

**Klonierung und funktionelle
Charakterisierung von zwei
Zelladhäsionsmolekülen
aus den marinen Schwämmen
Geodia cydonium und *Suberites domuncula***

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
„Doktor
der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Joachim Schütze
geb. in Wittmund

Mainz, 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 27.2.2002

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1.	Porifera	7
1.2.	Der Aggregationsfaktor	10
1.2.1.	Zellaggregation in Schwämmen	10
1.2.2.	Isolation und Zusammensetzung	11
1.2.3.	Elektronenmikroskopische Struktur	12
1.2.4.	Aggregationsrezeptoren	14
1.2.5.	Aggregationsfaktor und Histokompatibilität	15
1.3.	Amphiphysin	16
1.3.1.	Amphiphysin und Endocytose	16
1.3.2.	Eigenschaften und Vorkommen von Amphiphysin	16
1.3.3.	Funktion von Amphiphysin	17
1.4.	Dermatopontin	19
1.4.1.	Struktur und Vorkommen von Dermatopontin	19
1.4.2.	Funktion von Dermatopontin	21
2.	Zielsetzung	23
3.	Material	24
3.1.	Chemikalien	24
3.2.	Verbrauchsmaterialien	24
3.3.	Geräte	25
3.4.	Enzyme	26
3.5.	Kits	27
3.6.	Vektoren	27
3.7.	Marker	28
3.8.	Primer	28
3.9.	Bakterienstämme	30
3.10.	Antikörper	30
4.	Methoden	31
4.1.	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
4.1.1.	Berechnung der Schmelztemperatur der Primer	32
4.1.2.	Screening der cDNA-Bank mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion	32

4.1.3.	Durchführung der PCR	33
4.2.	Gelelektrophorese	33
4.2.1.	Herstellung des Gels	34
4.3.	Gelfärbung mit Ethidiumbromid	34
4.4.	Reinigung der PCR-Produkte	35
4.4.1.	Reinigung des PCR-Ansatzes	35
4.4.2.	Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen	36
4.5.	Ligation der PCR-Produkte	36
4.6.	Transformation	37
4.6.1.	Herstellung kompetenter Bakterien	37
4.6.2.	Messung der optischen Dichte (OD) einer Zellkultur	38
4.6.3.	Transformation	39
4.6.4.	Selektion der transformierten Bakterien	39
4.7.	Plasmidpräparation	40
4.8.	Messung der Konzentration und Reinheit einer DNA/RNA-Lösung	41
4.9.	Restriktionsverdau der gewonnenen Plasmide	42
4.10.	Checking-PCR	42
4.11.	Herstellung einer Dauerkultur	43
4.12.	DNA-Sequenzierung	43
4.12.1.	Sequenzierreaktion	44
4.12.2.	Gießen des Elektrophoresegels	45
4.12.3.	Gelelektrophorese	45
4.12.4.	Auswertung des Gellaufs	46
4.12.5.	Analyse der Sequenzdaten	46
4.13.	Subklonierung	46
4.14.	RNA-Präparation	47
4.14.	DEPC-Behandlung von Lösungen und Verbrauchsmaterialien	47
4.14.1.	RNA-Isolation mit Hilfe von TRIzol-Reagenz	47
4.15.	RNA-Gel	48
4.16.	Northern-Blot	49
4.16.1.	Herstellen der DNA-Sonde	49
4.16.2.	Gelelektrophorese	50
4.16.3.	Transfer	50
4.17.	Expression	52
4.17.1.	Expression des DERM_SD	52
4.17.2.	Aufreinigung des rekombinanten Proteins	53

4.17.3.Expression des Aggregationsfaktors	54
4.17.4.Aufreinigung des rekombinanten Proteins	54
4.18. SDS-PAGE und Western-Blot	55
4.18.1.Gelfärbung	57
4.18.2.Western-Blot	57
4.19. Proteinextraktion aus Schwammgewebe	59
4.20. Bestimmung der Proteinkonzentration	59
4.21. Bindungsassay	60
4.22. Aggregationstest	61
4.22.1.Papainverdau des Antikörpers	61
4.22.2.Dialyse des rekombinanten Proteins	61
4.22.3.Präparation von Schwammzellen	61
4.22.4.Präparation des Aggregationsfaktors	61
4.22.5.Durchführung des Aggregationsassays	61
4.23. Immunfluoreszenzmikroskopie	63
4.24. Transplantationsexperimente	64
4.25. Computerprogramme und Online-Dienste zur Auswertung der Daten	65
4.25.1.Computerprogramme	65
4.25.2.Internet-Adressen	65
4.26. Hälterung der Schwämme	66
5. Ergebnisse	67
5.1. Der Aggregationsfaktor aus <i>Geodia cydonium</i>	67
5.1.1. Screening der cDNA-Bank	67
5.1.2. Analyse der Sequenz	67
5.1.3. Northern-Blot-Analyse	70
5.1.4. Datenbankanalyse von AF_GEOCY	71
5.1.5. Phylogenetische Analyse von AF_GEOCY	73
5.1.6. Expression von AF_GEOCY	75
5.1.7. Western-Blot mit Proteinextrakt und rAF_GEOCY	76
5.1.8. Aggregationsassay	77
5.1.9. Lektin-AF-Western-Blot	79
5.1.10.Immunfluoreszenzmikroskopie	80
5.2. Dermatopontin aus <i>Suberites domuncula</i>	82
5.2.1. Screening der cDNA-Bank	82
5.2.2. Analyse der Sequenz	82
5.2.3. Northern-Blot	84

5.2.4. Datenbankanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz	85
5.2.5. Phylogenetische Analyse	86
5.2.6. Domänenstruktur von DERM_SD	87
5.2.7. Phylogenetischer Vergleich der Domänen	88
5.2.8. Expression von DERM_SD	90
5.2.9. Aggregationsassay	91
6. Diskussion	92
6.1. Der Aggregationsfaktor aus <i>Geodia cydonium</i>	92
6.1.1. Klonierung des Aggregationsfaktors	92
6.1.2. Nukleotidsequenz von <i>GEOCYAF</i>	93
6.1.3. Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz	94
6.1.4. Phylogenetische Analyse	95
6.1.5. Expression von <i>AF_GEOCY</i>	96
6.1.6. Funktionelle Charakterisierung	97
6.1.7. Immunfluoreszenzmikroskopie	98
6.1.8. Die Zellaggregation in <i>Geodia cydonium</i>	98
6.2. Dermatopontin aus <i>Suberites domuncula</i>	100
6.2.1. Nukleotidsequenz von <i>SDDERM</i>	100
6.2.2. Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz	100
6.2.3. Einfluß von <i>SD_DERM</i> auf die Zellaggregation	102
6.3. Ausblick	104
7. Zusammenfassung	105
8. Literaturverzeichnis	106
9. Abkürzungsverzeichnis	125

Publikationsliste

Danksagung

1. Einleitung

1.1. Porifera

Die Porifera (Schwämme) gehören mit zu den ältesten Metazoen. Der Stamm umfaßt etwa 5000 - 8000 Spezies, die man in die drei Klassen Calcarea (Kalkschwämme), Demospongiae (Hornschwämme) und Hexactinellida (Glasschwämme) einteilt. Sie kommen mit Ausnahme von ungefähr 120 im Süßwasser lebenden Arten überwiegend im Meer vor und siedeln vor allem in geringen Tiefen. Allerdings gibt es auch ausgesprochene Tiefseebewohner wie die Hexactinellida. Die Demospongiae stellen mit 80 – 90 % der Arten die größte Gruppe dar. Schwämme sind sessil lebende Organismen, die mit Hilfe der im Inneren ihres Körpers liegenden Choanocyten einen Wasserstrom erzeugen. Infolge dieser Strömung gelangt Wasser durch Einströmöffnungen, die Dermalporen, in das Kanalsystem des Schwammkörpers, wo die Choanocyten Nahrungspartikel - Detritus, Algen, Bakterien - herausfiltern. Exkretionsprodukte werden ebenso mit Hilfe dieses Wasserstroms durch das als Ausströmöffnung dienende Oskularrohr hinaus befördert. Neben dieser Form der Nahrungsaufnahme ist auch ein karnivorer Schwamm beschrieben worden (Vacelet und Boury-Esnault, 1995). Nach außen ist der Schwammkörper durch die Pinacocyten abgegrenzt. Im Inneren befindet sich das Mesenchym, hier findet sich eine Reihe unterschiedlicher Zelltypen, die jeweils unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen, unter anderem die omnipotenten Archaeocyten, die phagocytierenden Amöbocyten und die Collencyten, die das Mesenchymgerüst bilden. Zur Stabilisierung ihrer Körperform bilden die Schwämme meist ein Skelett, das aus den sog. Skleriten besteht. Diese bestehen bei den Demospongiae und Hexactinellida aus Kieselsäure, bei den Calcarea dagegen aus Kalk. Die Bildung der Sklerite erfolgt durch spezialisierte Zellen, den Skleroblasten. Die Sklerite können bei manchen Demospongiae durch Sponginfasern verbunden sein. Die Vermehrung der Schwämme kann durch Gametenbildung, bei einigen Arten aber auch vegetativ erfolgen. Eine Form der vegetativen Vermehrung ist die Bildung von Dauerstadien, sogenannter Gemmulae, die vor allem bei Süßwasserschwämmen eine Rolle spielen. Ein wesentliches Merkmal der Schwämme, das sie von allen anderen Metazoen unterscheidet, ist das Fehlen eigentlicher Organe. So existieren kein Nervensystem, kein Blutgefäßsystem und kein Exkretions- und Verdauungssystem (Kästner, 1985; Wehner und Gehring,

1990, Westheide und Rieger, 1996).



Abb. 1: Erscheinungsbild verschiedener mariner Schwämme: Kalkschwamm *Sycon raphanus*, Glasschwamm *Aphrocallistes* sp., Hornschwämme: *Suberites domuncula* mit *Paguristes oculatus*, *Geodia cydonium*, (von links oben nach rechts unten) (Abbildungen: W.E.G. Müller).

Der evolutive Ursprung der Schwämme wird vielfach bei den Choanoflagellaten gesucht, vor allem aufgrund der Ähnlichkeit mit den Choanocyten der Schwämme. Diese Choanocyten sind ein Bestandteil aller drei Klassen der Schwämme. Allerdings lassen bisherige Studien der Ultrastruktur, sowohl der Choanoflagellaten als auch der Choanocyten, eine exakte Aussage, inwieweit diese Strukturen tatsächlich homolog sind, nicht zu (Reitner und Mehl, 1996). Vergleiche der rRNA deuten aber auf eine Verwandtschaft von Choanoflagellaten und Metazoen, also auch von Schwämmen hin (Kumar und Rzhetsky, 1996; Cavalier-Smith *et al.*, 1996). Das Alter der Schwämme lässt sich aus paläontologischen Daten auf mindestens 600 Millionen Jahre (Mehl, 1998), aus molekularbiologische Untersuchungen sogar auf etwa 800 Millionen Jahre festlegen (Müller, 1995).

Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Porifera sind noch nicht eindeutig geklärt. So lassen sich die Hexactinellida und Demospongiae zu den Silicea zusammenfassen, ihnen stehen die Calcarea gegenüber (Böger, 1988). Andererseits kann man die Calcarea und Demospongiae als Cellularia den Symplasma, mit den Hexactinellida als alleinigen Vertretern, gegenüberstellen (z.

B. Mehl und Reiswig, 1991; Kruse *et al.*, 1998).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Spezies ordnen sich wie folgt in das System ein:

Geodia cydonium, Familie Geodiidae, Ordnung Astrophorida, Unterklasse Tetractinomorpha, Klasse Demospongiae.

Suberites domuncula, Familie Suberitidae, Ordnung Hadromerida, Unterklasse Tetractinomorpha, Klasse Demospongiae, in Symbiose mit *Paguristes oculatus*

1.2. Der Aggregationsfaktor

1.2.1. Zellaggregation in Schwämmen

Mit dem Schritt zur Vielzelligkeit mußten im Laufe der Evolution Mechanismen entstehen, die eine Adhäsion der Zellen untereinander als auch mit der extrazellulären Matrix ermöglichten. Zum Studium dieser Mechanismen bieten sich Schwämme als Modellorganismen an, da sie an der Basis der Metazoen stehen und sehr einfach gebaut sind. Bei Schwämmen existiert ein Zelladhäsionssystem, für das noch keine Entsprechung in höheren Metazoen gefunden werden konnte und dessen wesentlicher Bestandteil der Aggregationsfaktor (AF) darstellt. Die ersten Experimente zum Aggregationssystem stammen von Wilson. Er konnte zeigen, daß sich mechanisch dissoziierte Schwammzellen in einem Ca^{2+} -abhängigen Prozeß wieder zu Zellaggregaten zusammenlagern (Wilson, 1907). Diese Aggregation läßt sich in zwei Phasen unterteilen. Dissoziierte Einzelzellen bilden im Experiment zunächst primäre Zellaggregate einer Größe von 60 – 200 μm Durchmesser. Dieser Vorgang ist unabhängig von löslichen extrazellulären Faktoren. Der Mechanismus dieser Aggregation ist aber noch unverstanden. Der zweite Schritt ist die sogenannte sekundäre Aggregation. Darunter versteht man die Bildung größerer Zellaggregate unter Einfluß eines löslichen Aggregationsfaktors (Müller *et al.*, 1982).

1.2.2. Isolation und Zusammensetzung

Die erste Isolation von Aggregationsfaktoren aus marinen Schwämmen gelang 1973 aus *Microciona prolifera* (Henkart *et al.* 1973) und *Geodia cydonium* (Müller und Zahn, 1973). Zunehmend konnten entsprechende Proteine auch aus weiteren Schwammspezies isoliert werden (Misevic *et al.*, 1982). Der Aggregationsfaktor (AF) aus *Geodia cydonium* lässt sich in Calcium-Magnesium-freiem Seewasser (CMF) unter Zugabe von 20 mM EDTA extrahieren und in anschließender Gelfiltration aufreinigen. Bei dem Aggregationsfaktor aus *Geodia cydonium* handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Sedimentationskoeffizienten von 90 S. Der Proteinanteil beträgt 74 %. Dieser Proteinanteil setzt sich aus einem Kernprotein des AF und weiteren an das Kernprotein gebundenen Proteinen zusammen. Im Gegensatz zum Aggregationsfaktor aus *Microciona prolifera* ist das Molekül aus *Geodia cydonium* mit β -Glucuronidase nicht zu inaktivieren, ist dagegen aber Protease-sensitiv (Müller, 1982). Als ein Bestandteil des Aggregationsfaktors konnte aus *Geodia cydonium* ein 47 kDa-Protein mit immunologischen Methoden identifiziert werden (Gramzow *et al.*, 1986).

Der Aggregationsfaktor aus *Microciona prolifera* wurde als löslicher Partikel aus Schwammgewebe isoliert, welches zuvor mit Calcium-Magnesium-freiem Seewasser behandelt worden war. Aus diesem Rohextrakt konnte der Aggregationsfaktor über Zentrifugation und Gelchromatographie aufgereinigt werden. Der isolierte Aggregationsfaktor hat ein Molekulargewicht von 20×10^6 kDa. Es handelt sich um ein Glykoprotein, das zu 41,7 % aus Protein besteht, während sich die übrigen Bestandteile aus Hexose, Glucuronsäure, Galactosamin und Glucosamin zusammensetzen. Für die Aktivität des Aggregationsfaktors scheint vor allem die Glucuronsäure eine wichtige Rolle zu spielen, da sich seine Funktion durch β -Glucuronidase stören lässt (Cauldwell *et al.*, 1973).

Aus *Microciona prolifera* konnte das sog. Core-Protein des Aggregationsfaktors auf cDNA-Ebene sequenziert werden. Das als MAF bezeichnete abgeleitete Protein zeigt eine Sequenzhomologie zu der cytoplasmatischen Domäne des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Transporters aus höheren Vertebraten (Fernandez-Busquets *et al.*, 1996). Eine entsprechende cDNA wurde auch in *Geodia cydonium* gefunden. Das abgeleitete Protein aus *Geodia cydonium* zeigt die höchste Similarität zu Selektinen, die als Oberflächenproteine in Vertebraten vorkommen und sich unter anderem durch eine Lektin-artige Struktur am N-Terminus auszeichnen (Müller *et al.*, 1999). Aufgrund des Proteingehalts des Aggregationsfaktors kann man

folgern, daß in *Microciona prolifera* 250 bis 300 MAF-Proteine in einem Aggregationsfaktor-Partikel zu finden sind. Die Interaktion der MAF-Einheiten könnte durch Disulfidbrücken erfolgen. Des weiteren konnten in der Sequenz zwei potentielle Ca^{2+} -Bindungsstellen identifiziert werden (Fernandez-Busquets *et al.*, 1996). Dieses steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß eine geringe Ca^{2+} -Konzentration zur Aufrechterhaltung der Aggregationsfaktor-Struktur einerseits und andererseits eine hohe Ca^{2+} -Konzentration zur Zelladhäsion notwendig ist (Cauldwell *et al.*, 1973). Möglicherweise bindet MAF auch an Hyaluronat, das in AF-Aufreinigungen zu finden ist (Fernandez-Busquets *et al.*, 1996). Ein interessanter Aspekt ist weiterhin der bei der Untersuchung verschiedener Individuen von *Microciona prolifera* für MAF nachgewiesene Polymorphismus (Fernandez-Busquets *et al.*, 1997).

