des Ursprungsvolumens an 3 M Natriumacetat (pH 5,2) gegeben. Danach folgte die Zugabe von zweieinhalb Volumina eiskaltem Ethanol und der Ansatz wurde gut gemischt. Nach einer halbstündigen Inkubation bei -80 °C wurden die gefällten Nukleinsäuren abzentrifugiert (25 Minuten, 14000 x g, 4 °C) und das resultierende Pellet mit etwas eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in der gewünschten Menge *Aqua bidest.* aufgenommen.

1.6 Konzentrationbestimmung von Nukleinsäuren

Reine Nukleinsäuren absorbieren Licht einer Wellenlänge von 260 nm. Die Extinktionsmessungen erfolgten in einem Gene Quant II Photometer (PHARMACIA, Freiburg). Nach empirisch ermittelten Umrechnungsformeln (AUSUBEL *et al.* 1994) gilt:

DNA-Konzentration (doppelsträngig)	in µg/ml:	$50 \times A_{260}$
RNA-Konzentration	in ng/ml:	$50 \times 37 \times A_{260}$

Zur Ermittlung der Reinheit wurde die isolierte, in sterilem *Aqua bidest.* gelöste DNA oder RNA nochmals 1:100 mit *Aqua bidest.* verdünnt und dann der Extinktionsquotient A_{260}/A_{280} in einem Photometer gemessen.

Saubere DNA besitzt einen Extinktionsquotienten A_{260}/A_{280} von etwa 1,8 bis 1,9; für RNA liegt dieses Verhältnis bei 1,9 bis 2,0. Nicht abgetrennte Phenolreste oder Proteinverunreinigungen reduzieren diesen Wert, da Phenole sowie die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan Absorptionsmaxima bei 280 nm aufweisen.

1.7 Agarosegele

Zur Analyse der DNA-Fragmente wurden horizontale einprozentige Agarosegele verwendet. Als Laufpuffer diente 1x Tris-Borsäure-EDTA- (TBE-) Puffer. Die DNA wurde nach Zugabe von 2 µl 6 x Probenpuffer in die Taschen eingegeben. Als Längenstandard wurde der 1 kb Marker von MBI-FERMENTAS (Leon-Rot) verwendet und gleichzeitig mit der DNA auf dem Gel aufgetrennt. Zur Färbung der DNA wurde das Gel für ca. 20 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (2 µg/ml in *Aqua bidest.*) inkubiert, anschließend unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm detektiert und mit einem Photoimagersystem (UVP, Cambridge, UK) dokumentiert.

1 x TBE:

Tris/HCl 10,78 g
Borsäure 5,5 g
EDTA 0,74 g
ad 1l *Aqua bidest.*

6 x Probenpuffer:

Bromphenolblau 0,25 %
Saccharose 40 %
in *Aqua bidest.*

1.8 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die gewünschte DNA ausgeschnitten und mit Hilfe des *Nucleo Spin Extract 2 in 1* Kits von MACHEREY und NAGEL (Düren) isoliert. Das Gelstück wurde in 3x Volumen Puffer NT1 für 10 Minuten bei 50 °C geschmolzen. Die Lösung wurde dann auf im Kit enthaltene, spezielle Säulen mit Silikagelfilter aufgetragen und die DNA nach einem einminütigem Zentrifugationsschritt bei 6000 x g an den Filter gebunden. Gebundene DNA wurde zweimal mit 700 µl Puffer NT3 gewaschen. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt zur Entfernung sämtlicher Ethanolrückstände wurde die DNA mit 30 µl *Aqua bidest.* eluiert.

1.9 Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme erkennen bestimmte Basenabfolgen auf der doppelsträngigen DNA und schneiden diese an definierten Sequenzen. Die so erhaltenen Nukleinsäurefragmente mit definierter Länge weisen an ihren Enden die Schnittstelle des verwendeten Restriktionsenzym auf und können so effizient subkloniert werden. Zur Restriktion wurden 0,1 bis 3 µg DNA eingesetzt. Desweiteren wurde 1 µl eines für das Enzym spezifischen 10 x-Restriktionspuffers zugegeben. Dieser Ansatz wurde dann mit 3 Units Restriktionsendonuklease pro µg zu schneidende DNA versetzt. Der Ansatz wurde mit *Aqua bidest.* auf 10 µl aufgefüllt und für 2 Stunden bei der jeweiligen optimalen Reaktionstemperatur (i.d.R. 37 °C) inkubiert. Bei größeren DNA-Mengen wurde der Ansatz vervielfacht. Auch gleichzeitige Reaktionen mit mehreren Enzymen wurden durchgeführt. Hierzu wurde dann ein Universalpuffer (*One phor all buffer plus*, PHARMACIA, Freiburg) verwendet.

1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen *T4* kann glatte oder überstehende Enden doppelsträngiger DNA-Ketten unter Bildung von Phosphodiesterbrücken miteinander verknüpfen und so z.B. DNA-Fragmente in Plasmidvektoren klonieren. Die höchste Klonierungseffizienz wird mit DNA erreicht, die durch zwei verschiedene Restriktionsenzyme geschnitten wurde, welche nichtkomplementäre Überhänge produzieren. Dies wird als direkte Klonierung bezeichnet.

Das pGEM[®]-T System (PROMEGA, Heidelberg) erleichtert die Klonierung von PCR-Produkten durch die Bereitstellung von linearen Vektoren, die eine einzelne Thymidin-Extension am 3'-Ende haben. Dieses terminale Thymidin ist komplementär zu dem 3'-Adenosinrest, der durch viele nicht korrekturlesende DNA-Polymerasen an doppelsträngige DNA-Produkte angehängt wird (CLARK 1988). Das einzelne komplementäre Basenpaar, das sich zwischen Vektor und PCR-Produkt bildet, liefert die Bedingungen für eine effektive Ligationsreaktion (TA-Klonierung).

Typischer Ligationsansatz:

DNA-Fragmente (z.B. gereinigtes PCR-Produkt)	x µl
10 x Ligationspuffer	1 µl
Vektor	1 µl
<i>T4</i> Ligase	1 µl
<i>Aqua bidest.</i>	7-x µl

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert.

1.11 Herstellung kompetenter Bakterien

Mit dieser Methode wurden *E.coli* XL1 blue MRF⁺ Bakterien hergestellt, die kompetent für die Aufnahme der ligierten DNA sind. Bei dem TSS (*Transformation and Storage Solution*)-Reagenz (EPICENTRE TECHNOLOGIES über BIOZYM, Hess.Oldendorf) handelt es sich um eine Transformations- und Aufbewahrungslösung, mit der kompetente Bakterienzellen in einem Schritt hergestellt und ohne Hitzeschock transformiert werden können (CHUNG *et al.* 1989). Die Herstellung der

kompetenten Bakterien erfolgte nach der modifizierten Methode von HONDAL UND SCHAEFFER (1995).

Für 20 Proben mit 0,1 ml Volumen wurde zuerst eine Übernachtskultur von *E.coli* XL1 blue MRF'-Zellen in LB-Tetrazyklin (25 µg/ml) hergestellt. Mit 5 ml dieser Übernachtskultur wurden nach ca. 12 Stunden 200 ml LB-Medium angeimpft und bis zur früh-logarithmischen Phase ($OD_{600} = 0,3 - 0,4$) kultiviert. Die Kultur wurde dann 15 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend für 5 Minuten bei 4 °C und 5000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und restliche Flüssigkeitsreste vollständig entfernt. Das Pellet wurde dann in 2 ml eiskaltem 1x TSS resuspendiert und die Suspension durch Pipettieren gründlich gemischt. Anschließend wurden 100 µl Aliquots in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfcaps pipettiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80 °C konnten die so hergestellten kompetenten Bakterien für bis zu 20 Wochen aufbewahrt werden.

TSS:

Polyethylenglycol (PEG) (3350 oder 8000) 10 % (w/v)

Dimethylsulfoxid (DMSO) 5 % (v/v)

MgSO₄ 20-50 mM

in LB-Medium

pH 6,5

1.12 Transformation der TSS-kompetenten Zellen

Ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde langsam auf Eis aufgetaut. Zu diesen 100 µl wurde der Ligationsansatz hinzugeben und mit der Pipette vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte ein Inkubationsschritt von 30 Minuten auf Eis. Dann wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und der gesamte Ansatz für eine Stunde bei 37 °C und 200 x g geschüttelt. Dieser Ansatz wurde für 5 Minuten bei 4000 x g abzentrifugiert und ungefähr zwei Drittel des Überstandes entfernt. Das Pellet wurde im Rest des Überstandes resuspendiert und auf Medium-Platten mit Antibiotika (entsprechend der Antibiotikaresistenz für die das entsprechende Plasmid codiert) ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

Wurde das DNA-Fragment in den pGEM[®]-T-Vektor einkloniert, konnte man anhand der Blau/Weiß-Selektion positive Bakterienkolonien erkennen (ULLMANN *et al.* 1967).

1.13 Kontroll-PCR

Um den Erfolg der Ligation und Transformation zu kontrollieren, wurden einzelne Bakterienkolonien nach der Transformation mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers in 20 µl LB-Medium überführt. 1 µl dieser Lösung wurde dann für eine PCR (siehe 1.3) mit Primern, die die *multiple cloning site* des Vektors flankierten, verwendet. Nach Elektrophorese (siehe 1.7) zeigten sich bei gelungener Ligation und Transformation Banden entsprechend der Größe des Plasmidinserts.

1.14 Extraktion genomischer DNA

Zur Herstellung genomischer DNA mit Hilfe des *QIAGEN Genomic Tip100 – Kits* wurden 500 mg Schwammgewebe in einem sterilisierten Mörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das homogenisierte Gewebe wurde in 9,5 ml Puffer G2 mit 200 µg/ml RNase und 0,5 ml Proteinase K (20 mg/ml) überführt und gut geschüttelt. Anschließend wurde das Homogenat zwei Stunden bei 50°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (10 Minuten, 5000 x g, 4°C). Vom Überstand wurde ein 300 µl Aliquot aufbewahrt. Der restliche Überstand wurde auf eine mit 4 ml QBT äquilibrierte *Genomic Tip 100* Säule aufgegeben. 300 µl des Durchlaufes wurden wiederum aufbewahrt. Die Säule wurde dann zweimal mit 7,5 ml QC-Puffer gewaschen (jeweils 300 µl Waschfraktion aufgehoben). Die Elution erfolgte mit 5 ml QF-Puffer (auf 50 °C vorgewärmt) durch pH-Wert-Änderung und Änderung der Salzkonzentration. Wieder wurde ein 300 µl Aliquot abgenommen. Zur Elutionsfraktion wurde das 0,7 fache Volumen Isopropanol zugegeben und der Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 30 Minuten bei 4 °C und 10000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2 ml eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und nochmals 10 Minuten bei 10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde luftgetrocknet und über Nacht in *Aqua bidest.* resuspendiert. Alle Aliquots und die eluierte genomische DNA wurden auf einem 1 %igen Agarosegel (siehe 1.7) überprüft.

Puffer G2:

EDTA	30 mM
GuHCl	800 mM
Tris/HCl pH 8,0	30 mM
Triton X-100	0,5 %
Tween-20	5 %
in <i>Aqua bidest.</i>	

Puffer QBT:

Ethanol	15 %
MOPS	50 mM
NaCl	750 mM
Triton X-100	0,15 %
in <i>Aqua bidest.</i>	
pH 7,0	

Puffer QC:

MOPS	50 mM
Ethanol	15%
NaOH	1 M
in <i>Aqua bidest.</i>	
pH 7,0	

Puffer QF:

Ethanol	15 %
NaCl	1,25 mM
Tris/HCl	50 mM
in <i>Aqua bidest.</i>	
pH 7,0	

1.15 Homologiescreening nach freien Ig-ähnlichen Molekülen

Um aus einer cDNA-Bank ein bestimmtes Gen zu isolieren, wird ein Homologiescreening durchgeführt (BENTON UND DAVIS 1977). Hierzu wird eine einzelsträngige markierte DNA, die dem gesuchten Gen ähnelt, mit der in Phagen verpackten DNA hybridisiert. Diese hybridisierten Phagenplaques geben nach Antikörperinkubation und Detektion Farbsignale und können deshalb identifiziert werden.

1.15.1 Digoxigenin (DIG)-Markierung von DNA-Sonden

Mit Hilfe des *DIG Probe Synthesis Kit* von BOEHRINGER (Mannheim) wurde Digoxigenin-11-UTP mittels PCR in ein DNA-Fragment eingelagert. Dadurch konnte man DNA nichtradioaktiv markieren. Diese DIG-markierten DNA-Fragmente konnten anschließend mittels anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Konjugaten detektiert und durch eine anschließende Farbreaktion nachgewiesen werden.

PCR-Ansatz:

<i>Aqua bidest.</i>	34,75 µl
10 x Puffer	5 µl
PCR Oligomix	2,5 µl
dNTPs	2,5 µl
Forward-Primer	2 µl
Reverse-Primer	2 µl
Plasmid	0,5 µl
Expand Polymerase	0,8 µl

PCR-Bedingungen:

95 °C 1 Minute

95 °C 30 Sekunden, T_m 30 Sekunden, 72 °C 4 Minuten

72 °C 20 Minuten

Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (siehe 1.4) und mit 50 µl *Aqua bidest.* eluiert. Die Kontrolle erfolgte über ein Agarosegel (siehe 1.7). Bis zum weiteren Gebrauch wurde die DIG-markierte Sonde bei –20 °C eingefroren.

1.15.2 Kultivierung der Bakterien für die Phageninfektion

Als Wirtsbakterien für die rekombinanten Phagen wurden *E. coli* XL1-blue verwendet. Es wurde eine Übernachtskultur dieser Bakterien in LB-Medium mit 10 mmol/l Magnesiumsulfat und 0,2 % Maltose hergestellt. Maltose induziert die Ausbildung der Rezeptoren, die die Phagen zur Adsorption an die Bakterien benutzen; Magnesiumionen erleichtern die Anheftung der Phagen (SAMBROOK *et al.* 1989).

Diese Übernachtskultur wurde 3 Minuten bei 7000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet in 10 mmol/l Magnesiumsulfat bis zu einer $OD_{600} = 1$ resuspendiert. Diese Suspension konnte für maximal 2 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

1.15.3 Bestimmung des Phagentiters

Um den Titer einer Phagensuspension oder einer cDNA-Bibliothek zu ermitteln, wurden die durch die Phagen produzierten Löcher in einem Bakterienrasen ausgezählt.

Es wurden serielle Verdünnungen der Phagenlösungen in SM (*suspension medium*)-Puffer hergestellt. Aus jeder dieser Verdünnungen wurden 10 µl mit 100 µl Bakterienlösung (siehe 1.15.2) vermischt. Diese Bakterien/Phagensuspension wurde für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann in 3,5 ml heißen (50 °C) Top-Agar gegeben und sofort auf vorgewärmte LB-Agarplatten ausgegossen. Die Platten wurden 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden dann die Plaques ausgezählt. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe errechnete man dann die „plaque forming units per ml“ (pfu/ml) der Ursprungssuspension.

SM (*suspension medium*)-Puffer:

NaCl	5,8 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 g
1 M Tris/HCl (pH 7,5)	50 ml
Gelatine	100 mg
ad 1l <i>Aqua bidest.</i>	

Top-Agar:

Agarose	7 g
Hefeextrakt	5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2 g
NaCl	5 g
Caseinhydrolysat	10 g
ad 1l <i>Aqua bidest</i>	
pH 7,5 , autoklaviert	

1.15.4 Ausplattieren des Bakterien/Phagengemisches

Es wurden zwei große LB-Agarplatten (22 x 22 cm) hergestellt, getrocknet und dann 30 Minuten bei 37 °C vorgewärmt. Top-Agar wurde mit 10 mM Magnesiumsulfat versetzt und bis zum Gebrauch bei 50 °C vorgewärmt. Von der Bakteriensuspension wurden 2 ml mit 3 µl der *Geodia cydonium* cDNA-Bibliothek (Phagentiter von 10⁵ pfu/µl) gemischt. Diese Bakterien/Phagensuspension wurde anschließend 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit adsorbierten die Phagen an die bakteriellen lamB-Rezeptoren, die normalerweise dem Transport von Maltose in die Zelle dienen. Anschließend wurde die Bakterien/Phagensuspension mit dem vorgewärmten Top-Agar (30 ml) gemischt und dann auf die vorgewärmten LB-Agar-

Platten ausgegossen. Nach einer Inkubationszeit von ungefähr sieben Stunden bei 37 °C wurden kleine Plaques sichtbar.

1.15.5 Transfer der Plaques auf Membran

Für den Transfer der Plaques wurden drei Whatman-Papiere, die mit Denaturierungslösung, Neutralisierungslösung beziehungsweise 2 x SSC befeuchtet waren, vorbereitet. Die Transfermembran (Nylonmembran Hybond-NX, AMERSHAM, Braunschweig) wurde dann auf die Agarplatte aufgelegt. Mit einer Nadel wurde die Orientierung der Membran auf der Platte markiert und die Membran wurde mit Bleistift nummeriert. Nach einer Transferzeit von 1 bis 2 Minuten wurde die Membran vorsichtig abgezogen und mit der Plaquesseite nach oben nacheinander je fünf Minuten auf die Whatman-Papiere gelegt. Anschließend wurde der Filter 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet und schließlich die DNA der Plaques unter UV-Licht bei 1200 J (STRATAGENE UVLinker, Heidelberg) mit Membranstrukturen kreuzvernetzt. Die beiden Membranen wurden „Rücken an Rücken“ eingeschweißt und entweder direkt weiterbearbeitet oder bei 4 °C aufbewahrt.

Denaturierungslösung:

NaOH 0,5 N

NaCl 1,5 M

in *Aqua bidest.*

Neutralisierungslösung:

Tris/Cl pH 7,51 M

NaCl 1,5 M

in *Aqua bidest.*

20 x SSC Stammlösung:

NaCl 3 M

Na-Citrat pH 7,0 0,3 M

in *Aqua bidest.*

autoklavieren

Hybridisierung der Sonde

Die DIG-markierte Sonde (siehe 1.15.1) wurde 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Die Sonde wurde mit einer Konzentration von 2 ng/ml DIG-Easy-Hyb (BOEHRINGER, Mannheim) eingesetzt. Zu den eingeschweißten Membranen wurden 50 ml der Hybridisierungslösung gegeben. Diese wurden dann über Nacht bei 42 °C inkubiert.

1.15.7 Entwicklung der Membranen

Die benutzte Hybridisierungslösung mit der Sonde kann bei -20 °C für mindestens 1 Jahr aufbewahrt und mehrmals benutzt werden. Die Membranen wurden stringent gewaschen: Zweimal 5 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC mit 0,1 % SDS versetzt und anschließend zweimal 15 Minuten bei 68 °C in 0,5 x SSC mit 0,1 % SDS versetzt. Danach wurden sie 1 Minute bei Raumtemperatur in P1 mit 0,3 % Tween-20 inkubiert und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur in 1 %iger Blockierungslösung blockiert. Die Inkubation mit dem Antikörper anti-DIG-AP 1:10000 (150 mU/ml) in Blockierungslösung erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Es schlossen sich zwei Waschschrte à 15 Minuten in P1 mit 0,3 % Tween-20 an. Schließlich wurden die Membranen 2 Minuten in P3 präinkubiert. Die Detektion erfolgte mit NBT/BCIP in P3.

Blockierungslösung:

Das Blockingreagenz (BOEHRINGER, Mannheim) wird in P1 zu einer Endkonzentration von 10 % (w/v) gelöst.

P1:

Maleinsäure 100 mM
NaCl pH 7,5 150 mM
in *Aqua bidest.*

P3:

Tris-Cl 100 mM
NaCl 100 mM
in *Aqua bidest.*
pH 9,5

NBT:

75 mg/ml Nitroblautetrazolium Salz in 70% Dimethylformamid

BCIP:

50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat Toluidinium-Salz in 100 % Dimethylformamid

Detektionslösung:

45 µl NBT-Lösung mit 35 µl BCIP-Lösung in 10 ml P3 ansetzen.

1.15.8 Ausstechen der Plaques

Die zu den positiven Signalen gehörenden Plaques wurden nach ursprünglicher Orientierung der Membran auf der Platte markiert und anschließend mit der abgeschnittenen Spitze einer autoklavierten gelben Pipettenspitze in 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform gepickt. So konnten sie bei 4 °C für mindestens ein Jahr aufbewahrt werden.

1.15.9 Sekundäres und tertiäres Screening

Um die Plaques des ersten Screening zu vereinzeln, wurde an die erste Screening-Runde eine zweite und dritte Runde angeschlossen. Diese Screenings erfolgten nach der gleichen Methode wie das erste, es wurden lediglich kleinere LB-Agar-Platten (15 cm Durchmesser) benutzt. Die Bakterien/Phagensuspension wurde aus 200 µl Bakteriensuspension und 20 µl ausgestochener Phage vom ersten Screening gemischt. Als Membranen wurden Nitrocellulose-Filter verwendet, diese wurden nach dem Transfer zwei Stunden bei 80 °C gebacken. Als Sonde wurde die bereits für das erste Screening benutzte Hybridisierungslösung für 10 Minuten bei 68°C erwärmt und alle Filter wurden zusammen über Nacht bei 42 °C in dieser Lösung inkubiert. Die Entwicklung erfolgte wie beim ersten Screening. Positiven Signalen entsprechende Plaques wurden in 300 µl SM-Puffer mit 12 µl Chloroform gepickt, geschüttelt und bei 4 °C aufbewahrt.

1.15.10 *In vivo Excision*

Durch die *in vivo Excision* können Phagemid-Sequenzen (rezirkularisierte ausgeschnittene Fremd-DNA-Vektoranteile) leicht aus dem ZAP-Express-Vektor herausgeschnitten werden. Lambda Phage, Helferphage und *E.coli*-Wirtsstamm werden zusammen in Top-Agar ausplattiert, der *Excision*-Prozess tritt dann während der Plaqueeentwicklung auf den Platten auf. Die entstandenen Plaques werden *Excision*-Plaques genannt. Während der *lambda* Phage und der Helferphage in den XPORT-Zellen koreplizieren, vermittelt das pII-Protein, das von den Helferphagen codiert wird, die Replikation eines Einzelstranges der Phagemidsequenzen innerhalb der *lambda* DNA. Diese ausgeschnittene Phagemid-Einzelstrang-DNA wird dann als filamentöser Phagenpartikel verpackt und wird in den *Excision*-Plaques entlassen. Die ebenfalls im Top-Agar enthaltenen XLOLR-Zellen werden von diesem Phagen anschließend infiziert. Die Helferphagen aber können sich nicht in den XLOLR-Zellen vermehren, da sie *amber* Stopcodons enthalten, die von den XLOLR-Zellen nicht supprimiert werden. *Lambda* Phagen können sich ebenfalls nicht in den XLOLR-Zellen vermehren, da diese Zellen gegenüber einer *lambda*-Infektion resistent sind. Deshalb enthält jeder *Excision*-Plaques *lambda*-Phagenpartikel, Helferphagen, verpackte ausgeschnittene Phagemidpartikel, lysierte XPORT-Zellen und Phagemid-infizierte XLOLR-Zellen.

Die infizierten XLOLR-Zellen können kultiviert werden, indem man den *Excision*-Plaques mit einem sterilen Zahnstocher berührt und diesen dann in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika plaziert. Tetrazyklin tötet die XPORT-Zellen, aber erlaubt das Wachstum der XLOLR-Zellen. Gleichzeitig selektiert die Zugabe des vom Phagemid codierten Antibiotikums die XLOLR-Zellen, die die Phagemid DNA enthalten. Im Falle des ZAP-Express-Vektors selektiert Kanamycin für XLOLR-Zellen, die den pBK-CMV Vektor enthalten. Nach der Übernachtskultur kann dann die Plasmid-DNA hergestellt werden.

Durchführung

Der *Excision*-Wirtsstamm XPORT wurde über Nacht in NZY-Medium hochgezogen, der Wachstumsstamm XLOLR in LB-Tetrazyklin (25 µg/ml). Die Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen 1:10 in NZY-Medium verdünnt und bis zu einer

OD₆₀₀ = 2 kultiviert. Anschließend inkubierte die Kultur 30 Minuten bei Raumtemperatur, damit sich die F-Pili regenerieren konnten. Zum Koinfektionsansatz wurden folgende Komponenten gemischt:

50 µl XPORT (OD₆₀₀ = 2)
10 µl Helferphagen 704 (10⁸ pfu/ml)
1 µl eines gepickten Plaques (10-1000 pfu)
5 µl XLCLR (OD₆₀₀ = 2)
4 ml NZY-Top Agar

Dieser Ansatz wurde auf NZY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden die trüben *Excision*-Plaques mit einem sterilen Zahnstocher in 3 ml LB-Medium mit 5 µg/ml Tetrazyklin und 10 µg/ml Kanamycin überführt und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend isoliert (siehe 1.2) und die Ausbeute photometrisch bestimmt (siehe 1.6). Außerdem wurden Glycerol-Dauerkulturen aus den Übernachtskulturen hergestellt (siehe 1.1).

NZY Medium:

NaCl 5 g
MgSO₄ x 7 H₂O 2 g
Hefeextrakt 5 g
Caseinhydrolysat 10 g
ad 1 l *Aqua bidest.*
pH 7,5

NZY Agar:

NZY Medium 1 l
Agar 15 g
pH 7,5

NZY Top Agar:

NZY Medium 1 l
Agarose 0,7 % (w/v)

LB Medium:

NaCl 10 g
Caseinhydrolysat 10 g
Hefeextrakt 5 g
ad 1 l *Aqua bidest.*
pH 7,0

1.15.11 Identifikation der Screening-Klone

Die durch das Screening gewonnenen Klone wurden zuerst mittels einer Restriktion (siehe 1.9) auf die Größe des Inserts geprüft. Hierzu wurden die beiden an der *multiple cloning site* des Vektors pBK-CMV liegenden Enzyme *EcoRI* und *XhoI* verwendet. Die Kontrolle erfolgte mit Hilfe eines Agarosegels (siehe 1.7). Anschließend wurden die Klone sequenziert (siehe 1.16, pBK-CMV spezifische Sequenzierprimer T3 und T7).

1.16 Sequenzierung

Um die Basenabfolge in DNA-Strängen zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit die Didesoxy-Methode nach SANGER (1977) genutzt. Diese enzymatische Methode basiert auf der Fähigkeit der DNA-Polymerase einen Primer zu verlängern, der an den zu sequenzierenden DNA-Strang hybridisiert ist, bis ein kettenabbrechendes Nukleotid eingebaut wird. Jede Sequenzbestimmung wird als Set von vier separaten Reaktionen ausgeführt, von der jede alle vier Desoxyribonucleotid-Triphosphate (dNTPs) besitzt und mit einer begrenzenden Menge eines unterschiedlichen Didesoxyribonucleotid-Triphosphat (ddNTP) supplementiert ist. Da den ddNTPs die 3'-OH Gruppe fehlt, die für die Kettenverlängerung nötig ist, wird das wachsende Oligonucleotid selektiv an einem Guanin (G), Adenin (A), Thymin (T) oder Cytosin (C) terminiert – je nach dem entsprechenden Didesoxy-Analogen in der Reaktion. Die relativen Konzentrationen jedes der dNTPs und ddNTPs kann angepaßt werden, um ein verschachteltes Gemisch abgebrochener Ketten von mehreren Hundert bis zu einigen Tausend Basenpaaren Länge zu erhalten. Die resultierenden Fragmente, jedes mit einem gemeinsamen Anfang aber mit einem unterschiedlichen Nukleotid endend, werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe durch eine hochauflösende denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Hier wurde das Sequenziergerät LI-COR (Typ 4000S, MWG-BIOTECH, Ebersberg) verwendet. Die Primer sind mit einem Infrarotfarbstoff (IRD700) gekoppelt. Der Infrarotfarbstoff der DNA-Fragmente wurde durch einen Laserstrahl angeregt und emittierte infrarotes Licht der Wellenlänge 790 nm, welches dann von dem o.g. Gerät detektiert wurde.