Bereits Wilson konnte zeigen, daß Ca^{2+} für die Funktion des Aggregationsfaktors eine wesentliche Rolle spielt (Wilson, 1907). Der Aggregationsfaktor aus *Microciona prolifera* liegt bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 1 mM als Monomer vor, bei Konzentrationen von 20 mM geht er reversibel in einen Gelzustand über (Henkart *et al.*, 1973). Beträgt die Ca^{2+} -Konzentration 10 mM, was dem Ca^{2+} -Gehalt des Seewassers entspricht, so bildet sich der Gelzustand nur bei hohen Aggregationsfaktor-Konzentrationen. Entfernt man Ca^{2+} mit EDTA, so sinkt das Molekulargewicht des AF von 20×10^6 auf 2×10^5 . Für die Bindung des Ca^{2+} scheint der AF zwei verschiedene Bindungsstellen zu besitzen, die sich in ihrer Affinität unterscheiden (Cauldwell *et al.*, 1973). Für *Geodia cydonium* ist die Ca^{2+} -Abhängigkeit des Aggregationsprozesses ebenfalls gezeigt worden, der genaue Mechanismus aber unklar (Müller, 1982). Versuchsdaten lassen es möglich erscheinen, daß Ca^{2+} bei der Assoziation der Lektine, die mit dem Aggregationsfaktor interagieren, eine Rolle spielt (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996). Im Kontrast dazu sind Aggregationsfaktoren aus Süßwasserschwämmen noch bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 1 mM aktiv, was auf gewisse Unterschiede im Vergleich zu ihren marinen Gegenstücken schließen läßt (Fernandez-Busquets *et al.*, 1999).

1.2.3. Elektronenmikroskopische Struktur

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß es zwei in ihrer Erscheinung unterschiedliche Formen von Aggregationsfaktoren zu geben scheint. Sowohl der

Aggregationsfaktor aus *Microciona prolifera* als auch aus *Geodia cydonium* zeigt eine sogenannte *sunburst*-Struktur (Müller, 1982). Bei *Microciona prolifera* besteht die Struktur, aus einem zentralen Ring von 200 nm Durchmesser und 16 - 25 Armen mit einer Länge von 180 nm (Fernandez-Busquets *et al.*, 1996). Der Aggregationsfaktor aus *Geodia cydonium* erscheint zunächst als Kugel mit einer konkaven tassenförmigen Struktur mit einem Durchmesser von 740 – 1260 Å. Nach Behandlung mit Detergenz ist die *sunburst*-Struktur mit 25 +/- 8 Armen zu sehen, die eine Länge von ca. 610 nm haben. Über diese Arme können zwei Aggregationsfaktor-Komplexe miteinander interagieren. Für die Aufrechterhaltung der Struktur des Aggregationsfaktors spielen Glycosaminketten eine wichtige Rolle. Der Zusammenbau des gesamten Komplexes erfolgt vermutlich in der Zelle mit anschließender Freisetzung in den Extrazellularraum durch Exocytose (Müller, 1982). Eine andere diskutierte Möglichkeit besteht in der Abgabe nach außen über Sulfat-vermittelten Transport (Kuhns *et al.*, 1995). Neben der *sunburst*-Struktur ist für andere Schwammspezies eine lineare Struktur des Aggregationsfaktors beschrieben worden, wobei aber auch diese Struktur bei einigen Arten mit Seitenarmen versehen ist (Humphreys *et al.*, 1977).

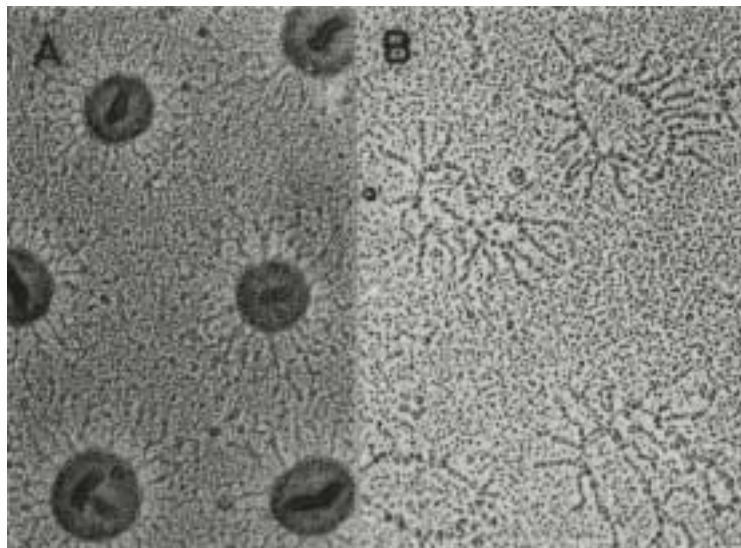


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Aggregationsfaktors. (A): Native Form (Vergrößerung x 140000), (B) Core-Struktur nach Behandlung mit Nonidet (Vergrößerung x 80000) (Aufnahmen: Prof. W.E.G. Müller).

1.2.4. Aggregationsrezeptoren

Für den Aggregationsprozeß ist neben dem Aggregationsfaktor ein Rezeptor notwendig. Als solcher konnte ein an die Zelloberfläche gebundener Aggregationsrezeptor (AR) identifiziert werden (Weinbaum und Burger, 1973; Müller *et al.* 1976; Varner *et al.*, 1988). Aus *Geodia cydonium* konnte ein Aggregationsrezeptor isoliert werden, dessen Gewicht ca. 29 kDa beträgt (Blumbach *et al.*, 1998). Bei der Bindung des Aggregationsfaktors an den Aggregationsrezeptor spielen Lektine eine entscheidende Rolle. Lektine sind Carbohydrat-bindende Proteine, die im gesamten Tierreich vorkommen und eine Vielzahl von Funktionen wahrnehmen (Hirabayashi und Kasai, 1993). Das Lektin aus *Geodia cydonium* konnte 1993 identifiziert werden (Pfeifer *et al.*, 1993). Bei ihm handelt es sich um ein S-Type-Lektin, das auch als Galektin bezeichnet wird. Das Molekulargewicht beträgt ca. 21 kDa. Es verbindet den Aggregationsfaktor-Komplex mit dem membrangebundenen Aggregationsrezeptor. Für die Zellaggregation sind der Aggregationsfaktor und das Lektin notwendig. Diese Zellaggregation läßt sich sowohl mit gegen den Aggregationsfaktor als auch mit gegen das Lektin gerichteten Antikörpern unterbinden. Außerdem konnte experimentell die Interaktion von Aggregationsfaktor, Lektin und einer AR-Fraktion bestätigt werden. (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996). Aus *Microciona prolifera* ließ sich ein Rezeptor mittels Gelfiltration aufreinigen, sein Molekulargewicht wird mit 50 kDa angegeben. Damit unterscheidet er sich von dem aus *Geodia cydonium* isoliertem Protein (Burger und Jumblatt, 1977). Auch hinsichtlich der Funktion der Lektine scheint sich *Microciona prolifera* von *Geodia cydonium* zu unterscheiden (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996).

Aus *Microciona prolifera* konnten zwei weitere Proteine isoliert werden, die an den Aggregationsfaktor binden. Bei beiden handelt es sich um periphere, nicht-integrale Membranproteine, als eigentliche Zelloberflächenrezeptoren kommen sie aber nicht in Frage. Die Molekulargewichte der beiden Proteine betragen 210 kDa und 68 kDa, eine Klonierung der zugehörigen Gene steht noch aus (Varner *et al.*, 1988). Auch über die genaue Funktion liegen keine Daten vor. Beide können an den Aggregationsfaktor binden, wobei das 68 kDa-Protein eine höhere Affinität zu dem Aggregationsfaktor besitzt als das 210 kDa-Protein. Eine durch Disulfidbrücken stabilisierte Struktur scheint für die Funktion des 68 kDa-Proteins notwendig zu sein. Für die Bindung an die Zelloberfläche wird ein integrales Membranprotein als Rezeptor angenommen, dessen Nachweis noch nicht gelungen ist (Varner, 1995). Auch die Struktur des 210 kDa-Proteins wird durch

Disulfidbrücken stabilisiert, außerdem konnte eine Glykosylierung nachgewiesen werden. Neben der Affinität für den Aggregationsfaktor konnte eine Bindung an die Zelloberfläche und an Lektine gezeigt werden. Möglicherweise dient das Protein als Brücke zwischen der Zelloberfläche und dem Aggregationsfaktor, eventuell ist es auch ein Teil davon. Generell stellt sich hier aber das Problem einer genauen Differenzierung zwischen Aggregationsfaktor-Komplex einerseits und assoziierten Proteinen andererseits (Varner, 1996).

1.2.5. Aggregationsfaktor und Histokompatibilität

Das Erkennen von eigenem Gewebe und die Abstoßung von Fremdgewebe ist für Schwämme von besonderer Bedeutung, weil sie sowohl das Überwachsen durch andere Organismen als auch das Verschmelzen zweier Individuen einer Spezies und damit die Bildung eines chimären Organismus verhindern müssen. Bereits in den klassischen Versuchen von Wilson (1907) zeigte sich, daß Zellen verschiedener Arten, keine speziesübergreifenden Aggregate bilden, woraus sich schließen läßt, daß der Aggregationsfaktor speziespezifisch ist. In anderen Experimente mit unterschiedlichen Schwammspezies zeigte sich aber, daß die Artspezifität nicht total ist, sondern es durchaus zu gemischten Zellaggregaten kommen kann. Im Süßwasserschwamm *Ephydatia fluviatilis* konnte im Gegensatz dazu sogar eine individuenspezifische Bildung von Zellaggregaten beobachtet werden. Einen möglicher Grund für die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse könnte in den jeweils gewählten Versuchsbedingungen liegen (Fernandez-Busquets *et al.*, 1999). Die Unterschiede in der Speziespezifität könnten ihren Grund aber auch in der Zweistufigkeit des Aggregationsprozesses haben. So könnte der unspezifischen artübergreifenden Aggregation die primäre Aggregation zugrunde liegen, die darauffolgende sekundäre Aggregation wäre hingegen artspezifisch. Dieses läßt sich zumindest an Experimenten mit *Geodia cydonium* und *Suberitis domuncula* belegen. Die Interaktion zwischen Aggregationsfaktor und Aggregationsrezeptor wäre dann an der Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst beteiligt (Müller, 1982). Für das *Microciona-prolifera*-Modell wird vermutet, daß vor allem die Interaktion zwischen Aggregationsfaktor und Zelloberfläche für die Artspezifität verantwortlich ist (Gradimir *et al.*, 1982). In diesem Zusammenhang könnte der Polymorphismus des MAF aus *Microciona prolifera* für eine Rolle des Aggregationsfaktors in der Histokompatibilität bei Schwämmen sprechen. Für diese These spricht auch, daß die MAF-Transkripte in

Transplantaten verstärkt exprimiert werden, es könnte sich hierbei um eine Art Abstoßungsprozeß handeln (Fernandez-Busquets *et al.*, 1998).

1.3. Amphiphysin

1.3.1. Amphiphysin und Endocytose

Amphiphysin ist ein mit synaptischen Vesikeln assoziiertes Protein, daß erstmals 1992 aus dem Huhn kloniert wurde (Lichte *et al.*, 1992). Es spielt eine Rolle bei dem endocytotischen Prozeß, der dem Recycling synaptischer Vesikel dient (Micheva *et al.*, 1997). Endocytose ist ein wesentlicher Vorgang, der bei einer Vielzahl von Geschehnissen im Organismus eine Rolle spielt, wobei die biochemischen Grundlagen verschieden sein können. Die Endocytose und die Wiederverwertung synaptischer Vesikel ist durch das Protein Clathrin vermittelt. Der grobe Ablauf der Bildung und Abschnürung der Vesikel und viele der beteiligten Protein-Protein-Wechselwirkungen sind mittlerweile aufgeklärt (Marsh und McMahon, 1999).

1.3.2. Eigenschaften und Vorkommen von Amphiphysin

Amphiphysin existiert in Säugern in zwei Isoformen die als Amphiphysin I und II bezeichnet werden. Amphiphysin I besitzt ein Molekulargewicht von 125 kDa, Amphiphysin II von 90 kDa (Micheva *et al.*, 1997). Beide zeigen vor allem im N-terminalen Bereich eine hohe Übereinstimmung (Ramjaun *et al.*, 1997) und insgesamt eine Aminosäure-Identität von 49 % (Owen *et al.*, 1998). Amphiphysin setzt sich aus drei Domänen zusammen, dem N-terminalen Bereich, der mittleren Region und der C-terminalen Region mit der SH3-Domäne (Takei *et al.*, 1999). Für Amphiphysin II sind mehrere Splicevarianten beschrieben worden (Ramjaun *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). Amphiphysin I ist im zentralen Nervensystem lokalisiert, während eine Expression in anderen Geweben auf RNA-Ebene nicht nachgewiesen werden konnte. In den Zellen ist es mit Immunfluoreszenz an den synaptischen Vesikeln nachzuweisen (Licht *et al.*, 1992). Amphiphysin II ist sowohl

im Gehirn als auch in Muskelzellen exprimiert, wobei die vorkommenden Splicevarianten ein unterschiedliches Expressionsmuster zeigen (Butler *et al.*, 1997). Aus der Maus konnte eine nur im Gehirn exprimierte Isoform von Amphiphysin II kloniert werden (LePrince *et al.*, 1997). Eine weitere Variante des Amphiphysin II zeichnet sich durch seine Eigenschaft aus mit dem Onkoprotein MYC zu interagieren und wird daher als BIN1 (*box-dependent myc-interacting protein-1*) bezeichnet. Dieses konnte im Nukleus nachgewiesen werden (Sakamuro *et al.*, 1996). Aus Invertebraten wurde bislang lediglich in *Drosophila melanogaster* ein Amphiphysin-ähnliches Protein gefunden (Razzaq *et al.*, 2000). Außerdem wurde im Rahmen der Sequenzierung des Genoms von *Caenorhabditis elegans* ein Amphiphysin identifiziert (Accession Z68217.1). Zur Amphiphysin-Familie gehören weiterhin zwei Hefeproteine, die als RVS167 und RVS161p (*reduced viability upon nutrient starvation*) bezeichnet werden. RVS1p fehlt im Vergleich mit RVS167 lediglich die am N-Terminus gelegene BAR-Domäne, ansonsten weisen beide Proteine dieselbe Domänenstruktur wie Amphiphysin auf (Balguerie *et al.*, 1999).

1.3.3. Funktion von Amphiphysin

Beide Amphiphysin-Isoformen können mit einer Reihe von Proteinen, die an der Endocytose beteiligt sind, wechselwirken. Dazu gehören unter anderem Clathrin, ein Hauptbestandteil endocytotischer Vesikel, Clathrin-Adapter-Moleküle (AP-2), Dynamin und Synaptojanin (Slepnev *et al.*, 1998). Die Bindung an Clathrin und das Clathrin-Adapter-Molekül (AP-2) erfolgt bei beiden Amphiphysin-Isoformen über die mittlere Domäne (Takei *et al.*, 1999). Amphiphysin I und -II binden beide an Dynamin, eine neuronale GTPase (Ramjaun *et al.*, 1997). Diese Interaktion erfolgt über die SH3-Domäne des Amphiphysin und die Prolin-reiche-Region des Dynamin. In der Prolin-reichen Region spielt vor allem die Sequenz PSRPNR eine entscheidende Rolle für die Bindung (Grabs *et al.*, 1997). Die Folgen der Bindung sind noch unklar, aber Amphiphysin scheint die Bildung von Dynamin-Multimeren zu verhindern (Owen *et al.*, 1998). Die Interaktion mit Synaptojanin, einer Inositol-5-Phosphatase, die sich in Neuronen findet, erfolgt ebenfalls über die SH3-Domäne des Amphiphysin (Ramjaun *et al.*, 1997; de-Heuvel *et al.*, 1997). Daneben konnten eine Bindung von Amphiphysin an weitere Proteine gezeigt werden, so an Endophilin, ein in Nerven vorkommendes Protein (Micheva *et al.*, 1997) und an Ankyrin, mit dem es zusammen in der Zelle lokalisiert zu sein

scheint (Butler *et al.*, 1997). Beide Amphiphysin-Isoformen hemmen zudem die Phospholipase D, die Phosphatidylcholin zu Cholin und Phosphorsäure hydrolysiert (Lee *et al.*, 2000). Schließlich scheint Amphiphysin I mit Actin wechselzuwirken und so die Entwicklung von Neuronen zu beeinflussen (Mundigl *et al.*, 1998). Amphiphysin I bindet außerdem an Lipid-Membranen und fungiert so möglicherweise als Adapter zwischen der Membran und weiteren Proteinen. Dieses ist bisher für das Homodimer des Amphiphysin I beschrieben worden, gilt vermutlich aber auch für das Heterodimer (Takei *et al.*, 1999). Als derartiges Heterodimer liegen beide Isoformen im Gehirn vor (Owen *et al.*, 1998). Die Interaktion mit der Plasmamembran kann aber auch über den N-Terminus des Amphiphysin II vermittelt werden. Dieser N-Terminus ist ebenso für die Bildung der Hetero- und Homodimere notwendig (Ramjaun *et al.*, 1999). Aus Mäuseembryonen konnte ein Protein isoliert werden, das eine Sequenzhomologie zu Amphiphysin zeigt, und wie dieses eine SH3-Domäne zeigt, wahrscheinlich handelt es sich um eine Splicevariante. Dieses als ALP1 (*Amphiphysin-like-Protein1*) bezeichnete Protein bindet über die SH3-Domäne an eine Tyrosinkinase, deren Funktion noch nicht aufgeklärt ist (Kadlec *et al.*, 1997). Für die Regulation des gesamten Endocytoseprozesses scheint die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung einzelner Komponenten eine wichtige Rolle zu spielen (Slepnev *et al.*, 1998). Amphiphysin I kann im Gegensatz zu Amphiphysin II phosphoryliert werden, wobei die Dephosphorylierung von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist (Bauerfeind *et al.*, 1997). Neben der Endocytose synaptischer Vesikel soll Amphiphysin II auch bei der Phagozytose humaner Makrophagen eine Rolle spielen (Morissette *et al.*, 1999; Gold *et al.*, 2000). Das Amphiphysin aus *Drosophila melanogaster* läßt sich aufgrund der geringen Sequenzhomologie zu dem Amphiphysin aus Vertebraten nicht zu einer der beiden Isoformen Amphiphysin I oder II zuordnen, wahrscheinlich gibt es ähnlich wie in *Caenorhabditis elegans* nur eine Isoform. Die SH3-Domäne des Proteins aus *Drosophila melanogaster* zeigt topologische Ähnlichkeiten. Die zweite Domäne hingegen zeigt deutliche Abweichungen zu Vertebraten. Eine Expression läßt sich in vielen Strukturen während der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* nachweisen, das Expressionsmuster weicht von dem anderer Proteine, die in Vertebraten mit Amphiphysin interagieren, wie z. B. Dynamin und Adaptin, ab. Dieses läßt den Schluß zu, daß es Unterschiede in der Funktion gibt und Amphiphysin in Invertebraten andere Aufgaben wahrnimmt als in Vertebraten (Razzaq *et al.*, 2000). Die aus Hefe isolierten Mitglieder der Amphiphysin-Familie RVS161p und RVS167 scheinen eine ähnliche Funktion zu besitzen wie Amphiphysin in Vertebraten. Entsprechende Hefemutanten zeigen

phänotypisch Beeinträchtigungen in Endocytose und Knospung. Für RVS167 konnte eine Interaktion mit Actin, für RVS161p mit RVS167 nachgewiesen werden (Balguerie *et al.*, 1999).

1.4. Dermatopontin

1.4.1. Struktur und Vorkommen von Dermatopontin

Dermatopontin ist ein in einer Reihe von Organismen gefundenes Protein der extrazellulären Matrix. Es wurde erstmals aus dem Rind isoliert (Neame *et al.*, 1989). Das homologe Protein aus dem Schwein wird als TRAMP (*Tyrosine Rich Acidic Matrix Protein*) bezeichnet, bezugnehmend auf den isoelektrischen Punkt im sauren Bereich (Cronshaw *et al.*, 1993). Ebenso wurde ein homologes Protein im Menschen identifiziert (Superti-Furga *et al.*, 1993). Bei Invertebraten wurde bisher einzig im Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* ein als Limulus-Aggregationsfaktor (LAF) bezeichnetes Protein gefunden, das eine 37 %ige Identität zu dem bovinen Dermatopontin zeigt und als homolog dazu betrachtet wird. (Fujii *et al.*, 1992).

Dermatopontin besitzt ein Molekulargewicht zwischen 18 kDa in *Limulus polyphemus* (Fujii *et al.*, 1992) und 22 kDa im Rind (Neame *et al.*, 1989). Die bisher gefundenen Proteine zeichnen sich durch eine Reihe gemeinsamer Merkmale aus. Dermatopontin besteht aus vier Domänen: einer tyrosinreichen Region am N-Terminus, gefolgt von den Regionen 2 und 3, die große Ähnlichkeit untereinander zeigen, und Region 4, die eine leichte Ähnlichkeit zu den beiden vorherigen Regionen zeigt. Diese Domänenstruktur könnte ein Hinweis auf die Entstehung durch Duplikation einer Ursprungssequenz im Laufe der Evolution sein. Die Regionen 2 bis 4 sind gekennzeichnet durch eine 6 Aminosäuren lange Wiederholungssequenz. Die Konsensussequenz lautet Asp-Arg-Glx-Trp-Asn/Gln/Lys-Phe/Tyr. Diese Sequenz ist sowohl im menschlichen als auch im bovinen Dermatopontin zu finden. Die Funktion dieses Motivs ist aber unklar (Superti-Furga *et al.*, 1993; Neame *et al.*, 1989). Des Weiteren findet sich in den humanen und bovinen Proteinen zehn Cysteinreste, zwischen denen Disulfidbrücken ausgebildet werden, wodurch insgesamt drei Schleifen gebildet werden (Superti-Furga *et al.*, 1993; Neame *et al.*, 1989). Diese Cysteinreste und

die Sequenzwiederholungen sind auch in *Limulus polyphemus* zu finden (Fujii *et al.*, 1992).

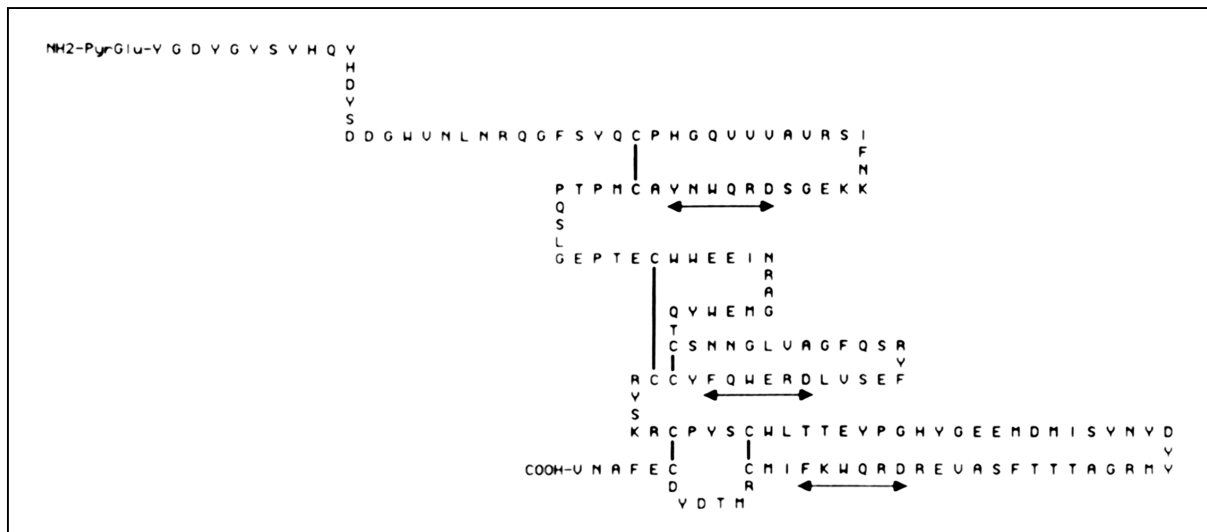


Abb. 3: Schematische Struktur des bovinen Dermatopontin. Dargestellt sind die Aminosäuresequenz, die fünf Disulfidbrücken und die drei Asp-Arg-Glx-Trp-Asn/Gln/Lys-Phe/Tyr-Wiederholungen (aus Neame *et al.*, 1989).

Als posttranslationale Modifikation sind für das porcine TRAMP Sulfatreste nachgewiesen worden (Forbes *et al.*, 1994). Eine Glykosylierung ist hingegen zumindest in der bovinen und humanen Form nicht nachweisbar (Neame *et al.*, 1989; Superti-Furga *et al.*, 1993). Für das Vorkommen von Isoformen gibt es lediglich für TRAMP experimentelle Belege (Cronshaw *et al.*, 1993). Am N-Terminus findet sich jeweils eine Signalsequenz zur Exkretion des Proteins, die zwischen 18 (Mensch) und 19 Aminosäuren (*Limulus polyphemus*) lang und im extrazellulären reifen Protein nicht mehr vorhanden ist (Fujii *et al.*, 1992; Superti-Furga *et al.*, 1993).

Für die Proteine aus Schwein, Maus und Mensch konnte eine Expression in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden (Forbes *et al.*, 1994; Superti-Furga *et al.*, 1993). Zellkulturexperimente zeigten eine Sekretion von TRAMP (Forbes *et al.*, 1994). Der Limulus-Aggregationsfaktor ist intrazellulär in sekretorischen Granulae nachweisbar und wird erst nach Stimulation ins extrazelluläre Milieu abgegeben (Fujii *et al.*, 1992). Für Vertebraten fehlen ähnliche Befunde zur Freisetzung bislang.

1.4.2. Funktion

Die Funktion des Dermatopontin ist für die einzelnen Proteine unterschiedlich gut aufgeklärt. Der Limulus-Aggregationsfaktor agglutiniert *in vitro* Erythrocyten und führt zur Aggregation von *Limulus*-Amöbocyten (Fujii *et al.*, 1992). Für die porkine Form TRAMP konnten *in vitro*-Versuche zeigen, das TRAMP die Bildung von Kollagenfibrillen beschleunigt und sie gegenüber einer Dissoziation stabilisiert. Eine Bindungsstelle für TRAMP im Kollagenmolekül konnte allerdings noch nicht identifiziert werden (MacBeath *et al.*, 1993). Für eine Verbindung zwischen Dermatopontin und Kollagen spricht auch die Tatsache, das Zellen, die auf kollagen-beschichteten Schalen kultiviert wurden, eine geringere Dermatopontinexpression zeigen als die Vergleichszellen auf unbeschichteten Schalen (Kuroda *et al.*, 1999). Ein weiterer Aspekt ist die Rolle von Dermatopontin bei einigen Krankheitsbildern. So ist eine Überexpression von Dermatopontin bei progressiver systemischer Sklerose in der Dermis zu beobachten. Für diese Krankheit sind außerdem Veränderungen der Kollagenfibrillen beschrieben worden. Das parallele Auftreten beider Phänomene spricht dafür, daß auch *in-vivo* eine Interaktion zwischen Dermatopontin und Kollagen stattfindet (Okamoto *et al.*, 1996). *In vitro*-Versuche ergaben, daß der *Transforming growth factor* TGF- β 1 zu einer verstärkten, hingegen Interleukin 4 zu einer verminderten Expression führt. Die Rolle von Dermatopontin in der Pathogenese beruht eventuell auf dem Einfluß dieser beiden Cytokine auf die Menge an vorhandenem Dermatopontin (Kuroda *et al.*, 1999).

Die Interaktion von Dermatopontin mit anderen Proteinen ist besonders für das bovine Protein untersucht worden. Zum einen bindet Dermatopontin an Decorin. Decorin ist ein leucin-reiches Proteoglycan der extrazellulären Matrix, daß u.a. mit Kollagen interagiert. Zum anderen bindet Dermatopontin aber auch an TGF- β . TGF- β ist ein Cytokin, welches Differenzierung und Proliferation vieler Zellen, aber auch die Ausbildung der extrazellulären Matrix beeinflusst. In *in vitro*-Experimenten konnten die biologischen Effekte des TGF- β durch Dermatopontin verstärkt werden.

Decorin und TGF- β können ihrerseits aneinander binden. Durch die Bindung von Decorin an TGF- β kann dessen Funktion moduliert werden. Decorin und Dermatopontin zusammen bilden möglicherweise einen Komplex, der mehr TGF- β binden kann, als die beiden Moleküle für sich alleine genommen. Auf diese Art könnte die verfügbare Menge an TGF- β kontrolliert und so dessen Wirkung beeinflusst werden (Okamoto *et al.*, 1999). Die Interaktion zwischen Decorin und Dermatopontin ist dabei in Experimenten unabhängig vom Vorhandensein der

Disulfidbrücken. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Interaktion über den Proteinanteil des Decorin und nicht dessen Dermatansulfatketten vermittelt wird (Okamoto *et al.*, 1996).

Unabhängig davon werden als mögliche Bindungspartner des Dermato pontin auf der Zelloberfläche Integrine diskutiert. Dafür sprechen sowohl experimentelle Hinweise, als auch das Vorhandensein einer RGAT-Sequenz an Position 151 - 154 des bovinen Dermato pontin, die der typischen Integrin-bindenden RGDS-Sequenz ähnelt und dieser funktionell entsprechen könnte. Eine endgültige Bestätigung hierfür steht aber noch aus (Lewandowska *et al.*, 1991).

2. Zielsetzung der Arbeit

Mit der Entstehung der Vielzelligkeit mußten im Laufe der Evolution Mechanismen entstehen, die eine Adhäsion der Zellen untereinander bewirken. Die Porifera bieten sich als Modellorganismen zur Untersuchung dieser Zellaggregation an, da sie an der Basis der Metazoen stehen.

Ein wesentlicher Bestandteil des Zellaggregationssystems bei Schwämmen ist der sog. Aggregationsfaktor. Es handelt sich hierbei um einen Glykoproteinkomplex, der als löslicher Faktor im Extrazellularraum vorliegt und über Lektine und Aggregationsrezeptor eine Zellaggregation vermittelt. Die ersten Experimente zum Aggregationsfaktor wurden bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Bis heute ist es gelungen, einige Proteine mit Hilfe proteinchemischer Verfahren zu identifizieren und ihre Funktion zu untersuchen. Mit der Einführung molekularbiologischer Methoden bietet es sich an, die zugrundeliegenden Gene zu identifizieren und auf dieser Grundlage zu einem tieferen Verständnis der Zellaggregation gelangen. In der Arbeitsgruppe W.E.G. Müller gelang es, ein cDNA-Fragment, welches mutmaßlich für einen Teil des Aggregationsfaktors kodiert, zu klonieren. Die cDNA stammte aus *Geodia cydonium*, einem Schwamm, der im Hinblick auf den Aggregationsprozeß besonders gut untersucht ist und sich daher als Untersuchungsobjekt eignet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die cDNA vollständig isoliert werden und bestätigt werden, daß es sich um einen Teil des Aggregationsfaktors handelt. Anschließend sollte das Protein in *E. coli* rekombinant hergestellt werden, um seine Rolle im Aggregationsprozeß zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte außerdem eine zweite cDNA kloniert werden, die eine Sequenzhomologie zu Dermatopontin aus Vertebraten und zu dem aus *Limulus polyphemus* isolierten Aggregationsfaktor LAF zeigt. Dermatopontin und LAF sind Bestandteile der extrazellulären Matrix und spielen eine Rolle bei der Adhäsion zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Das cDNA-Fragment, welches als Ausgangspunkt diente, stammte aus dem marinen Schwamm *Suberites domuncula*. Neben der Klonierung sollten auch erste Hinweise auf eine mögliche Funktion im Schwamm geliefert werden. Zu diesem Zweck sollte das Protein rekombinant hergestellt werden.

3. Material

3.1. Chemikalien

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

3.2. Verbrauchsmaterialien

Einwegspritzen	BRAUN, Melsungen
Entwickler & Fixierer für Röntgenfilme	KODAK, Paris, Frankreich
Falcon Reaktionsgefäße (5, 15 und 50 ml)	BECTON & DICKINSON, New Jersey, USA
Filterpapier	MACHERY & NAGEL, Düren
Frischhaltefolie	MELITTA, Minden
Latexhandschuhe	N.S. UNI-GLOVES SDN. BHD., SEREMBAU, Malaysia
Microstrips 0,2 ml, tubes und caps	DIANOVA, Hamburg
Omnistrips 0,3 ml, tubes und caps	DIANOVA, Hamburg
Nitrocellulosemembranen	SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel
Nylonmembrane	AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg
Parafilm M	AMERICAN NATIONAL CAN, Greenwich, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Petrischalen	GREINER, Frickenhausen
Pipettenspitzen	ROTH, Karlsruhe
Pipettenspitzen mit Filtereinsatz	BIOZYM, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 und 2,0 ml	EPPENDORF, Hamburg
Röntgenfilm FUJI New RX	FUJI, über BECHTHOLD, Kelkheim
Screeningplatten	NUNC, Wiesbaden
Sterilfilter 0,2 µm	MILLIPORE, Bedford, USA

Videoprinterpapier

Whatman 3MM-Papier

ROTHHAAR &
SCHRÖDER, Heidelberg
WHATMAN, über BENDER
& HOBEIN, Bruchsal

3.3. Geräte

SemiDry Blotting-Kammer Transblot SD
Proteinelektrophoreseeinheit Protean Mini

Brutschrank TypBK

Elektrophoresekammer

Heizblock Thermostat 5320

Heizplatte

pH-Meter Typ CG 840

Powersupply

Schüttelinkubator Certomath

Sterilbank

Photometer Gene Quant

Vortexer

Wasserbad

Thermocycler:

Hybaid Touchdown

Perkin Elmer Geneamp 9600

DNA-Sequenzierer LI-COR 4200L

Fluoreszenzmikroskop AH3BT3

Folienschweißautomat

Thermomixer 5436

Kühlschränke (-20 °C & 4 °C)

Gefrierschrank -80 °C

Magnetrührer mit Heizplatte

Mikrotom

BIO-RAD, München

BIO-RAD, München

EHRET, Emmerdingen

BIORAD, München

EPPENDORF, Hamburg

IKA Labortechnik, Staufen

SCHOTT, Mainz

BIORAD, München

BRAUN, Melsungen

KÖTTERMANN, Hängingen

AMERSHAM-PHARMACIA,
Freiburg

LABOTEC, Wiesbaden

KÖTTERMANN, Hängingen

HYBAID/AGS, Heidelberg

APPLIED BIOSYSTEMS,
Weiterstadt

LICOR, über MWG-

BIOTECH, Ebersberg

OLYMPUS, Hamburg

PETRA-ELECTRIC, Burgau

EPPENDORF, Hamburg

LIEBHERR, Ochsenhausen

NUNC, Wiesbaden

IKA Labortechnik, Staufen

CAMBRIDGE

INSTRUMENTS, Nußloch

Pipetten	GILSON, Villieres-Le-Bel
Rollinkubator	Institutswerkstatt
Speed VacSVC100/RH40-11	SAVANT
	INSTRUMENTS,
	Farmingdale, USA
SterilisatorTK/L7	EHRET, Emmendingen
Transilluminator und Gel-Dokumentationssystem	UVP LIMITED, Cambridge
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	STRATAGENE, Amsterdam, Niederlande
Waage PT 120R6	SARTORIUS, Göttingen
Zentrifugen:	
Sorvall RC-5B	DU PONT, Bad Homburg
Haemofuge	HERAEUS, Hanau
Zentrifuge 5415 C	EPPENDORF, Hamburg
Kühlzentrifuge 5402	EPPENDORF, Hamburg

3.4. Enzyme

Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
Biotherm DNA-Polymerase	GENECRAFT, Münster
Synergy DNA-Polymerase	GENECRAFT, Münster
Alkalische Phosphatase (CIAP)	PROMEGA, Mannheim
T4-Ligase	MBI, St. Leon-Rot
RNaseA	QIAGEN, Hilden
Thrombin	AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg

Restriktionsenzyme

Bam HI	MBI, St. Leon-Rot
Bgl II	PROMEGA, Mannheim
Eco RI	MBI, St. Leon-Rot
Hind III	MBI, St. Leon-Rot
Kpn I	PROMEGA, Mannheim
Not I	MBI, St. Leon-Rot
Nco I	MBI, St. Leon-Rot

Nhe I	PROMEGA, Mannheim
Pae I (Sph I)	MBI, St. Leon-Rot
Sac I	MBI, St. Leon-Rot
Sac II	MBI, St. Leon-Rot
Sal I	MBI, St. Leon-Rot
Sma I	MBI, St. Leon-Rot
Xba I	MBI, St. Leon-Rot
Xho I	MBI, St. Leon-Rot