1.16.1 Sequenzierreaktion

Die spezifischen Infrarot-markierten Primer wurden bei der Firma MWG-BIOTECH (Ebersberg) bestellt. Für die eigentliche Sequenzierreaktion wurde der *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* der Firma AMERSHAM (Heidelberg) benutzt.

Ungefähr 1 µg der in *Aqua bidest.* gelösten DNA wurde mit 2 pmol infrarot-markierten Primer versetzt und der Ansatz mit *Aqua bidest.* auf 19 µl aufgefüllt. Je 1,5 µl Terminationsmix (A, C, G, T) des Kits (enthält DNA-Polymerase, Desoxy- und Didesoxynucleotide) wurde in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt. Dazu wurden je 4,5 µl des DNA/Primer-Gemisches gegeben. Die Proben wurden dann in einen Thermocycler gestellt und nach folgenden Bedingungen amplifiziert:

95 °C 5 Minuten

95 °C 30 Sekunden, T_m 30 Sekunden, 72 °C 45 Sekunden

95 °C 3 Minuten (finale Denaturierung)

Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und zur Inaktivierung der Reaktion mit je 3 µl Stopp/Ladepuffer versetzt.

Stopp/Ladepuffer:

Formamid 95 % (v/v)

Xylencyanol 0,1 % (v/v)

Bromphenolblau 0,1 % (w/v)

EDTA 10 mM

Der Puffer wurde mit *Aqua bidest.* auf 100 % aufgefüllt.

1.16.2 Herstellung des Gels und Elektrophorese

Zwei Glasplatten wurden mit *Aqua bidest.* gereinigt und mit Isopropanol entfettet. Zwischen die Platten wurden Abstandshalter von 0,25 mm Dicke eingesetzt.

Es wurde das Zweikomponentensystem Sequagel XR der Firma BIOZYM als Gel-Lösung verwendet. Von Komponente 1 (enthält Harnstoff, Acrylamid und Acrylamid Derivate) wurden 24 ml mit 6 ml Komponente 2 (enthält 5 x TBE und Katalysatoren) gemischt, steril filtriert und dann mit 175 µl 10 %igem Ammoniumperoxodisulfat (APS)

versetzt. Mit einer Spritze wurde diese Gel-Lösung in die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Für die späteren Probenaschen wurde ein Vorkamm eingesetzt. Nach einer 2 bis 3stündigen Polymerisation des Gels wurde der Vorkamm entfernt und die ausgebildete Tasche von Gelresten befreit. Das Gel wurde in die Apparatur eingehängt und zur Erwärmung des Gels ein ungefähr 30minütiger Vorlauf gestartet. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Nach Ende des Vorlaufs wurde der eigentliche Kamm (*48-well sharktooth-comb*) eingesetzt und je 1,5 µl der Proben in der Reihenfolge A,C, G, T in die Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde gestartet und für die Dauer der Elektrophorese (6-7 Stunden) wurde eine Spannung von 1500 V angelegt. Die DNA-Sequenz konnte dann anschließend anhand des Bandenmusters abgelesen werden.

10 x TBE-Puffer:

Tris 107,8 g

Borsäure 55,0 g

EDTA 7,4 g

ad 1l vollentsalztes *Aqua bidest.*

2 Präparation und enzymatische Manipulation von RNA

2.1 Behandlung von Lösungen mit Dimethylpyrocarbonat (DMPC)

Um RNase-freie Lösungen herzustellen, wurde den Lösungen 0,1 % DMPC (Dimethylpyrocarbonat) zugesetzt. DMPC bindet kovalent an die Tyrosin- und Histidinreste der RNasen und zerstört dadurch deren Struktur (LEONARD *et al.* 1970). Die Lösung wurde 30 Minuten gerührt, für 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur Inaktivierung des DMPCs 1 Stunde autoklaviert.

2.2 Extraktion von Total-RNA

Mit Hilfe des Reagenz TRIzol (GIBCO, Eggenstein) wurde Total-RNA aus *Geodia*-Stückchen isoliert. TRIzol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat. Ausgangsmaterial für die Extraktion war 1 g bei -80 °C gelagertes *Geodia*-Gewebe. Das Schwammgewebe wurde mit Hilfe von Mörser und Pistill unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver homogenisiert. Das Pulver wurde dann in 1 ml TRIzol gegeben und gründlich gevortext. Durch einen Zentrifugationsschritt wurden unlösliche Zellbestandteile entfernt (10 Minuten, 12000 x g, 4 °C). Der Überstand wurde mit 200 µl Chloroform gemischt und nach dreiminütiger Inkubation zentrifugiert (15 Minuten, 12000 x g, 4 °C), wonach sich eine obere wässrige Phase und eine untere phenolische Phase bildete. Die obere Phase, die die RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500 µl Isopropanol präzipitierte die RNA und konnte dann abzentrifugiert werden (10 Minuten, 12000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde mit 1 ml 75 % eiskaltem Ethanol gewaschen und noch einmal zentrifugiert (5 Minuten, 7500 x g, 4 °C), um das Ethanol zu entfernen. Das RNA-Pellet wurde anschließend luftgetrocknet und schließlich in 100 µl DMPC-Wasser resuspendiert. Die Ausbeute der Isolierung wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (siehe 1.6) und die Reinheit auf einem RNA-Gel überprüft.

Die isolierte RNA wurde aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

2.3 RNA-Gel

Für ein RNA-Gel wurden 0,5 g Agarose in 43,5 ml DMPC-Wasser aufgeköcht. Nachdem diese Lösung auf 60 °C abgekühlt war, wurden 2,5 ml 20 x Boratpuffer und 4 ml Formaldehyd zugegeben. Für ein Kontroll-RNA-Gel wurden 8 µg RNA mit 3 µl 6 x Färbelösung (MBI-FERMENTAS, Leon-Rot) und Ladepuffer versetzt.

Alle Proben wurden 15 Minuten bei 56 °C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt. Pro Spur wurden 18 µl aufgetragen. Das Gel lief bei 10 V/cm in 1 x Boratpuffer. Anschließend wurde das Gel 2 Minuten in Toluidinblau gefärbt und durch Wasser entfärbt.

20 x Boratpuffer:

Natriumtetraborat-Decahydrat	23,73 g
Borsäure	38,14 g
0,5 M EDTA pH 8,0	8 ml

in *Aqua bidest.*

pH 7,4

Toluidinblaulösung:

Toluidinblau	1 %
Methanol	40 %

in *Aqua bidest.*

Ladepuffer:

deionisiertes Formamid	197 µl
Formaldehyd	64 µl
20 x Boratpuffer	39 µl

in *Aqua bidest.*

2.4 Northern Blot-Analyse

Mit der Methode der Northern Blot-Analyse kann ein bestimmtes Gen identifiziert und die Größe des Transkriptes nachgewiesen werden. Dazu wird zuerst die Total-RNA auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und dort durch UV-Kreuzvernetzung fixiert. Die Membran wird anschließend mit einer DIG-markierten DNA-Sonde (siehe 1.15.1) hybridisiert. Die Digoxigenin-Markierung ermöglicht den Nachweis der Hybridisierungsprodukte mittels eines anti-DIG-AP gekoppelten Antikörpers. Als Substrat für die alkalische Phosphatase im Chemilumineszenz-Nachweis dient CDP-Star™ (BOEHRINGER, Mannheim). Die enzymatische Dephosphorylierung durch die alkalische Phosphatase führt zur Bildung eines

metastabilen Diocetan-Phenolat-Anions. Der Zerfall dieser Intermediate führt zur Lichtemission, die dann auf Röntgenfilmen aufgezeichnet wird.

2.4.1 Gel

Für das RNA-Gel (siehe 2.3) wurden 5 µg RNA eingesetzt. Als Längenstandards wurde der DIG-markierte Marker I, II oder III von BOEHRINGER (Mannheim) verwendet. Proben und Marker wurden für 15 Minuten bei 56 °C erhitzt, und dann sofort auf Eis gestellt. Pro Tasche wurden je 18 µl aufgetragen und das Gel lief bei 80 V in 1 x Boratpuffer bis die Bromphenolblaufront ungefähr $\frac{3}{4}$ der Gellänge erreicht hatte. Das Gel wurde nach dem Lauf einmal 5 Minuten in DMPC-Wasser und einmal 15 Minuten in 20 x SSC gewaschen.

20 x SSC Stammlösung:

NaCl 3 M

Na-Citrat pH 7,0 0,3 M

in *Aqua bidest.*

autoklavieren

2.4.2 Transfer

Der Blot wurde in folgender Reihenfolge aufgebaut: Papierstapel, 2 Whatman-Papiere, 1 Whatman-Papier in 20 x SSC angefeuchtet, Nylon-Membran Hybond-N, Gel mit Taschenöffnungen nach unten, 3 Whatman-Papiere in 20 x SSC angefeuchtet und zwei lange Whatman-Papiere, die in einen Puffertank einhängt werden. Dieser Aufbau wurde durch Gewichte beschwert. Um eine Verdunstung des Puffers zu verhindern, wurde alles in Frischhaltefolie eingewickelt,. Der Transfer erfolgte für 3 Stunden bei Raumtemperatur in 20 x SSC-Puffer.

2.4.3 Hybridisierung

Nach dem Transfer wurde der Blot abgebaut, die Geltaschen auf der Membran eingezeichnet und das Gel zur Kontrolle des Transfers mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Membran wurde bei Raumtemperatur getrocknet und die transferierte RNA durch

UV-Kreuzvernetzung (900 kJ) auf der Membran fixiert. Es erfolgte eine Prähybridisierung für 30 Minuten in der bei 50 °C vorgewärmten DIG-Easy-Hyb-Lösung von BOEHRINGER (Mannheim), um unspezifische Bindestellen der Membran abzusättigen. 150 ng DIG-markierte Sonde wurden 10 Minuten bei 95 °C denaturiert und dann direkt auf Eis gestellt. Die Sonde wurde mit 10 ml DIG-Easy-Hyb gemischt und zur Membran zugefügt. Die Hybridisierung erfolgte ca. 12 Stunden bei 50 °C.

2.4.4 Entwicklung

Alle Waschgefäße wurden mit SDS-Lösung vorbehandelt und anschließend mit RNase-AWAY[®] (MOLECULAR BIO-PRODUCTS, San Diego, USA) gespült, um RNasen zu deaktivieren. Gewaschen wurde die Membran erst für zweimal 5 Minuten bei Raumtemperatur in 2 x SSC mit 0,1 % SDS. Dann zweimal 15 Minuten bei 42 °C (niedrige Stringenz) bzw. 68 °C (hohe Stringenz) in 0,1 x SSC mit 0,1 % SDS. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. An den zweiten Waschschrift fügte sich eine 1 minütige Äquilibration in P1 an. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen eine Stunde durch Inkubation der Membran in 2% Blockierungslösung abgesättigt. Die Inkubation mit dem anti-DIG-AP Antikörper (1:5000 in 1 %iger Blockierungslösung verdünnt) erfolgte 1 Stunde. Der nächste Waschschrift betrug zweimal 15 Minuten in P1 mit 0,1 % Tween-20. Daran schloß sich ein Äquilibrationsschritt in P3 an. Die Detektion erfolgt durch Chemilumineszenz mit CDP-Star[™] (BOEHRINGER, Mannheim). Die Substratlösung wurde 5 Minuten über den Blot geschwappt und dann sanft abgestrichen. Die weitere Entwicklung erfolgte in der Dunkelkammer. Auf den Blot wurde ein Film (*Fuji RX New*, BECTHOLD, Kelkheim) aufgelegt (10 Minuten bis 24 Stunden) und anschließend entwickelt.

P1:

Maleinsäure 100 mM
NaCl pH 7,5 150 mM
in *Aqua bidest.*

P3:

Tris-Cl 100 mM
NaCl 100 mM
in *Aqua bidest.*
pH 9,5

3 Proteinchemische Methoden

3.1 Expression eines rekombinanten Proteines

Wenn ein Fremdprotein in Prokaryonten exprimiert werden soll, wird die spezifische Gensequenz in einen Expressionsvektor kloniert. In diesem Experiment wurde der Expressionsvektor pQE32 (QIAGEN, Hilden) verwendet. Er enthält Regulatorelemente des *E.coli lac*-Operons, wodurch die Expressionsinduktion des einklonierten Proteingens durch β -D-Isopropyl-Thiogalactopyranosid (IPTG) -Zugabe möglich ist. Zusätzlich werden an das Fremdprotein 6 Histidinreste angehängt (hier an den N-Terminus), die eine leichtere Aufreinigung des rekombinanten Proteines über Affinitätschromatographie ermöglichen. Proteine mit solch einem Histidin-Tag binden mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-13} an mit Nickel versetzte Nitrilotriessigsäure (NTA = *Nitrilotriaceticacid*). Durch pH-Wert-Änderungen können die Proteine wieder von der Nickel-NTA-Säule gelöst werden, da die Histidinreste protoniert werden und so nicht mehr mit dem zweifach positiv geladenen Nickel wechselwirken können. Hier wurde das *Ni-NTA-Spin Kit* (QIAGEN, Hilden) zur Aufreinigung des rekombinanten Proteines benutzt.

Die gewünschte Nukleotidsequenz wurde durch PCR mit Primern, die Restriktionsstellenadapter enthalten, aus der *Geodia cydonium* cDNA-Bank amplifiziert (siehe III.B.1.3), zunächst in pGEM[®]-T-einkloniert und dann in den Expressionsvektor pQE32 ligiert. Es folgte eine Transformation von *E. coli* XL1blue MRF' kompetenten Zellen (siehe 1.12). Nach einer Kontroll-PCR (siehe 1.13) wurden Klone, die das entsprechende Insert enthielten, ca. 12 Stunden in 5 ml LB-Amp kultiviert. Anschließend wurden 100 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Amp mit der Übernachtskultur angeimpft und diese dann bis zu einer $OD_{600} = 0,5 - 0,6$ bei 37 °C kultiviert. Nach Erreichen dieser optischen Dichte wurde eine Probe von 1 ml als nicht-induzierte Kontrolle entnommen und eingefroren. Der Rest der Kultur wurde mit 1 mM IPTG für 4 Stunden bei 37 °C und 250 rpm induziert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (20 Minuten, 4000 x g). Das Pellet wurde bei -80°C bis zum späteren Gebrauch eingefroren.

Zur Reinigung des rekombinanten Proteines wurde das Pellet langsam auf Eis aufgetaut. Pro Gramm Feuchtgewicht wurden 5 ml Puffer A zugegeben und dann wurde das Pellet durch leichtes Rühren eine Stunde bei Raumtemperatur resuspendiert. Nach Abzentrifugation der Zellreste (30 Minuten, 10000 x g, Raumtemperatur) wurde der Überstand abgenommen und 5 µl für die spätere Kontrolle bei -20°C aufbewahrt.

Zu 4 ml Überstand wurde 1 ml 50 % Ni-NTA Gemisch zugegeben, dieser Ansatz für 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend in eine Säule gefüllt. Nach Absetzen des Ansatzes und Entfernung des Überstandes (20 µl für Kontrolle eingefroren) wurde die Säule dreimal mit 4 ml Puffer C gewaschen. Die Elution erfolgte zuerst viermal mit 0,5 ml Puffer D und anschließend viermal mit 0,5 ml Puffer E. Anschließend erfolgte ein letzter Elutionsschritt mit zweimal 0,5 ml Puffer E. Von jedem Wasch- und Elutionsschritt wurden 20 µl-Aliquots für die spätere Kontrolle eingefroren. Die Elutionsfraktionen wurden bis zum späteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

Puffer A:

GuHCl 6 M
NaH₂PO₄ 0,1 M
Tris/HCl pH 8,0 0,01 M
in *Aqua bidest.*

Puffer C:

Harnstoff 8 M
NaH₂PO₄ 0,1 M
Tris/HCl pH 8,0 0,01 M
in *Aqua bidest.*

Puffer D:

Harnstoff 8 M
NaH₂PO₄ 0,1 M
Tris/HCl pH 5,9 0,01 M
in *Aqua bidest.*

Puffer E:

Harnstoff 8 M
NaH₂PO₄ 0,1 M
Tris/HCl pH 4,5 0,01 M
in *Aqua bidest.*

3.2 Transplantationsversuche

An frischen, im Aquarium gehaltenen, *Geodia cydonium*-Individuen wurden Transplantationsversuche mittels der Insertionstechnik (PANCER *et al.* 1996) durchgeführt:

3.2.1 Autotransplantation

Aus einem *Geodia cydonium*-Individuum wurde mit einem Korkbohrer ein kleines Stück (Durchmesser 2 cm) entfernt und an einer anderen Stelle des gleichen Individuums in ein entsprechend gebohrtes Loch wieder eingesetzt. Das auf diese Weise präparierte *Geodia cydonium*-Individuum wurden weiter im Aquarium gehalten und regelmäßig beobachtet. Nach einer Woche wurde der Versuch abschließend begutachtet und dokumentiert. Anschließend wurde das Gewebe an der Transplantationsstelle kleingeschnitten und bei -80°C aufbewahrt. Zur Kontrolle wurde noch Gewebe von einer anderen Stelle des Individuums kleingeschnitten und eingefroren.

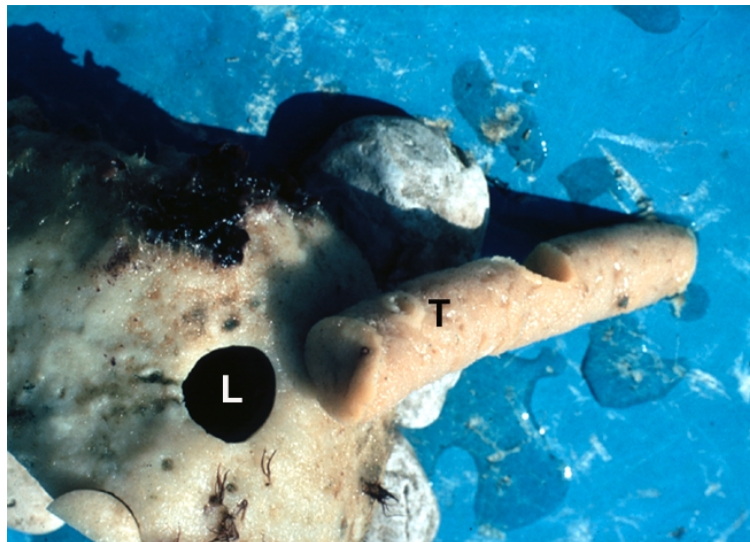


Abbildung 4: Ein Gewebestück (T) wurde mit einem Korkbohrer aus einem *Geodia cydonium* - Individuum entnommen und in ein ebenfalls mit Korkbohrer hergestelltes Loch (L) an einer anderen Stelle im gleichen Individuum eingesetzt.

3.2.2 Allotransplantation

Bei der Allotransplantation wurde ebenfalls mittels der Insertionstechnik ein Stück Gewebe aus einem *Geodia cydonium*-Individuum entfernt. Anschließend wurde es in ein Loch mit einem etwas kleinerem Durchmesser in einem anderen Individuum wieder eingesetzt. Dieses Individuum mit dem eingesetzten Transplantat wurde weiter im Aquarium gehältert und regelmäßig beobachtet. Eine Woche nach der Transplantation wurde der Versuch abschließend begutachtet und dokumentiert. Es wurden verschiedene Gewebeproben kleingeschnitten und bei -80 °C aufbewahrt.

3.3 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus *Geodia cydonium*

Um Proteine aus *Geodia cydonium* zu isolieren, wurde 1 g *Geodia cydonium*-Gewebe in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das Pulver wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 ml Extraktionspuffer pro eingesetztes Gramm Gewebe zugegeben. Das Gemisch wurde gevortext und dann unter zwischenzeitlichem Schütteln 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach schloßen sich zwei Zentrifugationsschritte an (16000 x g, 20 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Extraktionspuffer:

Harnstoff	8 M
DTT	10 mM
CHAPS	0,5 %
Pharmalyt pH 3-10	0,8 %
PMSF	1 mM

3.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Mittels der Bradford-Reagenzlösung von ROTH (Roti[®]-Quant) wurde die Proteinkonzentration der verschiedenen Proteinproben bestimmt. Die Bradford-Methode (BRADFORD 1976) beruht darauf, daß die Färbelösung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration die Farbe ändert. Die Bindung des roten Farbstoffes an basische oder aromatische Aminosäuren stabilisiert die anionische (blaue) Form des Farbstoffes, dessen Absorptionsmaximum bei 595 nm gemessen wird.

Zunächst wurde eine Eichgerade mit BSA (*bovine serum albumin* = Rinder Serumalbumin)-Lösungen einer Verdünnungsreihe von 0,3 µg bis 50 µg/ml in einer Mikrotiterplatte angesetzt. Es wurden Dreifach-bestimmungen durchgeführt. Zu jeder Verdünnung wurden 150 µl Bradford-Reagenz zugegeben, kurz gemischt und im *Elisa-Reader* bei 595 nm gemessen.

Die Probe wurde in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt, dazu wurden 150 µl Bradford-Reagenz gegeben und die Messung erfolgte wie bei den BSA-Verdünnungen.

3.5 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die SDS-PAGE können Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch das stark anionische Detergenz SDS (*sodium dodecyl sulfate*) in Verbindung mit dem reduzierenden Reagenz β-Mercaptoethanol und Hitze dissoziieren die Proteine in ihre Untereinheiten und SDS bindet an die denaturierten Polypeptide. Die durch die SDS-Bindung resultierende negative Nettoladung ist proportional zum Molekulargewicht des Polypeptids und unabhängig von der Sequenz. Die elektrophoretische Mobilität stellt somit eine lineare Funktion des Molekulargewichtes dar (WEBER und OSBORN 1969). Mit Hilfe von Markern mit bekanntem Molekulargewicht kann das Molekulargewicht der Proteine bestimmt werden. Der Vernetzungsgrad der Matrix und somit der Trennbereich der Gele läßt sich durch Änderung der Polyacrylamidkonzentration variieren.

Die SDS-PAGE wurde nach dem diskontinuierlichen Prinzip (LAEMMLI 1970) in der Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell von BIO-RAD (München) durchgeführt. Die

Gelmatrix ist in ein Trenn- und ein Sammelgel gegliedert. Die Polyacrylamidkonzentrationen der hier benutzten Trenngele lagen zwischen 7,5 und 15 %. Es handelte sich um Vertikalgele mit einer Geldicke von 0,5 mm, die zwischen zwei durch Spacer getrennte Glasplatten gegossen wurden.

12 % Trenngel:		5 % Sammelgel:	
<i>Aqua bidest.</i>	3,3 ml	<i>Aqua bidest.</i>	2,1 ml
Acrylamid-Mix	4,0 ml	Acrylamid-Mix	0,5 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	1,0 M Tris pH 6,8	0,38 ml
10 % SDS	0,1 ml	10 % SDS	0,03 ml
10 % APS	0,1 ml	10 % APS	0,03 ml
TEMED	0,004 ml	TEMED	0,003 ml

Zur Bestimmung der Molekulargewichte der Proben wurde ein Proteinstandard (*BroadRange* Marker, BIO-RAD, München) auf das Gel aufgetragen. Die Proben wurden im Verhältnis 1 : 5 mit Probenpuffer verdünnt, 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und dann sofort bis zum Auftragen auf Eis gestellt. Nach Auftragen der Proben wurde eine Spannung von 8 V/cm Gellänge angelegt. Hatte die blau gefärbte Lauffront die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht, wurde die Spannung auf 15 V/cm Gellänge erhöht. Das Gel wurde anschließend entweder gefärbt (siehe 3.6) oder auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferriert (siehe 3.7).

SDS-Laufpuffer:		5 x Probenpuffer:	
Tris/HCl pH 8,3	25 mM	Tris/HCl pH 6,8	250 mM
Glycin	192 mM	Saccharose	50 %
SDS	0,1 %	SDS	10 %
in <i>Aqua bidest.</i>		Bromphenolblau	0,2 %
		β-Mercaptoethanol	2,5 %
		in <i>Aqua bidest.</i>	

3.6 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde für einige Zeit (30 Minuten bis 12 Stunden) zur Färbung und gleichzeitigen Fixierung in eine Färbelösung (Roti[®]-Blue) von ROTH (Karlsruhe)

eingelegt. Roti[®]-Blue ist eine kolloidale Coomassie Brilliant Blue G-250 Färbung für Proteine in Polyacrylamidgelen. Während der Färbezeit wurde das Gel langsam bewegt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit *Aqua bidest.* entfernt.

Die Detektionsgrenze der Roti[®]-Blue -Färbung liegt bei über 30 ng pro Bande.

3.7 Western Blot-Analysen

Durch das sogenannte Western Blotting, ursprünglich nach TOWBIN *et al.* (1979) und dann verändert von BURNETTE (1981), werden die in der PAGE aufgetrennten Proteine aus der Gelmatrix auf eine Trägermembran transferiert. Im allgemeinen werden Antigene, die auf Membranen immobilisiert wurden, mit Antikörpern in einem dreistufigen Prozeß detektiert. Zuerst wird der primäre Antikörper, der gegen das Antigen gerichtet ist, zugegeben, um an potentielle Antigenstellen zu binden. Im zweiten Schritt wird ein sekundäres Antikörper-Enzym-Konjugat zugegeben, das konstante Domänen der Immunglobuline erkennt. Das Enzym (AP oder POD), das an den zweiten Antikörper gekoppelt ist, katalysiert eine kolorimetrische Reaktion im dritten Schritt. Nach Zugabe des entsprechenden Substrates kommt es zur Ablagerung des gefärbten Substrates auf der Membran an der Reaktionsstelle.

Der Transfer der Proteine auf die Trägermembran wurde mittels der 1984 von KYHSE-ANDERSON entwickelten Methode des „Semidry-Blottings“ durchgeführt.

Eine stark hydrophobe PVDF -Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für 20 Sekunden in Methanol eingelegt. Danach wurde sie für einige Minuten in *Aqua bidest.* gespült und für 30 Minuten in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3) äquilibriert. Gleichzeitig wurden 16 Filterpapiere (auf Gelgröße zugeschnitten) kurz vor Gebrauch in Transferpuffer eingeweicht. Ein Stapel aus 8 Filterpapieren wurde auf eine ebene Fläche gelegt, die Luftblasen ausgerollt und das Gel aufgelegt. Darauf wurde die PVDF-Membran gelegt, eine Ecke markiert, die restlichen 8 Filterpapiere aufgelegt und erneut die Luftblasen ausgerollt. Dieser Blotstapel wurde mit der Membran auf der Anodenseite auf die angefeuchteten Graphitelektroden aufgelegt. Der Transfer erfolgte dann bei 1 mA/cm² Membranfläche für 1 Stunde.