3.5. Kits

QIAprep-Spin Plasmid Miniprep	QIAGEN, Hilden
NucleoSpin System	MACHEREY- NAGEL, Düren
High Pure Plasmid Isolation Kit	ROCHE, Mannheim
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
GeneClean™ - Spin Kit	BIOZYM, Hess.Oldendorf
High Pure PCR Product Purification Kit	ROCHE, Mannheim
Oligotex™ mRNA Minikit	QIAGEN, Hilden
Thermo-Sequenase Kit	AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg
PCR DIG Probe Synthesis Kit	ROCHE, Mannheim

3.6. Vektoren

λ -ZAP-Express/pBK-CMV	STRATAGENE, Heidelberg
pGEM™-T Cloning Kit	PROMEGA, Mannheim
pQE30,	QIAGEN, Hilden
pGEX 2T	AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg

3.7. Marker

Prestained Protein Marker

NEW ENGLAND
BIOLABS, Schwalbach

Bestehend aus folgenden Proteinen: MBP- β -Galactosidase (175 kD), MBP-Paramyosin (83 kD), Glutamat-Dehydrogenase (62 kD), Aldolase (48 kD), Triosephosphat-Isomerase (33 kD), β -Lactoglobulin A (25 kD), Lysozym (17 kD), Aprotinin 7 (kD)

SDS-Page-Standard, broad range

BIORAD, München

Bestehend aus folgenden Proteinen: Aprotinin (6,5 kD), Lysozym (14,4 kD), Trypsininhibitor (21,5 kD), Carbonatanhydrase (31 kD), Ovalbumin (45 kD), Serumalbumin (66,2 kD), Phosphorylase b (97,4 kD), β -Galactosidase, (116,25 kD), Myosin (200 kD)

DNA-Marker: 1 kb DNA-Ladder

GENECRAFT, Münster

Bestehend aus folgenden Fragmenten: 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 8000 bp, 10000 bp

RNA-Marker I

ROCHE, Mannheim

bestehend aus folgenden Fragmenten: 0,3 kb; 0,4 kb; 0,6 kb; 1,0 kb; 1,6 kb; 1,9 kb; 2,8 kb; 5,3 kb; 7,4 kb

RNA-Marker III

ROCHE, Mannheim

bestehend aus folgenden Fragmenten: 1,6 kb; 1,9 kb; 2,8 kb; 5,3 kb; 7,4 kb

RNA-Marker II

ROCHE, Mannheim

bestehend aus folgenden Fragmenten: 0,3 kb; 0,4 kb; 0,6 kb; 1,0 kb; 1,6 kb

3.8. Primer

Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG BIOTECH, Ebersberg bezogen. Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

Dermatopontin-spezifische Primer

mdesma	TGA CCC GGG GTG ATT CAT CTT CCA AAT CCT	$T_m = 68\text{ °C}$
pdebam	CGC GGA TCC AAG ATG TTT GTG AAT GCT ACT	$T_m = 67\text{ °C}$
Derm1	TCT TCA TGG TGG TTG CTG TC	$T_m = 62\text{ °C}$
Derm2	CAT CTT CCA AAT CCT GTC CTC AT	$T_m = 59\text{ °C}$
Derm4	AAT TCC AGT TCA GAG TTT CAA	$T_m = 52\text{ °C}$
Derm3	ATT ACG TAC AGA GCA TCC ATA G	$T_m = 57\text{ °C}$
Derm5	GCT ATT TGG GAA CGT GCA	$T_m = 54\text{ °C}$

Aggregationsfaktor-spezifische Primer

Afpsma1	TGC CCC CGG GCC AGA AAC TGG GCA AGT CAG AC	$T_m = 64\text{ °C}$
Afmecor1	CTG GAA TTC CCT CAG AAG GAG GAG GAA ATT CG	$T_m = 70\text{ °C}$
AFM1	CTC ATC TCC GGG TCT TCG TAT GG	$T_m = 64\text{ °C}$
AFM2	GTC AAC AAC TCT TCG TTA GCC GG	$T_m = 62\text{ °C}$
AFM3	GAC AGC AGT GTC TTG ATT CTC CTG G	$T_m = 65\text{ °C}$
AFM4	AGG TGT TTG TCT TGA GTA G	$T_m = 52\text{ °C}$
AFP1	ACA AGC CGA GTA GAA GAT CTA	$T_m = 56\text{ °C}$
AFP2	AGC CGA GTA GAA GAT CTA ATA	$T_m = 54\text{ °C}$
AF3	AGG TTC TCC GAT GTC AAG ACT	$T_m = 62\text{ °C}$
AF4	CTC ACT CTC TTC TTC GGT GCG	$T_m = 66\text{ °C}$

Vektorspezifische Primer

Sowohl IR-markiert als auch nicht markiert:

T3:	CGG AAT TAA CCC TCA CTA AAG	$T_m = 56\text{ °C}$
T7:	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	$T_m = 56\text{ °C}$
SP6:	TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C	$T_m = 56\text{ °C}$
pQE-F:	GGC GTA TCA CGA GGC CCT TTC G	$T_m = 52\text{ °C}$

<i>pQE-R:</i>	CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG G	$T_m = 52\text{ °C}$
<i>pGEX5seq</i>	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG C	$T_m = 68\text{ °C}$

3.9. Bakterienstämme

XL1-Blue MRF' STRATAGENE, Heidelberg
 $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1}$
 $\text{gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\text{Q}}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$

XL1-Blue STRATAGENE, Heidelberg
 $\text{endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96 recA1 relA1 lac [F' proAB}$
 $\text{lacI}^{\text{Q}}\Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$

BL 21 STRATAGENE, Heidelberg
E. coli B F⁻ dem ompT hsd(r_B-m_B⁻) gal

M15 E. coli K 12 STRATAGENE, Heidelberg

3.10. Antikörper

1D2 Anti-AF	Arbeitsgruppe W.E.G.Müller
PoAb-AF	Arbeitsgruppe W.E.G.Müller
Anti-Lektin Antikörper IIIc8	Arbeitsgruppe W.E.G. Müller
Penta-His Antikörper Maus IgG ₁	QIAGEN, Hilden
Anti-GST Antikörper Ziege	AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg
Anti-Maus IgG, alkalische Phosphatase gekoppelt	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen
Anti-Ziege IgG, alkalische Phosphatase gekoppelt	DIANOVA, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG, alkalische Phosphatase gekoppelt	SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen

4. Methoden

4.1. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion ist es möglich, DNA-Fragmente auf einfache Weise beliebig zu vervielfältigen. Diese Methode wurde 1985 von Kary Mullis entwickelt (Saiki *et al.*, 1985). Eine typische PCR-Reaktion umfaßt drei Schritte.

1. Die DNA wird durch Erhitzen auf 95°C denaturiert, so daß sie einzelsträngig vorliegt.
2. An die einzelsträngige DNA werden bei einer niedrigen Temperatur (Annealingtemperatur) kurze Oligonukleotide, die sog. Primer angelagert. Diese Primer sind komplementär zu bestimmten Sequenzenabschnitten in der zu amplifizierenden DNA.
3. Im dritten Schritt wird aus der einzelsträngigen DNA beginnend an den Primern wieder ein DNA-Doppelstrang synthetisiert. Dieses geschieht mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase, die in den meisten Fällen aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* stammt. Diese sog. Elongationszeit ist von der Länge des zu erwartenden Produkts abhängig. Es gilt die Regel, daß ungefähr 1000 bp/min synthetisiert werden.

Dieser Reaktionszyklus wird 30 - 35 mal wiederholt. Als Ergebnis liegt ein DNA-Abschnitt millionenfach vervielfältigt vor. Durch die Wahl geeigneter Primer kann man dabei spezifisch bestimmte DNA-Bereiche amplifizieren. Das Amplifikationsprodukt kann mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die PCR kann, da sie schnell, einfach und sehr sensitiv ist, für viele Anwendungen eingesetzt werden. Bei der Wahl der Primer sind folgende Regeln zu beachten:

1. Die Länge sollte 20 - 30 Nukleotide betragen.

2. Die vier Basen sollten in der gleichen Häufigkeit vorliegen.
3. Die 3'-Enden sollten weder inter- noch intramolekular komplementär sein.
4. Es sollten keine Bereiche mit Polypurin oder Polypyrimiden oder sich wiederholenden Sequenzen auftreten.
5. Die Annealingtemperaturen der verwendeten Primer sollte in etwa gleich sein.

4.1.1. Berechnung der Schmelztemperatur der Primer

Um den Schmelzpunkt T_m eines Primers zu bestimmen, wendet man folgende Gleichung an:

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

Die Annealingtemperatur T_a berechnet sich im Anschluß daran nach folgender Formel:

$$T_a \text{ } [^\circ\text{C}] = T_m - 2 \text{ } [^\circ\text{C}]$$

4.1.2. Screening der cDNA-Bank mit Hilfe der PCR

Aufgrund der oben erwähnten Spezifität der PCR ist es möglich aus einer cDNA-Bank gesuchte DNA-Abschnitte gezielt zu vervielfältigen und anschließend zu isolieren. Dabei wurden meistens ein genspezifischer Primer und ein vektorspezifischer Primer eingesetzt. Auf diese Weise konnte jeweils der 5'- oder der 3'-Bereich der in den Vektor inklonierten cDNA amplifiziert werden.

Durchführung der PCR

In ein 0,2 ml Reaktionsgefäß wurden die folgenden Komponenten pipettiert.

10 x Puffer	5 µl
cDNA-Bank	2 µl
dNTP-Mix	2,5 µl
Primer 1	2,5 µl
Primer 2	2,5 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
<i>Aq. bidest.</i>	30 µl
Gesamtvolumen	50 µl

Um Verunreinigungen so gering wie möglich zu halten, wurde an einer Sterilbank gearbeitet. Anschließend wurde die PCR in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt:

95 °C: 5 min

95 °C: 30 sec; $T_m - 2$ °C: 30 sec; 72 °C: x min 30 - 35 Zyklen

72 °C: 10 min

4 °C: ∞

Um das Ergebnis der PCR zu kontrollieren, wurde ein Teil der Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen.

4.2. Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese kann man DNA-Moleküle ihrer Größe nach in einer porösen Matrix, dem sog. Gel, auftrennen. Dabei wird der Umstand genutzt, daß DNA aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen ist und im elektrischen Feld in Richtung der Anode wandert. Die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel ist dabei u.a. von der Größe der Moleküle abhängig. Kleine Moleküle wandern schneller als große. Weiterhin beeinflussen Art und Konzentration der Gelmatrix, Temperatur, Spannung und Art des verwendeten Puffers die Wanderungsgeschwindigkeit. Um

die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen, läßt man ein Gemisch aus DNA-Fragmenten bekannter Größe, den sog. Marker, mitlaufen.

4.2.1. Herstellung des Gels

Zur Herstellung des Gels wurden 1 % Agarose in TBE-Puffer aufgekocht und in einen Gelschlitten mit einem Kamm gegossen. Nach dem Erstarren konnten der Kamm entfernt und das Gel in die mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer gesetzt werden. Die DNA-Proben wurden nun in die durch den Kamm entstandenen Taschen gefüllt. Je nach Art des verwendeten Kamms 5 µl bzw. 10 µl Probe, die vorher mit 1 µl bzw. 2 µl Probenpuffer versetzt worden waren. Die angelegte Spannung betrug 10 V/cm. Der Lauf wurde gestoppt, nachdem der Puffer etwa zwei Drittel der Gellänge zurückgelegt hatte. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt.

1 x TBE:		6 x Probenpuffer:	
Tris/HCl	10,78 g	Bromphenolblau	0,25 %
Borsäure	5,5 g	Saccharose	40 %
EDTA	0,74 g		in <i>Aqua bidest.</i>
	ad 1l <i>Aqua bidest.</i>		

4.3. Gelfärbung mit Ethidiumbromid

Um die im Agarosegel aufgetrennte DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel für 10 -15 min in eine Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml Ethidiumbromid in TBE-Puffer) gelegt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare doppelsträngiger DNA. Bestrahlt man nun mit ultraviolettem Licht, so ist eine orange-rote Fluoreszenz im Bereich von 590 nm sichtbar. Das gefärbte Gel wurde mit einem Gel-Dokumentationssystem fotografiert. Die erhaltenen Bilder konnten ausgedruckt oder auf Diskette gespeichert werden. Da die Intensität der Fluoreszenz von der DNA-Menge abhängig ist, kann man auf diese Art auch die Konzentration der DNA bestimmen, indem man mit der bekannten Konzentration

des Markers vergleicht. Diese Methode der Mengenbestimmung ist nicht sehr genau, reicht aber für viele Anwendungen aus.

4.4. Reinigung der PCR-Produkte

Um mit dem PCR-Produkt weiterzuarbeiten, war es notwendig, dieses zu reinigen und von den übrigen Bestandteilen der Reaktion zu trennen. Dazu standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Zum einen konnte der gesamte PCR-Ansatz aufgereinigt werden, zum anderen konnte man aber auch das entstandene PCR-Produkt aus dem Agarosegel extrahieren.

4.4.1. Reinigung des PCR-Ansatzes

Das bei einer PCR entstandene DNA-Fragment wurde mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (ROCHE, Mannheim) von den übrigen Bestandteilen einer PCR getrennt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bindung der DNA an eine Membran aus Silicagel, während die anderen Komponenten der PCR ausgewaschen werden können. Es wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen: Ein Volumenteil PCR-Gemisch wurde mit 5 Volumenteilen Bindungspuffer versetzt, gemischt und auf die Silicagel-Säule aufgetragen. Man zentrifugierte 2 min und verwarf den Durchfluß. Die DNA war dabei an die Silicagelmembran gebunden worden. Nach Zugabe von 750 µl Waschpuffer wurde erneut für 2 min zentrifugiert. Durch diesen Waschschrift wurden bis auf die amplifizierte DNA alle weiteren Komponenten entfernt. Den Durchfluß verwarf man wiederum und durch 1-minütiges Zentrifugieren wurde restlicher Puffer entfernt. Die Säule wurde dann in einem Sammelröhrchen plaziert und 50 µl steriles *Aq.dest.* aufgetragen. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt eluierte man die DNA in das Sammelröhrchen. Die DNA wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für die weitere Verwendung aufbewahrt.

4.4.2. Isolierung von PCR-Produkten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente, die man in der Gelelektrophorese aufgetrennt hatte, aus dem Agarosegel zu extrahieren, wurde das *GeneClean Spin Kit* (BIO101, Vertrieb über Q-BIOGENE, Heidelberg) eingesetzt. Die dabei angewandte Methode beruhte auf dem Schmelzen der Agarose, der Bindung der DNA an Glasmilch und dem Auswaschen der übrigen Substanzen. Zunächst wurde das gewünschte DNA-Fragment unter dem UV-Licht des Transilluminators mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 450 µl Glasmilch-Suspension inkubierte man bei 56 °C im Heizblock bis die Agarose geschmolzen war. Man durchmischte die Suspension und trug die Flüssigkeit auf einen Filter auf. Die DNA wurde von der Glasmilch gebunden, die bei dem folgenden Zentrifugationsschritt vom Filter zurückgehalten wurde, während die Flüssigkeit in das Auffanggefäß gelangte. Dieser Durchfluß wurde verworfen und 550 ml *GC New Wash* aufgetragen. Dieser Waschpuffer wurde in einem 2-minütigen Zentrifugenlauf wieder entfernt, verworfen, und das im Filter zurückbleibende Pellet durch 1-minütiges Zentrifugieren getrocknet. Zum Eluieren der DNA gab man 30 µl steriles *Aq. dest.* auf den Filter, inkubierte bei 37 °C für 2 min und zentrifugierte erneut ab. Im Durchfluß befand sich die DNA in Lösung und konnte in dieser Form weiterverwendet oder bei –20 °C aufbewahrt werden.

4.5. Ligation der PCR-Produkte

Bei der Ligation wird das zu klonierende DNA-Fragment mit einem in linearer Form vorliegenden Vektor verknüpft. Diese Reaktion wird durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Da die Taq-Polymerase an das 3'-Ende der PCR-Produkte ein einzelnes Adenosin anhängt (Clark, 1988), verwendet man zur Ligation einen Vektor, der an den Enden jeweils ein Thymidin besitzt. Diese Art der Ligation wird als T-A-Ligation bezeichnet und ist effizienter als eine Ligation mit sog. glatten Enden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das pGEMTM-T-Vektor-System von Promega verwendet, das neben dem Vektor auch Ligase und Puffer enthält. Für eine Reaktion pipettierte man folgende Komponenten in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß:

7,5 µl 2 x Ligasepuffer
1 µl pGEMTM-T-Vektor
5,5 µl gereinigtes PCR-Produkt
1 µl T4-DNA-Ligase

Man inkubierte bei 4 °C über Nacht oder 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend konnte dieser Ansatz ohne weitere Behandlung für die Transformation verwendet werden.

4.6. Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von DNA durch Zellen. Wenn man Bakterien mit einem geeigneten Vektor transformiert, kann man den Vektor mit der darin enthaltenen gewünschten DNA beliebig vermehren, da die Zellen bei ihrer Teilung die Vektor-DNA an die Nachkommen weitergeben. Damit möglichst viele Zellen DNA aufnehmen, verwendet man zur Transformation sogenannte kompetente Bakterien.

4.6.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterien sind in der Lage DNA-Moleküle aus der Umgebung in geringen Maße in ihre Zelle aufzunehmen. Um eine Transformation effizienter durchzuführen, verwendet man kompetente Zellen. Als kompetente Zellen bezeichnet man Bakterien, die man mit physikalischen und chemischen Methoden so manipuliert hat, daß sie in verstärktem Maße DNA aufnehmen können. Eine Möglichkeit zur Herstellung kompetenter Bakterien ist die Verwendung sog. TSS-Lösung (*Transformation and Storage Solution*) (EPICENTRE TECHNOLOGIES über BIOZYM, Hess.Oldendorf) Die Herstellung der kompetenten Bakterien erfolgte in

Anlehnung an die Methode von Hondal und Schaeffer (1995). Man verdünnte eine Über-Nacht-Kultur des *E. coli*- Stamms *XL-1Blue* oder eines anderen benötigten Bakterienstammes in 50 ml LB-Medium und ließ die Kultur auf dem Schüttler bei 250 upm und 37 °C bis zur mittleren logarithmischen Phase wachsen. Die Zellen wurden dann bei 4 °C und 1500 x g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 100 µl pro 1 ml Kulturmedium vorgekühlter 1 x TSS-Lösung aufgenommen. Nach Resuspendieren der Zellen teilte man sie in Aliquots zu je 100 µl. Die so behandelten Bakterien wurden bei –80 °C eingefroren und bei Bedarf zur Transformation eingesetzt.

TSS:

Polyethylenglycol (PEG) (3350 oder 8000)	10 % (w/v)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	5 % (v/v)
MgSO ₄	20 - 50 mM
in LB-Medium	
pH 6,5	

LB-Medium:

Bacto-Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

ad 1l *Aqua bideest.*

pH 7,3 autoklavieren

LB-Agar:

LB-Medium	1 l
Agar	15 g
autoklavieren	

4.6.2. Messung der optischen Dichte (OD) einer Zellkultur

Um das Wachstum einer Bakterienkultur zu verfolgen, macht man sich zunutze, daß die Absorption einer Zellsuspension von der Zellzahl abhängig ist. Bei einer Wellenlänge von 600 nm entspricht eine OD-Einheit bei *E. coli* ungefähr $0,8 \times 10^9$ Zellen je Milliliter (Brown, 1993). Ein Aliquot der Suspensionskultur wird dazu in einem Spektralphotometer mit Licht der entsprechenden Wellenlänge 600 nm durchstrahlt. Aus der gemessenen optischen Dichte kann dann die Bakterienzahl berechnet werden.

Für die Messung wurde ein Spektralphotometer DU 64 der Firma BECKMANN verwandt. Ein Aliquot der Bakterienkultur wurde 1:10 verdünnt und in einer 100 µl Mikroglasküvette gemessen.

4.6.3. Transformation

Pro Ligationsansatz, den man transformieren wollte, wurden 100 µl kompetente Bakterien 5 min auf Eis aufgetaut. Man pipettierte den Ligationsansatz dazu und ließ die Zellen weitere 20 - 30 min auf Eis stehen. Dann gab man 800 µl auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium zu. Die Ansätze wurden im Schüttler bei 250 upm und 37 °C für 1,5 h inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Bakterien auf einem Nährboden ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht aufbewahrt. Am folgenden Tag konnten die Platten ausgewertet werden.

4.6.4. Selektion der transformierten Bakterien

Bei einer Transformation wird nur ein recht geringer Teil der Bakterien transformiert, während die meisten Zellen keine Plasmid-DNA aufnehmen. Weiterhin hat ein Teil der transformierten Zellen lediglich Vektor-DNA ohne Insertion aufgenommen. Um diese Bakterien von denen, die Vektor mit Insertion aufgenommen haben, zu unterscheiden, bedient man sich zweier Selektionmerkmale. Die verwendeten Vektoren besitzen ein Gen, daß den Bakterien, die den Vektor aufgenommen haben, eine Antibiotikaresistenz verleiht. Da man die Bakterien auf Antibiotika-haltigen Nährböden (5 µg/ml Ampicillin bzw. Carbenicillin) ausstreicht, können nicht-transformierte Bakterien nicht wachsen. Der hier eingesetzte pGEMTM-T-Vektor verhilft den Bakterien zu einer Resistenz gegen Ampicillin bzw. das Ampicillin-Analogon Carbenicillin. Zum zweiten besitzen die Vektoren an der Stelle, an der die Insertion einkloniert wird, das *Lac-z*-Gen, das für β-Galactosidase codiert. Zur Induktion dieses Gens gibt man zu den Nährböden 0,5 mM IPTG (β-D-Isopropyl-Thiogalactopyranosid). Trägt der Vektor keine Insertion, so wird β-Galactosidase gebildet, die das in den Nährböden vorhandene X-Gal (80 µg/ml) zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Somit bleiben

Insertion-tragende Bakterienkolonien weiß, während solche ohne Insertion blau erscheinen. Allerdings kann es in einigen Fällen vorkommen, daß auch Insertion-tragende Bakterienkolonien blau erscheinen. Um das Plasmid aus weißen Kolonien zu gewinnen, pickte man je eine weiße Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher oder einer sterilen Pipettenspitze, überführte sie in 5 ml LB-Medium, dem man das entsprechende Antibiotika zugesetzt hatte und ließ sie bei 37 °C und 250 upm im Schüttler über Nacht wachsen. Am folgenden Tag konnte das Plasmid isoliert werden.

Ampicillin: 50 mg/ml in *Aqua bidest.*, Vorratslösung
Kanamycin: 10 mg/ml in *Aqua bidest.*, Vorratslösung
IPTG: 0,1 M in *Aqua bidest.*, Vorratslösung
X-Gal: 100 mg in 2 ml Dimethylformamid, Vorratslösung

4.7. Plasmidpräparation

Die Gewinnung der Plasmide aus den Bakterienkulturen kann auf einfache Weise mit dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim) erfolgen. Die dabei angewendete Methode beruht auf der Lyse der Bakterienzellen unter alkalischen Bedingungen und der Bindung der Plasmide an eine Silicagelmembran in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen. Im Einzelnen ging man nach folgendem Protokoll vor: Die üN-Kulturen wurden zunächst 20 - 30 min auf Eis gestellt und dann in 2 ml Reaktionsgefäßen abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst gründlich entfernt und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Das Resuspendieren hatte vorsichtig zu erfolgen, um die Bakterien-DNA nicht zu scheren. Der Puffer P1 enthält außerdem RNaseA, um die RNA der Zellen zu verdauen. Man gab nun Puffer P2 zu, invertierte mehrmals und inkubierte für 1 - 2 min. Dieser Puffer enthält SDS und NaOH. Dadurch kam es zu einer Lyse der Zellen, Freisetzung ihres Inhalts und Denaturierung von DNA und Proteinen. Um die Lysisreaktion zu beenden, gab man 350 µl Puffer P3 zu und invertierte wiederum kurz. Dieser Schritt neutralisierte zunächst und führte zu einer Präzipitation von Proteinen, chromosomaler DNA und anderen Zellbestandteilen, während die Plasmid-DNA renaturieren konnte. Durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 14000 upm wurde das Präzipitat am Boden

des Reaktionsgefäßes gesammelt. Der Überstand mit dem darin gelösten Plasmid wurde abgenommen und auf eine Säule gegeben. Diese Säule enthält eine Membran aus Silicagel, an welche die Plasmid-DNA bindet. Die Säulen wurden mit 500 µl Puffer PB überschichtet und für 2 min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säule mit 750 µl Puffer PE überschichtet und erneut für 2 min zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Durchflusses, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 min, um restlichen Puffer zu entfernen. Durch diese Waschschriffe wurden Verunreinigungen und Salzreste der vorher verwendeten Puffer entfernt. Die Säule wurde jetzt in einem Sammelgefäß plaziert und mit 100 µl sterilem Wasser überschichtet und erneut für 2 min zentrifugiert. Bei diesem Schritt löste sich die DNA von der Membran und gelangte in das Sammelgefäß, wo sie als wäßrige Lösung vorlag und bei -20 °C aufbewahrt werden konnte. Der DNA-Gehalt der Probe wurde dann photometrisch bestimmt.

4.8. Ultraviolettabsorptionsspektrometrie

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

Alle Messungen wurden mit dem Spektralphotometer Genequant II der Firma PHARMACIA durchgeführt. 100 µl einer 1:20 Verdünnung der Nukleinsäure-Lösungen wurden in eine Mikroquarzküvette pipettiert und die Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Schritt gemessen. Das Gerät war so programmiert, daß es sowohl die Konzentration, als auch die Reinheit der DNA-Lösung anzeigte

4.9. Restriktionsverdau der gewonnenen Plasmide

Um zu kontrollieren, ob die Plasmide tatsächlich die gewünschte Insertion enthielten, unterzog man sie einem Restriktionsverdau. Restriktionsendonukleasen stammen aus Bakterien und sind in der Lage, eine für sie spezifische Sequenz von wenigen Nukleotiden zu erkennen und zu schneiden, indem sie die Phosphodiesterbindung der DNA spalten. Im verwendeten Vektor befinden sich auf beiden Seiten der Insertionsstelle eine Reihe von potentiellen Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Man wählte zwei Enzyme aus, die auf jeweils einer Seite der Insertion schneiden. Als Puffer wurde ein Universalpuffer (*One phor all buffer plus*, AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg) verwendet.

Für einen Ansatz wurden folgende Komponenten in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

Plasmidlösung	6 µl
OPA-Puffer	2 µl
EcoR I	1 µl
Xho I	1 µl

Man inkubierte für 1 h bei 37 °C und setzte dann 5 µl bzw. 10 µl des Ansatzes für die Gelelektrophorese ein, um die Größe der Insertion zu bestimmen.

4.10. Checking-PCR

Neben dem Restriktionsverdau lassen sich Bakterienkolonien mit Hilfe der PCR-Technik auf das Vorhandensein bzw. Fehlen rekombinanter Plasmide überprüfen. Besonders wichtig ist diese Methode, wenn das verwendete Vektorsystem keine Blau-Weiß Selektion ermöglicht, wie es zum Beispiel häufig bei Expressionsvektoren der Fall ist.

Zur Durchführung überführte man mit einer sterilen Pipettenspitze die zu überprüfende Kolonie in 20 µl LB-Medium und resuspendierte die Zellen. Von dieser Lösung wurde 1 µl für eine PCR mit Primern, die rechts und links der *multiple cloning site* des Vektors liegen, verwendet. Die entstandenen PCR-

Produkte wurden anschließend elektrophoretisch analysiert. Ihre Größe entsprachen den klonierten DNA-Fragmente.

4.11. Herstellung einer Dauerkultur

Von einem Teil der üN-Kulturen setzte man eine Dauerkultur, einen sog. Glycerinstock, an, der tiefgefroren aufbewahrt wird. 2 Volumenteile einer üN-Kultur und ein Volumenteil Aufbewahrungsmedium (LB-Medium + 50 % Glycerin) wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und durchmischt. Dieser Glycerinstock ist bei -20 °C für ca. 6 Monate und bei -80 °C für ca. 2 Jahre haltbar. Bei Bedarf kann hiervon eine Kultur angesetzt werden, indem man zunächst einen Teil auf einem Nährmedium ausstreicht, am folgenden Tag eine Kolonie aufnimmt und eine neue üN-Kultur ansetzt.

4.12. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung hat zum Ziel die Basenabfolge in einem bestimmten DNA-Fragment zu ermitteln. Dazu stehen zum einen das Maxam-Gilbert-Verfahren, zum anderen das Sanger-Verfahren zur Verfügung. Die im folgenden beschriebene Vorgehensweise beruht auf dem Prinzip der Sanger-Sequenzierung. Dabei wird die DNA mittels einer DNA-Polymerase synthetisiert. Dem Reaktionsgemisch ist dabei neben dNTPs noch jeweils ein 2'-3'-Dideoxynukleotid hinzugefügt (ddNTP). Wird ein solches ddNTP anstelle eines normalen dNTP eingebaut, so kommt es zu einem Abbruch der Synthesereaktion, da die OH-Gruppe zum Knüpfen der nächsten Phosphodiesterbindung fehlt. Das Verhältnis von dNTP zu ddNTP im Reaktionsansatz ist so gewählt, daß die Synthese der einzelnen Stränge zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgebrochen wird und so ein Gemisch von Strängen verschiedener Länge entsteht. Für jedes Nukleotid setzt man eine Reaktion mit dem jeweiligen ddNTP an. Die Ansätze werden dann auf ein hochauflösendes Polyacrylamidgel aufgetragen, mit dem Fragmente, deren Länge sich nur in einem Nukleotid unterscheidet, aufgetrennt werden können. Anhand der Abfolge der Banden im Gel kann die Sequenz gelesen werden. Für die Sequenzierung wurde das *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer*

cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg) eingesetzt, das Gemische von dNTPs mit je einem ddNTP als sog. Terminationsmische enthält. Zur Markierung der Syntheseprodukte verwendete man mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Primer. Die Sequenzen wurden mit einem automatischen Sequenziergerät vom Typ LiCor 4200 gelesen.

4.12.1. Sequenzierreaktion

Die Synthese der DNA-Stränge erfolgte mittels einer PCR-Reaktion. In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde folgender Ansatz pipettiert:

x µl Plasmid
1 µl markierten Primer
y µl *Aq. dest.* (Gesamtvolumen 18 µl).

Es wurden in der Regel zwischen 10 µl und 14 µl Plasmid eingesetzt.

Die Ansätze wurden durchmischt und lichtgeschützt und bis zur endgültigen Verwendung auf Eis aufbewahrt. In 4 PCR-Reaktionsgefäße pipettierte man jeweils 1,5 µl basenspezifischer Terminationsmische und anschließend 4,5 µl der obigen Ansätze. Die PCR wurde dann nach folgendem Protokoll durchgeführt:

95 °C: 5 min
95 °C: 30 sec; $T_m - 2$ °C: 20 sec; 70 °C: 1 min; 30x
4 °C: ∞

Im Anschluß wurden die Proben bei 95 °C für 5 min inkubiert, um sie zu denaturieren. Dann stellte man sie sofort auf Eis und gab nach einigen Minuten 3 µl Ladepuffer hinzu. Danach wurden die Proben auf das Gel aufgetragen.

Stop-/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

4.12.2. Gießen des Elektrophoresegels

Um die Produkte der Sequenzierreaktion aufzutrennen, wurde ein Polyacrylamidgel gegossen. Dazu wurden zunächst die dafür bestimmten Glasplatten gereinigt. Zwischen die Platten legte man Abstandhalter mit einer Dicke von 0,25 mm. Für das Gel wurden 24 ml von Komponente 1 und 6 ml von Komponente 2 der Sequagel-XR-Lösungen (Vertrieb über BIOZYM, Hess. Oldendorf) zusammengegeben. Diese Mischung wurde mit einer Spritze durch einen Filter mit einer Porengröße von 45 µm gedrückt. Anschließend gab man 175 µl frisch hergestellte 10-%ige APS-Lösung hinzu, um den Polymerisationsprozeß zu starten. Diese Lösung wurde sofort zwischen die Gelplatten gegossen und der Vorkamm eingesteckt. Nach ca. 2 h war das Gel fertig polymerisiert und wurde in das Sequenziergerät eingehängt.

4.12.3. Gelelektrophorese

Vor dem Laden des Gels wurde zunächst ein 45-minütiger Vorlauf gestartet. Als Laufpuffer wurde frisch angesetzter 1 x TBE verwendet. Nach dem Vorlauf wurde der Kamm eingesetzt, jeweils 2 µl Probe in die vom Kamm gebildeten Taschen pipettiert und der Gellauf, der 6 - 7 h benötigte, gestartet.

4.12.4. Auswertung des Gellaufs

Mit Hilfe des Programms Image-Analysis wurden die Sequenzen automatisch gelesen, bei Bedarf manuell korrigiert und anschließend abgespeichert. Im Normalfall konnten zwischen 500 und 1200 bp gelesen werden.

4.12.5. Analyse der Sequenzdaten

Um herauszufinden, ob es sich bei den sequenzierten DNA-Abschnitten um die gewünschten cDNAs handelt, wurden die Daten mit Hilfe des Programms BLAST [*Basic Local Alignment Search Tool*] an Datenbanken geschickt. Hierbei wurde das Unterprogramm *blastx* verwendet, das die Nukleotidsequenz automatisch in alle sechs möglichen Leseraster übersetzte und mit einer Proteindatenbank verglich.

4.13. Subklonierung

Mit dem verwendeten Sequenzierer kann man zwischen 500 und 1200 Basenpaare von jeweils beiden Enden der Insertion lesen. Ist die im Vektor befindliche Insertion länger, so reichen diese Leseweiten nicht aus. Um auch den in der Mitte liegenden Teil zu lesen, stehen verschiedene Möglichkeiten offen. Ein Ansatz ist die Herstellung von spezifischen Primern anhand der schon bekannten Sequenz, um den noch nicht sequenzierten Teil in einer PCR zu vervielfältigen. Das PCR-Produkt kann dann in einen Vektor inkloniert und sequenziert werden. Eine andere Möglichkeit besteht im Ausschneiden des unbekanntes Teils der Insertion mit Restriktionsenzymen und der anschließenden Einklonierung in einen Vektor.

4.14. RNA-Präparation

4.14.1. DEPC-Behandlung von Lösungen und Verbrauchsmaterialien

Bei Arbeiten mit RNA ist es notwendig alle verwendeten Lösungen und Materialien mit einem RNase-Inhibitor wie z. B. Dimethylpyrocarbonat (DMPC) zu behandeln. DMPC bindet kovalent an die Aminosäuren Tyrosin und Histidin der RNasen und zerstört dadurch deren Struktur (Leonard *et al.*, 1970). Zur Herstellung von RNase-freien Puffern und Wasser wurden diese mit 0,1 % DMPC versetzt und ½ h lang gerührt. Reaktionsgefäße wurden über Nacht in DMPC-Lösung behandelt. Zur Inaktivierung des DMPC wurde anschließend autoklaviert. Zum Pipettieren wurden RNase-freie PCR-Filterspitzen verwendet. Hitzestabile Glasgefäße wurden bei 180 °C für 3 h sterilisiert. Die Arbeitsfläche, Gelkammer und Gelkämme wurden mit RNase-Away (ROTH, Karlsruhe) behandelt, um RNasen zu inaktivieren.

4.14.2. RNA-Isolation mit Hilfe von TRIzol-Reagenz

TRIzol (GIBCO LifeTechnologies) ist ein Reagenz, bestehend aus einer monophasischen Lösung von Phenol und Guanidin-Isothiocyanat zur Isolation von RNA aus Zellen und Gewebe. Die Methode beruht auf einem Verfahren von Chomczynski und Sacchi (1987). Nach der Homogenisierung und Lyse der Proben und der Zugabe von Chloroform erfolgt die Trennung die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase, wobei die RNA ausschließlich in der wässrigen Phase verbleibt. Durch Versetzen mit Isopropanol wird die RNA dann ausgefällt.