3.7.1 Immunodetektion transferierter Proteine

Um die transferierten Proteine auf der PVDF-Membran nachzuweisen, gibt es verschiedene Methoden: a) Anfärbung mit einem Farbstoff (Coomassie, Amidoschwarz oder Indian Ink) oder b) Immunologischer-Nachweis. Zur Färbung des geblotteten Markers wurde die Färbung mit Amidoschwarz durchgeführt. Zur Identifikation der gewünschten Proteine wurde eine Immunodetektion durchgeführt. Hierbei benutzt man einen spezifischen Antikörper gegen das Protein. Der so gebildete Antigen-Antikörper-Komplex wird mit einem sekundären, gegen den spezifischen Antikörper gerichteten, Antikörper nachgewiesen. Der zweite Antikörper ist an ein Enzym (Meerretich-Peroxidase) gekoppelt und der Komplex kann als Farbreaktion oder durch Chemilumineszenz nachgewiesen werden. In beiden Fällen werden vorher die freien Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt, um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern (HARLOW und LANE 1988). Zur Kontrolle wurden die Blots nach der Detektion in India Ink gefärbt und mit *Aqua bidest.* entfärbt.

Amidoschwarz-Färbelösung:

Amidoschwarz 0,1 %
Methanol 40 ml
Essigsäure 10 ml
ad 100 ml *Aqua bidest.*

Amidoschwarz-Entfärber:

Methanol 80 ml
Essigsäure 5 ml
ad 100 ml *Aqua bidest.*

3.7.2 Absättigung freier Bindungsstellen

Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Membran nach dem Transfer in einer 3 %igen Blockierungslösung in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBST) mit 0,1 % Tween-20, die aus dem *BM Chemiluminszenz Blotting Substrat* (BOEHRINGER, Mannheim) hergestellt wurde, über Nacht inkubiert.

TBST:

NaCl 150 mM
Tris/HCl pH 8,8 100 mM
Tween-20 0,1 %
in *Aqua bidest.*

3.7.3 Immunodetektion

Nach der Blockierung der freien Bindungsstellen erfolgte ein Waschschritt von dreimal 10 Minuten in TBST. Der Blot wurde mit dem Primär-Antikörper (verdünnt in TBST mit 0,3 %iger Blockierungslösung) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (POD-gekoppelt), ebenfalls in TBST mit 0,3 %iger Blockierungslösung verdünnt.

Nach Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde der Blot erneut gewaschen und anschließend das Substrat aus dem *BM Chemilumineszenz Blotting Substrat Kit* (BOEHRINGER, Mannheim) auf den Blot pipettiert. Der Blot wurde 2 Minuten geschwenkt, das überschüssige Substrat abgestrichen und der Blot in eine Plastikfolie eingeschweißt. Dann wurde der Blot in eine lichtundurchlässige Kammer gelegt und ein geeigneter Film (*Fuji RX New*, BECHTHOLD, Kelkheim) aufgelegt und entwickelt.

3.7.4 Färbung mit India Ink

Die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine wurden nach der Immunodetektion und dem Nachweis mittels Chemilumineszenz zur Kontrolle mit India Ink gefärbt. Die Detektionsgrenze der India Ink-Färbung liegt bei 5 ng (LEK *et al.* 1995). Dazu wurden die Blots erst 10 Minuten in TBS gewaschen und anschließend mindestens 2 Stunden bis zur zufriedenstellenden Färbung in India Ink-Lösung inkubiert. Die Entfärbung erfolgte mit *Aqua bidest.*

India Ink-Färbelösung:

Pelikan Fount India 17	2 µl/ml
Methanol	40 %
Essigsäure	10 %

in *Aqua bidest.*

3.8 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie erlaubt den indirekten Nachweis eines jeweils eingesetzten monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers mittels eines Farbstoffgekoppelten anti-Spezies Antikörpers, z.B. *anti-rabbit-FITC* (VANDESANDE 1983).

Kleine *Geodia cydonium*-Stückchen wurden für 1 Stunde in 6 %ige HF-Lösung eingelegt und in Seewasser gespült. Nach 3 Stunden in 2 % Paraformaldehyd/1 % NaBH_4 wurden die *Geodia cydonium*-Würfel in Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und verblieben ca. 12 Stunden in PBS mit 6,8 % Saccharose. Anschließend wurden die Proben 1 Stunde in Aceton entwässert und mit 100 ml Technovit 100/ 0,6 g Härter (HAEREUS-KULZER, Wehrheim) ca. 12 Stunden geschwenkt. Im letzten Härtungsschritt wurden die Proben 5 Minuten in 15 ml Infiltrationslösung (+ 0,5 g Härter II) bewegt, bis zum folgenden Tag auf Eis gehärtet und per Mikrotom 0,2 μm dünne Schnittpräparate hergestellt.

Die Objektträger mit den *Geodia*-Schnitten wurden durch Eintauchen in 1 %ige 3-Aminopropyltriethoxy-Silanlösung (in Aceton) und anschließendes Waschen mit Aceton und *Aqua bidest.* beschichtet. Anschließend wurden sie 30 Minuten in PBS gelegt und danach mit primärer Antikörperlösung bedeckt. Einer 4stündigen Inkubation folgte ein ca. 12 stündiger Waschschrift in PBS (4 °C). Anschließend wurde für weitere 4 Stunden 1:100 (in 0,5 % BSA) verdünnter Sekundärantikörper (*anti-Rabbit-FITC*, DIANOVA, Hamburg) aufgetragen. Ein nochmaliger Waschschrift mit PBS (3 Stunden bei Raumtemperatur) entfernte überschüssige Antikörper. Schließlich wurden die Objektträger zur Kernfärbung 10 Minuten in DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol, SIGMA, Deisenhofen) eingelegt, wiederum in PBS gewaschen und mit *Anti-Fading* (MOLECULAR PROBES, Leiden, Niederlande) eingedeckelt.

PBS:

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

KH_2PO_4 1,8 mM

Na_2HPO_4 9,6 mM

3.9 Messung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration

Grundlage der Bestimmung intrazellulärer Calciumionen-Konzentrationen ist die Fähigkeit mancher polyzyklischer Chelatbildner, ihre Fluoreszenzeigenschaften nach Bindung von freien Ca^{2+} zu ändern.

Für die Bestimmung des intrazellulären Calciumgehaltes diente Fura-2 als Fluoreszenzindikator. Da die Aufnahme des negativ geladenen calciumsensitiven Indikators in die Zelle, z.B. mittels Mikroinjektion, nur mit Hilfe spezieller Vorrichtungen möglich und außerdem zellschädigend ist, wurde er in Form des Acetoxymethylesters (AM) eingesetzt. Die fünf Carboxylgruppen von Fura-2 werden durch die Acetoxymethylgruppen maskiert und die ungeladene, hydrophobe Acetoxymethylesterform kann die Zellmembran passieren. Durch intrazelluläre Esterasen werden die Estergruppen abgespalten, wobei im Folgenden die calciumsensitive Polycarboxylatform des Fura-2-Moleküls entsteht. Diese Polycarboxylatform wird wegen ihrer negativ geladenen Gruppen durch die Zellmembran zurückgehalten (KAO *et al.* 1994). Die nun in höheren Konzentrationen in der Zelle akkumulierten calciumsensitiven Formen des Fura-2 binden die Ca^{2+} -Ionen über die indikatoreigenen Carboxylgruppen komplex.

Fura-2 gehört zu den radiometrischen Indikatoren, da die Peaks der Spektren von Ca^{2+} -freien (380 nm) und Ca^{2+} -bindenden (340 nm) Fura-2 verschoben sind. Dadurch wird der Effekt verschiedener Artefakte minimiert und die Berechnung des Quotienten möglich (KAO *et al.* 1994). Die Schwammzellen wurden mit einem „inverted-stage“ Olympus IX70 Mikroskop mit einem apochromatisch reflektiertem Lichtfluoreszenz-Objektiv (UApo/340) betrachtet.

Die Anregung erfolgte mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm (ND25 Filter) durch eine Quecksilberquelle (OSP-EXA). Das emittierte Licht der Wellenlänge 510 nm passierte eine bildintensivierende CCD-Kamera (C2400-87, HAMAMATSU, Herrsching). Die Bilder wurden als 256 x 256 Pixel mit 8-bit „arrays“ durch ein computergesteuertes Bildbearbeitungsprogramm (Hamamatsu, Argus 50) digitalisiert. Das Verhältnis aufeinanderfolgender 340/380 nm „Anregungsbilderpaaren“ wurde mit einer Standardkurve für freies Ca^{2+} verglichen (GRYNKIEWICZ *et al.* 1985).

Kalibrierungen wurden mit dem „Fura-2 Calcium Imaging Calibration Kit“ nach den Anweisungen des Herstellers (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) durchgeführt.

3.9.1 Beschichtung der Kulturgefäße mit Poly-L-Lysin

Um die Haftung von Zellen auf dem Boden von Kulturschalen zu ermöglichen, ist es notwendig, die Kulturgefäße mit geeigneten Substanzen zu beschichten. Die Inkubation der in Einzelkammern unterteilten Kulturgefäße (Lab-Tek®) mit 100 µg/ml Poly-L-Lysin (MW<300000) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) erfolgte für ca. 12 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurden die zweimal mit CMFSW (Ca²⁺- und Mg²⁺-freies Seewasser) gewaschen.

3.9.2 Isolierung von Schwammzellen

Ein etwa 1 cm³ großes Stück *Geodia cydonium* wurde mit einem Skalpell klein geschnitten und zur Unterstützung der Zelldissoziation 1 Stunde bei Raumtemperatur in 40 ml CMFSW + 2,5 mM EDTA auf einer Rollapparatur inkubiert. Danach erfolgte die weitere Homogenisierung durch Auf- und Abpipettieren. Nach Filtration durch eine Nylon-Filtergaze (Maschenweite 0,5 µm) wurde die Einzelzellsuspension bei 600 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet zweimal mit je 30 ml CMFSW gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 2 ml CMFSW aufgenommen.

3.9.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Schwammzellzahl wurde in einer Zählkammer nach Neubauer vorgenommen. Die in CMFSW resuspendierten Zellen wurden nach Bestimmung der Zellzahl in einer Dichte von $3,3 \times 10^5$ Zellen pro cm² in den mit Poly-L- vorbereiteten Kulturkammern ausgesät, mit CMFSW überschichtet und ca. 12 Stunden bei 17 °C kultiviert.

3.9.4 Beladung der Zellen mit Fura-2/AM

Nach Entfernung des CMFSW-Überstandes wurden die Zellen mit 12 µM Fura-2/AM + 1 % BSA beladen und für 2 Stunden im Brutschrank bei 17 °C (Fura-2/AM-Aufnahme) inkubiert. Die optimale Fura-2-Konzentration sowie die Beladungsdauer wurden vorher empirisch ermittelt. Nach Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes mußten

alle nachfolgenden Inkubationsschritte im Dunkeln durchgeführt werden. Vor einem weiteren Inkubationsschritt über 1 Stunde bei 17 °C (Fura-2/AM-Aktivierung) im Brutschrank wurden die Einzelkammern mit je 2 ml CMFSW gewaschen.

3.9.5 Messung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration

Nach zweimaligem Waschen der beschichteten Zellkammern mit Locke's-Lösung für Schwämme wurde die Schwammzellsuspension in 900 µl Locke's-Lösung inkubiert. Die Basislinie wurde über 5 Minuten aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Probelösung. Im ersten Versuch war dies 10 µl Calciumchlorid/ ml Inkubationslösung (Endkonzentration 10 mM). Nach weiteren 5 Minuten erfolgte dann die Zugabe von 5 µl anti-TKlg-Antikörper. Im zweiten Versuch wurden die Inkubationslösungen in der umgekehrten Reihenfolge zugegeben. Die Änderung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration wurde jeweils über 20 Minuten verfolgt. Der anti-TKlg-Antikörper wurde vor Gebrauch 24 Stunden gegen PBS – mit dreimaligen Pufferwechsel – bei 4°C dialysiert.

CMFSW mit EDTA:

NaCl	460 mM
Na ₂ SO ₄	7 mM
KCl	10 mM
Hepes	10 mM
Penicillin	4 ml/l
Streptomycin	4 ml/l
EDTA	2,5 mM
pH	8,5

Locke's-Lösung:

NaCl	500 mM
KCl	5,6 mM
NaHCO ₃	3,6 mM
Glucose	5,6 mM
Hepes	10 mM
pH	8,0

Fura-2/AM 2 mM in DMSO

IV ERGEBNISSE

1 Herstellung des Expressionskonstruktes

Um polyklonale Antikörper gegen die Immunglobulin-Domäne herstellen zu können, wurde ein rekombinantes Proteinfragment aus der Rezeptortyrosinkinase (RTK), welches aus diesen Domänen besteht, durch das pQE-Expressionssystem hergestellt.

Für die Expression wurde mit den zwei spezifischen Primern *GClg.F* und *GClg.R* mittels PCR ein DNA-Fragment (715 bp) aus der cDNA-Bank von *Geodia cydonium* (siehe III.B.1.3), das die beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen der RTK einschließt, amplifiziert. Die verwendeten Primer besaßen Restriktionsadapter (*HindIII* bzw. *BamHI*) und erlaubten deshalb die effiziente Ligation in den ebenfalls mit *HindIII* und *BamHI* geschnittenen Expressionsvektor pQE32. Zur Kontrolle wurde das Plasmid mit den pQE-spezifischen Vektorprimern (*pQE.F/pQE.R*) sequenziert. Das korrekt amplifizierte und in pQE32 ligierte Fragment konnte durch *E.coli* zur Expression gebracht werden. Über den N-terminalen Histidin-Tag wurde das Proteinfragment anschließend affinitätschromatographisch gereinigt.

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der affinitätschromatographischen, denaturierenden Reinigung des ca. 30 kDa großen TKIg-Proteinfragment (einschließlich His-Tag) als SDS-Gel.

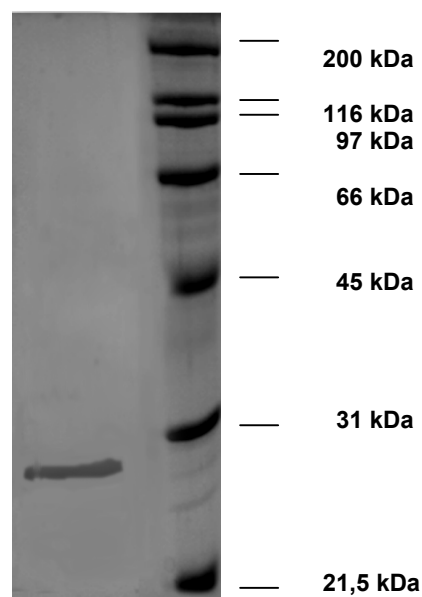


Abbildung 5: 12% SDS-Gel. Aufreinigung des in *E. coli* exprimierten TKIg-Proteinfragmentes. Rechts ist der Proteinstandard, links das gereinigte Proteinfragment aufgetragen.

2 Charakterisierung des anti-TKIg-Antikörper

Der in unserem Institut hergestellte polyklonale Antikörper gegen das rekombinante TKIg-Fragment wurde durch Western Blot-Versuche auf seine Spezifität getestet. Auf das SDS-Gel wurde ein Proteintotalextrakt von *Geodia cydonium* (siehe III. B.3.3) direkt nach 5 minütigem Erhitzen bei 95 °C aufgetragen. In Abbildung 6 ist zu erkennen, daß der Antikörper besonders stark mit Proteinen zwischen 120 kDa und 100 kDa reagiert. In diesem Bereich liegt das theoretische Molekulargewicht der RTK (116 kDa), gegen dessen Immunglobulin-ähnlichen Domänen der Antikörper gerichtet ist. Zusätzlich wird noch ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa erkannt.

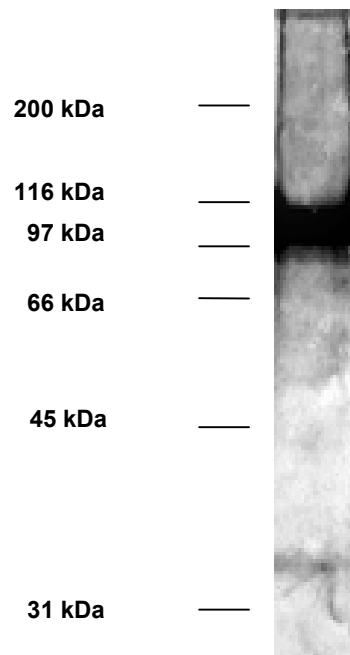


Abbildung 6: Western Blot mit anti-TKIg-Antikörper auf Totalextrakt von *Geodia cydonium*. Die entsprechenden Größen der Proteine aus dem Standard sind links aufgetragen.

3 Screening nach Molekülen mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen

Nach Herstellung des rekombinanten TKIg-Proteinfragmentes und polyklonaler Antikörper gegen dieses Fusionsprotein, wurde im Folgenden auf der cDNA-Ebene nach Molekülen gesucht, die Immunglobulin-ähnliche Domänen besitzen. Hierzu wurde aus dem Plasmid (*GCIg/pQE*) eine Dig-markierte Sonde amplifiziert (siehe III.B.1.15.1). Die beiden dazu benutzten Primer *GCTK2.F* und *GCTK2.R* liegen N-terminal bzw. C-terminal der Immunglobulin-ähnlichen Domänen und schließen ein 715 bp großes Fragment ein.

PCR Ansatz:

<i>Aqua bidest.</i>	34,75 µl	PCR-Bedingungen:
10 x Puffer	5 µl	95°C 1 Minute
PCR Oligomix	2,5 µl	35 Zyklen:
dNTPs	2,5 µl	95°C 30 Sekunden
GCTK2.F	2 µl	56°C 30 Sekunden
GCTK2.R	2 µl	72°C 4 Minuten
GCIg5/pQE	0,5 µl	
Expand Polymerase	0,8 µl	72°C 20 Minuten

Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit 50 µl *A.bidest* eluiert und auf einem Agarosegel überprüft. Mit dieser Sonde wurde ein niedrig stringentes Homologiescreening der *Geodia cydonium* cDNA-Bank durchgeführt. Die nach drei Screeningrunden positiven Klone wurden durch *in vivo Excission* (siehe III.B.1.15.10) aus dem Phagenvektor isoliert und mit den pBK-CMV spezifischen Sequenzierprimern *T3* und *T7* ansequenziert.

Von diesen positiven Klonen hatten nach Computeranalyse vierzehn Klone Immunglobulin-ähnliche Domänen. Nach weiteren Analysen stellten sich sieben Klone als identisch untereinander und mit der Rezeptortyrosinkinase von *Geodia cydonium* heraus. Weitere sechs Klone bildeten eine Gruppe mit der gleichen Sequenz und zwei positive Klone bildeten eine zweite Gruppe – beiden Gruppen

waren im 5'-Bereich deutlich kürzer als die RTK cDNA. Diese acht Klone der beiden neuen Gruppen wurden in pGEM®-T subkloniert und vollständig durchsequenziert.

4 Sequenzen der isolierten cDNAs aus *Geodia cydonium*

Durch das Homologiescreening wurden zwei neue cDNA-Klone isoliert. Wie auch die *RTK*-cDNA codieren beide für zwei extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen. Sie codieren aber nicht, im Gegensatz zur *RTK*, für eine intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden GCSAM, für *Geodia cydonium* Schwamm-Adhäsionsmolekül (*sponge adhesion molecule*), genannt.

GCSAML: Die cDNA, die für die längere Form der GCSAM codiert, *GCSAML*, ist 1974 bp lang und hat einen offenen Leserahmen von Nukleotid 1 bis zum Stopcodon TGA (Nukleotide 1808-1810). Das mögliche Startcodon für Methionin ist an Position 83-85 und weicht mit einem Guanin an Position -3 und einem Threonin an Position +4 von der bei eukaryotischen mRNAs charakteristischen Kozak-Sequenz (KOZAK 1991; -3:A,+4:G) ab. Ein trunkiertes Polyadenylierungssignal AATAA (ZARKOWER *et al.* 1986) ist vorhanden (Nukleotide 1887-1891).

Die abgeleitete Aminosäuresequenz *GCSAML* besteht, ausgehend vom Start-Methionin, aus 576 Aminosäuren. Das theoretische Molekulargewicht von *GCSAML* beträgt 64,3 kDa und der isoelektrische Punkt liegt bei 4,60. Außerdem besitzt *GCSAML* acht N-Glykosylierungsstellen.

Folgende Signaturen befinden sich in der abgeleiteten Aminosäuresequenz:

- 1) ein mögliches Signalpeptid: Hydrophobe Aminosäuren AS 6-9
- 2) eine Prolin/Serin/Threonin-reiche Region: AS 211-239
- 3) zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen: AS 240-344 und AS 345-456
- 4) eine Transmembranregion: AS 457-487
- 5) ein *ITIM* (*immunoreceptor tyrosin based inhibitory motif*)-Motiv: AS 533-538

Sequenz des langen SAM, GCSAML:

```

1                                     M F T G A I V L V G F L T
1 CAAGGAGCTGGAGTGCCTCGCAGCCTGCACGCCGTGCACGTACGTGATTCCTGGGACGACGACGCGGAAATGTTACTGGGGCCATAGTCTTGTGGGCTTCTTACA

14  V H L S S O Q D C Q R V S S A F R E D S S T T S P T T Y N G I E P N F P P C T V
121 GTACATCTTAGTTCACAGCAGGATGTGACAGAGTTTCTTCAGCTTTTCGAGAAGATTCATCAACAACATCTCCAACAACATACAATGGATTAGGCCAAACTTCCACCCTGTACTGG

54  N P A R T L F E C G A G E G V L S D G D I G P T D S V D V S D P D Q V T R F F V
241 AACCTGCTAGAACCTTATTTGAGTGTGGAGCAGGAGGAGTGTGAGTGTGGAGACATTTGGACCTACAGACTCAGTGGATGTCAATGATCCAGACCAGGTCCACAGTCTTTGTG

94  W H R D N G S V G L F F S A S D V S R V S Y I D V Y F L S L P S A K I G P P E T
361 TGGCATCGAGACAATGGCTCTGTGGGACTCTCTCTCTCCAGTGTGCTCCAGAGTCTCCTACATTTGATGTATATCTTGTAGTCTTCTCTGCCCCAAATAGGACCACCTGAGACT

134 T V I T T D I N P R V E A T V T P E N C P S F T S T S N T L T R N M F T I S P N
481 ACTGTATTACTACTGATATCAATCCAAGAGTTGAGGCTACTGTCACCCCTGAGAACTGTTCTTCACTTCCACTAGTAATACACTGACCAGGAACATGTTTACAATACACTATCTCT

174 D N L I I T F N F N Q S T T D W M F I S E I L L C E G D P P S S I S C D S P T T
601 GATATTTGATCATCACATTCATTTCAATTCAGAGCACTACAGACTGGATGTTTATCAGTGAGATACTACTGTGTGAAGGAGATCTCCATCTCCATCTCTGTGACTCTCTCACT

*****P/S/T-reiche Region*****
214 D P T T P T T T P P P S P T P P S L T L S S P P P T G L P V S P D L S Q P H S V
721 GACCCACAACCAACCAACCCCTCTCCCTCTCCACCCCTCCCTCTCACTCTCTCTCCCTCCCCACCCACTGGACTACCAGTGGAGCCCTGACCTGAGCAGGACCACTCTGTG

..... Immunglobulin-ähnliche Domäne 1.....
254 T L T C S A A S P P A R G Y Q Y Q W Q W R R R N G T L L S N T H T R F S I T P S T
841 ACTCTCACTGTCTGCCCGCAGCTCTCTGCCCGTGGCTACCAATACAGTGGCAGTGGAGGAAATGGGACACTACTGAGCAACACACACTAGATTCCTATCACACCTCCAGC

294 N T Q S S S L V I S G L R Y S D A G D Y M C T V E Y G V C P D G V D C S G T T P

961 AACACTCAGTCCAGTAGTCTAGTCATATCTGGTCTCAGATATTCTGATGACAGGAGACTACATGTGTACAGTGGAGTATGGAGTATGCTCTGATGGAGTGGACTGCAGTGGAACTCCA

334 V T G N I H L D L P L I V E V D S S G L V A R E G S E V V V L T C E V Y G Y P R
1081 GTCACTGGAAACATACATCTTGACTCCCATTTGATAGTGGAGTGGATTCTCTGGGCTGGTGGCGAGAGGAAAGTGGTGGTTGTTCTGACATGTGAGGTGTATGGCTACTCTCGA

.....Immunglobulin-ähnliche Domäne 2.....
374 D S S P P M W S S P G R N L E S G R F N V I T F R Y T G T L S N G S V S S S D K
1201 GACTCTCCCTCCATGTGGAGCTCTCTGGGAGAACTGGAGTCTGGCAGATTCACATTACTCCAGATACACTGGCAGACTGAGCAATGGCAGTGTGTCTCTCTGACAGGTTG

.....Transmembranregion.....
414 A L S Q L T I F N V T V A D E G E Y T C S V A G E S A S F R V D I G G S N S S G
1321 GCCTGTCTCACTACCATATTCACGTCCTGTGGCTGATGAAGGAGATACACATGTTCACTGGCTGGGGAATGCTTCTTCCGTTGATAGTGGCTCCAACCTCAAGTGGC

->*****Transmembranregion*****<-
454 S N S R V I A G V L I T L L S L I V L I I I L I V I F W V V W R Y R T R G K L D
1441 AGTAACACAGAGTGTGCTGGAGTCTGATACTCTTTATCACTCATAGTCCCTCATATAATTCTCATAGTATCTTCTGGTGGTGGGCGCTACCCGACAAAGGGAAGTGGAC

494 M G C C R E L S C G S C S C V P L L T A L K G K R G T K S H G E G P G N Q T E V
1561 ATGGGGTGTGACAGGAGCTCTCTGTGGCTCATGTTTATGTTGCTCTCTTACTGCTCTGAAAGGCAAGAGGAAACAAAGAGCCATGGAGAGGTCTCTGGGAACAGACTGAGGTG

ITIM
534 V Y E E V D G G Q P L T S T Q D V I S L K R N E A Y G K I G T Q S T T S G P N T
1681 GTCTATGAGGAGTGGTGGTGGTCAAGCACTCACTAGTACACAAGATGTGATCTCTCTGAAAGGAAATGAGGCTTACGGGAAGATTGGCACCCAGAGTACTACTCTGACCCCAACACT

574 A L
1801 GCACCTTGTACTGCAGCTTTACTTAAACACACCATGTGAAGTACAGACCACTTTTGAAGTGGAGACTCAATTTGTTGTTTGTAAATAAGAATTCAAATAGCCATCTTTGTTATTG
1981 CCATGATAGTGTGTTGTGTACACAAAGAAATGGTTCATAGTTGCCAGCTAAA
    
```

Abbildung 7: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von GCSAML. Die Signaturen sind oberhalb der Aminosäuresequenz eingezeichnet. Die konservierten Aminosäuren der Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen sind blau (Ig-ähnl. Domäne 1) bzw. grün (Ig-ähnl. Domäne 2) dargestellt.

GCSAMS: Die cDNA der kurzen Form von GCSAM, GCSAMS, ist 1365 bp lang. Der durchgehende Leserahmen beginnt an den Nukleotidpositionen 77-79. Es kann kein mögliches Start-Methionin abgeleitet werden. Das Stopcodon TGA ist an den Nukleotiden 1017-1019 vorhanden. In dieser Sequenz befindet sich die typische Polyadenylierungssignalstelle AATAAA an den Nukleotidpositionen 1265-1270. Die abgeleitete Aminosäuresequenz umfaßt 313 Aminosäuren (Abbildung 8) und hat ein theoretisches Molekulargewicht von 33,9 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 7,78. GCSAMS besitzt weiterhin sechs N-Glykosylierungsstellen.