Etwa 1 g tiefgefrorenes Schwammgewebe wurde mit Mörser und Pistill unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert, in 6 ml TRIzol-Reagenz überführt, gevortext und 5 min bei RT inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C abgetrennt, der Überstand in 6 Reaktionsgefäße überführt und pro 1 ml verwendeten TRIzol-Reagenz 200 µl Chloroform zugegeben. Nach 15 sec Vortexen und 3-minütiger Inkubation bei RT wurde 15 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert und die obere wässrige Phase abgenommen. Der auf sechs neue Reaktionsgefäße verteilte Überstand wurde mit

jeweils 0,5 ml Isopropanol versetzt, gemischt und die RNA 10 min bei RT ausgefällt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C wurde das RNA Pellet mit 75 %igen Ethanol gewaschen und in 50 µl H₂O aufgenommen. Die Konzentration der gewonnenen RNA konnte spektrophotometrisch bestimmt werden. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei –80 °C gelagert.

4.15. RNA-Gel

Zur Kontrolle der Qualität der isolierten RNA wurde diese auf ein Elektrophoresegel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung von einzelsträngiger RNA muß aufgrund der möglichen Ausbildung von Sekundärstrukturen unter denaturierenden Bedingungen stattfinden. Als denaturierende Substanz wurde Formaldehyd verwendet (Lehrach *et al.*, 1977).

Zur Herstellung des Gels wurden 0,5 g Agarose, 2,5 ml 10 x Boratpuffer und 42,5 ml *Aqua bidest.* aufgekocht und nach Abkühlung auf 60 °C mit 4 ml 37 %igen deionisierten Formaldehyd versetzt. Nach dem Ausgießen des Gels wurde die Total-RNA mit einer entsprechenden Menge an RNA-Probelösung versetzt, bei 56 °C 10 min lang denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandards wurde die DIG-markierten Marker I, II oder III von ROCHE (Mannheim) verwendet. Der Gellauf selbst erfolgte bei 10 V/cm in 1 x Boratpuffer. Das Gel wurde anschließend in Toluidinblaulösung gefärbt und in *Aqua bidest.* 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

Ladepuffer:

deionisiertes Formamid 197 µl

Formaldehyd 64 µl

20 x Boratpuffer 39 µl

in *Aqua bidest.*

Toluidinblaulösung:

Toluidinblau 1 %

Methanol 40 %

4.16. Northern-Blot

Ein Northern-Blot dient dazu, in aus einem Organismus isolierter RNA ein bestimmtes Transkript durch eine spezifische Sonde nachzuweisen. Dazu wird die auf einem Gel aufgetrennte RNA auf eine Membran transferiert, fixiert, mit einer markierten Sonde hybridisiert und anschließend die Sonde detektiert. Als Markierung wurde Digoxigenin-UTP verwendet. Die Detektion erfolgt mit einem gegen das Digoxigenin gerichteten Antikörper, an den alkalische Phosphatase gekoppelt ist. In einer sich anschließenden Enzymreaktion wird das Substrat CDP-StarTM (ROCHE, Mannheim) zu einem metastabilen Diocetan-Phenolat-Anion umgesetzt. Die beim Zerfall dieser Verbindung entstehende Chemolumineszenz wird zur Belichtung eines Films benutzt, auf dem so ein Bandenmuster entsteht.

4.16.1. Herstellen der DNA-Sonde

Das DNA-Fragment wurde mit dem *PCR DIG Probe Synthesis Kit* (ROCHE, Mannheim) markiert. Die dabei angewandte Methode beruht darauf, daß in einer PCR die DNA amplifiziert wird, wobei in das PCR-Produkt Digoxigenin-gekoppeltes UTP eingebaut wird. Das auf diese Weise markierte Fragment kann dann mit Hilfe von Antikörpern, an die alkalische Phosphatase gebunden ist, nachgewiesen werden. Für die PCR setzte man folgende Reaktion an:

10x Puffer	5 µl
PCR DIG Probe Synthesis Mix	2,5 µl
dNTP-Stammlösung	2,5 µl
Primer p	2 µl
Primer m	2 µl
Template	1 µl
Wasser	34,25 µl
Enzym-Mix	0,75 µl

Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde auf ein Gel aufgetragen, um zu kontrollieren, ob das richtige Fragment entstanden ist. Das entsprechende DNA-Fragment wurde anschließend mit der oben beschriebenen Methode aus dem Gel extrahiert.

4.16.2. Gelelektrophorese

Zunächst wurde eine Gelelektrophorese wie oben beschrieben durchgeführt. Es wurden 5 – 10 µg Total-RNA aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das Gel zunächst 5 min in *Aqua dest.* und dann 20 min in 20 x SSC langsam geschüttelt.

20 x SSC Stammlösung:

NaCl 3 M

Na-Citrat pH 7,0 0,3 M

in *Aqua bidest.*

4.16.3. Transfer

Anschließend wurde der Blot in der folgenden Reihenfolge aufgebaut: Ein 4 cm hoher Stapel Papiertücher, zwei Blatt trockenes Whatmanpapier, ein Blatt in 20 x SSC angefeuchtetes Whatmanpapier, in Wasser angefeuchtete Nylon-Membran, Gel, wobei die Geltaschen oben liegen sollten, drei Blatt in 20 x SSC angefeuchtetes Whatmanpapier. Alle Papiere waren auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Zuerst kamen zwei lange Streifen Whatmanpapier, die wiederum in 20 x SSC angefeuchtet waren. Diese Streifen wurden mit dem einen Ende auf den Stapel gelegt und mit dem anderen Ende in eine Schale mit 20 x SSC, so daß der Puffer aufgrund der Kapillarkraft durch das Whatmanpapier, das Gel und durch die Membran gesogen wurde. Dabei wurde die RNA aus dem Gel auf die Membran übertragen. Der Blot wurde mit einem Gewicht beschwert und die RNA 3 h transferiert. Anschließend wurde der Blot wieder abgebaut und die RNA im UV-Crosslinker zur Fixierung an der Membran mit 120 mJ bestrahlt. Nach diesem Schritt wurde die RNA zusammen mit der Hybridisierungslösung welche die zuvor bei 95 °C denaturierte Sonde enthielt, in Plastikfolie eingeschweißt und bei 50 °C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Als Hybridisierungslösung wurde Dig-Easy-Hyb (ROCHE, Mannheim) verwendet. Es wurden 150 ng DIG-markierte

Sonde eingesetzt. Am nächsten Morgen wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und in einem Falconröhrchen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für eine weitere Verwendung aufbewahrt. Die Membran wurde nun in flachen Schalen gewaschen. Zunächst 2 x 15 min in Waschlösung A und anschließend 2 x 15 min bei $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Waschlösung B. Mit diesen Waschschrritten wurden Verunreinigungen und falsch gebundene Sonde entfernt. Es schloß sich ein Waschschrritt in Puffer P1 für 5 - 10 min an. Dann wurde die Membran für 30 min in 2 % Blocking-Reagenz in P1 gewaschen und dann 30 min in 2 % Blocking-Reagenz mit dem Anti-Dig-Antikörper-AP in P1 inkubiert. Der Antikörper lag dabei in einer Verdünnung von 1:10000 vor. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde nochmals für 2 x 10 min mit P1 gewaschen. Zum Schluß wurde 2 x in P3 gewaschen. Für sämtliche Waschschrritte war ein Volumen von 100 - 200 ml Flüssigkeit erforderlich. Außerdem erfolgten die Waschschrritte auf einem Schüttler. Zur Detektion der Signale wurde die Membran für 5 min mit CDP-Star-Lösung bedeckt. Nach diesem Schritt wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschweißt und in einer Röntgenfilmkassette mit dem Film inkubiert. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 5 und 60 min.

Blockierungslösung:

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

Waschlösung A:

2 x SSC
0,1 % SDS

Waschlösung B:

0,5 x SSC
0,1 % SDS

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

4.17. Expression

Zu beiden im Rahmen dieser Arbeit klonierten cDNAs sollten die entsprechenden Proteine in *E. coli* exprimiert werden, um mit den rekombinanten Proteinen Funktionsstudien durchzuführen. Dabei kamen zwei verschiedene Expressionssysteme zum Einsatz: Das pQE-System (QIAGEN, Hilden) und das pGEX-System (AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg).

4.17.1. Expression des DERM_SD

Um ein Fremdprotein in Prokaryonten zu exprimieren, muß das entsprechende Gen in einen Expressionsvektor kloniert werden. Für die Expression des DERM_SD aus *Suberites domuncula* wurde der prokaryotische Expressionsvektor pQE30 der Firma QIAGEN eingesetzt. Dieser Vektor enthält Regulator-Elemente des *E. coli lac*-Operons, durch Zugabe von β -D-Isopropyl-Thiogalactopyranosid (IPTG) kann die Expression des rekombinanten Proteins gestartet werden. Die Sequenz ist dabei dergestalt in den Vektor einkloniert, daß zusätzlich sechs Histidin an den N-Terminus des Proteins angefügt werden. Diese dienen dazu das rekombinante Protein über Affinitätschromatographie aufzureinigen. Über die Histidinreste binden die Proteine mit einer Dissoziationskonstante von 10^{-13} an mit zweifach positiv geladenen Nickel versetzte Nitrilo-Triessigsäure (NTA = *Nitrilotriaceticacid*), welche wiederum an das Säulenmaterial gebunden ist. Über eine Änderung des pH-Wertes können die Proteine nach mehreren Waschschritten von der Nickel-NTA-Säule gelöst werden, da Histidin protoniert wird und nicht mehr mit dem Nickel wechselwirken kann. Ein weiterer Vorteil ist der einfache Nachweis des rekombinanten Proteins im Western-Blot mit Hilfe eines Anti-Histidin-Antikörpers.

Die gewünschte Nukleotidsequenz wurde mittels PCR amplifiziert. Als Matrize diente die im Vektor pGEMTM-T einklonierte cDNA. Die verwendeten Primer besaßen neben der genspezifischen Sequenz Schnittstellen für zwei in der *multiple-cloning-site* des Vektors vorhandene Restriktionsenzyme. Nach Restriktionsverdau von Insert und Vektor und Dephosphorylierung des Vektors mit alkalischer Phosphatase konnte das PCR-Produkt dadurch gerichtet in den

Expressionsvektor pQE30 einligiert werden. Nach der Transformation von kompetenten Zellen wurden mit einer checking-PCR Klone, welche die entsprechende Insertion enthielten, identifiziert und von diesen eine Über-Nacht-Kultur angesetzt. Zur Expression wurden 2 ml dieser Kultur in 100 ml LB-Amp gegeben und dann bis zu einer $OD_{600} = 0,5 - 0,6$ bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kultiviert. Dann wurde eine Probe von 1 ml als nicht-induzierte Kontrolle entnommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Der Rest der Kultur wurde mit 1 mM IPTG für 6 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 250 upm weiter inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten bei $4000\text{ } \times g$ abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

4.17.2. Aufreinigung des rekombinanten Proteins

Für die Aufreinigung des rekombinanten Proteines wurde das *Ni-NTA-Spin Kit* (QIAGEN, Hilden) benutzt. Dazu taute man das Pellet zunächst auf Eis auf. Pro 50 ml Kulturvolumen wurden 2 ml Puffer B zugegeben und die Zellen eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren lysiert. Nach Abzentrifugation vorhandener Zellbruchstücke für 30 Minuten bei $10000\text{ } \times g$ und Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und 20 μl für die spätere Kontrolle bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. 1 ml Überstand gab man anschließend auf eine Ni-NTA-Säule und zentrifugierte ($700\text{ } \times g$, 2 min). Der Durchfluß wurde als Kontrolle aufbewahrt. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit Puffer D, indem jeweils 700 μl aufgetragen und dann wieder zentrifugiert wurde ($700\text{ } \times g$, 2 min). Der Durchfluß wurde auch hier zur Kontrolle aufgehoben. Zur Elution des rekombinanten Proteins wurde dann zweimal 200 μl Puffer E auf die Säule gegeben und wie oben beschrieben zentrifugiert. Beide Eluate bewahrte man bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf.

Puffer B:

Harnstoff	8 M
NaH_2PO_4	0,1 M
Tris/HCl pH 8,0	0,01 M

in *Aqua bidest.*

Puffer D:		Puffer E:	
Harnstoff	8 M	Harnstoff	8 M
NaH ₂ PO ₄	0,1 M	NaH ₂ PO ₄	0,1 M
Tris/HCl pH 5,9	0,01 M	Tris/HCl pH4,5	0,01 M
in <i>Aqua bidest.</i>		in <i>Aqua bidest.</i>	

4.17.3. Expression des Aggregationsfaktors

Um den Aggregationsfaktor aus *Geodia cydonium* zu exprimieren, wurde der prokaryotische Expressionsvektor pGEX-2T (AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg) eingesetzt. Auch dieser Vektor besitzt die Regulator-Elemente des *E.coli-lac*-Operons zur Induktion der Expression durch Zugabe von β -D-Isopropyl-Thiogalactopyranosid (IPTG). Bei diesem System wird an den N-Terminus des rekombinanten Proteins das Enzym Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* angefügt. Das so entstandene Fusionprotein lässt sich dann über eine Glutathion-Sepharosesäule affinitätschromatographisch aufreinigen. Glutathion-S-Transferase bindet hierbei an das Säulenmaterial, während andere Proteine durch mehrere Waschschriffe eluiert werden. Anschließend kann das Fusionsprotein mit Glutathion-haltigem Elutionspuffer von der Säule gewaschen werden. Weiterhin lässt sich das rekombinante Protein im Western-Blot mit Hilfe eines Anti-GST-Antikörpers detektieren. Die Amplifikation der Insertion, Ligation, Transformation und Expression entsprach der für das pQE-System beschriebenen Vorgehensweise. Nach 6 h Induktion wurden die Zellen für 20 Minuten bei 4000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde bei -20 °C aufbewahrt.

4.17.4. Aufreinigung des rekombinanten Proteins

Zur Aufreinigung wurde das Pellet in 50 μ l PBS pro ml Kulturvolumen resuspendiert und mittels Ultraschall lysiert. Durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 10000 x g wurden Zellbruchstücke entfernt. Ein Aliquot des Lysates bewahrte man für eine spätere Kontrolle auf. Das Zellysate wurde dann mit Glutathion-Sepharose, die zuvor in PBS gewaschen wurde, für 30 min bei Raumtemperatur

unter leichtem Schütteln inkubiert. Dabei wurden 2 ml Sepharose für ein aus 100 ml Expressionskultur gewonnenes Lysat eingesetzt. Die Sepharose füllte man anschließend in eine Säule. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift der Säule mit dem 10-fachen Volumen PBS. Von den Waschschriften wurden ebenfalls Proben zur späteren Kontrolle aufgehoben. Zur Elution des rekombinanten Proteins gab man anschließend 1 ml Glutathion-Elutionspuffer auf die Säule. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur ließ man den Elutionspuffer aus der Säule laufen. Dieser enthielt nun das rekombinante Protein und wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der Elutionsschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Alternativ konnte das rekombinante Protein von der Säule eluiert werden, indem man mit Thrombin das Protein von der Glutathion-S-Transferase trennte. Dazu wurde eine Thrombinlösung mit einer Konzentration von 10 Units/mg auf die Säule gegeben und anschließend mit PBS eluiert.

PBS:		Elutionspuffer:	
NaCl	140 mM	Glutathion	10 mM
KCl	2,7 mM	Tris-HCl pH 8,0	50 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM		
KH ₂ PO ₄	1.8 mM		

4.18. SDS-PAGE und Western-Blot

Mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese läßt sich ein Gemisch aus Proteinen in einem elektrischen Feld der Größe nach auftrennen. Durch das stark anionische Detergens 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 (Weber und Osborn, 1969). Mit Hilfe von Markern mit bekanntem Molekulargewicht kann das Molekulargewicht der Proteine bestimmt werden. Der Trennbereich der Gele ist von der Polyacrylamidkonzentration abhängig. Die aufgetrennten Proteine können nach dem Gellauf entweder mit Coomassie angefärbt oder aber auf eine Membran

transferiert werden, um anschließend bestimmte Proteine mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen. 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 Polyacrylamid-Konzentrationen der hier benutzten Trenngele lag bei 12 %. Es handelte sich um Vertikalgele mit einer Geldicke von 0,5 mm, die zwischen zwei durch Abstandhalter getrennte Glasplatten gegossen wurden. Zunächst wurde das 12-%ige Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht stattfindet, nach untenstehendem Schema pipettiert: nach der Zugabe von TEMED wurde das Gel sofort zwischen die sorgfältig mit Isopropanol gereinigten Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min war der Polymerisationsvorgang abgeschlossen und der Isopropanol wurde abgegossen. Nun wurde der Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt und das Sammelgel gegossen. Nach weiteren 30 min konnte der Kamm entfernt und die Taschen mit Whatman-Papier gereinigt werden.

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

Das fertige Gel wurde in die Gelkammer gestellt und diese mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden die bei 95 °C für 10 min denaturierten Proben und der Größenstandard aufgetragen, um das Gel dann bei 200 V für ca. 1 h laufen zu lassen.

SDS-Laufpuffer:		5 x Probenpuffer:	
Tris/HCl pH 8,325 mM		Tris/HCl pH	6,825 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>	

4.18.1. Gelfärbung

Das Gel wurde nach dem Lauf für 1 - 3 h in Roti-Blue-Lösung zum Färben gegeben. Roti-Blue ist eine kolloidale Coomassie Brilliant Blue G-250 Färbung für Proteine in Polyacrylamidgelen. Die Detektionsgrenze der Roti-Blue-Färbung liegt bei 30 ng pro Bande. Nach mehrstündiger Entfärbung in *Aqua dest.* konnte das Gel fotografiert werden.

4.18.2. Western-Blot

Bei dem als Western-Blotting bezeichneten Verfahren, ursprünglich von Towbin *et al.* (1979) beschrieben und dann verändert von Burnette (1981), werden die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Trägermembran transferiert. Die auf der Membran fixierten Proteine können mittels Antikörpern detektiert werden. Im allgemeinen wird zunächst ein primärer Antikörper, der gegen das Antigen gerichtet ist, zugegeben. Im zweiten Schritt wird ein sekundäres Antikörper-Enzym-Konjugat zugegeben, das konstante Domänen der Immunglobuline erkennt. Das an den Antikörper gekoppelte Enzym (alkalische Phosphatase) katalysiert eine chemische Reaktion. Nach Zugabe des entsprechenden Substrates kommt es bei Verwendung von NBT und X-Phosphat zur Ablagerung des gefärbten Substrates auf der Membran bzw. bei Verwendung von CDP-Star zur Lichtemission an der Reaktionsstelle.

Der Transfer der Proteine auf die Trägermembran wurde mit der von Kyhse-Anderson (1984) entwickelten Methode des Semidry-Blottings durchgeführt. Nach erfolgtem Gellauf wurde der Blot wie folgt aufgebaut: Zuerst wurden acht in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere gelegt, darauf die PVDF-Membran, die zuvor für 30 sec in Methanol und anschließend für 10 min in Transferpuffer getränkt wurde. Auf die Membran wurde das Gel gelegt. Abschließend wurden wieder acht in Transferpuffer getränkte Whatmanpapiere aufgelegt. Der Blot wurde nun mit der Membran nach unten auf die Anode der Blottingapparatur gelegt. Die Kathode wurde aufgelegt, die Apparatur geschlossen und die Proteine bei 1 mA/cm² für 60 min transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membranspur, die den Marker enthielt, abgeschnitten, mit Amidoschwarz 5 min gefärbt, anschließend entfärbt und getrocknet. Die restliche Membran wurde über Nacht

bei 4 °C in Blockingpuffer inkubiert, um die freien Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen und die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern. Am nächsten Tag erfolgten 5 Waschschriffe zu je 5 min in TBST. Dann folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in TBST, 1 % Blockingpuffer, für 1 h. Nach 5 weiteren Waschschriffen für 5 min in TBST, wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper für 1 h inkubiert. Anschließend wurde für 2 x 10 min in TBST und für ebenfalls 2 x 10 min in P3 gewaschen. Alle Schriffe erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Zur Detektion der Signale wurde die Membran für 5 min mit dem Substrat CDP-Star (ROCHE, Mannheim) überschichtet. Anschließend ließ man die Membran kurz abtropfen und legte sie in eine Röntgenfilmkassette. Danach wurde ein Film (*Fuji RX New*, BECHTHOLD, Kelkheim) aufgelegt und entwickelt. Die Belichtungsdauer lag zwischen 2 und 15 min. Alternativ wurde die Membran mit NBT/X-Phosphat im Dunkeln inkubiert, bis ein deutlicher Farbniederschlag sichtbar wurde.

Transferpuffer:

Tris 25 mM
 Glycin 192 mM
 Methanol 20%
 pH 8,3

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.*

TBST:

NaCl 150 mM
 Tris/HCl pH 8,81 mM
 Tween-20 0,1 %
 in *Aqua bidest.*

NBT:

75 mg/ml Nitro-blau-tetrazolium 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.

4.19. Proteinextraktion aus Schwammgewebe

Um Proteine aus *Geodia cydonium* zu isolieren, wurde 1 g Gewebe in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerkleinert. 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 min auf Eis gestellt. Danach schloß sich ein Zentrifugationsschritt an (16000 x g, 20 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Extraktionspuffer:

Tris, HCl, pH 8	50 mM
NaCl	0,5 M
Triton X-100	1 %

4.20. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bradford-Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, 1976) beruht darauf, daß eine Färbelösung in Abhängigkeit der Proteinkonzentration ihre Farbe ändert. Der rote Farbstoff bindet an basische oder aromatische Aminosäuren, wodurch die anionische (blaue) Form des Farbstoffes

stabilisiert wird, dessen Absorptionsmaximum dann bei 595 nm gemessen werden kann.

Zunächst wurde mit BSA- (*bovine serum albumin* = Rinder-Serumalbumin) Lösungen eine Verdünnungsreihe von 0,3 µg bis 50 µg/ml in einer Mikrotiterplatte angesetzt. Zu jeder Verdünnung wurden 150 µl Bradford-Reagenz (Roti-Quant, ROTH, Karlsruhe) zugegeben, kurz gemischt und im *Elisa-Reader* bei 595 nm gemessen. Die erhaltenen Werte dienten zur Erstellung einer Eichgerade.

Die Proben wurden bei unterschiedlichen Verdünnungen mit 150 µl Bradford-Reagenz gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Eichgerade bestimmt.

4.21. Bindungsassay

Die Interaktion zwischen Proteinen läßt sich unter bestimmten Bedingungen mit Hilfe eines modifizierten Western-Blotting-Verfahrens nachweisen. Dabei werden Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Dann erfolgt die Inkubation mit einer den potentiellen Liganden enthaltenden Proteinfraktion. Dieser Ligand läßt sich dann mit spezifischen Antikörpern nachweisen. Dabei ist allerdings zu beachten, daß die Proteine denaturiert vorliegen und möglicherweise nicht mehr an ihren Liganden binden können. Bei der Verwendung rekombinanter Proteine kommt außerdem hinzu, daß sie sich hinsichtlich ihrer posttranslationalen Modifikationen von den nativen Proteinen unterscheiden (Carr und Scott, 1992). Zur Durchführung wurde rekombinanter Aggregationsfaktor auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Nach Blockieren unspezifischer Bindungsstellen erfolgte die Inkubation mit Proteinextrakt aus *Geodia cydonium* bei Raumtemperatur für 1 h. Nach drei Waschschritten mit TBST wurde die Membran analog einem Western-Blot weiterbehandelt. Als primärer Antikörper wurde ein Anti-Lektin-Antikörper, als sekundärer Antikörper ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Die Detektion erfolgte kolorimetrisch mit NBT und X-Phosphat.

4.22. Aggregationstest

Mit dissoziierten Schwammeinzelzellsuspensionen lassen sich *in vitro* mit Hilfe eines einfachen Assays die für die Zellaggregation notwendigen Faktoren untersuchen. Unter geeigneten Bedingungen bilden die Einzelzellen dabei wieder makroskopisch sichtbare Zellaggregate (Zahn und Müller, 1973).

4.22.1. Papainverdau des Antikörpers

Antikörper lassen sich mit der Protease Papain spalten. Dabei werden die beiden Antigen-bindenden Stellen vom Antikörpermolekül abgespalten und man erhält zwei sogenannte Fab-Fragmente. Zu diesem Zweck wurde die Antikörperlösung mit 1 M HCl auf pH 6,5 eingestellt. Dann wurde Cystein bis zu einer Endkonzentration von 50 mM und EDTA bis zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt. Pro ml Antikörperlösung wurden 0,3 Agarose gekoppeltes Papain zugegeben. Dieser Ansatz wurde 10 h bei Raumtemperatur auf dem Rolleninkubator belassen. Anschließend wurde die Reaktion durch Zentrifugation der Papain-gekoppelten Agarose gestoppt und die Antikörperlösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.22.2. Dialyse des rekombinanten Proteins

Für die Funktionstests mußten die Elutionspuffer, in denen die rekombinanten Proteine vorlagen, entfernt werden. Dazu wurden die Eluate in Dialyseschläuche gefüllt und über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gegen Calcium-Magnesium-freies Seewasser dialysiert.

4.22.3. Präparation von Schwammzellen

Die Einzelzellsuspension der Schwammzellen gewann man durch Vereinzeln der Zellen in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freien artifiziellem Seewasser (CMFSW) + EDTA (2,5

mM). Dazu wurden etwa 1 - 2 cm³ große Gewebestücke aus den Schwämmen geschnitten, in CMFSW-EDTA überführt und in einer sterilen Petrischale zerkleinert. Die etwa 1 mm³ großen Stückchen wurden nun in 40 ml frisches CMFSW-EDTA überführt und ca. 15 min bei RT gerollert. Der Überstand wurde abgegossen und erneut 40 ml CMFSW-EDTA zugegeben. Nach 1 h auf dem Rollinkubator wurde die Lösung durch ein Nylonnetz mit 40 µm Maschenweite filtriert. Im Filtrat befanden sich nun die vereinzelt Zellen, die durch 10-minütige Zentrifugation bei 500 x g pelletiert wurden. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit CMFSW-EDTA, dann wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen CMFSW-EDTA aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

CMFSW

NaCl	460 mM
Na ₂ SO ₄	7 mM
KCl	10 mM
Hepes	10 mM
Penicillin	4 ml/l
Streptomycin	4 ml/l
In <i>Aq. dest.</i>	

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
In <i>Aq. dest.</i>	
pH 8,5	

4.22.4. Präparation des Aggregationsfaktors

Zur Aufreinigung des Aggregationsfaktors wurde frisches Schwammgewebe in CMFSW mit 80 mM EDTA homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden zu dem zellfreien Überstand 40 mM CaCl₂ hinzugefügt, um den Aggregationsfaktor zu präzipitieren. Die Suspension wurde bei 16000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, das Pellet in CMSFW mit 5 mM EDTA aufgenommen und 30 min gerührt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt unter denselben Bedingungen wurde der Überstand auf eine Sepharose 6B-Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule wurde der Aggregationsfaktor mit CMFSW eluiert. Diese Fraktion wurde als AF-Fraktion 6B bezeichnet und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.22.5. Durchführung des Aggregationsassays

Die Schwammzellen wurden in einer Dichte von 25 x 10⁶ Zellen/ml in 3 ml Glassröhrchen gegeben und auf dem Rolleninkubator bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt erfolgte in artifiziellem Seewasser. In weiteren Experimenten wurden gereinigter Aggregationsfaktor, Fab-Fragmente des Antikörpers PoAb-AF, bzw. rekombinantes Protein zugegeben. Nach 30 min wurden die Ergebnisse fotografisch dokumentiert.

4.23. Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenzmikroskopie erlaubt den indirekten Nachweis eines Proteins im Gewebe mit Hilfe eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers und eines Farbstoff-gekoppelten anti-Spezies Antikörpers, z. B. *anti-rabbit-FITC* (Vandesande, 1983).

Kleine Stücke von *Geodia cydonium* wurden für 1 Stunde in 6 %iger HF-Lösung eingelegt und anschließend mit Seewasser gespült. Nach 3 h Inkubation in 2 % Paraformaldehyd/1 %NaBH₄ wurden die Gewebeschnitte in Phosphat-gepufferter

Kochsalzlösung (PBS) gewaschen und verblieben ca. 12 h in PBS mit 6,8 % Saccharose. Danach wurden die Gewebestücke in Aceton 1 h entwässert und mit 100 ml Technovit 100/0,6 g Härter (HAEREUS-KULZER, Wehrheim) ungefähr 12 h geschwenkt. Im folgenden wurden die Proben 5 min in 15 ml Infiltrationslösung (+ 0,5 g Härter II) bewegt, über Nacht auf Eis gehärtet und mit dem Mikrotom 0,7 μm dünne Schnittpräparate hergestellt.

Die Objektträger für die Schnitte wurden durch Eintauchen in 1-%ige 3-Aminopropyltriethoxy-Silanlösung (in Aceton) und Waschen in Aceton und *Aqua bidest.* beschichtet. Nach dem Auftragen der Schnitte wurden sie 30 min in PBS gelegt und anschließend mit primärer Antikörperlösung bedeckt. Nach 4-stündiger Inkubation und einem ca. 12-stündigen Waschschrift in PBS (4 °C) erfolgte für 4 h die Inkubation mit 1:100 (in 0,5 % BSA) verdünnten Sekundäantikörper (*anti-Rabbit-FITC*, DIANOVA, Hamburg). Durch einen weiteren Waschschrift mit PBS (3 h bei Raumtemperatur) wurden überschüssige Antikörper entfernt. Schließlich wurden die Objektträger zur Anfärbung der Zellkerne für 10 min in DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol, SIGMA, Deisenhofen) eingelegt, nochmals 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

4.24. Transplantationsexperimente

An Schwämmen lassen sich mit einfachen Mitteln Transplantationsexperimente durchführen. Dazu bedient man sich der sogenannten Insertionstechnik (Pancer *et al.*, 1996). Zur Durchführung eines Autograftexperimentes wurde einem Schwamm mit einem Korkbohrer ein Gewebestück entnommen und an einer anderen Stelle in einem vorgebohrten Loch plziert. Nach fünf Tagen wurde die entsprechende Gewebestelle entnommen und zur Herstellung histologischer Präparate verwendet.

4.25. Computerprogramme und Online-Dienste

4.25.1. Computerprogramme

DNASIS

Analyse und Translation von Nukleotidsequenzen

HITACHI Software engineering

CLUSTALW 1.7 (Thompson *et al.*, 1994):

Sequenzvergleiche von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

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

GENEDOC 2.4 (Nicholas und Nicholas, 1997):

Graphische Umsetzung von Sequenzvergleichen

Freeware. Zu beziehen über: <http://www.cris.com/~Ketchup/genedoc.shtml>

PC/Gene (PC/Gene, 1995):

Translation von Nukleotidsequenzen, Identifizierung von Proteindomänen und Strukturmotiven

IntelliGenetics Inc., Mountain View, USA.

4.25.2. Internet-Adressen

Online-Sequenzvergleiche mit Nukleotid- und Protein-Datenbanken:

BLAST (Altschul *et al.*, 1990; 1997): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

FASTA (Pearson und Lipman, 1988): <http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>

Online-Identifizierung von Protein-Domänen und Strukturmotiven:

PROSITE (Bairoch, 1992): <http://www.ebi.ac.uk/searches/prosite.input.html>

BLOCKS (Henikoff und Henikoff, 1994): <http://www.blocks.fhcrc.org/>

PROFILE (Bucher *et al.*, 1996): http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html

Online-Zugriff auf Nukleotid- und Aminosäure-Datenbanken (z. B. Genbank):

ENTREZ (Benson *et al.*, 1999)

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

4.26. Hälterung der Schwämme

Die Schwämme der Spezies *Suberites domuncula* (Demospongiae, Hadromerida) und *Geodia cydonium* (Demospongiae, Astrophorida) wurden in der nördlichen Adria in der Nähe von Rovinj (Kroatien) gesammelt und in einer mit Meerwasser gefüllten Kühlbox nach Mainz transportiert. Dort wurden sie in ein Aquarium überführt und in artifiziellem Seewasser (hergestellt aus dem Meeressalz "Tropic Marine" der Firma Dr. Binder GmbH, Wartenberg) bei 16 °C gehalten. Die Schwämme fütterte man zweimal in der Woche mit je 4 ml Phytoplankton ("Marin Niedere Tiere Futter" der Firma AMTRA AQUARSTIK, Rodgau), außerdem wurden dem Wasser zweimal im Monat Vitamine und Spurenelemente zugefügt ("Vitamine & Mineral Supplement" der Firma KENT MARINE, Marietta, GA). Zusätzlich wurden die Einsiedlerkrebse der Spezies *Paguristes oculatus*, die in der Schale bestimmter Molluskenarten (z. B. *Trunculariopsis trunculus*) leben, welche wiederum von *Suberites domuncula* bewachsen sind, ebenfalls zweimal die Woche mit tiefgefrorenen *Artemia salina* gefüttert. Die spezifische Dichte des Wassers wurde auf einen Wert von ca. 1,028 eingestellt.

5. Ergebnisse

5.1. Der Aggregationsfaktor aus *Geodia cydonium*

5.1.1. Screening der cDNA-Bank

In der Arbeitsgruppe Müller lag ein DNA-Fragment aus der cDNA-Bank von *Geodia cydonium* vor, das für ein Protein des Aggregationsfaktors kodiert. Eine Analyse der Sequenz ergab, daß die cDNA am 5'-Ende unvollständig war. Um vollständige Klone aus der cDNA-Bank zu erhalten, wurde die cDNA-Bank mittels PCR (Kap. 4.1.) nach vollständigen Klonen durchsucht. Dazu konstruierte man die genspezifischen Reverse-Primer *AFM*, *AFM2*, *AFM3*, und *AFM4* (Kap. 3.8.), die jeweils zusammen mit dem für den Vektor pBK-CMV spezifischen Primer T3 in einer PCR eingesetzt wurden.

PCR Ansatz:

PCR-Bedingungen:

<i>Aqua bidest.</i>	37,5 µl	95 °C, 5 min
10 x Puffer	5 µl	35 Zyklen:
dNTP-Mix	2 µl	95 °C, 30 sec
Primer 1	2 µl	T _a 30 sec
Primer 2	2 µl	72 °C, 30 sec
cDNA-Bank	1 µl	1 Zyklus:
Taq-Polymerase	0,5 µl	72 °C, 10 min

Die entstandenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt, mit dem Vektor pGEMTM-T ligiert, transformiert und sequenziert (Kap. 4.5. – 4.12.)