GCSAMS hat zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen-Signaturen: AS 3-107 und 108-221. Die Transmembranregion erstreckt sich über die Aminosäuren 222-249.

Sequenz des kurzen SAM, GCSAMS:

```

1          T P T G L P V S P D L S Q P
1 ACAGACACAGTTGTAGGGAATAATGCAGAGAAGATGAGGGAGATTATGGATTGGTATGTGGAGGCACCTTGATAAACACCCACTGGACTACCAGTGAGCCCTGACCTGAGCCAGCCA
.....
14 H S V T L T C S A A S P P A R G Y Q Y Q W Q W R R N G T L L S N T H T R F S I T
121 CACTCTGTCACTCTCACTTGGCTCTGCCGCCAGTCCCTCTGCCCGTGGCTACCAATACCAAGTGGCAGTGGAGGGAATGGGACACTACTGAGCAACACACACTAGATTCTCTATCACA
.....
54 P S T N T H S S S L V I S G L R Y S D A G D Y M C T V E Y G A C P D G V D C N G
241 CCCTCCACCAACTCATTCCAGTAGTCTAGTCATATCTGGTCTCAGGTATTTCTGATGCAGGAGACTACATGTGTACAGTGGAGTATGGAGCATGTCTGTGGAGTGGACTGCAATGGA
.....
94 T T P V T G T I H L E L P L I V E V D S S G L V V R E G S E V I V L T C E V Y G
361 ACCACTCCAGTCACTGGAAACCATACATCTTGAAGTCCATTGATAGTGGAGGTGGACTCCTCTGGGCTGGTGGTGAGAGAGGAAGTGAAGTGAATGTTCTGACATGTGAGGTGTACGGC
.....
134 Y P R D S S P P M W S S P G R N L E S G R F N I T P R Y T G T L S N G S V S S S
481 TATCCTCGAGACTCCTCCCTCCCATGTGGAGCTCTCTGGGAGAACTGGAGTCTGGTAGATTCAACATTACTCCAGATACACTGGCACACTGAGCAATGGCAGTGTCTCTCTCT
.....
174 D K V A L S Q L T I F N V T V A D E G E Y T C S V D G E S A S F R V D L G D S N
601 GATAAAGTGGCCCTCTCTCAACTCACCATATTCAACGTCACTGTGGCTGATGAAGGAGTACACATGTTCAAGTGGATGGGGAATCTGCTTCTCCGTGTGATCTAGGTGACTCCAAC
.....
214 S S G S N S G V I A G V L I T L L L L I A L I I I L I F V F W V V W R Y R R R G
721 TCAAGTGGCAGTAAACCGGAGTGTGTGGAGTTTAAATAACTCTTCTATTACTATAGCCCTCATCATAATTCTCATATTCTGCTTCTGGTGGTGTGGCCCTACCCGAGAAGAGGG
.....
254 K F D L G S C R E L S C G S C S C V P L L A A L K G V K L P T R H R E N L N K N
841 AAGTTTGACTTGGGCTTGCAGGGAGCTCCTGTGGCTCATGTTTATGTGTGCTCCTCTCTGCTGCAGTAAAGGTGTCAAACCTCCCAAACAAGACACCGAGAAAACCTGAACAAGAAC
.....
294 G T R L R L N E R N F C Q T H V R R G
961 GAAACAAGACTGAGACTGAACGAGAGGAATTTCTGCAGACACATGTACGAAGAGTTGACATCAAGCGGAGCCCGAGACCAAGAACATCAGACTATGAAGAAATACAGCTGTCT
1081 TAACTACATGGACATTAATAACTTGAATTTAGCAGCAGACTCCAGGGCCGAAGGCTAGGGCGAAAGTGTACTCTTTGAAAGTTGAGATGGATTGGAAACATAAAGTTTCTATGCTTA
1201 GCAATAGAAATTAATGTAATTAATTTATCATTTCTTTGTTTATCACTCTGTGTTTTGTAACCAAAATAAATTTGGACTATTTTGTATTGCGTTTTGTTCATCGTCTGTCTGCTGCCAC
1321 GGTACTATAAATATTTGGGATGAGATATGTTGTTAATTTGGTAAA

```

Abbildung 8: cDNA-Sequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz von GCSAMS. Die Signaturen sind oberhalb der Aminosäuresequenz eingezeichnet. Konservierte Aminosäuren der Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen sind blau (Ig-ähnli. Domäne 1) bzw. grün (Ig-ähnli. Domäne 2) dargestellt.

5 Northern Blot-Analysen

Um die Gesamtlänge der mRNAs beider GCSAMs zu bestimmen, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt (III.B.2.4). Für GCSAML wurde mit den beiden Primern *ITIM.F* und *JM.R1* eine 370 bp lange spezifische Dig-markierte Sonde hergestellt, die im für die intrazelluläre Region codierenden Bereich der cDNA liegt. Für GCSAMS wurde ebenfalls eine spezifische Sonde (371bp) im intrazellulären Bereich mittels der Primer *SAMS.F* und *JM.R2* hergestellt. Auf dem RNA-Gel des Northern Blots wurde je 5 µg Total-RNA aufgetrennt.

Mit der spezifischen Sonde für *GCSAML* ergab sich eine 2,1 kB große Bande und mit der für *GCSAMS* spezifischen Sonde eine 1,4 kB große Bande (Abbildung 9). Die so ermittelten mRNA-Längen der beiden *GCSAMs* stimmten jeweils mit der cDNA-Länge aus der Sequenzanalyse überein. Die cDNA-Sequenzen sind also vollständig.

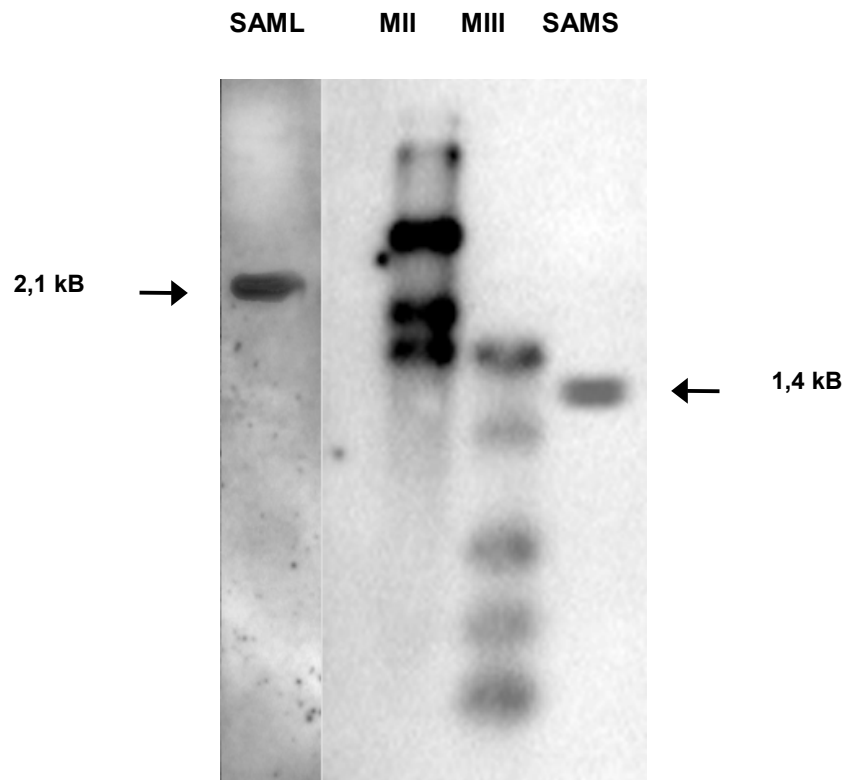


Abbildung 9: Northern Blot-Analyse mit SAML- und SAMS-Sonde. MII = Dig-markierter RNA Marker II (Banden von oben nach unten 5,3 kB, 2,8 kB, 1,9 kB, 1,6 kB). MIII = Dig-markierter RNA Marker III (Banden von oben nach unten 1,6 kB, 1,0 kB, 0,6 kB, 0,4 kB, 0,3 kB).

6 Phylogenetische Analyse der Sequenzen

6.1 Vergleich der *SAM*-Sequenzen mit der *RTK*-Sequenz

Beide *SAM*-Sequenzen wurden durch ein Homologiescreening mit einer aus der *RTK*-Sequenz entstandenen Immunglobulin-ähnlichen Sonde gefunden. Deshalb erfolgte ein Vergleich der beiden *SAM*-Sequenzen mit der cDNA-Sequenz der *RTK* (*GCRTKc*).

Auf Nukleotidebene wurden 13 Substitutionen zwischen *GCSAML* und *GCRTKc* (zwei Substitutionen für *GCSAMS- GCRTKc*) innerhalb der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 1 aufgezeichnet (Abbildung 10). Diese Substitutionen führten zu 6 Aminosäureaustauschen (2 Austauschen). Innerhalb der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 2 sind 12 Nukleotidsubstitutionen zwischen *GCSAML* und *GCRTKc* (4 *GCSAMS- GCRTKc*) vorhanden, die in 6 (2) Aminosäureaustauschen resultieren (Abbildung 11).

A. Immunglobulin-ähnliche Domäne 1

```
GCSAML_IG1 : CCACACTCTGTCACTCTCACTTGTCTGCGCCAGTCCTCCTGCCCGTGGCTACCAATACCAGTGGCAGT
GCSAMS_IG1 : .....
GCRTKc_IG1 : .....
GCRTKg_IG1 : .....AC.....
```

```
GCSAML_IG1 : GGAGGAGGAATGGGACACTACTGAGCAACACACACTAGATTCTCTATCACACCTTCCACCAACTCA
GCSAMS_IG1 : .....C.....
GCRTKc_IG1 : .....C.....
GCRTKg_IG1 : .....C.....---
```

```
GCSAML_IG1 : GTCCAGTAGTCTAGTCATATCTGGTCTCAGATATTCTGATGCAGGAGACTACATGTGTACAGTG
GCSAMS_IG1 : T.....G.....
GCRTKc_IG1 : T.....G.....
GCRTKg_IG1 : .....
```

B. Immunglobulin-ähnliche Domäne 2

```
GCSAML_IG2 : AGTGAGGTGGTTGTTCTGACATGTGAGGTGTATGGCTATCCTCGAGACTCCTCCCCTCCCATGTGGAGCT
GCSAMS_IG2 : .....A.....C.....
GCRTKc_IG2 : .....A.....C.....
GCRTKg_IG2 : .....A.....
```

```
GCSAML_IG2 : CTCTGGGAGAAACCTGGAGTCTGGCAGATTCAACATTACTCCAGATACACTGGCACACTGAGCAATGG
GCSAMS_IG2 : .....T.....
GCRTKc_IG2 : .....T.....
GCRTKg_IG2 : .....T..C.....GAA.....
```

```
GCSAML_IG2 : CAGTGTGTCCTCCTCTGACAAGGTGGCCTTGTCTCAACTCACCATATTCAACGTCAGTGTGGCTGATGAA
GCSAMS_IG2 : .....T..A.....C..C.....
GCRTKc_IG2 : .....T..A.....C.....A.....
GCRTKg_IG2 : .....A.....C.....T.....C.....
```

```
GCSAML_IG2 : GGAGAGTACACATGTTTCAGTG
GCSAMS_IG2 : .....
GCRTKc_IG2 : .....AG.....
GCRTKg_IG2 : .....
```

Abbildung 10: Vergleich der Nukleotidsequenzen der Immunglobulin-ähnlichen Domänen zwischen den beiden *SAM*-Genen und der cDNA (*GCRTKc*) als auch der genomischen Sequenz der Rezeptortyrosinkinase (*GCRTKg*). A. Bereich der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 1, B. Bereich der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 2.

Es zeigt sich, daß die drei Sequenzen im Bereich der Immunglobulin-ähnlichen Domänen eine hohe Homologie aufweisen. GCSAML hat ungefähr 95 % Identität zur Sequenz der RTK, GCSAMS dagegen 100% in der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 1. In der zweiten Immunglobulin-ähnlichen Domäne weist GCSAML fast 95 % Identität auf, GCSAMS circa 97 %. Im 5'-Bereich zeigen sich Ähnlichkeiten bei GCSAML und GCRTKc. Im 3'-Bereich unterscheiden sich diese beiden Sequenzen aber nach der Transmembran-Region deutlich voneinander. GCSAMS dagegen hat eine sehr hohe Homologie zu GCRTKc, es kommt nur zu wenigen Aminosäureaustauschen, allerdings ist GCSAMS im 5'-Bereich fast 156 Aminosäuren kürzer als GCRTKc.

```

GCSAML : QGTGAASQPARRARTCIQWIFGHDDAEMFTGAIVLVGLFTVHLSSQQDCQRVSSAFREDSSTTSPTTYNGIEPNFPPTCV
GCSAMS : -----
GCRTKc : -----

GCSAML : NPARTLFECEGEGVLSGDGIGPTDSVDVSDPDQVTRFFVWHRDNGSVGLFFSASDVSRVSYLDVYFLSLPSAKIGPPET
GCSAMS : -----
GCRTKc : -----MSVIGQTRSPGSLSGIETMA-----LWDST-----LLPVMSPESPILDVYFLSLPSASIQPPET

GCSAML : FVITTEINIRVEATVTDENCSFTSTSNLTRNMFITSDNPDNLIITFNFNCSITDWMFISEILLCEGDEPFSISICDSPT
GCSAMS : -----
GCRTKc : FVITTEFTFPRVETVILPESCSFSSTSDTLTRNTYTVFENNEGLIITFNFNQDIDWMFISEILLCEGDEPFSISICDSPT

GCSAML : FDETT--PTTTFPSPTPFSITLSSPPFTGLPVSPDLSQPHSVTLTCSAASPPARGYQYQWQWRRNGTLLSNTHTRFSIT
GCSAMS : -----TGLPVSPDLSQPHSVTLTCSAASPPARGYQYQWQWRRNGTLLSNTHTRFSIT
GCRTKc : FDE--QTPTTSESPSPTPEFALSSPFTGLPVSPDLSQPHSVTLTCSAASPPARGYQYQWQWRRNGTLLSNTHTRFSIT

GCSAML : PSTNTQSSSLVISGLRYSDAGDYMCTVEYGVCPDGVDCSGTTPVTGNIHLDLPLIVEVDSSGLVAREGSEVVLTCVYV
GCSAMS : PSTNTQSSSLVISGLRYSDAGDYMCTVEYGAAPDGVDCNGTTPVTGTIHLPLPLIVEVDSSGLVAREGSEVVLTCVYV
GCRTKc : PSTNTQSSSLVISGLRYSDAGDYMCTVEYGAAPDGVDCNGTTPVTGTIHLPLPLIVEVDSSGLVAREGSEVVLTCVYV

GCSAML : YPRDSSPPMWSSPGRNLESGRFNITPRYTGTLSNGSVSSSDKVALSQTIFNVTVADEGEYICSVAGESASFRVDIGESN
GCSAMS : YPRDSSPPMWSSPGRNLESGRFNITPRYTGTLSNGSVSSSDKVALSQTIFNVTVADEGEYICSVAGESASFRVDLGDNS
GCRTKc : YPRDSSPPMWSSPGRNLESGRFNITPRYTGTLSNGSVSSSDKVALSQTIFNITVADEGEYKCSVDGESASFRVDLGESN

GCSAML : SSGSNSRVIAGVLITLLSLIIVLIILIVIFWVWVRYRTRGKLDMGCCRELSCSCSCVPLLALTKGKRGTKSHGEGPGNQ
GCSAMS : SSGSNSRVIAGVLITLLSLIIVLIILIVIFWVWVRYRTRGKLDLGSRELSCSCSCVPLLAALKGKLPTRHRENLNKN
GCRTKc : SSGSNSRVIAGVLITLLSLIIVLIILIVIFWVWVRYRTRGKLDLGSRELSCSCSCVPLLAALKGKLPTRHRENLNKN

GCSAML : TEVYVEEVDGGQPLSTQDVISLKRNEAYGKIGTQSTTSGPNLAL-
GCSAMS : CTRLRLNERNFCQTHVRRG-----
GCRTKc : CTRLRLNERNHIADINTEIYSVQKPLKKISKSPPLPPLTLLETE

```

Abbildung 11: Vergleich der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen von GCSAML, GCSAMS und dem entsprechenden Fragment von GCRTKc (*accession number* X98340 bis Aminosäure 496). Identische Aminosäurereste der drei Sequenzen sind grau unterlegt dargestellt. Aminosäurereste, die in mindestens zwei Sequenzen übereinstimmen sind rot unterlegt.

6.2 Vergleich der SAM-Sequenzen mit Sequenzen aus der Datenbank

Die Sequenzen der Immunglobulin-ähnlichen Domänen 1 und 2 der beiden Formen der *Geodia cydonium*-GCSAM wurden auch mit Sequenzen aus den Datenbanken verglichen (Abbildung 12).

Immunglobulin-ähnliche Domäne 1: Die Immunglobulin-ähnliche Domäne 1 beider Sequenzen zeigt deutliche Homologie zu korrespondierenden Segmenten der RTK des Schwammes (sowohl cDNA als auch dem Gen), Homologie zur variablen Region der humanen Immunglobulin lambda-Kette (WELSCHOF *et al.* 1995), und zur Immunglobulin lambda-Kette der Regenbogenforelle (DAGGFELDT *et al.* 1993). Der Prozentsatz an identischen Aminosäuren zwischen GCSAM und den Schwamm-RTK Sequenzen beträgt ungefähr 98 % und zwischen GCSAM und den anderen Sequenzen ungefähr 36 % .

Immunglobulin-ähnliche Domäne 2: Die Immunglobulin-ähnlichen Domänen 2 von sowohl GCSAML als auch GCSAMS zeigen die höchste Homologie zu den korrespondierenden Abschnitten der beiden Schwamm RTK-Sequenzen. Sie weisen eine Identität von ungefähr 95 % auf. Die nächsthöhere Ähnlichkeit wird mit 39 % zum Zelladhäsionsmolekül NCAM-180 des Wassermolches (*Cynops pyrrhogaster*) gefunden, gefolgt von der variablen Region der schweren Kette humaner Immunglobuline (RIBOLDE *et al.* 1994) mit einer Identität von ca. 32 %, und den Immunglobulin-ähnlichen Domänen in der UNC-89 Sequenz von *Caenorhabditis elegans* mit ungefähr 26 %iger Identität.

A. Immunglobulin-ähnliche Domäne 1

```

GCSAML_IG1 : PHSVTLTCSAASPARGYQY-QWQWRRNGT---LI-----SNTHTRFSITPSTNTQSSSLVLSGLRYSAGDYMCTV
GCSAMS_IG1 : PHSVTLTCSAASPARGYQY-QWQWRRNGT---LI-----SNTHTRFSITPSTNTHSSSLVLSGLRYSAGDYMCTV
GCRTKc_IG1 : PHSVTLTCSAASPARGYQY-QWQWRRNGT---LI-----SNTHTRFSITPSTNTHSSSLVLSGLRYSAGDYMCTV
GCRTKg_IG1 : PHSVTLTCSAASPARGYQY-QWQWRRNGT---LI-----SNT-TRFSITPSTNTQSSSLVLSGLRYSAGDYMCTV
Ig_lambda  : --TVTISCTRSGNVAAY-NVQWYQQRPGSAPITLIYEDDHRPAGVDPDRFSGSIDSSNSASLTLISGLRAEADADYYC--
Ig_trout    : --TVSLNCKTSSDVHSGY-VLAWYQQKPGGAPQLIYRATTLQSGTSPSRFSGS--GSGSDFTLTLISGVKVEADADYYC--

```

B. Immunoglobulin-ähnliche Domäne 2

```

GCSAML_IG2 : SEVVVLTCEVYGYPRDSSPPMW--SSPGRNLE-----SGRFNITPRYTGTLSNGSVSSSDKVALSQLT
GCSAMS_IG2 : SEVIVLTCEVYGYPRDSSPPMW--SSPGRNLE-----SGRFNITPRYTGTLSNGSVSSSDKVALSQLT
GCRTKc_IG2 : SEVIVLTCEVYGYPRDSSPPMW--SSPGRNLE-----SGRFNITPRYTGTLSNGSVSSSDKVALSQLT
GCRTKg_IG2 : SEVIVLTCEVYGYPRDSSPPMW--SSPGRNLE-----SGRFITTPRYTNTLSNGSVSSSEKVALSQLT
Ig_heavy   : SETLSLTCAVYGGFSDNDWSIRQPPGKRLWIGEINHSGSTNYNEGLKSRVSI SAYTSKNQFS---LR
NCAM_newt  : -AAAVLACDADGFDPPEIS--W--TKDGEMIE-----DDSDKYKFTEDG-----SEMT
UNC89_CE   : SEKVVLECKVIE--PKPKVSR--LHDNVSRE-----KNENSEKTIITQESITVESVEGVERVT

```

```

GCSAML_IG2 : IFNVTVADEGEVTCV
GCSAMS_IG2 : IFNVTVADEGEVTCV
GCRTKc_IG2 : IFNITVADEGEVTCV
GCRTKg_IG2 : IFNVTVADEGEVTCV
Ig_heavy   : LSSVTAADTAVVFC-
NCAM_newt  : IFNIDKSDGCDVTC--
UNC89_CE   : ITSSELHQCKVTC--

```

Abbildung 12: Vergleich der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen GCSAML und GCSAMS mit Sequenzen aus der Datenbank. A. Bereich der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 1. B. Bereich der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 2.

Für den Vergleich herangezogene Sequenzen: GCRTKc = cDNA Sequenz RTK *Geodia cydonium* (X98340, Aminosäuren 1-496, PANCER *et al.* 1996), GCRTKg = genomische Sequenz von GCRTK (X94128, bis Aminosäure 505 GAMULIN *et al.* 1997), Ig_lambda = variable Region der humanen Immunglobulin lambda Kette (CAA85627, Aminosäuren 17-91, WELSCHOF *et al.* 1995), Ig_Forelle = Immunglobulin lambda Kette der Regenbogenforelle (S29575, Aminosäuren 29-101, DAGGFELDT *et al.* 1993), Ig_heavy h = variable Region der humanen Immunglobulin schweren Kette (3603467, Aminosäuren 15-96, RIBOLDI *et al.* 1994), NCAM_Molch = Zelladhäsionsmolekül NCAM 180 des japanischen Wassermolches, *Cynops pyrrhogaster* (BAA24032, Aminosäuren 228-284, MIZUNO *et al.* 1997), UNC_89 = UNC 89 Segment von *C.elegans* (2088675, Aminosäuren 3008-3075, BENIAN *et al.* 1996).

Die Farbmarkierungen zeigen den Grad der Übereinstimmung an. (Ig1: Rot 100 %, Hellgrau 70 % und Dunkelgrau 80 %; Ig2: Rot 100 %, Dunkelgrau 60% und Hellgrau 50 %).

7 Aufklärung der Exon/Intron-Struktur zwischen den Immunglobulin-ähnlichen Domänen

Da bekannt war, daß sich zwischen den beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen der *RTK* ein Intron befindet, wurden auch die beiden *GCSAMs* daraufhin untersucht.

Anhand der cDNA-Sequenzen von *GCSAML* und *GCSAMS* wurde ein Primer (*IgP1.F*) in der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 1 und je ein spezifischer Primer am 5'-Ende der cDNA-Sequenz konstruiert (*JM.R1* für *GCSAML* bzw. *JM.R2* für *GCSAMS*). Die PCR-Reaktion mit der genomischen Bank als Ausgangsprodukt und den Primern für *GCSAML* ergab ein PCR-Produkt mit einer Länge von 1220 Nukleotiden. Nach Sequenzierung des Produktes konnte man feststellen, daß *GCSAML* ein Intron mit einer Länge von 190 Nukleotiden zwischen den beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen aufweist (Abbildung 13).

Die entsprechende PCR-Reaktion mit den Primern für *GCSAMS* ergab ein Produkt mit einer Länge von 1028 Nukleotiden, was genau der Länge der cDNA zwischen den beiden Primern entspricht. Bei *GCSAMS* existiert also kein Intron zwischen den beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen.

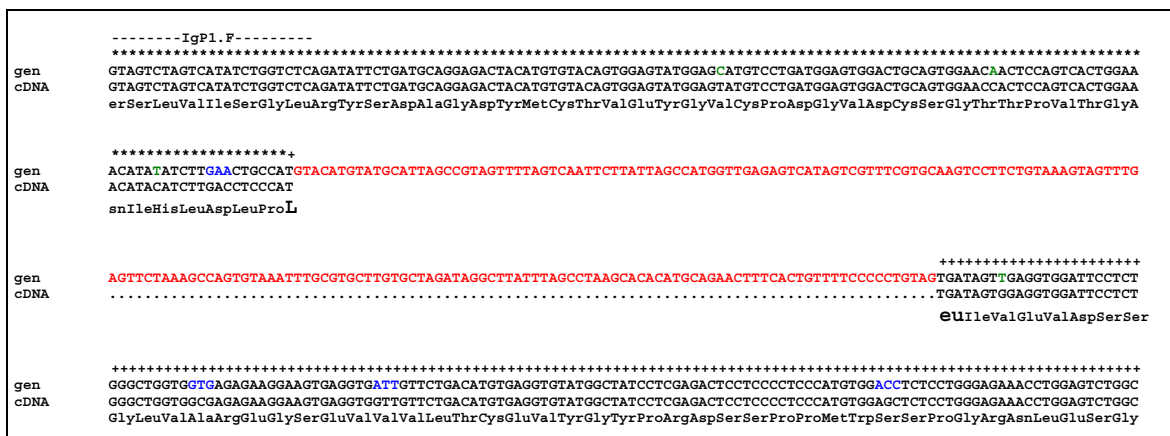


Abbildung 13: Vergleich der genomischen Sequenz (gen) mit der cDNA-Sequenz (cDNA) von *GCSAML* im Bereich zwischen den beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Das Intron ist rot dargestellt. Die Immunglobulin-ähnlichen Domänen sind oberhalb der genomischen Sequenz markiert: * Immunglobulin-ähnliche Domäne 1, + Immunglobulin-ähnliche Domäne 2. Nukleotidaustausche, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führen, sind grün dargestellt. Solche, die einen Aminosäureaustausch zur Folge haben, sind blau dargestellt.

8 Genomische PCR über das Intron zwischen den Immunglobulin-ähnlichen Domänen

Genomische DNA aus sechs verschiedenen *Geodia cydonium*-Individuen wurde (wie unter III.B.1.14 beschrieben) hergestellt. Die Amplifikation über das Intron wurde mit den beiden Primern, die die Spleißstelle flankieren (*IGINT.F* und fluoreszenzmarkierter *IGINT.R*), mit den üblichen PCR-Methoden und einer Anlagerungstemperatur von 58 °C für 30 Sekunden durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte aus den Schwämmen 1-6 wurden auf einem 7 %igem Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetrennt und durch den Laserimager des automatischen DNA-Sequenators visualisiert. Eine Sequenzierungsreaktion diente als Längenvergleich für die amplifizierten Produkte. Das Ergebnis waren je sechs bis sieben klare Banden pro Individuum (Abbildung 14). Nur die Individuen 3 und 4 zeigten das gleiche Bandenmuster, während die anderen sich deutlich unterschieden.

Einige der durch die PCR-Reaktion erhaltene Introns wurden aus einem Agarosegel isoliert (III.B.1.8), in pGEM[®]-T einkloniert und anschließend sequenziert. Zu diesem Vergleich der genomischen PCR-Klone aus der PCR-Reaktion mit den Primern *IGINT.F* und *IGINT.R* (sowohl für *RTK* als auch für *GCSAML*) wurde zusätzlich noch der Klon aus der für *GCSAML* spezifischen genomischen PCR mit den beiden Primern *IgP1.F* und *JM.R1* gestellt (Abbildung 15). Der Vergleich der Intronsequenzen zeigt, daß die sequenzierten Introns gleicher Länge oft verschieden waren.

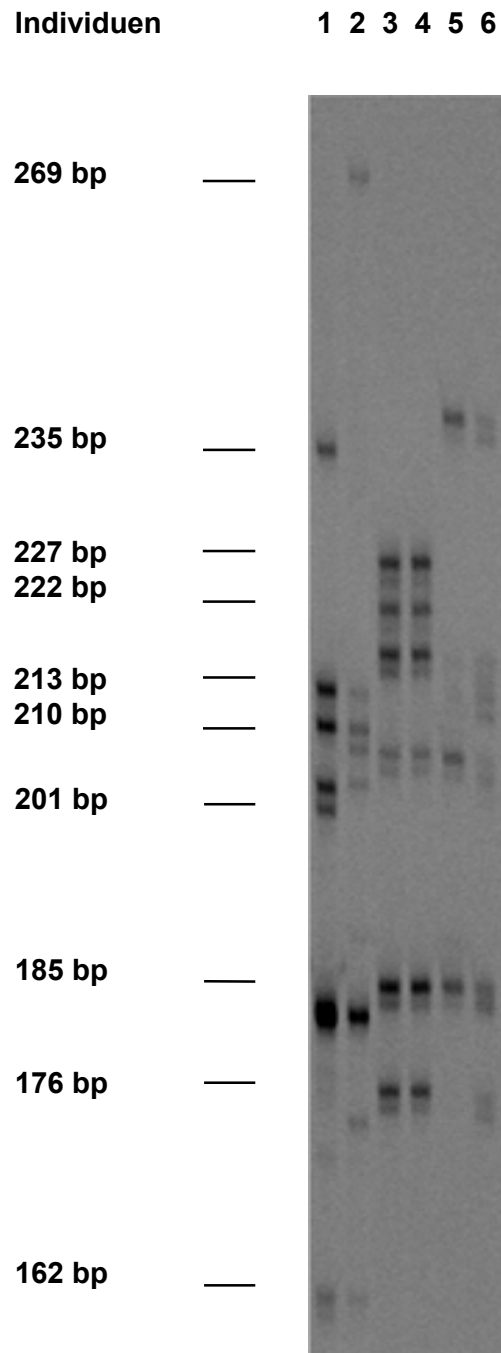


Abbildung 14: Genomische PCR-Amplifizierung über das Intron, das die beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen von *GCSAML* und *GCRTK* trennt. Ausgangsprodukt war die genomische DNA von sechs verschiedenen *Geodia cydonium*-Individuen. Auftrennung auf einem 7 %igem Polyacrylamidgel. Eine Sequenzierungsreaktion diente als Marker für die Länge der Amplifikationsprodukte uns ist auf der linken Seite in bp angegeben. Aufgrund der Primer sind diese Längen 43 bp länger als die tatsächlichen Introns.

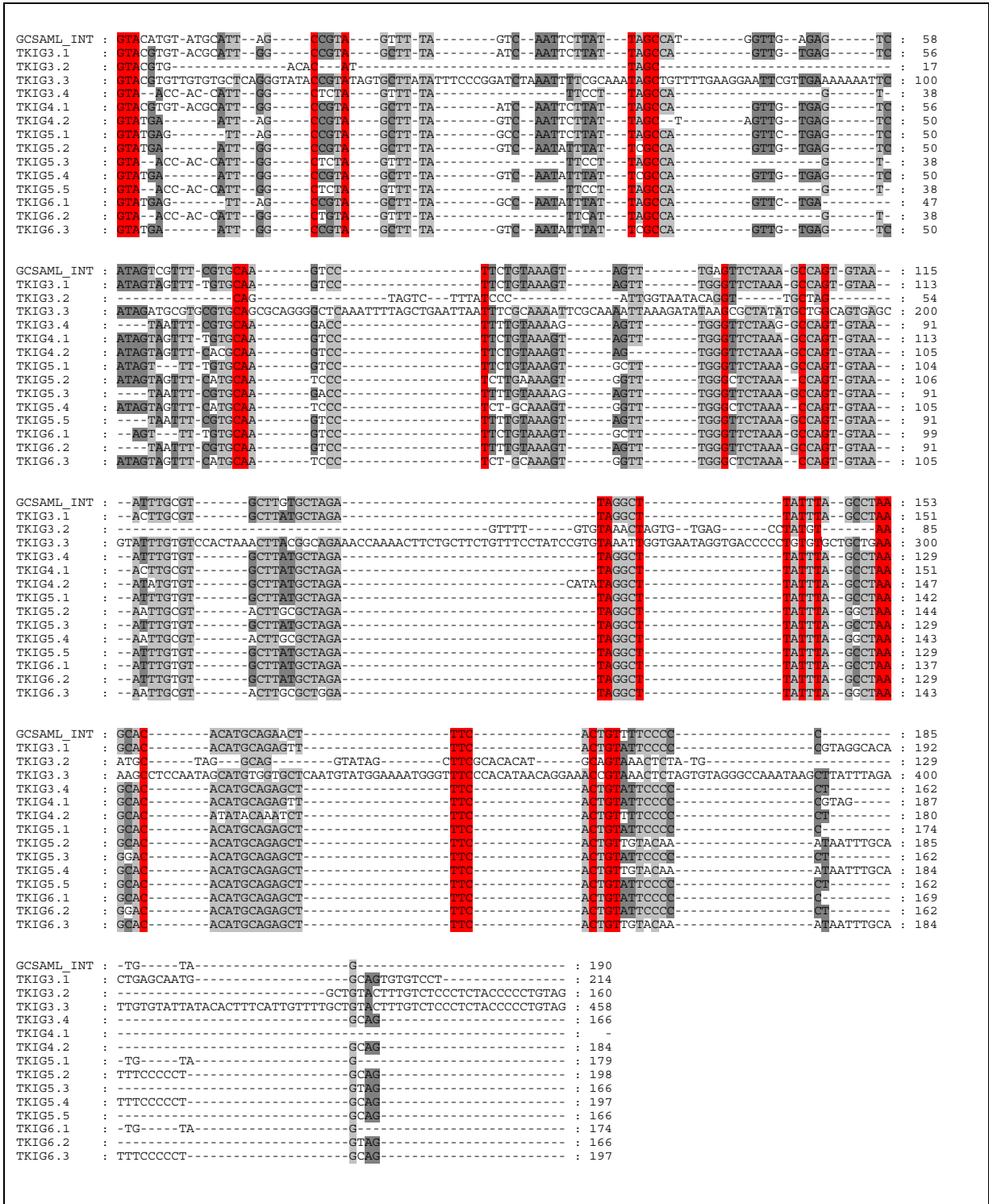


Abbildung 15: Vergleich 15 genomischer Sequenzen des Introns, das die beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen trennt. 4 PCR-Klone des Schwammes 3 (TKIG 3.1-3.4), 2 Klone des Individuums 4 (TKIG 4.1 und 4.2), 5 Klone des Schwammes 5 (TKIG 5.1-5.5), 3 Klone des Schwammes 6 (TKIG 6.1-6.3) und ein PCR-Klon von GCSAML (GCSAML_INT). Die Farbmarkierungen zeigen den Grad der Übereinstimmung an (Rot 100 %, Hellgrau 80 % und Dunkelgrau 60 % Übereinstimmung).

9 Ergebnisse der Transplantationsversuche

9.1 Autotransplantation

Bei der Autotransplantation wurde mittels der Insertionstechnik (siehe III.B.3.2.1) ein Gewebepropf von einer Stelle eines Schwammindividuum an eine andere Stelle des gleichen Individuums gesetzt. Bereits nach 4 Tagen konnte man eine Verschmelzung des Gewebes des eingesetzten Propfes mit dem des Empfängers erkennen (Abbildung 16 A). An den Gewebegrenzen kam es zur Ausbildung einer sogenannten Fusionszone.

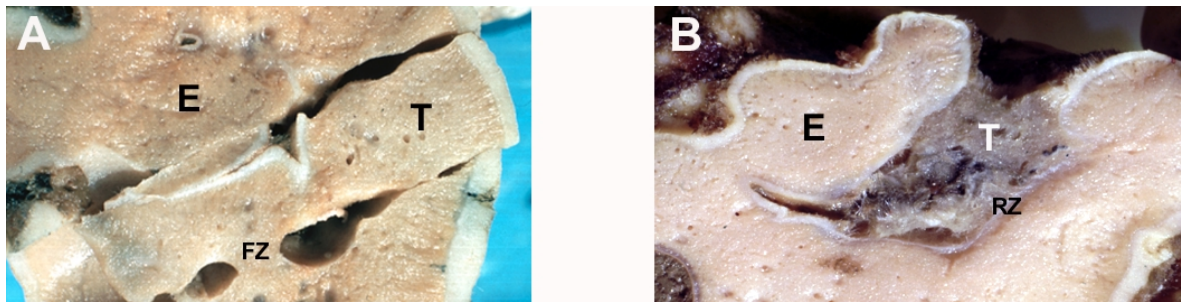


Abbildung 16: A. Autotransplantation *Geodia cydonium*; 5 Tage nach der Transplantation geschnittener Schwamm. Vergrößerung 1x. B. Allotransplantation *Geodia cydonium*; 7 Tage nach der Transplantation geschnittener Schwamm. Vergrößerung 1x. T = Transplantat, E = Empfänger, FZ = Fusionszone, RZ = *rejection zone* (Abstoßungszone). Fotos von PROF. DR. W.E.G. MÜLLER.

9.2 Allotransplantation

Bei der Allotransplantation wurde mittels der Insertionstechnik ein Gewebepropf eines Individuums in ein anderes Schwammindividuum eingesetzt. Nach einer anfänglichen Fusion der beiden Gewebe, kam es nach 3 Tagen zu einer Abstoßung des fremden Gewebes durch den Empfänger und schließlich zur nekrotischen Degeneration des Transplantates (Abbildung 16 B). An den Gewebegrenzen bildete sich eine Abstoßungszone (*rejection zone*).

10 Untersuchungen der Transplantationsprozesse in Zusammenhang mit GCSAML

10.1 Immunhistochemische Analysen

Autotransplantation-Experimente wurden mittels der Insertionstechnik an *Geodia cydonium* durchgeführt (siehe III.B.3.2). Die Schwämme wurden bis zu 10 Tagen gehalten und anschließend analysiert. Nach Aufschneiden der Versuchsobjekte zeigte sich, daß die Transplantate während dieser Zeit fast vollständig mit dem Empfänger verschmolzen (Abbildung 16). In den Gewebeschnitten wurden durch Färbung mit Ziehl's Fuchsin (Anilin Blau) die 20 µm großen sphäkulösen Zellen mit ihren großen intrazellulären Einschlüssen (SIMPSON 1984) deutlich sichtbar (Abbildung 17 A). Diese Zellen arrangierten sich an den Grenzen der Fusionszone. Durch Färbung der Gewebeschnitte mit dem polyklonalen Antikörper gegen die Immunglobulin-ähnlichen Domänen, anti-TKlg-Antikörper, wurde dann die Fusionszone durch den mit FITC-gekoppelten zweiten Antikörper gefärbt (Abbildung 17 C und D). Bei einem weiteren Versuch wurde eine Antikörperpräparation mit dem Antigen, das für die Immunisierung eingesetzt wurde, adsorbiert. Wurden die Gewebeschnitte mit dieser Antikörperpräparation inkubiert, sieht man nur die Autofluoreszenz des Gewebes, eine rötliche Färbung (Abbildung 17 B). Es wird deutlich, daß in den Fusionszonen nicht die sphäkulösen Zellen durch den Antikörper erkannt werden, sondern Zellen, die kleiner als 8 µm sind.

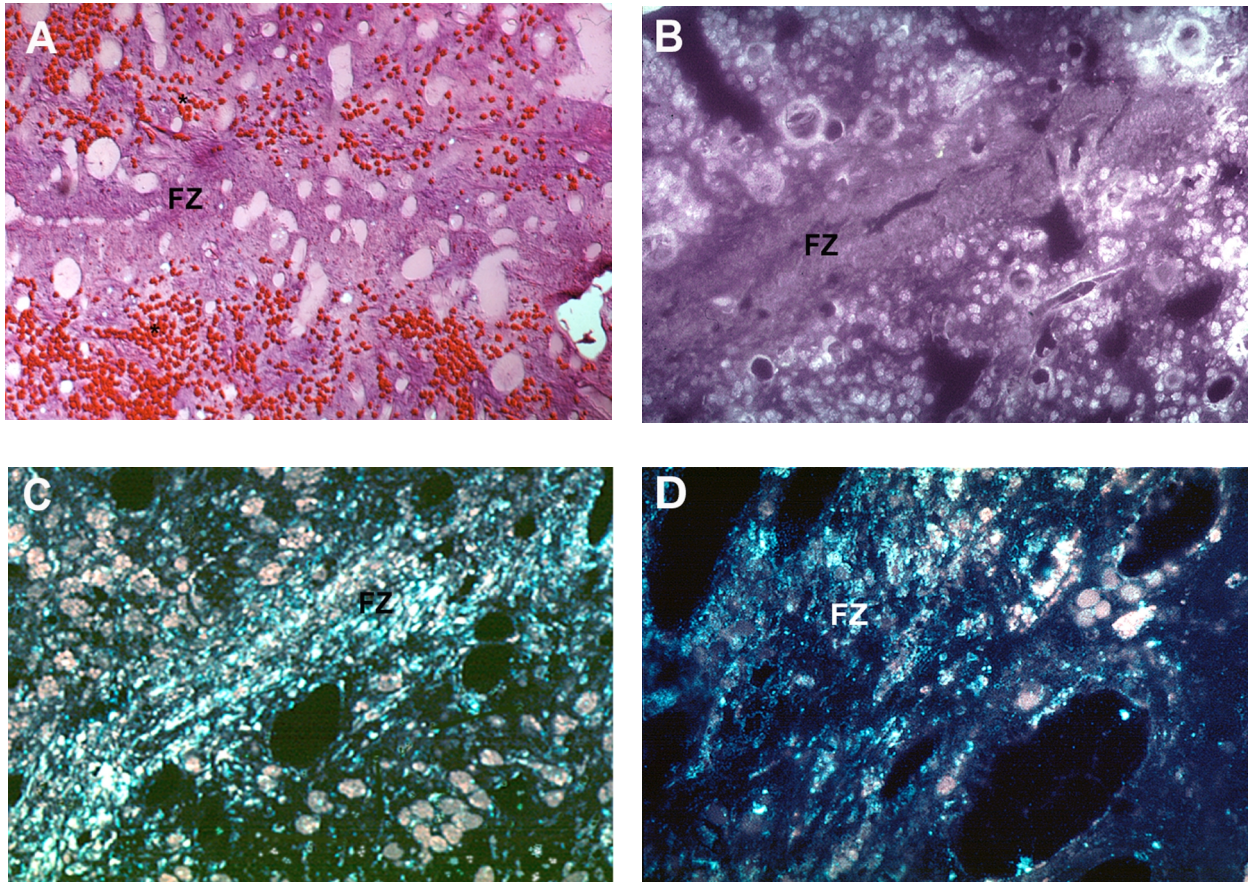


Abbildung 17: Schnitte durch die Autotransplantate von *Geodia cydonium*. A. Schnitt mit Ziehl's Fuchsin/Anilinblau gefärbt, Ansammlungen von sphäkulösen Zellen (*), die die Fusionszone umgeben. B. Inkubation mit anti-TKlg-Antikörper, der vorher mit rekombinanten Antigen adsorbiert wurde. Anschließend wurden die Schnitte mit FITC-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG behandelt. C und D. Immunfluoreszenzbilder von Schnitten durch die Fusionszone, die mit dem anti-TKlg-Antikörper inkubiert wurden, die Immunkomplexe wurden mit FITC-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG sichtbar gemacht. Vergrößerungen: A und B 50 x, C 80x, D 150 x.

10.2 Northern Blot-Analysen

Um die Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen zu unterstützen, wurde für Northern Blot-Analysen Gewebe aus der Fusionszone der Autotransplantate entnommen und die Total-RNA aus diesem präpariert (siehe III.B.2.2). Als Kontrolle wurde Gewebe von einer anderen Stelle des gleichen Individuums entnommen und daraus ebenfalls die Total-RNA isoliert. Als Sonde für die Northern Blots wurde das mittels der Primer *ITIM.F* und *JM.R1* hergestellte DIG-markierte 370 bp große PCR-

Produkt verwendet. Der Blot wurde unter niedrig stringenten Bedingungen durchgeführt. Die Untersuchung der gleichen Menge an RNA (5 µg) aus Gewebe der Fusionszone nach der Transplantation zeigte, daß die Expression von *GCSAML* hochreguliert wird (Abbildung 18). Die Gleichsetzung der Intensität des Signales der Kontrolle mit 1, führt zu einem Anstieg der Bandenintensität in den Transplantatproben um fast 40 %. Bei Kontroll-experimenten mit einem Haushaltsgen [β -Tubulin (1,7 kbp)] zeigte sich fast keine Änderung in der Bandenintensität.

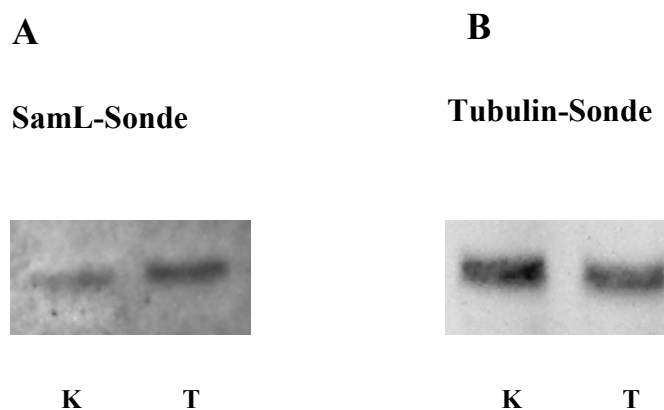


Abbildung 18: Northern Blot-Analyse der Expression von *SAML* nach Autotransplantation. A. *GCSAML* Northern Blot. Links Kontroll-RNA, rechts RNA aus Fusionsgewebe. B. Tubulin-Northern Blot. Links Kontroll-RNA, rechts RNA aus Fusionsgewebe.

10.3 Western Blot-Analysen

Von den Auto- und Allotransplantaten wurden auch Proteintotalextrakte (siehe III.B.3.3) hergestellt. Bei den Autotransplantationen wurden jeweils aus Kontrollgewebe einer anderen Stelle des Schwammes und aus Fusionsgewebe an der Transplantationsstelle Proteinextrakte hergestellt. Bei den Allotransplantationen wurde ein Extrakt aus dem Gewebe der Abstoßungszone (beinhaltete also Empfänger- und Spendergewebe) und ein Extrakt nur aus dem eingesetzten Pfropf hergestellt.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe III.B.3.4) wurden je 5 µg der Extrakte durch eine 10 %ige SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine

PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis erfolgte durch die anti-TKlg-Antikörper und nachfolgender Inkubation mit dem sekundären anti-Kaninchen-POD-Antikörper. Detektiert wurde mit dem Chemilumineszenz-System von BOEHRINGER (siehe III.B.3.7.3).

Es ergaben sich für die verschiedenen Extrakte unterschiedliche Bandenmuster. In den Extrakten der Autotransplantation dominiert eine breite Bande zwischen 120 kDa und 100 kDa. Die RTK mit theoretischem Molekulargewicht von 116 kDa paßt in diesen Bereich. Im Fusionsextrakt der Autotransplantation tritt eine zusätzlich Doppelbande ca. 68 kDa auf. Sie entspricht GCSAML (theoretisches Molekulargewicht 61,5 kDa mit mehreren Glykosylierungsstellen). Die Bande bei ca. 35 kDa entspricht der kurzen Form GCSAMS mit einem theoretischen Molekulargewicht von 33,9 kDa mit ebenfalls mehreren Glykosylierungsstellen.

Die vermutliche RTK-Bande bleibt im Fusionsgewebe gleich stark, GCSAMS bleibt ebenfalls gleich stark. Die Bande, die GCSAML entspricht, tritt hingegen erst im Fusionsgewebe auf.

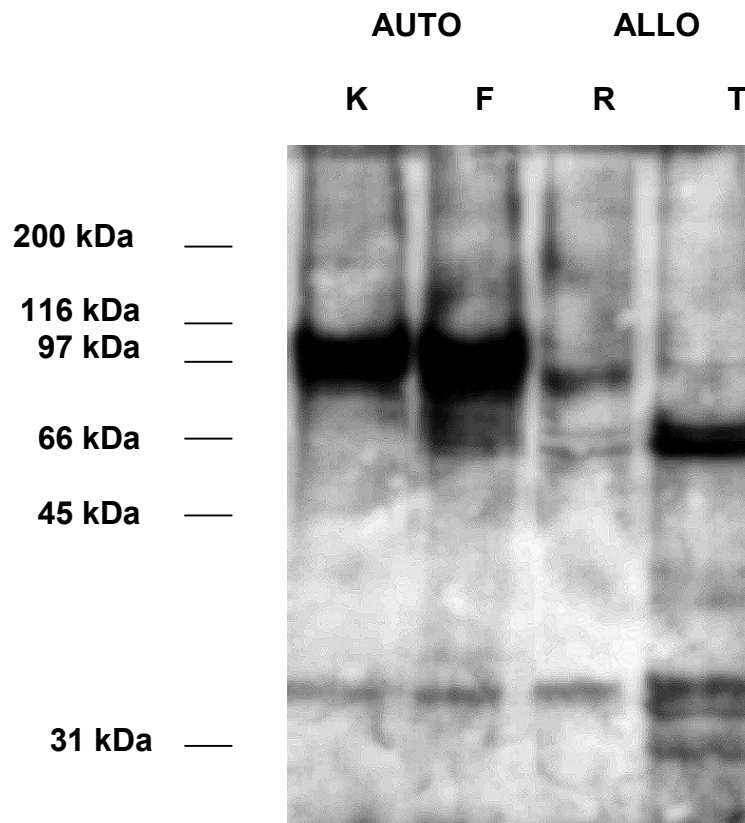


Abbildung 19: Western Blot der Totalextrakte der Transplantationen von *Geodia cydonium*. Inkubation mit dem anti-TKlg-Antikörper und nachfolgende Inkubation mit dem sekundären anti-Kaninchen-POD-Antikörper.

Auto = Autotransplantation, Allo = Allotransplantation, K = Proteinextrakt aus Kontrollgewebe, F = Proteinextrakt aus Fusionsgewebe, R = Proteinextrakt aus Abstoßungsgewebe, T = Proteinextrakt aus dem Transplantat.

In den Extrakten der Allotransplantation erscheint die breite Bande der RTK zwischen 97 kDa und 120 kDa in zwei diskrete Banden bei ca. 116 kDa und 100 kDa aufgelöst. Ansonsten zeigt sich auch in diesen Extrakten die Bande von GCSAML bei 68 kDa und eine zusätzliche Bande bei 70 kDa. Auch die Bande von GCSAMS bei 35 kDa ist zu sehen.

Im Extrakt aus dem Pfropf nimmt die Bande bei 68 kDa deutlich an Intensität zu, während die Bande bei 116 kDa abnimmt im Vergleich zum Extrakt aus dem Fusionsgewebe. Außerdem treten im Pfropfgewebe noch zusätzliche Banden bei 42 und 45 kDa auf, sowie Banden unterhalb der 35 kDa Bande (34 kDa und 32 kDa).

11 Immunhistochemische Analyse von *Suberites domuncula*-Gewebeschnitten

Gewebeschnitte von *Suberites domuncula* wurden ca. 12 Stunden mit einem zentrifugierten Proteintotalextrakt aus *Geodia cydonium* inkubiert. Anschließend erfolgte eine 90 minütige Inkubation mit dem polyklonalen anti-TKlg-Antikörper. Die gebildeten Komplexe wurden durch den sekundären, anti-Kaninchen Antikörper, der mit FITC gekoppelt ist, detektiert. Es wurden drei weitere Versuche durchgeführt. Zunächst wurden die Gewebeschnitte nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert, dann wurde nur die Inkubation mit dem Primärantikörper ausgelassen und in einem dritten Versuch wurden die Gewebeschnitte ohne vorherige Extraktinkubation mit dem Primär- und Sekundärantikörper inkubiert.

In Abbildung 20 ist deutlich zu erkennen, daß die *Suberites domuncula* Gewebeschnitte nach der Inkubation mit dem *Geodia cydonium* Proteinextrakt eine deutlich stärkere Fluoreszenz zeigen als die Kontrolle ohne Inkubation mit dem anti-TKlg-Antikörper. Inkubation der *Suberites domuncula* Gewebeschnitte nur mit dem anti-TKlg-Antikörper ohne vorherige Proteinextrakt-Inkubation, führt zu einer schwachen Fluoreszenz.

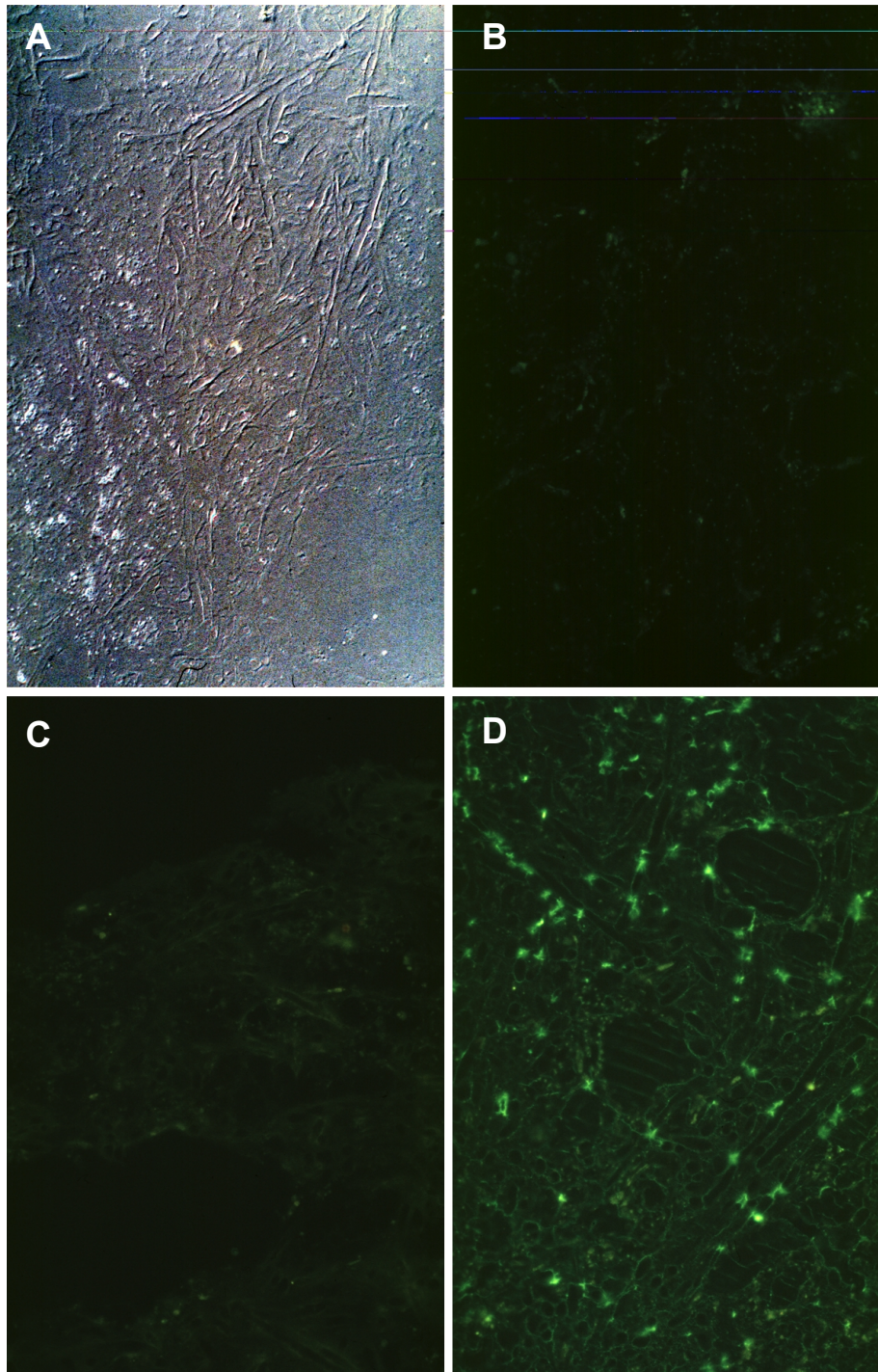


Abbildung 20: Gewebeschnitte *Suberites domuncula*. A. Nomarski-Aufnahme der *Suberites domuncula*-Gewebeschnitte. B. Inkubation mit *Geodia cydonium*-Proteintotalextrakt und nachfolgende Inkubation mit Sekundärintikörper. C. Inkubation mit anti-TKlg-Antikörper und nachfolgende Inkubation mit Sekundärintikörper. D. Inkubation mit *Geodia cydonium*-Proteintotalextrakt und nachfolgende Inkubation mit anti-TKlg-Antikörper und Sekundärintikörper. Je 20x Vergrößerung.

12 Ligandensuche für das ITIM-Motiv von GCSAML

Das *ITIM* (*Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif*) -Motiv der *Killer cell inhibitory* (KIR)-Rezeptoren bindet an SH-Domänen enthaltende Tyrosinphosphatasen (BOLLAND UND RAVETCH 1999). Da auch im GCSAML ein *ITIM*-Motiv zu finden ist, wurde mittels Western Blots nach einem Bindungspartner gesucht. Dazu wurde ein Peptid (NQTE^{VVpYEEVDG}-amid), welches das *ITIM*-Motiv umfaßt, in Auftrag gegeben. Der N-Terminus dieses Peptids ist biotinyliert und das Tyrosin im *ITIM*-Motiv ist phosphoryliert.

Das gefriergetrocknet gelieferte Peptid wurde in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in PBS mit 1 mM Natriumvanadat gelöst und aliquotiert eingefroren. Protein-totalextrakte (III.B.3.3) der Transplantationsversuche von *Geodia cydonium* wurden durch ein 10 %iges SDS-PAGE (III.B.3.5) aufgetrennt und durch Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen (III.B.3.7). Diese Membran wurde dann mit dem Peptid (0,75 mg) in TBS eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Membranen mit einem Streptavidin-Peroxidase gekoppelten Komplex inkubiert und anschließend erfolgte die Detektion durch das Chemilumineszenz-System (III.3.B.7.3). Als Negativkontrolle wurde der Blot anstelle des Peptides nur mit TBS inkubiert.

Das *ITIM*-Peptid bindet an zwei Proteine mit Molekulargewichten von ca. 116 kDa und ca. 48 kDa (Abbildung 21).

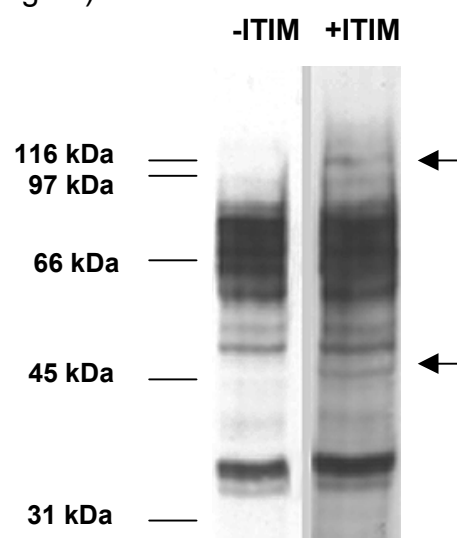


Abbildung 21: Western Blot Totalextrakte *Geodia cydonium*. Links Inkubation nur mit TBS, rechts Inkubation mit *ITIM*-Peptid in TBS, anschließend wurden beide Blots mit Streptavidin-POD inkubiert. Links sind die Molekulargewichte entsprechend eines mitgelaufenen Standards aufgetragen. Die Pfeile rechts zeigen auf die durch das *ITIM*-Motiv gebundenen Proteine.

13 Effekte des anti-TKlg-Antikörpers auf den intrazellulären Calciumspiegel

Um den Einfluß des Schwamm-Adhäsionsmoleküle auf den intrazellulären Calciumspiegel zu untersuchen, wurde die Calciumion-Konzentration in *Geodia cydonium*-Zellen mittels des Fluoreszenzindikators Fura-2/AM gemessen (III.B.3.9). Im ersten Versuch erfolgte die Inkubation der Zellen zuerst mit 10 mM Calciumchlorid und nach 5 Minuten mit 5 µl anti-TKlg-Antikörper. Im zweiten Versuch wurden die Zellen zuerst mit anti-TKlg-Antikörper (5 µl) inkubiert und anschließend mit 10 mM Calciumchlorid. Die Änderung der intrazellulären Calciumionenkonzentration wurde jeweils über 17 Minuten gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte der Quotienten (340 /380 nm) \pm der Standardabweichung dargestellt (Abbildung 22).

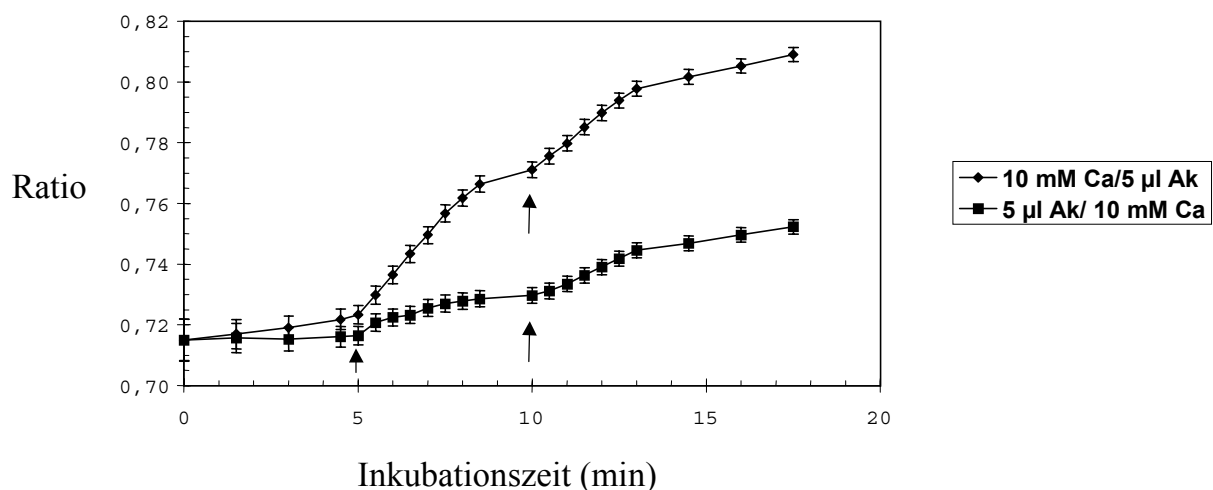


Abbildung 22: Effekt des anti-TKlg-Antikörpers auf die intrazelluläre Calciumionenkonzentration in *Geodia cydonium*-Zellen. Die Zellen wurden 5 Minuten (Pfeil) nach Beginn der Messung mit 10 mM Calciumchlorid bzw. 5 µl anti-TKlg-Antikörper inkubiert. Nach weiteren 5 Minuten (Pfeil) erfolgte dann die Zugabe von 5 µl anti-TKlg-Antikörper bzw. 10 mM Calciumchlorid.

Bei Anwesenheit von extrazellulären Ca^{2+} im Medium, wurde eine Erhöhung des 340/380 nm-Wertes von $0,723 \pm 0,003$ auf $0,771 \pm 0,003$ gemessen. Die anschließende Zugabe des anti-TKlg-Antikörpers bewirkte eine weitere Erhöhung dieses Wertes auf $0,809 \pm 0,002$. Wurden die Zellen zuerst mit anti-TKlg-Antikörper inkubiert, erhöhte sich der 340/380 nm-Quotient von $0,716 \pm 0,002$ auf $0,730 \pm 0,001$. Anschließende Inkubation mit extrazellulären Ca^{2+} ließ den 340/380 nm-Quotienten weiter auf $0,752 \pm 0,002$ steigen. Im Pseudocolorbild (Abbildung 23)

sieht man die Änderung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration deutlich in der Änderung der Farbe von dunkelblau zu hellgrün.

Die Stimulation der *Geodia cydonium*-Zellen mit dem anti-TKlg-Antikörper verringerte also den Einfluß extrazellulären Ca^{2+} auf die intrazelluläre Calciumionen-Konzentration. Ohne Antikörperinkubation führte extrazellulär angebotenes Ca^{2+} zu einem fast doppelt so starken Anstieg der intrazellulären Calciumionen-Konzentration wie nach vorheriger Antikörperinkubation.

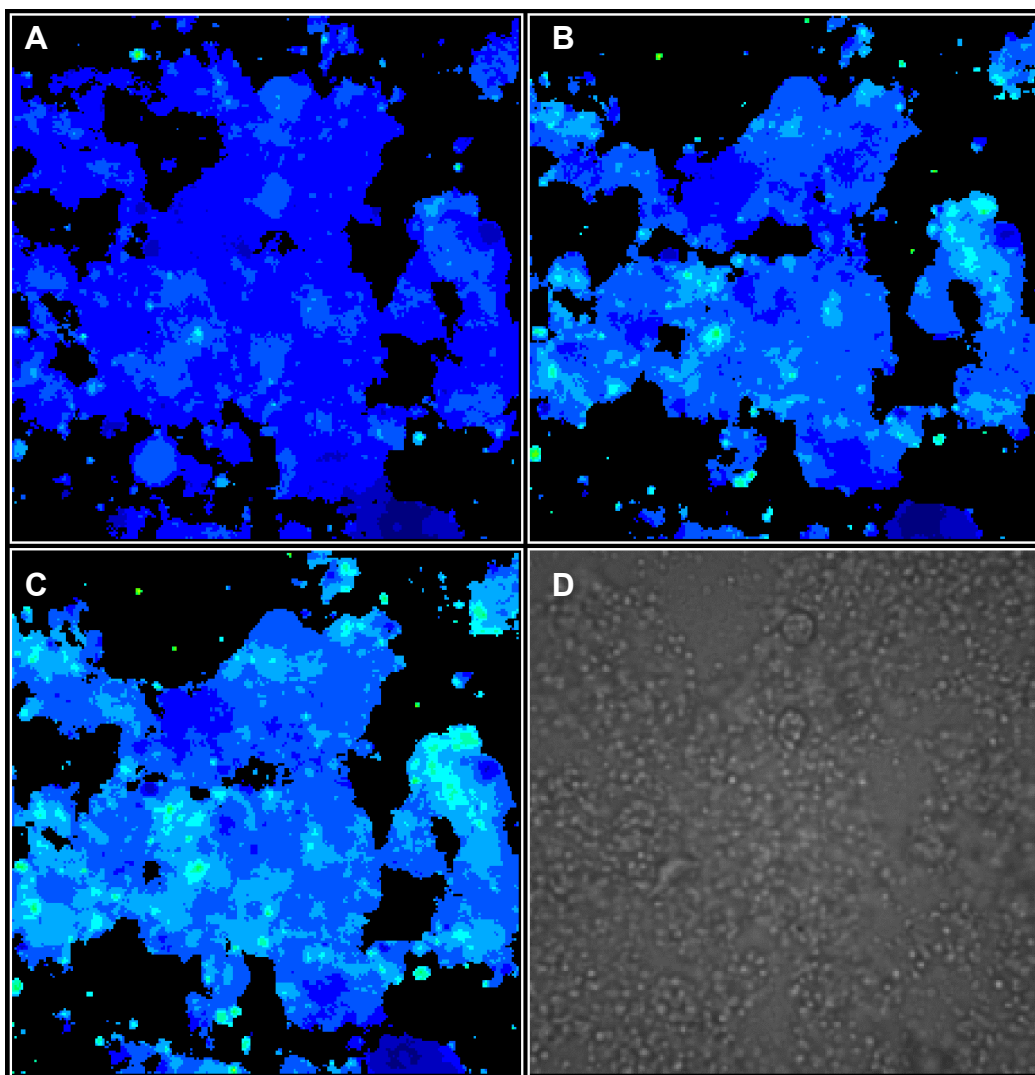


Abbildung 23: Pseudocolorbild der Messung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration. A: Basismessung ohne Inkubation der Probelösung. B: Messung nach Inkubation von 10 mM Ca^{2+} . C: Messung nach Inkubation mit 5 μl anti-TKlg-Antikörperlösung. D: Lichtbild. Die Farbe ändert sich mit zunehmender Calciumionen-Konzentration von dunkelblau über hellblau zu grün. Vergrößerung 400x.

V DISKUSSION

1 Analyse der Sequenzen

Mit der Rezeptortyrosinkinase (RTK) wurde aus dem Schwamm *Geodia cydonium* bereits ein Molekül isoliert, das zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen besitzt (SCHÄCKE *et al.* 1994). Frühere Northern Blot- und Southern Blot-Versuche haben gezeigt, daß zusätzlich zu mindestens zwei Transkripten für die RTK noch andere Gene mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen in *Geodia cydonium* existieren müssen (PANCER *et al.* 1996). Ziel der Arbeit war es, weitere Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie im Schwamm zu identifizieren.

Nach einem niedrig stringenten Homologiescreening der cDNA Bank mit dem Fragment der RTK, welches den beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen entspricht, wurden zwei neue cDNAs gefunden. Deren abgeleitete Aminosäuresequenzen bestehen jeweils aus zwei extrazellulären, Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und unterschiedlich langen intrazellulären Regionen ohne erkennbare Domäne. Sie wurden vorläufig Schwamm-Adhäsionsmoleküle – *sponge adhesion molecules* (SAM) genannt. In Abbildung 24 ist vergleichend der strukturelle Aufbau sowohl der RTK als auch der beiden SAMs gezeigt.

Die längere Form der Schwamm-Adhäsionsmoleküle, *GCSAML*, ist 1998 Nukleotide, die kürzere Form (*GCSAMS*) nur 1365 Nukleotide lang. Die Ergebnisse des Northern Blots mit spezifischen Sonden für *GCSAML* bzw. *GCSAMS* lassen darauf schließen, daß die vollständigen Sequenzen isoliert wurden (Abbildung 9).

Die lange Form (*GCSAML*) hat ein Start-Methionin, welches jedoch nur geringe Homologie zur KOZAK-Konsensussequenz (KOZAK 1986) aufweist. Da es aber nur bei circa 5 % der eukaryotischen mRNAs zu einer absoluten Homologie mit dieser Konsensussequenz kommt, ist diese Abweichung bei *GCSAML* nicht bedeutend. Auch bei anderen *Geodia cydonium*-cDNAs wurde eine Abweichung von der Kozak-Sequenz beobachtet. Das fehlende Start-Methionin bei der kürzeren Form (*GCSAMS*) ist nicht überraschend, da z.B. auch bei Tyrosinkinasen die Translation aufwärts eines nicht-AUG-Codons startet (KOZAK 1991).

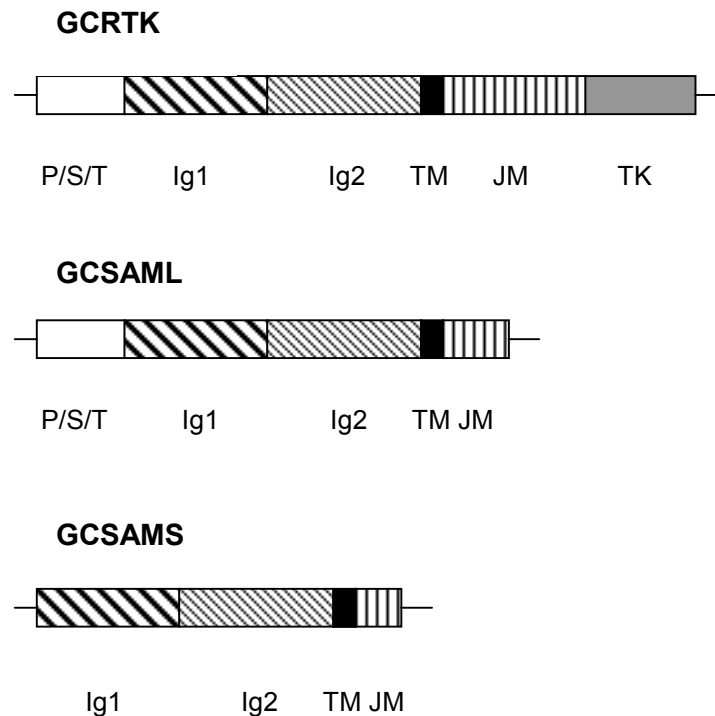


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Struktur der drei Moleküle aus *Geodia cydonium*, die Immunglobulin-ähnliche Domänen besitzen. P/S/T = Prolin,Serin,Threonin-reiche Region, Ig1 = Immunglobulin-ähnliche Domäne 1, Ig2 = Immunglobulin-ähnliche Domäne 2, TM = Transmembranbereich, JM = Juxtamembranbereich, TK = Tyrosinkinasedomäne.

Desweiteren besitzt die lange Form am 5'-Ende eine Prolin-Serin-Threonin-reiche Sequenz, die der kurzen Form fehlt. Eine solche Domäne findet sich bei Proteinen oft in der Nähe von Anheftungsstellen für Zelloberflächen (CHEN *et al.* 1995). Sie dient zur Verlängerung der Bindungsregion für Proteine (OHLENDIECK *et al.* 1993). Prolin-Serin-Threonin reiche Sequenzen werden als Modul von Zelladhäsionsproteinen angesehen (LIPKE 1996).

Bei der langen Form findet sich ein trunkiertes Polyadenylierungssignal (AATAA) wie es in den meisten *Geodia cydonium*-cDNAs (WIENS *et al.* 1998) zu finden ist, während bei *GCSAMS* das charakteristische Polyadenylierungssignal AATAAA (ZARKOWER *et al.* 1986) vorkommt.

Beide SAM-Formen unterscheiden sich in den Immunglobulin-ähnlichen Domänen sowohl untereinander als auch von der RTK. Dies trifft sowohl für die Nukleotid- als auch für die Aminosäureebene zu (Abbildungen 10 und 11). Obwohl die Gesamtübereinstimmung zwischen den Sequenzen hoch ist, ist die Tatsache auffallend, daß die Austausch auf einige wenige Stellen innerhalb der

Immunglobulin-ähnlichen Domänen beschränkt sind. Ein Grund hierfür könnte die relativ hohe Fehlerrate der *Taq*-Polymerase sein, die nach LUNDBERG (1991) bei $1,6 \times 10^{-6}$ liegt. Die Analyse jeweils mehrerer cDNA-Sequenzen führte aber zu identischen Ergebnissen und so kann die Einführung von Nukleotidsubstitution durch die *Taq* weitgehend ausgeschlossen werden.

Das Phänomen, daß es Moleküle gibt, die sich nur in wenigen Nukleotiden unterscheiden, aber trotzdem verschiedene Spezifität besitzen, ist auch bei den humanen NK (*Natural killer*)-Zellen zu beobachten. Sie exprimieren MHC (*major histocompatibility complex*-Haupthistokompatibilitäts-komplex)-Klasse I-spezifische Rezeptoren, die sich in nur wenigen Nukleotiden unterscheiden. Diese sogenannten KIRs (*killer cell inhibitory receptors* – KIRs) sind Typl-Transmembran-Rezeptoren, die entweder zwei oder drei Immunglobulin-Domänen besitzen. Sie weisen sehr unterschiedliche Spezifitäten für Allele der MHC-Klasse I-Rezeptoren auf, obwohl sie sich nur in drei bis fünf Aminosäuren unterscheiden (LONG UND WAGTMANN 1997).

Immunglobulin-Domänen werden je nach Anordnung der β -Stränge in verschiedene Klassen eingeordnet. Der V-Typ hat die β -Stränge ABCC'C'DEFG, der C-Typ dagegen nur ABCDEFG. Ein weiteres Kriterium für die Klassenzuordnung ist die Anzahl der Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen einer Domäne: Beim V-Typ liegt die Anzahl der Aminosäuren zwischen den Cysteinen bei 65 bis 75, beim C-Typ hingegen liegt sie zwischen 55 und 60 Aminosäuren (WILLIAMS UND BARCLAY 1988). Der C-Typ gliedert sich noch in den C1-Typ und den C2-Typ. Der C1-Typ kommt nur in Immunglobulinen, T-Zellrezeptoren und MHC-Molekülen vor. Der C2-Typ dagegen tritt bei Nicht-Immunglobulin-verwandten Molekülen wie den Zelladhäsionsproteinen und Zelloberflächenrezeptoren auf (SMITH UND XHUE 1997).

Die Immunglobulin-ähnliche Domäne 2 wird nach Anwendung der verschiedenen Sequenzkriterien (HOOD UND HUNKAPILLER 1991) zum V-verwandten Typ gerechnet. Ausschlaggebend ist hierbei die Anzahl der Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen (66) und das Vorhandensein des C'- und C''-Stranges.

Die Zuordnung der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 1 ist schwieriger. Nach Anzahl der Aminosäuren zwischen den Cysteinen (57) gehört sie zum C-Typ. Die Aminosäure Leucin, die zwischen dem C- und dem D- β -Faltblatt vorhanden ist, findet sich auch in C'- β -Faltblättern, was wiederum für eine Zuordnung zum V-verwandten Typ spricht. Die Immunglobulin-ähnliche Domäne 1 besitzt eine Homologie mit der

variablen Region der leichten Kette humaner Immunglobuline, die eindeutig zum V-Typ gehört. Aufgrund dieser Homologie wird auch die Immunglobulin-ähnliche Domäne 1 der SAM zum V-verwandten Typ gerechnet.

Beide Immunglobulin-ähnlichen Domänen werden also dem V-verwandten Typ zugeordnet (Abbildung 25).

Bestimmung der β -Stränge der Immunglobulin-ähnlichen Domänen

A. Immunglobulin-ähnliche Domäne 1

	---B---	---C---	C'	--D---	----E----	----F---
	***	** *	*	***	*****	*** ** *
GCSAML_IG1 :	PHSVTLTCSAASPARGYQY-QWRRRNGT	LL-----SNHTRFSITPSTNTQSSSLVISGLRYS	DAGDYMCTV			
GCSAMS_IG1 :	PHSVTLTCSAASPARGYQY-QWRRRNGT	LL-----SNHTRFSITPSTNTQSSSLVISGLRYS	DAGDYMCTV			
GCRTKc_IG1 :	PHSVTLTCSAASPARGYQY-QWRRRNGT	LL-----SNHTRFSITPSTNTQSSSLVISGLRYS	DAGDYMCTV			
GCRTKg_IG1 :	PHSVTLTCSAASPARGYQY-QWRRRNGT	LL-----SNHTRFSITPSTNTQSSSLVISGLRYS	DAGDYMCTV			
Ig_lambda :	--TVTISCTRSNGVAAM-YVQNYQQRPGSAPITLIYEDDHRP	SGVPRFRFSGSIDSSNSASLTSGLRAEAD	EADYYC--			
Ig_trout :	--TVSLNCKTSDVHSGY-YLANVYQQRKPGAPQLLIYRATTLQ	SGTSPFRFSGS--GSGDFTLTSGLVKVED	DAGDYYC--			

B. Immunglobulin-ähnliche Domäne 2

	----B-----	----C-----	----C'-----	--C'--	---D---	---E
	***	**	*			* **
GCSAML_IG2 :	SEVVVLTCEVYGYPRDSSPPMW--SSPGRNLE	-----SGRFNITPRYTGTLNNGSVSSSDKVALS	QLT			
GCSAMS_IG2 :	SEVVVLTCEVYGYPRDSSPPMW--SSPGRNLE	-----SGRFNITPRYTGTLNNGSVSSSDKVALS	QLT			
GCRTKc_IG2 :	SEVVVLTCEVYGYPRDSSPPMW--SSPGRNLE	-----SGRFNITPRYTGTLNNGSVSSSDKVALS	QLT			
GCRTKg_IG2 :	SEVVVLTCEVYGYPRDSSPPMW--SSPGRNLE	-----SGRFITTPRYTNTLNNGSVSSSEKVALS	QLT			
Ig_heavy :	SETLSLTCAVYGGFSFDNDWSIRQPPCKRLWIGEINHSGSTNYNPSLKSRV	SISAYTSKNQFS--LR				
NCAM_newt :	-HAAVLAADADGFDPDEIS--W--TKDGE	MI-----DDSDKYKFTEDG-----SE	MT			
UNC89_CE :	SEKVVLECKVIEE--PKPKVSW--LHDNVSRE	-----KNPNSEKTIITQESITVESVEG	VERVT			

	E-	---F---
	*	* **
GCSAML_IG2 :	IFNVTVADEGEVTC	SV
GCSAMS_IG2 :	IFNVTVADEGEVTC	SV
GCRTKc_IG2 :	IFNITVADEGEVTC	SV
GCRTKg_IG2 :	IFNVTVADEGEVTC	SV
Ig_heavy :	LSSVTAADTAVV	FCA-
NCAM_newt :	IFNIDKSD	EGDYTC--
UNC89_CE :	ITSSSEL	SHQKVTG--

Abbildung 25: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen GCSAML und GCSAMS mit Sequenzen aus der Datenbank und Bestimmung der β -Stränge. A. Bereich der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 1. B. Bereich der Immunglobulin-ähnlichen Domäne 2. Für den Vergleich herangezogene Sequenzen: GCRTKc = cDNA-Sequenz RTK *Geodia cydonium* (X98340, Aminosäuren 1-496, PANCER *et al.* 1996), GCRTKg = genomische Sequenz der GCRTK (X94128, bis Aminosäure 505 GAMULIN *et al.* 1997), Ig_lambda = variable Region der humanen Immunglobulin lambda Kette (CAA85627, Aminosäuren 17-91, WELSCHOF *et al.* 1995), Ig_Forelle = Immunglobulin lambda Kette der Regenbogenforelle (S29575, Aminosäuren 29-101, DAGGFELDT *et al.* 1993), Ig_heavy h = variable Region der humanen Immunglobulin schweren Kette (3603467, Aminosäuren 15-96, RIBOLDI *et al.* 1994), NCAM_Molch = Zelladhäsionsmolekül NCAM 180 des japanischen Wassermolches, *Cynops pyrrhogaster* (BAA24032, Aminosäuren 228-284, MIZUNO *et al.* 1997), UNC_89 = UNC 89 Segment von *C.elegans* (2088675, Aminosäuren 3008-3075, BENIAN *et al.* 1996). Die Farbmarkierungen zeigen den Grad der Übereinstimmung an (Ig1: Rot 100 %, Hellgrau 70 %, Dunkelgrau 60 %; Ig2: Rot 100%, Dunkelgrau 80 %, Hellgrau 50 %). Die Buchstaben oberhalb der Sequenzen bezeichnen die β -Stränge. * kennzeichnen die Aminosäurereste, die charakteristisch für die einzelnen β -Stränge sind.

Nach HOOD *et al.* (1985) war die Duplikation eines Gens für einen ursprünglichen Oberflächenrezeptor ein sehr früher Vorgang, der von der Divergenz eines V- und eines C-Exons gefolgt wurde. Moderne Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie enthalten verschiedene Anzahlen von V- und/oder C-Domänen. Die frühe Divergenz wird durch ein Fehlen signifikanter Sequenzhomologien bei V- und C-Domänen der Immunglobuline und T-Zellrezeptoren reflektiert, obwohl sie ähnliche tertiäre Strukturen aufweisen. Ein zweiter früher Schritt in der Evolution der Immunglobulin-Superfamilie war die Erlangung der Fähigkeit des DNA-Rearrangements, die eine einzigartige Eigenschaft der Immunrezeptormitglieder dieser Familie geblieben ist.

Somatische Reorganisation der Segmente von Immunglobulin-Genen (HORDVIK *et al.* 1992) und somatische Mutationen innerhalb von Immunglobulin-Domänen wurden bei Knorpelfischen (KOKUBU *et al.* 1988), Amphibien (SCHWAGER *et al.* 1988) und Vögeln (REYNAUD *et al.* 1989) identifiziert. Solche Mechanismen schon dem phylogenetisch ältesten Metazoa-Stamm, den Porifera, zuzuschreiben, ist etwas verfrüht.

Zwei Ergebnisse könnten allerdings darauf hinweisen, daß eine primordiale genetische Mobilität der Immunglobulin-ähnlichen Domänen auch schon bei Schwämmen existiert: In einer vorherigen Analyse wurde ein hoher Polymorphismus in den Immunglobulin-Genen der RTK verschiedener *Geodia cydonium*-Individuen festgestellt (PANCER *et al.* 1996). Auch in den Immunglobulin-ähnlichen Domänen der SAM kommt es zu Austausch an einigen bestimmten Positionen (Abbildungen 10 und 11).

Bei der Analyse der beiden GCSAM auf genomischer Ebene zeigte sich, daß die lange Form GCSAML – wie auch die RTK – zwischen den Immunglobulin-ähnlichen Domänen ein Intron aufweist. Das 190 Nukleotide lange Intron hat die typischen GT-AG Intron Grenzen (MANIATIS UND REED 1987). Das Intron teilt das Codon für die Aminosäure Leucin, so daß die erste Base sich noch vor dem Intron befindet, die restlichen zwei Basen dann nach dem Intron auftreten. Damit ist das Kriterium für ein Phase 1 Intron erfüllt (PATTHY 1995). Auch das Gen der RTK besitzt zwischen den beiden Immunglobulin-ähnlichen Sequenzen ein Phase 1 Intron (GAMULIN *et al.* 1997). Nach der genomischen PCR über das Intron zwischen den Immunglobulin-ähnlichen Domänen, wurde deutlich, daß es sich hier um ein polymorphes Intron handelt. Je sechs bis sieben verschieden lange Introns konnten aus einem *Geodia cydonium*-Individuum isoliert werden (Abbildung 14). Selbst gleichlange Introns

verschiedener Individuen hatten eine unterschiedliche Sequenz (Abbildung 15). Dieser Polymorphismus wird durch die Existenz verschiedener Moleküle mit extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen, die durch ein Intron getrennt sind, erklärt. Die verwendeten Primer paaren sowohl mit der *RTK*-Sequenz als auch mit der *SAML*-Sequenz. Zusätzlich zu diesen Molekülen könnten im Schwamm noch weitere Moleküle mit einer sehr ähnlichen extrazellulären Struktur existieren. Eine weitere Erklärung wäre die Existenz mehrerer Kopien der *RTK*- und *SAML*-Gene im *Geodia cydonium*-Genom.

Das Fehlen des Introns zwischen den beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen im *SAMS*-Gen führt zur „Intron-early/late“-Debatte. Die „Intron-early“-Hypothese geht davon aus, daß Introns Relikte der RNA-Welt sind und Gene des eukaryontischen Systems mit Introns die ursprüngliche Form der gestückelten Gene darstellen (DARNELL 1978, GILBERT 1978, 1986). Nach dieser Theorie haben Bakterien durch Eliminierung ihrer Introns eine schnellere Wachstumsrate erreicht (DARNELL UND DOOLITTLE 1986). Die „Intron-late“-Hypothese dagegen sieht den Aufbau der prokaryontischen Gene als ursprünglich an und behauptet, daß die Insertion von Introns in die Gene der Eukaryonten erst später erfolgte (CRICK 1979, CAVALIER-SMITH 1985, PATTHY 1999).

Durch den Verlust des Introns im *SAMS*-Gen könnte die „Intron-early“-Hypothese bestätigt werden. Allerdings spricht die Situation im Schwamm eher für die „Intron-late“-Hypothese. Das Gen für *SAMS*, das für zwei extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen ohne ein dazwischen liegendes Intron und ohne weitere Domäne im cytoplasmatischen Bereich codiert, scheint primitiver als sein verwandtes Gen *SAML* zu sein. Dieses weist das besagte Intron auf und codiert außerdem noch für ein Motiv im cytoplasmatischen Bereich. Außerdem existiert mit der *RTK* ein weiteres Gen im Schwamm, das extrazellulär für zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen mit dazwischen liegendem Intron und intrazellulär für eine TK-Domäne codiert. Wie schon von GAMULIN *et al.* (1997) gezeigt, wird diese TK-Domäne im Gegensatz zu anderen RTKs von Eukaryonten nur durch ein Exon codiert.

Die Entwicklung der Gene mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen in *Geodia cydonium* könnte also von *SAMS* oder einem noch nicht identifizierten Gen ausgegangen sein. Nach Insertion eines Introns in das *SAMS*-Gen konnte dann das *SAML*-Gen entstehen und daraus durch Exon-shuffling dann das *RTK*-Gen gebildet werden.

2 Vorgänge bei der Gewebetransplantation

Schon lange ist bekannt, daß Schwämme eine hohe Regenerationsfähigkeit besitzen (WILSON 1907). Diese Fähigkeit in Kombination mit inflammatorischen Antworten auf Verletzungen zu reagieren, ist eine essentielle Komponente ihrer Fähigkeit zu überleben (JONES 1957). Zusätzlich dazu haben Schwämme Mechanismen entwickelt, um zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden. Transplantations-Experimente mit Schwämmen gehören zu den klassischen Pionieruntersuchungen, um die Selbst/Selbst- und Selbst/Fremd-Erkennung verstehen zu lernen. Die Fähigkeit der Schwämme, mit Autotransplantaten zu fusionieren und Allotransplantate abzustößen, wurde durch PARIS (1961) und MOSCONA (1968) entdeckt. Sogar ein primordiales Immungedächtnis für den Schwamm *Callyspongia diffusa* wurde aufgrund einer beschleunigten Rate der Abstoßung von „Second-set“-Transplantaten postuliert (BIGGER *et al.* 1982). SMITH und HILDEMANN (1986) haben die Alloimmun-Antworten bei Schwämmen in zwei Hauptabstoßungsprozesse unterteilt. Einige Arten können Barrieren bilden, um sich von fremden Gewebe abzugrenzen, so z.B. der marine Schwamm *Axinella verrucosa* (BUSCEMA *et al.* 1983) oder der Süßwasser-Schwamm *Ephydatia muelleri* (MUKAI 1992). Andere Arten reagieren mittels zytotoxischer Faktoren, die das Transplantat zerstören, z.B. der marine Schwamm *Callyspongia diffusa* (HILDEMANN *et al.* 1979). Nach PANCER *et al.* (1996) könnte diese Unterscheidung allerdings nicht charakteristisch für eine spezifische Schwammart sein, sondern eher von der Art der Transplantationsmethode abhängig sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es bei Autotransplantaten des Schwammes *Geodia cydonium* zu einer Fusion der beiden Gewebe kommt. Um die Fusionszone herum sieht man eine Anhäufung von großen sphäkulösen Zellen (Abbildungen 17). Bei Allotransplantaten hingegen bildet *Geodia cydonium* eine physico-chemische Barriere aus, die zwei inkompatible Allotransplantate voneinander trennt. Dies wurde schon früher bei einigen marinen und Süßwasser-Schwämmen beobachtet (HILDEMANN *et al.* 1979). HUMPHREYS (1994) beschreibt die Bildung einer kollagenösen Grenze zwischen zwei inkompatiblen Geweben bei dem Schwamm *Microciona prolifera*. Diesem Prozeß geht eine schnelle Anhäufung von sogenannten grauen Zellen an der Kontaktzone voraus. Bei *Geodia cydonium*

resultierte die Transplantation von inkompatiblen Gewebe mittels der Insertionstechnik in zellulärem Tod und Nekrose des Allotransplantates. Dies ist möglicherweise das Ergebnis cytotoxischer Interaktionen und vielleicht auch humoraler toxischer Faktoren.

In Autotransplantaten werden an den Fusionszonen Integrinrezeptoren stark hoch reguliert, was ihre funktionale Beteiligung vermuten läßt (WIMMER *et al.* 1999 a,b). Die Bindung dieser Rezeptoren an Kollagen oder Fibronektin liefert jedoch nicht genug Spezifität, um die funktionelle Interaktionen der Zellen eines multizellulären Individuums zu unterstützen. Folglich müssen zusätzliche Komponenten, die die Fusion von Selbstgewebe erlauben, existieren.

Da die beiden GCSAM zur Immunglobulin-Superfamilie gehören, liegt die Vermutung nahe, daß sie an einem Erkennungsprozeß von Selbst bzw. Fremd beteiligt sind. Um diese Beteiligung der SAM an der Erkennung von Selbst bzw. Fremd nachzuweisen, wurden mehrere Versuche durchgeführt.

Ein Versuch bestand in der Herstellung eines Antikörpers gegen die beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Dazu wurde dieses Fragment in einen Expressionsvektor gebracht und das rekombinante Protein aus *E.coli*-Kulturen gereinigt (Abbildung 5). Dieses Protein diente als Antigen bei der Herstellung polyklonaler Antikörper gegen die Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Die polyklonalen Antikörper wurden mittels Western Blot-Analysen charakterisiert (Abbildung 6). Sie reagierten im Proteintotalextrakt von *Geodia cydonium* am stärksten mit Proteinen zwischen 120 kDa und 100 kDa. Zwischen diesen Molekulargewichten ist eine breite Bande zu sehen. Da das theoretische Molekulargewicht der RTK 116 kDa beträgt, weist diese Bande auf eine starke Expression des *RTK*-Gens hin. Im Extrakt wird außerdem eine Bande bei 35 kDa detektiert. Für GCSAMS ergibt sich ein abgeleitetes Molekulargewicht von 33,9 kDa. Das 35 kDa-Protein könnte also einem glykosyliertem GCSAMS entsprechen. Ein Protein, welches GCSAML entspricht, wird nicht vom Antikörper erkannt. Der Grund hierfür könnte in der geringen Anzahl von SAML-Transkripten liegen.

Im Proteinextrakt des Fusionsgewebes der Autotranplantate zeigte sich nach Detektion mit dem TKIg-Antikörper eine 70 kD Bande, die in den Kontrolleextrakten nicht zu sehen ist (Abbildung 19). Das theoretische Molekulargewicht von GCSAML beträgt 61,4 kDa. Die Bande bei 70 kDa kann einer glykosylierten Form von GCSAML entsprechen. Die Bandenintensität sowohl der RTK als auch des GCSAMS

ändert sich nicht. Durch die Autotransplantation wird anscheinend die Genexpression von GCSAML verstärkt, während die Expression des RTK-Gens und des GCSAMS-Gens gleich bleibt. Diese Ergebnisse passen gut zu der Aussage, daß GCSAML ein instabiles Protein ist, während GCSAMS als stabiles Polypeptid eingeschätzt wurde (PC/GENE [PHYSICHEM]1995).

Die Proteinextrakte des Abstoßungsgewebes und des Pfropfgewebes der Allotransplantation zeigen beide die hochmolekularen Banden der RTK bei ungefähr 120 kDa und 100 kDa. Eine Doppelbande bei 70 kDa bzw. 68 kDa kann verschiedenen glykosylierten GCSAML-Proteinen entsprechen. Die 35 kDa-Bande von GCSAMS tritt ebenfalls bei beiden Extrakten in Erscheinung. Im Proteinextrakt des Pfropfgewebes treten zusätzliche Banden bei 45 kDa, 41 kDa, 34 kDa und 32 kDa auf, welche Abbauprodukte darstellen könnten, da der eingesetzte Pfropf schon nekrotische Degeneration zeigte (Abbildung 17 B). Im Proteinextrakt des Pfropfes werden die RTK-Banden deutlich schwächer als im Extrakt des Abstoßungsgewebes. Die 68 kDa-Bande hingegen wird im Pfropfextrakt wesentlich stärker als im Proteinextrakt des Abstoßungsgewebes.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß GCSAML und auch die RTK an der Erkennung von Selbst (Autotransplantation) und Nicht-Selbst (Allotransplantation) beteiligt sind. GCSAMS hingegen scheint zumindest keine auffällige Rolle zu spielen. Sicherlich sind die Vorgänge bei Fusion und Abstoßung sehr komplex. Je nach Aktivierungszustand der einzelnen Gene, kommt es zu einem unterschiedlichen Expressionsmuster der Proteine. Im Falle der Fusion könnte ein Zustand angetroffen worden sein, in dem *SAML* aktiviert ist und verstärkt exprimiert wird. Somit konnte das Protein – im Gegensatz zum Kontrollextrakt – detektiert werden. Die *RTK* und *SAMS* befinden sich noch im gleichen Aktivierungszustand. Im Falle der Abstoßung ist *SAML* ebenfalls aktiviert, während die RTK ihre Aufgabe bereits erfüllt hat und die Expression geringer ist. Allerdings könnte die RTK durch die nekrotische Degeneration des Gewebes bereits abgebaut werden – was sich in den zusätzlichen niedermolekularen Banden ausdrücken könnte.

In den Immunhistologischen Analysen zeigte sich, daß es an den Fusionszonen der Autotransplantate zu einer Hochregulierung der Proteine mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen kommt (Abbildung 17). Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der Western Blot-Analyse überein. Da der Antikörper nicht spezifisch für die Immunglobulin-ähnlichen Domänen der GCSAM ist, kann es auch zu einer

Detektion von RTK-Proteinen oder weiteren Proteinen mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen kommen. Die Versuche auf RNA-Ebene jedoch zeigen spezifisch, daß die GCSAM an der Fusion beteiligt sind. In Northern Blot-Analysen kam es zu einem deutlichen Anstieg der Expression des *GCSAML*-Transkriptes (Abbildung 18). Ob der Anstieg der *GCSAML*-Proteine in der Fusionszone der Autotransplantate auf eine Induzierung der entsprechenden Gene während des Transplantationsprozesses oder auf eine Einwanderung von speziellen Zellen in diese Zone zurückzuführen ist, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Letztere Möglichkeit wurde von HUMPHREYS (1994) bei der Untersuchung des Schwammes *Microciona prolifera* für die sogenannten grauen Zellen vorgeschlagen.

Die immunhistochemischen Analysen an *Suberites domuncula*-Gewebeschnitten zeigten, daß auch in diesem Schwamm Proteine mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen existieren (Abbildung 20). Dies ist aus der schwachen Fluoreszenz der Gewebeschnitte nach Inkubation mit dem anti-TKlg-Antikörper im Gegensatz zur Negativkontrolle zu schließen. Die starke Fluoreszenz nach der Inkubation der Gewebeschnitte mit *Geodia cydonium*-Proteintotalextrakt, weist wiederum auf eine Rolle der SAM-Proteine in der Erkennung von Fremd hin.

Aus diesen vier Versuchen – Western Blot-Analyse, Northern Blot-Analyse, Immunfluoreszenzuntersuchungen *Geodia*-Gewebeschnitte und Immunfluoreszenzuntersuchungen *Suberites*-Gewebeschnitte – geht deutlich hervor, daß besonders *GCSAML* an der Erkennung von Selbst und Fremd beteiligt ist. Welche Mechanismen und welcher Signalweg hierbei eine Rolle spielen muß noch geklärt werden. Ein Schritt in diese Richtung war die Suche nach einem Liganden für das *ITIM*-Motiv von *GCSAML*.

3 Inhibitorische Rezeptoren

Mitglieder der relativ neu entdeckten Klasse der inhibitorischen Rezeptoren besitzen sogenannte *ITIM*-Motive (*immune receptor tyrosine-based inhibitory motif*). Diese Rezeptoren modulieren Zellantworten durch die Erhöhung des Schwellenwertes für die Aktivierung und durch die Beendigung stimulatorischer Signale (BOLLAND UND RAVETCH 1999). Sie sind inaktiv, wenn sie mit sich selbst aggregieren, aber nach Coligation mit stimulatorischen Rezeptoren sind sie in der Lage zelluläre Signale zu unterdrücken. Strukturell gesehen gehören diese Rezeptoren entweder zur Immunglobulin-Superfamilie oder zur Lektin-ähnlichen-Superfamilie. Die cytoplasmatischen Domänen der inhibitorischen Rezeptoren enthalten ein oder mehrere *ITIMs*. *ITIMs* sind durch die Konsensussequenz (ILV)xYxx(LV) charakterisiert (VIVIER UND DAERON 1997, BURSHTYN *et al.* 1997). Beispiele für Mitglieder dieser Familie sind z.B. die KIR-Rezeptoren der NK (*natural killer*)-Zellen und CD22 auf B-Zellen. In einer Vielzahl von Fällen wurde gezeigt, daß *ITIM*-Sequenzen nach Coligation phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung schafft eine Bindungsstelle für Src-Homologie 2 (SH2)-Domänen-enthaltende cytoplasmatische Faktoren, die dann die inhibitorischen Signale intrazellulär weiterleiten können (MUTA *et al.* 1994, KUROIWA *et al.* 1998, GERGELY *et al.* 1999). Oft haben diese inhibitorischen Rezeptoren einen aktivierenden Rezeptorpartner, welcher hochhomologe extrazelluläre Domänen und einen kürzeren cytoplasmatischen Bereich hat, dem die Signalkapazität fehlt (BOLLAND UND RAVETCH 1999). Die Transmembrandomäne dieses aktivierenden Rezeptors ist durch die Anwesenheit einer geladenen Aminosäure charakterisiert. Dieses Merkmal ist typisch für Rezeptoren, die mit akzessorischen Untereinheiten assoziieren, die das aktivierende *ITAM* (*immunoreceptor tyrosin-based activating motif*)-Motiv enthalten (VELY UND VIVIER 1997). Die Funktion dieser aktivierenden Rezeptoren könnte in der Rekrutierung von Kinasen liegen, die die *ITIMs* der inhibitorischen Rezeptoren phosphorylieren.

Als Beispiel für die inhibitorischen Rezeptoren und deren Funktion stehen im Folgenden die KIR- (*Killer cell inhibitory receptors*) Rezeptoren der NK-Zellen.

NK-Zellen sind für die angeborene und erworbene Immunität von besonderer Bedeutung. Sie rearrangieren ihre Gene nicht und NK-Antworten können ohne klonale Expansion beginnen (LONG UND WAGTMANN 1997). Die Hauptliganden für die

inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zellen sind MHC-Moleküle der Klasse I. NK-ähnliche Zellen wurden schon bei Vögeln, Schlangen und Würmern charakterisiert, bis jetzt wurden die KIR-Moleküle und ihre aktivierenden Rezeptorpartner jedoch nur bei Säugetieren gefunden (KUBAGAWA *et al.* 1997).

Phosphorylierung der *ITAMs* aktivierender Rezeptoren führt zu einer Rekrutierung von Kinasen über SH2-Domänen-Interaktionen. Die Membranassoziation der PI3 (Phosphatidylinositol 3)-Kinase resultiert in der Produktion von PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphat) und der Ansammlung von PH (*Plecstrin-homology*)-Domänen-enthaltenden Faktoren wie BTK und PLC γ . Durch die Phosphorylierung von PLC γ durch BTK kommt es zur Aktivierung der PLC γ und nachfolgend zur Produktion von IP3. Dies wiederum führt zur Freisetzung von intrazellulärem Ca $^{2+}$ und daran anschließenden Einstrom von extrazellulären Ca $^{2+}$ (KAUFMAN *et al.* 1995). Die phosphorylierten *ITIM*-Sequenzen der KIR führen zur Rekrutierung der Tyrosinphosphatase SHP-1 (D'AMBROSIO *et al.* 1995). Diese dephosphoryliert dann die *ITAMs* der aktivierenden Rezeptoren und auch die assoziierten Kinasen. Alle folgenden Schritte des oben beschriebenen Signalweges werden dadurch gestoppt (Abbildung 26) (BLERY *et al.* 1997).

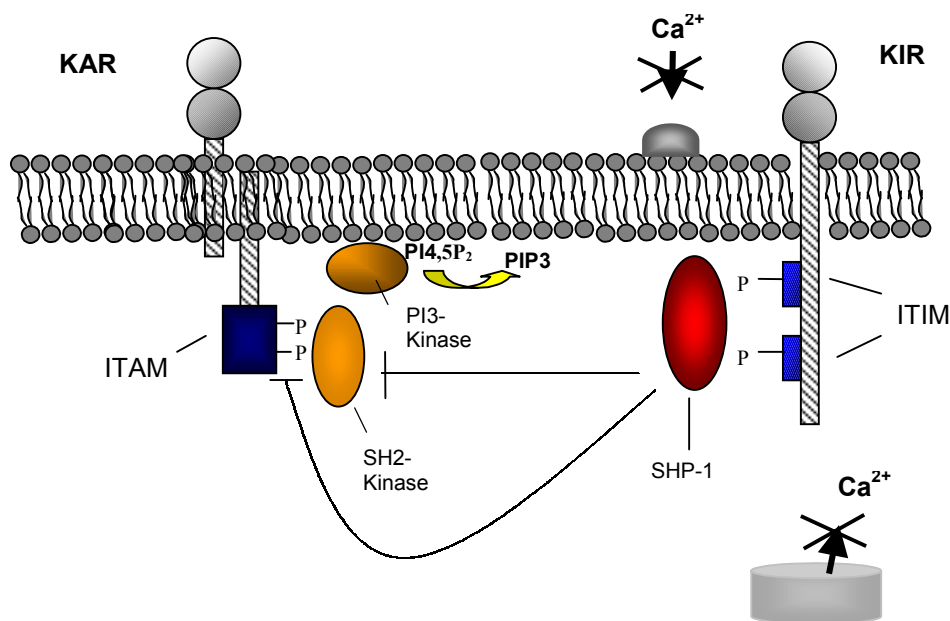


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Signalweges der KIR-Rezeptoren. Die phosphorylierten *ITIM*-Sequenzen des KIR rekrutieren die SHP-1. Diese dephosphoryliert die *ITAMs* und die assoziierten Kinasen. Dies wiederum führt im weiteren zur Inhibierung des Ca $^{2+}$ -Einstroms und zur Freisetzung von intrazellulären Ca $^{2+}$. KAR= Killer cell activatory receptor, KIR = Killer cell inhibitory receptor, *ITAM* = immunoreceptor tyrosine-based activatory motif, *ITIM* = immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif, SHP-1 = SH-Domänen enthaltende Tyrosinphosphatase 1. Verändert nach BOLLAND UND RAVETCH (1999).

Anstelle der Tyrosinphosphatase SHP-1 kann auch die SH2-enhaltende Inositol 5-Polyphosphat-Phosphatase (SHIP) an die phosphorylierten ITIMs binden. In diesem Fall kommt es nicht zu einer Hemmung der Freisetzung intrazellulären Ca^{2+} , sondern nur zur Inhibierung des extrazellulären Ca^{2+} -Einstroms (BOLLAND UND RAVETCH 1999).

Da SAML ein *ITIM*-Motiv besitzt und zur Immunglobulin-Superfamilie gehört, kann man es auch zur neuen Familie der inhibitorischen Rezeptoren zählen. Auch die Existenz eines zweiten, in den extrazellulären Domänen hochhomologen Rezeptorpartners ist mit SAMS gegeben. Allerdings fehlt SAMS die geladenen Aminosäure im Transmembranbereich.

In einer Western Blot-Analyse, in der die Proteintotalextrakte aus *Geodia cydonium* mit dem *ITIM*-Peptid von GCSAML inkubiert wurden, zeigte sich eine Bande bei ca. 116 kDa und eine weitere bei 48 kDa. Die in der Literatur diskutierten Bindungspartner SHP-1 (62 kDa), SHP-2 (70 kDa) und SHIP (145 kDa) stimmen vom Molekulargewicht nicht mit der gefundenen Bande überein. Die 116 kDa-Bande könnte die RTK darstellen, der eine Rolle bei der Phosphorylierung des *ITIM*-Motives zukommen und die an eventuell nicht phosphorylierte Peptide binden könnte. Ob im Schwamm überhaupt eine SH-Domänen enthaltende Tyrosin-Phosphatase existiert, ist noch nicht geklärt.

Die Messung der intrazellulären Calciumionen-Konzentration entspricht ebenfalls den vorhin erläuterten Mechanismen der inhibitorischen Rezeptoren. Wurden die dissoziierten *Geodia cydonium*-Zellen nur mit extrazellulärem Ca^{2+} inkubiert, stieg die intrazelluläre Calciumionenkonzentration deutlich ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) an. Wurden die Zellen zuerst mit anti-TKlg-Antikörper inkubiert, führte die Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} zu einer geringeren Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als im vorherigen Experiment (Abbildung 22). Dies kann mit einer Aktivierung der inhibitorischen Rezeptoren und einer nachfolgenden Inhibierung des extrazellulären Ca^{2+} -Einstroms – wie es für die KIRs der NK-Zellen beschrieben wurde – begründet werden.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Der evolutionär älteste Tierstamm der Metazoa, die Schwämme (Porifera), bietet sich als Modellorganismus zur Untersuchung von Selbst/Fremd-Erkennung an. Bei der Evolution von einzelligen zu mehrzelligen Tieren wurde diese Unterscheidung wichtig. Bei den Vertebraten tritt das Immunsystem bei der Unterscheidung von Selbst und Fremd in Erscheinung. Die Immunrezeptoren sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Das Schwämme ein angeborenes Immunsystem besitzen, ist schon länger bekannt. Ob sie auch Vorläufer von Immunrezeptoren aufweisen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden.

Ein erster Schritt stellte die Identifizierung weiterer Gene mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen dar. Mit der Isolierung der beiden „Schwamm-Adhäsionsmoleküle“ GCSAML und GCSAMS durch ein Homologiescreening ist dies gelungen.

Desweiteren sollte die Beteiligung dieser Moleküle an einer Immunantwort mit Hilfe von Transplantationsexperimenten untersucht werden. Die Gewebe von Autotransplantaten fusionierten, während es bei Allotransplantationen zu einer Abstoßung des eingesetzten Gewebes kam. Durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen sowohl an *Geodia cydonium*-Zellen als auch an *Suberites domuncula*-Zellen konnte gezeigt werden, daß Moleküle mit Immunglobulin-ähnlichen Domänen an den Reaktionen der Selbst/Fremd-Unterscheidung beteiligt sind. Northern Blot-Analysen belegten die Beteiligung speziell von GCSAML an der Autotransplantation. Western Blot-Analysen bestätigten diese Ergebnisse und weiteten sie auf Allotransplantationen aus.

Beide GCSAM-Gene können der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet werden. Durch den unterschiedlichen Aufbau der Gene – SAMS fehlt im Gegensatz zu SAML und RTK das Intron zwischen den Immunglobulin-ähnlichen Domänen – konnte ein weiterer Hinweis auf die „Intron-late“-Hypothese im Schwamm *Geodia cydonium* gefunden werden.

GCSAML kann durch die Existenz des sogenannten ITIM-Motives in die spezielle Klasse der inhibitorischen Rezeptoren gruppiert werden und stellt damit einen Vorläufer der Immunrezeptoren dar.

VI ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1 Abkürzungen

AF	Aggregationsfaktor
AIF	<i>Allograft-inflammatory-factor</i>
AP	alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i> (zweifach destilliertes Wasser)
AR	Aggregationsrezeptor
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl Phosphat
bp	Basenpaare (<i>base pair(s)</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i> (mRNA Abschrift)
C-Domäne	<i>constant</i> (konstante) Domäne
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DIG	Digoxygenin
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMAP	Endotheliales Monocyten-aktivierendes Polypeptid
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GPX	Glutathion-Peroxidase
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i> (Interzelluläres Adhäsionsmolekül)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	β -D- Isopropyl-Thiogalactopyranosid
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosin based activation motif</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosin based inhibitory motif</i>
kB	<i>kilobase(s)</i> ; KiloBasen
kDa	KiloDalton
KIR	<i>killer cell inhibitory receptor</i> Inhibitorischer Rezeptor der „Natural Killer“-Zellen
LB	<i>Luria Bertani</i> - Medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNS (<i>messenger RNA</i>)
NBT	4-Nitro-Tetrazoliumblausäure

NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i> (Neuronale Zelladhäsionsmolekül)
NK-Zellen	„Natural Killer“-Zellen
NTA	Nitrilo-Tri-Essigsäure
OD	optische Dichte
OPA	<i>One phor all buffer plus</i> (PHARMACIA, Freiburg)
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pfu	<i>plaque forming units</i>
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5,-trisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidifluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAM	Schwamm-Adhäsionsmolekül (<i>Sponge adhesion molecule</i>)
SAML	Schwamm-Adhäsionsmolekül, lange Form
SAMS	Schwamm-Adhäsionsmolekül, kurze Form
SCR	<i>short consensus repeat</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SHIP	SH2-enhaltende Inositol 5-Polyphosphat Phosphatase
SM	Suspensionsmedium
SRCR	<i>scavenger receptor cystein rich</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenediamine
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperatur</i>)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Tumornekrose-Faktor)
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
TSS	Transformations- und Aufbewahrungslösung (<i>Transforming and storage solution</i>)
U	<i>units</i> (Einheiten oder Enzymaktivitäten)
UV	Ultraviolett
V-Domäne	<i>variable</i> (variable) Domäne

2 Abkürzungen für Aminosäuren und Basen

Aminosäure

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

Aminosäure

Leucin	Leu	L
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

Abkürzung

Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. und Lipman J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Amzel L.M. und Poljak R.J. (1979). Three-dimensional structure of Igs. *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 961-997.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Smith J.A., Seidmann J.G. und Struhl K. (1994). *Curr. Prot. Mol. Biol.* John Wiley and Sons, New York.
- Bairoch A. (1992). The prosite textbook. In: PC/GENE (Analytical software, IntelliGenetics Inc., Mountain View, CA).
- Bartl S. und Weissman I.L. (1994). Isolation and characterization of major HC class II B genes from the nurse shark. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 262-266.
- Beck G. und Habicht G.S. (1997). Das Wirbeltier-Immunsystem. Vorformen bei Wirbellosen. *Spektrum der Wissenschaften* **1**, 30-35.
- Benian G.M., Tinley T.L., Tang X. und Borodovsky M. (1996). The *Caenorhabditis elegans* gene Unc-89, required for muscle M-line assembly, encodes a giant modular protein composed of Ig and signal transduction domains. *J. Cell Biol.* **132**, 835-848.
- Bengston S. (Hrsg) (1994). Early life on earth. New York: Columbia University Press.
- Benton W.D. und Davis R.W. (1977). Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**, 180-182.
- Bigger C.H., Jokiel P.L., Hildemann W.H. und Johnston I.S. (1982). Characterization of memory in a sponge. *J. Immunol.* **129**, 1570-1572.
- Birnboim H.C. und Doly J. (1979). *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1522.
- Blery M., Delon J., Trautmann A., Cambiaggi A., Olcese L., Biassoni R., Moretta L., Chavrier P., Moretta A., Dayeron M. und Vivier E. (1997). Reconstituted killer cell inhibitory receptors for major histocompatibility complex Class I molecules control mast cell activation induced via immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *J. Biol. Chem.* **272**, 8989-8996.
- Blumbach B., Pancer Z., Diehl-Seifert B., Steffen R., Münkner J., Müller I. und Müller W.E.G. (1998). The putative sponge aggregation receptor: isolation and characterization of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains and short consensus repeats. *J. Cell. Sci.* **111**, 2635-2644.

- Bolland S. und Ravetch J.V. (1999). Inhibitory Pathways Triggered by ITIM-containing Receptors. *Adv. Immunol.* **72**, 149-175.
- Bourgois A. (1975). Evidence for an ancestral immunoglobulin gene coding for half a domain. *Immunochem.* **12**, 873-876.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Burnette N.W. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Burshtyn D.N., Yang W., Yi T. und Long E.O. (1997). A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. *J. Biol. Chem.* **272**, 13066-13072.
- Buscema M. und Van de Vyver G. (1983). Variability of allograft rejection processes in *Axinella verrucosa*. *Dev. Comp. Immunol.* **7**, 613-616.
- Cavalier-Smith T. (1985). Selfish DNA and the origin of introns. *Nature* **315**, 283-284.
- Chen M.H., Shen Z.M., Bobin S., Kahn P.C. und Lipke, P.N. (1995). Structure of *Saccharomyces cerevisia* α agglutinin: evidence for a yeast cell wall protein with multiple immunoglobulin-like domains with atypical disulfides. *J. Biol. Chem.* **270**, 26168-26177.
- Chung C.T., Niemela S.L. und Miller R.H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 2172-2175.
- Cikryt P., Feuerstein S. und Wendel A. (1982). Selenium- and non-selenium-dependent glutathione peroxidase in mouse liver. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 2873-2877.
- Clark J.M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**, 9677-9686.
- Conway M.S. (1993). The fossil record and the early evolution of the Metazoa. *Nature* **361**, 219-225.
- Crick F. (1979). Split genes and RNA splicing. *Science* **204**, 264-271.

- D'Ambrosio D., Hippen K.L., Minskoff S.A., Mellman I., Pani G., Siminovitch K.A. und Cambier J.C. (1995). Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1. *Science* **268**, 293-297.
- Daggfeldt A, Bengton E. und Pilstrom L. (1993). A cluster type organization of the loci of the Immunoglobulin light chain in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) indicated by nucleotide sequences of cDNAs and hybridization analysis. *Immunogenetics* **38**, 199-209.
- Darnell J.E. (1978). Implications of RNA. RNA splicing in evolution of eukaryotic cells. *Science* **202**, 1257-1260.
- Darnell J.E. und Doolittle W.F. (1986). Speculations on the early course of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1271-1275.
- Doolittle R.F. (1995). Similar amino acid sequences revisited. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 244-245.
- DuPasquier L. (1993). Evolution of the Immune System in *Fundamental Immunology*, 3rd ed. Paul, W.E. (Hrsg.), Raven, New York.
- Eickbush T.H. und Moudrianakis E.N. (1978). The compaction of DNA-helices into eithercontinuous supercoils of folded fiber rods and toroids. *Cell* **13**, 295-306.
- Fritig B., Heitz T. und Legrand M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 16-22.
- Gamulin V., Skorokhod A., Kavsan V., Müller I.M. und Müller W.E.G. (1997). Experimental indication against blockwise evolution of metazoan protein molecules: example, receptor tyrosine kinase gene from the sponge *Geodia cydonium*. *J. Mol. Evol.* **44**, 242-252.
- Gergely J., Pecht I. und Sármay G. (1999). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing receptors regulate the immunoreceptor tyrosine-based activation motif-induced activation of immune competent cells. *Immunol. Lett.* **68**, 3-15.
- Gilbert W. (1978). Why genes in pieces? *Nature* **271**, 501.
- Gilbert W. (1986). The RNA world. *Nature* **319**, 618.
- Greenberg A.S., Steiner L., Kasahara M. und Flajnik M.F. (1993). Isolation of a shark immunoglobulin light chain cDNA clone encoding a protein resembling mammalian κ light chains: Implications for the evolution of light chain. *Immunology* **90**, 10603-10608.

- Grynkiewicz G., Poehie M. und Tsien R.Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.
- Halaby D.M. und Mornon J.P.E. (1998). The Immunoglobulin Superfamily: An insight on its tissue, species, and functional diversity. *J. Mol. Evol.* **46**, 389-400.
- Harlow E. und Lane D. (1988). *Antibodies- A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Harpaz Y. und Chotha C. (1994). Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J. Mol. Biol.* **238**, 528-532.
- Hashimoto K., Nakanishi T. und Kurosawa Y. (1992) Identification of a shark sequence resembling the major histocompatibility complex class I α 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2209-2212.
- Hildemann W.H., Johnston, I.S. und Jokiel P.L. (1979). Immunocompetence in the lowest metazoan phylum: Transplantation immunity in sponges. *Science* **204**, 420-422.
- Hill R.L., Delaney R., Fellows R.E. und Lebovitz H.E. (1966). The evolutionary origins of T cell receptors. *Sem. Immunol.* **6**, 361-363.
- Hohmann V.S., Schluter S.F. und Marchalonis J.J. (1992). Complete sequence of a cDNA clone specifying sandbar shark immunoglobulin light chain: Gene organization and implications for the evolution of light chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 276-280.
- Hondal R. und Schaeffer C. (1995) *Epicentre Forum* **2** (3), 5
- Holden H.M., Ito M., Hartshorne D.J. und Rayment I. (1992). X-ray structure determination of Telokin, the C-terminal domain of myosin light chain kinase, at 2.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**, 840-851.
- Hood L., Kronenberg M. und Hunkapiller, T. (1985). T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* **40**, 225- 229.
- Hood L. und Hunkapiller T. (1991). Molecular evolution and the immunoglobulin gene superfamily. In: Osawa S. und Honjo T. (Hrsg.): *Evolution of Life*, 23-143, Springer Verlag, Tokyo.

- Hordvik I., Voie A.M., Glette J., Male R. und Endresen C. (1992). Cloning and sequence analysis of two isotypic IgM heavy chain genes from Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Eur. J. Immunol.* **22**, 2957-2962.
- Humphreys T. (1994). Rapid allogeneic recognition in the marine sponge *Microciona prolifera*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **712**, 342-345.
- Hunkapiller T. und Hood L. (1986). The growing immunoglobulin gene superfamily. *Nature* **323**, 15-16.
- Hunkapiller T. und Hood L. (1989). Diversity of the immunoglobulins through evolution. *Adv. Immunol.* **44**, 1-63.
- Johansson M.W. und Söderhall K. (1996). The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **15**, 46-50.
- Jones E.Y., Harlos K., Bottomley M.J.H. und Robinson R.C. (1995). Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1,8 Å resolution. *Nature* **360**, 232-239.
- Jones W.C. (1957). The contractility and healing behavior of pieces of *Leucosolenia complicata*. *Q. J. Microsc. Sci.* **71**, 203-217.
- Kaestner A. (1993). Lehrbuch der speziellen Zoologie. Band I: Wirbellose Tiere, Gruner H.E. (Hrsg.). 1. Teil: Einführung Protozoa, Placozoa, Porifera. Gustav Fischer Verlag Jena, 5. Auflage, 251-297.
- Kao J., Fan Y., Haehnel I., Brett J. (1994). A peptide derived from the amino terminus of endothelial-monocytes-activating polypeptide II modulates mononuclear and polymorphonuclear leukocyte functions, defines an apparently novel cellular interaction site, and induces an acute inflammatory response. *J. Biol. Chem.* **169**, 9774-9779.
- Kasahara M., Vazquez M., Sato K., McKinney E.C. und Flajnik M.F. (1992). Evolution of the major histocompatibility complex: Isolation of a class II A gene from the cartilaginous fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6688-6691.
- Kasahara M., McKinney E.C., Flajnik M.F. und Ishibashi T. (1993). The evolutionary origin of the major histocompatibility complex: Polymorphism of class II α chain genes in the cartilaginous fish. *Eur. J. Immunol.* **23**, 2160-2164.
- Kaufman D.S., Schoon R.A., Robertson M. J. und Leibson P.J. (1995). Inhibition of selective signaling events in natural killer cells recognizing major histocompatibility complex class I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6484-6488.

- Keller R. (1987). Immunologie und Immunpathologie. Thieme Verlag, Stuttgart, 35-37.
- Klein J. (1989). Are invertebrates capable of anticipatory immune responses? *Scand. J. Immunol.* **29**, 499-505.
- Kokubu F., Litman R., Shablott M.J., Hinds K. und Litman G.W. (1988). Diverse organization of immunoglobulin V_H gene loci in a primitive vertebrate. *EMBO J.* **7**, 3413-3422.
- Kozak M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates transcription by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- Kozak, M. (1991). An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell. Biol.* **115**, 887-903.
- Kruse M., Steffen R., Batel R., Müller I.M. und Müller W.E.G. (1999). Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponge. *J. Cell Sci.* **112**, 4305-4313.
- Kubagawa H., Burrows P.D. und Cooper, M.D. (1997). A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5261-5266.
- Kuroiwa A., Yamashita Y., Inui M., Yuasa T., Ono M., Nagabukuro A., Matsuda Y. und Takai T. (1998). Association of tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2, inositol 5-phosphatase SHIP with gp49B1, and chromosomal assignment of the gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 1070-1074.
- Kyhse-Andersen J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lek L.-H., Yang E.-B., Wang D.-F. und Cheng L.-Y. (1995) Comparison of the sensitivity of different India inks staining of electro-blotted proteins on filter membranes. *J. Biochem. Biophys. Methods* **30**, 9-20.
- 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**, 93-97.

- Lipke P. N. (1996). Cell adhesion proteins in the non-vertebrate eukaryotes. *Progr. Molec. Subcell. Biol.* **17**, 119-157.
- Litman G.W., Murphy K., Berger L., Litman R., Hinds K. und Erickson B. W. (1985). Complete nucleotide sequence of three VH genes in *Caiman*, a phylogenetically ancient reptile: Evolutionary diversification in coding segments and variation in the structure and organization of recombination elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 844-848.
- Long E.O. und Wagtmann N. (1997). Natural killer cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 345-350.
- Lundberg K.S., Shoemaker D.D., Adams M.W., Short J. M., Sorge J.A. und Mathur E.J. (1991). High fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6.
- Mackie G.O. und Singla C.L., 1983. Studies on hexactinellid sponges. I, Histology of *Rhabdocalyptus dawsoni* (Lambe, 1873). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B 301**, 365-400.
- Maniatis T. und Reed R. (1987). The role of small nuclear ribonucleo protein particles in pre-mRNA splicing. *Nature* **325**, 673-678.
- Marchalonis J.J. und Schluter S.F. (1990a). On the relevance of invertebrate recognition and defense mechanisms to the emergence of the immune response of vertebrates. *Scand. J. Immunol.* **32**, 12-18.
- Marchalonis J.J. und Schluter S.F. (1990b). Origins of immunoglobulins and immune recognition molecules. *BioScience* **40**, 758-761.
- 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: *Sponge Science- Multidisciplinary Perspectives*. Watanabe Y. und Fusetani N. (Hrsg.), Springer, Tokyo, 133-156.
- Mizuno M., Takabatake T., Takahashi T.C., und Takeshima K. (1997). pax-6 gene expression in newt eye development. *Dev. Genes Evol.* **207**, 167-176.
- Moscona A.A. (1968). Cell aggregation: properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems. *Dev. Biol.* **18**, 250-277.
- Müller W.E.G. (1995). Molecular phylogeny of Metazoa (animals): Monophyletic origin. *Naturwiss.* **82**, 36-38.
- Müller W.E.G. (1998). Origin of Metazoa: sponges as living fossils. *Naturwiss.* **85**, 11-25.

- Müller W.E.G. und Zahn R.K. (1973). Purification and characterization of a species-specific aggregation factor in sponges. *Exp. Cell Res.* **80**, 95-104.
- Mukai H. (1992). Allogeneic recognition and sex differentiation in chimeras of the freshwater sponge *Ephydatia muelleri*. *J. Exp. Zool.* **264**, 298-311.
- 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.
- Muta T., Kurosaki T., Misolovin Z., Sanchez M., Nussenzweig M.C. und Ravetch J.V. (1994). A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* **368**, 70-73.
- Nicholas K.B. und Nicholas, H.B.Jr. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Version 1.1.004. Distributed by the author; cris.com/~ketchup/genedoc.shtml; INTERNET.
- Ohlendieck K., Dhume S. T., Partin J.S. und Lennarz W. S. (1993). The sea urchin egg receptor for sperm: isolation and characterization of the intact, biologically receptor. *J. Cell. Biol.* **122**, 887-895.
- Pahler S., Blumbach B., Müller I. und Müller W.E.G. (1998). A putative multiadhesive basal lamina protein from the marine sponge *Geodia cydonium*: cloning of the cDNA encoding a fibronectin-, an SRCR- as well as a complement control protein module. *J. Exp. Zool.* **282**, 332-343.
- Pancer Z., Kruse M., Schäcke H., Scheffer U., Steffen R., Kovács P. und Müller W.E.G. (1996). Polymorphism in the immunoglobulin-like domains of the receptor tyrosine kinase from the sponge *Geodia cydonium*. *Cell Ad. Com.* **4**, 327-339.
- Paris J. (1961). Contribution à la biologie des eponges siliceuses *Tethya lyncurium* Lmck. et *Suberites domuncula* O.: Histologie des greffes et serologie. *Vie et Milieu* **11**, 1.
- Patthy L. (1995). Protein Evolution by Exon-Shuffling. Springer, New York.
- Patthy L. (1999) Genome evolution and the evolution of exon-shuffling –a review. *Gene* **238**, 103-114.
- Pearson W.R. und Lipman D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.

- Pfuhl M. und Pastore A. (1995). Tertiary structure of an immunoglobulin-like domain from the giant muscle protein titin: a new member of the I-set. *Structure* **3**, 391-401.
- Rast J.P., Anderson M.K., Strong S.J., Luer C., Litman R.T. und Litman G.W. (1997). α , β , γ and δ T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. *Immunity* **6**, 1-3.
- Rast J.P. und Litman G.W. (1994). T-cell receptor gene homologs are present in the most primitive jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9248-9252.
- Reiswig H.M. und Mackie G.O. (1983): Studies on hexactinellid sponges. III. The taxonomic status of the Hexactinellida within the Porifera. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B 301**, 419-428.
- Reynaud C.A., Dahan A., Anquez V. und Weill, J.C. (1989). Somatic hyperconversion diversifies the single V_H gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* **59**, 171-183.
- Riboldi P., Gaidano G., Schettino E.W., Steger T.G., Knowles D.M., Dalla-Favera R. und Casali P. (1994). Two acquired immunodeficiency syndrome-associated Burkitt's lymphomas produce specific anti-IgM cold agglutinins using somatically mutated VH4-21 segments. *Blood* **83**, 2952-2961.
- Saiki R.K., Scharf S.J., Faloona F., Mullis K.B., 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.
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989). Molecular cloning I-III. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schäcke H., Rinkevich B., Gamulin V., Müller I.M., Müller W.E.G. (1994). Immunoglobulin-like domain is present in the extracellular part of the receptor tyrosine kinase from the marine sponge *Geodia cydonium*. *J. Mol. Recog.* **7**, 272-276.
- Schluter S.F., Hohman V.S., Edmundson A.G. und Marchalonis J.J. (1989). Evolution of immunoglobulin light chains: cDNA clones specifying sandbar shark constant regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9961-9965.

- Schwager J., Grossberger D. und Du Pasquier L. (1988). Organization and rearrangement of immunoglobulin M genes in the amphibian *Xenopus*. *EMBO J.* **7**, 2409-2415.
- Simpson T.L. (1984). *The Cell Biology of Sponges*. Springer-Verlag, New York.
- Smith L.C. und Hildemann W.H. (1986). Allogeneic cell interactions during graft rejection in *Callyspongia diffusa* (Porifera; Demospongia); a study with monoclonal antibodies. *Proc. R. Soc. Lon.* **B 226**, 465-477.
- Smith D.K. und Xue H. (1997). Sequence profiles of Immunoglobulin and Immunoglobulin-like domains. *J. Mol. Biol.* **274**, 530-545.
- Söderhall K. und Cerenius L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 23-28.
- Thomsen N.K., Soroka V., Jensen P.H., Berezin V., Kiselyov V.V., Bock E. und Poulsen F.M. (1996). The three-dimensional structure of the first domain of neural cell adhesion molecule. *Nature Struct. Biol.* **3**, 581-585.
- Thompson J.D., Higgins D.G. und Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Ullmann A., Jacob F. und Monod J. (1967). Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **24**, 339.
- Utans U., Arceci R.J., Yamashita Y. und Russell M.E. (1995). Cloning and characterization of Allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection. *J. Clin. Invest.* **95**, 2954-2957.
- Utans U., Quist W.C. und McManus B.M. (1996). Allograft inflammatory factor-1: a cytokine-responsive macrophage molecule expressed in transplanted human hearts. *Transplantation* **61**, 1387-1392.
- Van de Vyver G. und Buscema M. (1990). Diversity of immune reactions in the sponge *Axinella polypoides*. In: Rützler K (Hrsg). *New perspectives in sponge biology*. Washington DC, Smithsonian Institution Press, 96-107.

- Vandesande F. (1983). Immunohistochemical double staining techniques. In: *Immunohistochemistry*, Cuello A.C. (Hrsg.), Wiley, New York, 257-272.
- Vély F. und Vivier E. (1997). Conservation of structural features reveals the existence of a large family of inhibitory cell surface receptors and noninhibitory/activatory counterparts. *J.Immunol.* **159**, 2075-2077.
- Vivier E. und Daeron M. (1997). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol. Today* **18**, 286-291.
- Vogelstein B. und Gillespie D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* **76**, 615-619.
- Weber K. und Osborn M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
- Wehner G. und Gehring W. (1990). Zoologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 618-624.
- Welschof M., Terness P., Kolbinger F., Zewe M., Duebel S., Doesham H., Hain C., Finger M., Jung M., Moldenhauer G., Hayashi N., Little M. und Opelz G. (1995). Amino acid sequence based PCR primers for amplification of rearranged human heavy and light chain immunoglobulin variable region genes. *J. Immunol. Methods* **179**, 203-214.
- Westheide W. und Rieger R. (1996). Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 75-119.
- Wiens M., Koziol C., Hassanein H.M.A., Batel R. und Müller W.E.G. (1998). Expression of the chaperones 14-3-3 and HSP70 induced by PCB 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Mar Ecol Prog Ser* **165**, 247-257.
- Wiens M., Koziol C., Hassanein H.M.A., Müller I.M. und Müller W.E.G. (1999). A homolog of the putative tumor suppressor QM in the sponge *Suberites domuncula*: downregulation during the transition from immortal to mortal (apoptotic) cells. *Tissue Cell.* **31**, 163-169.
- Wimmer W., Blumbach B., Diehl-Seifert B., Koziol C., Batel R., Steffen R., Müller I.M. und Müller W.E.G. (1999a). Increased expression of integrin and receptor tyrosine kinase genes during autograft fusion in the sponge *Geodia cydonium*. *Cell Adhes. Commun.* **7**, 111-124.
- Wimmer W., Perovic S., Kruse M., Schröder H.-C., Krasko A., Batel R. und Müller W.E.G. (1999b). Origin of the integrin-mediated signal transduction. Functional

- studies with cell cultures from the sponge *Suberites domuncula*. *Eur. J. Biochem.* **260**, 156-165.
- Williams A.F., Barclay A.N., Clark S.J., Paterson D.J. und Willis A.C. (1987). Similarities in sequences and cellular expression between rat CD2 and CD4 antigens. *J. Exp. Med.* **165**, 368-380.
- Williams A. F. und Barclay A. N. (1988). The immunoglobulin superfamily - domains for cell surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* **6**, 381-405.
- Williams A.F., Davis S.J., He W. und Barclay A.N. (1989). Structural diversity in domains of the immunoglobulin superfamily. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **54**, 637-647.
- Wilson H.V. (1907). On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J. Exptl. Zool.* **5**, 245-258.
- Zarkower D., Stephenson P., Sheets M. und Wickens M. (1986). The AAUAAA sequence is required both for cleavage and for polyadenylation of simian virus 40 pre-mRNA *in vitro*. *Molec. Cell. Biol.* **6**, 2317-2323.

PUBLIKATIONSLISTE

- Wagner-Hülsmann C., Bachinski N., Diehl-Seifert B., **Blumbach B.**, Steffen R., Pancer Z. und Müller W.E.G. (1996). A Galectin Links the Aggregation Factor to Cells in the Sponge [*Geodia cydonium*] System. *Glycobiol.* **6**, 785-793.
- Müller W.E.G., **Blumbach B.**, Wagner-Hülsmann C. und Lessel U. (1997). Galectins in the Phylogenetically Oldest Metazoa, the Sponges [Porifera]. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **9**, 123-130.
- Pancer Z., Skorokhod A., **Blumbach B.** und Müller W.E.G. (1998). Multiple Ig-like Featuring Genes Divergent Within and Among Individuals of the Marine Sponge *Geodia cydonium*. *Gene* **207**, 227-233.
- Pahler S., **Blumbach B.**, Müller I. und Müller W.E.G. (1998). Putative Multiadhesive Protein from the Marine Sponge *Geodia cydonium*: Cloning of the cDNA Encoding a Fibronectin-, an SRCR- as well as a Complement Control Protein Module. *J. Exp. Zool.* **282**, 332-343.
- Blumbach B.**, Pancer Z., Diehl-Seifert B., Steffen R., Münkner J., Müller I. und Müller W.E.G. (1998). The Putative Sponge Aggregation Receptor: Isolation and Characterization of a Molecule Composed of Scavenger Receptor Cysteine-rich Domains and Short Consensus Repeats. *J. Cell Sci.* **111**, 2635-2644.
- 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.
- Wimmer W., **Blumbach B.**, Diehl-Seifert B., Koziol C., Batel R., Steffen R., Müller I.M. und Müller W.E.G. (1999). Increased Expression of Integrin and Receptor Tyrosine Kinase Genes during Autograft Fusion in the Sponge *Geodia cydonium*. *Cell Adhesion Commun.* **7**, 111-124.
- Müller W.E.G., Kruse M., **Blumbach B.**, Skorokhod A. und Müller I.M. (1999). Gene Structure and Function of the Tyrosine Kinases in the Marine Sponge *Geodia cydonium*: Autapomorphic Characters of Metazoa. *Gene* **238**, 179-193.
- Müller W.E.G. , **Blumbach B.** und Müller I.M. (1999). Evolution of the Innate and Adaptive Immune Systems: Relationships Between potential Immune molecules in the Lowest Metazoan Phylum [Porifera] and Those in Vertebrates. *Transplantation* **68**, 1215-1227.

Die vorliegende Dissertation entstand im Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Abteilung für Angewandte Molekularbiologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Zeit von April 1996 bis April 2000.

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die genannten Hilfsmittel verwendet zu haben.

Mainz, April 2000