5.1.2. Analyse der Sequenz

Ein Vergleich der erhaltenen cDNA-Sequenzen mit der bereits vorliegenden Teilsequenzen des Aggregationsfaktors ergab eine völlige Übereinstimmung im überlappenden Bereich. Der cDNA-Klon wurde *GEOCYAF* (*Geodia cydonium*-

Aggregationsfaktor) genannt. Die cDNA ist 1710 bp lang und hat einen offenen Leserahmen von 1242 Nukleotiden. Ein mögliches Startcodon für Methionin findet sich an Position 40. Es besitzt ein Guanosin an Position –3 und an der Position +4 und weicht damit zum Teil von der bei eukaryotischen mRNAs charakteristischen Kozak-Sequenz (KOZAK 1991; -3:A,+4:G) ab. Ein erstes Stopkodon liegt an Position 1282. Das abgeleitete Protein ist 414 Aminosäuren lang und wurde AF_GEOCY benannt (**Abb. 4**). Das errechnete theoretische Molekulargewicht beträgt 46,558 kDa und der isoelektrische Punkt liegt bei 4.75. Eine potentielle Stelle für eine N-Glykosilierung befindet sich am Asn61. Eine Signalsequenz zur Sekretion in den Extrazellularraum lässt sich nicht ermitteln.

```

      9      18      27      36      45      54
ACA AGC CGA GTA GAA GAT CTA ATA GAA AGA GAC AAG GAC ATG GCT GAA AGG CAC
-----
      M      A      E      R      H

      63      72      81      90      99      108
GAC GGA GGA GGA GCA GGA GGC GGA GGA GGC AAG GGA GGG AAA ATC TTG AGC ATG
-----
      D      G      G      G      A      G      G      G      G      G      K      G      G      K      I      L      S      M

      117      126      135      144      153      162
ACG GTG AAA CGG GCT CAG CGA GTA CAA GAG AAG ATG ATG CAG AAA CTG GGC AAG
-----
      T      V      K      R      A      Q      R      V      Q      E      K      M      M      Q      K      L      G      K

      171      180      189      198      207      216
TCA GAT CAG ACA AGG GAC GAA GTT TTT GAG GAG TTT GTG AAC AAC TTC CAC AAA
-----
      S      D      Q      T      R      D      E      V      F      E      E      F      V      N      N      F      H      K

      225      234      243      252      261      270
CAG AAC GCA TCT GCA ATC AAG CTG CAA AAG GAG CTA ATG AAG TAC ATG AAC AGC
-----
      Q      N      A      S      A      I      K      L      Q      K      E      L      M      K      Y      M      N      S

      279      288      297      306      315      324
ATT AGA GTT CTA TAC CAG AAC ACT AAA TCC ATG TCT GAC ACT CTG AAG GAG CTG
-----
      I      R      V      L      Y      Q      N      T      K      S      M      S      D      T      L      K      E      L

      333      342      351      360      369      378
TAC GAA GAA GAT TGG GAC GGC TGC GAG AAA CAA CGA GAA CTA ATG GAG CAA CGC
-----
      Y      E      E      D      W      D      G      C      E      K      Q      R      E      L      M      E      Q      R

      387      396      405      414      423      432
ATT CTC TTA TGG GAG GAC CTA CTT ACT TCA CTT ACG TCA AGA ACA GTA GAG CCA
-----
      I      L      L      W      E      D      L      L      T      S      L      T      S      R      T      V      E      P

      441      450      459      468      477      486
ATG ACC AAC TAC ATT TCA AGG TTC TCC GAT GTC AAG ACT CGA ATC CAG AAG AGA
-----
      M      T      N      Y      I      S      R      F      S      D      V      K      T      R      I      Q      K      R

      495      504      513      522      531      540
GAG AGA AAA ATG GTG GAC TAC GAC CTC CGA AGA CGA GAG CTG GAA CAT GCC AAA
-----
      E      R      K      M      V      D      Y      D      L      R      R      R      E      L      E      H      A      K

```

TCG	AAA	GCG	AAA	GTA	549	558	AAC	GAC	CAG	567	AAA	GTT	CAA	576	CAG	GCA	GAA	585	GAT	ACA	CAT	594	ACG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	K	A	K	V	N	D	Q	K	V	Q	Q	A	E	D	T	H	T						
CAA	GCC	AAG	CAG	CTT	603	612	TAT	GAC	GAG	621	ATT	ACA	GAC	630	GAA	CTT	TAT	639	GAA	GAA	CTA	648	CCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Q	A	K	Q	L	Y	D	E	I	T	D	E	L	Y	E	E	L	P						
ACT	CTA	TAT	GAT	AGT	657	666	CGA	ATC	CAG	675	TTT	TAT	GGC	684	CAG	ATT	TTT	693	CAG	AGC	ATA	702	GCA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	L	Y	D	S	R	I	Q	F	Y	G	Q	I	F	Q	S	I	A						
GCG	GCA	GAA	ACA	AGG	711	720	TTT	CAT	GCT	729	GAA	ATC	TCA	738	AAG	GTT	GAT	747	GAA	GAT	CTT	756	GCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	A	E	T	R	F	H	A	E	I	S	K	V	D	E	D	L	A						
AGA	GTG	ATG	GAC	GGG	765	774	CTG	GCG	TCC	783	GAG	GCA	GCG	792	ACT	GGC	GTT	801	CAT	TCA	ACC	810	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	V	M	D	G	L	A	S	E	A	A	T	G	V	H	S	T	K						
AAA	CAG	AGG	AAC	GCT	819	828	CTG	TCC	AAC	837	GCT	CCC	AAG	846	CTG	CTC	TCT	855	CCA	GAA	GAA	864	GAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
K	Q	R	N	A	L	S	N	A	P	K	L	L	S	R	P	E	E						
GAG	AGT	GAG	GAA	GAC	873	882	TCT	GAA	GGA	891	GGG	ACA	GAA	900	AGC	CAA	CCA	909	ACA	TCT	CGC	918	TCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	S	E	E	D	S	E	G	G	T	E	S	Q	P	T	S	R	S						
CCT	TCT	CTA	AAA	CAG	927	936	TCC	CAC	CTC	945	TCT	CCC	TCC	954	CCT	CCT	GAA	963	CCC	AAC	CAA	972	AAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	S	L	K	Q	S	H	L	S	P	S	P	P	E	P	N	Q	N						
AAC	ATT	GAT	CAA	GAC	981	990	ACG	TCG	ACA	999	TCA	TCT	GAT	1008	GTA	GCT	GTG	1017	GAT	CCC	GCA	1026	CCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
N	I	D	Q	D	T	S	T	S	S	D	V	A	V	D	P	A	P						
GGA	GGA	CAG	CCA	AAA	1035	1044	AAG	CCA	CCC	1053	CCT	TTC	AGG	1062	TCT	CCA	GAC	1071	CAC	TCC	GAG	1080	ACA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G	G	Q	P	K	K	P	P	P	F	R	S	P	D	H	S	E	T						
GCT	GAG	ACA	GGT	ACG	1089	1098	GGG	GAG	GCA	1107	GAG	GAA	AAA	1116	GGA	GAC	ACA	1125	GAG	GAC	CAA	1134	CAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	E	T	G	T	G	E	A	E	E	K	G	D	T	E	D	Q	Q						
GAA	CTC	CAG	GAG	AAT	1143	1152	CAA	GAC	ACT	1161	GCT	GTC	GAA	1170	TCT	CCT	CCG	1179	GCT	AAC	GAA	1188	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
E	L	Q	E	N	Q	D	T	A	V	E	S	P	P	A	N	E	E						
TTG	TTG	ACA	GAT	GAA	1197	1206	GAC	AGG	GAG	1215	CAG	AAT	GTG	1224	GCT	AGC	CCT	1233	CTC	AAA	ACC	1242	CCA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	L	T	D	E	D	R	E	Q	N	V	A	S	P	L	K	T	P						
CCA	CCC	AAA	CCT	GCA	1251	1260	GCC	CCT	CGA	1269	ATT	TCC	TCC	1278	TCC	TTC	TGA	1287	CGA	TAC	CAC	1296	TAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	P	K	P	A	A	P	R	I	S	S	S	F											
TAT	CCC	TAC	AGA	AAC	1305	1314	AGC	AGA	GGA	1323	GAG	TGA	AAC	1332	AGT	TGA	GAA	1341	AGA	GGC	AGA	1350	CAC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CTG	AGA	ATA	TCT	CTA	1359	1368	CAC	GGT	GGT	1377	GGC	TAC	TCA	1386	TCT	CTA	CCA	1395	AGG	TGA	AGA	1404	TGA

```

1413      1422      1431      1440      1449      1458
CGA CGA ACT AAC GTT TGA GAA AGG AGC TAT CAT CTA CGT GGT GCC ATA CGA AGA

      1467      1476      1485      1494      1503      1512
CCC GGA GAT GAG GAA GAA GGT TGG TGC ATG GGA GTG CTT AAG AAA AAC GGC GAC

      1521      1530      1539      1548      1557      1566
AAA GGT ATA TTT CCA GAG AAT TTT ACA AAG AAA CAG GAC TAG TCC CGT AAT CAC

      1575      1584      1593      1602      1611      1620
ACA TTT TTT CTG CAC ATA ATT ATG TTT ATG TGG TTA TTT TAG TAT TTT TAC ATA

      1629      1638      1647      1656      1665      1674
GCG TAT AGG TTT TAT TTT ATC AAT AAC TCA TTT GTG AAA GAC AAC AAT ATT AGA

      1683      1692      1701      1710
CAA AAT AAA ATC TCG ATA TAA AAA TAC TTT AAC TGT

```

Abb. 4: Darstellung der Nukleotidsequenz von *GEOCYAF* und der abgeleiteten Aminosäuresequenz *AF_GEOCY*. In grün unterlegt das mutmaßliche Startmethionin, in rot das erste im Leserahmen erscheinende Stopkodon.

5.1.3. Northern-Blot-Analyse

Zur Bestimmung der Länge der mRNA wurde ein Northern-Blot (Kap. 4.16.) durchgeführt. Dazu wurde zunächst mit dem PCR-DIG-Probe-Synthesis Kit eine Sonde hergestellt (Kap. 4.16.1.). Dabei wurden die Primer *AF3* und *AF4* verwendet. Auf diese Weise entstand eine 423 nt lange mit Digoxigenin markierte Sonde. Für den Blot wurden zwei RNA-Präparationen (Kap. 4.14.) aus *Geodia cydonium* eingesetzt.

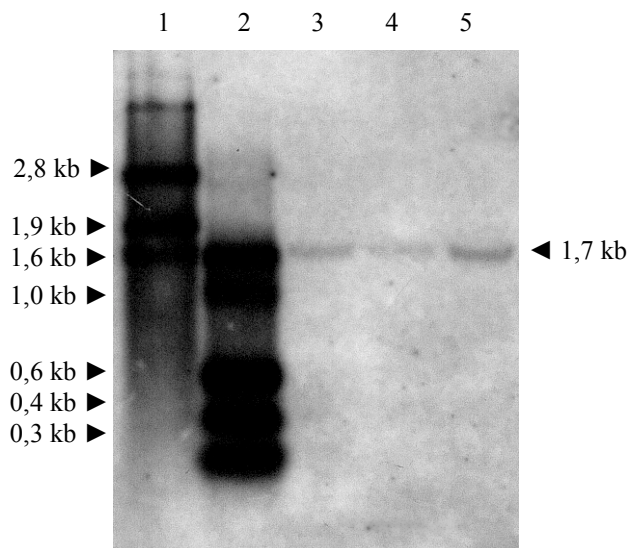


Abb. 5: Northern-Blot mit 10 µg RNA-Probe 1 (Spur 3), 5 µg (Spur 4) und 10 µg (Spur 5) RNA-Probe 2 aus *Geodia cydonium*. Der Längensstandard ist in Spur 1 (RNA-Marker III, ROCHE) und Spur 2 (RNA-Marker II, ROCHE) gezeigt.

Als Ergebnis ergab sich eine Bande, die einer Länge von ungefähr 1,7 kb (**Abb. 5**). Diese Länge stimmt mit der Länge des Klon *GEOCYAF* überein. Aus diesem Ergebnis läßt sich schließen, daß der isolierte cDNA-Klon die vollständige mRNA repräsentiert.

5.1.4. Datenbankanalyse von AF_GEOCY

Die Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Klon AF_GEOCY mit Sequenzdatenbanken unter Verwendung des Programms *blastp* (Kap. 4.24.) ergab die höchste Similarität zu humanen Amphiphysin II [*Accession number* AF004015 (Ramjaun und McPherson, 1998)] und zu dem ebenfalls humanen Amphiphysin-homologen Protein BIN 1 (*bridging integrator protein*) [*Accession number* U84004 (Wechsler-Reya *et al.*, 1992)]. Eine etwas geringere Ähnlichkeit findet sich zu Amphiphysin aus *Drosophila melanogaster* [*Accession number* AJ242855.1 (Razzaq *et al.*, 2000)] und dem Amphiphysin-ähnlichen Protein aus *Caenorhabditis elegans* [*Accession number* Z68217 (Sluston, Genbank submission)]. Weiterhin zeigen sich geringe Similaritäten zu dem aus *Saccharomyces cerevisiae* klonierten Protein RVS161 [*Accession number* NP_009935 (Sato *et al.*, 1998)] und dem aus *Arabidopsis thaliana* isolierten hypothetischem Protein MDF20 [*Accession number* AB009050-BA000015]. Signifikante Ähnlichkeiten zu Proteinen aus Protozoen oder Prokaryoten sind nicht vorhanden. Ein Vergleich der Sequenzen (**Abb. 6**) zeigt, daß die Sequenz aus *Geodia cydonium* vor allem im N-terminalen Bereich eine hohe Ähnlichkeit zu den humanen Sequenzen zeigt. Die ersten 260 Aminosäuren sind zu 37 % identisch und zu 60 % ähnlich. Im Gegensatz zu den anderen Aminosäuresequenzen besitzt die Schwammsequenz aber eine Glycin-reiche Region im Bereich der Aminosäuren 7 – 18, die in den anderen Organismen fehlt. Im mittleren und im C-terminalen Bereich sind die Sequenzen hingegen deutlich unterschiedlicher. Im C-terminalen Bereich beträgt der Anteil an identischen Aminosäuren lediglich noch 13 % und der Anteil an ähnlichen Aminosäuren 24 %. Der Schwammsequenz fehlt

außerdem das im humanen BIN1 vorhandene Kernlokalisierungssignal (NLS). Ebenso fehlt die im Amphiphysin vorkommende prolin-reiche Region. Die für Amphiphysin typische SH-3-Domäne, die am C-Terminus lokalisiert ist, findet sich im Schwamm nur verkürzt wieder.

```

BIN1_HUMAN : MAEMGSKG-----VTAGKIASNVQKKLTRAQEKVLQKLGKAD : 37
AMPHII_HUM : MAEMGSKG-----VTAGKIASNVQKKLTRAQEKVLQKLGKAD : 37
AF_GEOCY   : MAERHDGCGAGGGGKCGKILSMTVKRAQRVQEKMMOKLGSID : 43
              Glycin-reich
              ←-----→

BIN1_HUMAN : ETKDEQFEQCVONFNKQLTEGTRLQKDLRITYLASVKAMHEASK : 80
AMPHII_HUM : ETKDEQFEQCVONFNKQLTEGTRLQKDLRITYLASVKAMHEASK : 80
AF_GEOCY   : QTRDEVFEFVNNFHKNASAIKLOKELMKYMNISIRVLYQNTK : 86
              N

BIN1_HUMAN : KLNECLQEVYEEDWPGRDEANKIAENNDLLWMDYHQKLVDAQAL : 123
AMPHII_HUM : KLNECLQEVYEEDWPGRDEANKIAENNDLLWMDYHQKLVDAQAL : 123
AF_GEOCY   : SMSDTLKLKELYEEDWDGCEKQRELMEQRIILLWEDLLTSLTSRTV : 129

BIN1_HUMAN : LTMDTYLGQFPDIKSRIAKRGRKLVVDYDSARHHYESLQTAKKK : 166
AMPHII_HUM : LTMDTYLGQFPDIKSRIAKRGRKLVVDYDSARHHYESLQTAKKK : 166
AF_GEOCY   : EPMTNYISRFSDVKTRIQKREKRMVDYDLRRRELEHAKSKAKV : 172

BIN1_HUMAN : DEAKIAK-----AEEEL : 178
AMPHII_HUM : DEAKIAKPVSLLEKAAPQWCQKGLQAHLVAQTNLLRNQAAEEEL : 209
AF_GEOCY   : NDQKVQQ-----AEDTH : 184

BIN1_HUMAN : IKAQKVFEEENVDLQEEELPSLWNSRVGFYVNTFQSIAGLEENF : 221
AMPHII_HUM : IKAQKVFEEENVDLQEEELPSLWNSRVGFYVNTFQSIAGLEENF : 252
AF_GEOCY   : TQAKQLMDEITDELVEELPTLYDSRIQFYGQIFQSIAAAEETF : 227

BIN1_HUMAN : HKEMSKLNQNLNDVLVGLEKQHGSENTFTVKAQERKSKLFSRL : 264
AMPHII_HUM : HKEMSKLNQNLNDVLVGLEKQHGSENTFTVKAQE----- : 285
AF_GEOCY   : HAEISKVDEDLARVMDGLASEAATGVHSTKKQR----- : 260
              ←-----

BIN1_HUMAN : RRKKNSDNAPAKGNKSPSPDGGSPAATPEIRVNHEPEPAGGAT : 307
AMPHII_HUM : -----SDNAPAKGNKSPSPDGGSPAATPEIRVNHEPEPAGGAT : 323
AF_GEOCY   : -----NALSNAPKLLSRPEEESEEDSEGGTESQPTSRSPSL : 296
              NLS →----- Prolin-reich ←-----

BIN1_HUMAN : PGATLPKSPS----- : 317
AMPHII_HUM : PGATLPKSPSQLRKGPVPPPKHTPSKEVKQEILSLFEDTF : 366
AF_GEOCY   : KQSHLSPSPP----- : 306
              -----→

BIN1_HUMAN : ----- : -
AMPHII_HUM : VPEISVTTPSQFEAPGPFSEQASLLDDFDPLPVVTPSPVKAPT : 409
AF_GEOCY   : ----- : -

BIN1_HUMAN : ----- : -
AMPHII_HUM : SGQSIPWDLWEPTESPAGSLPSGEPSSAAEGTFAVSWPSQTAEP : 452
AF_GEOCY   : ----- : -

BIN1_HUMAN : ---QPAEASEVAGGTQPAAGAQPGETAASEAASSSLPAVVVE : 357
AMPHII_HUM : GPAQPAEASEVAGGTQPAAGAQPGETAASEAASSSLPAVVVE : 495
AF_GEOCY   : ---EPNQNNDIDQDTSSTSSDVAVDPAAGGQPKKPPFRSPDHS : 346

```

```

BIN1_HUMAN : TFPATVNGTVEGGSGAGRLDLPFGFMFKVQAQHDYTATDTDEL : 400
AMPHII_HUM : TFPATVNGTVEGGSGAGRLDLPFGFMFKVQAQHDYTATDTDEL : 538
AF_GEOCY   : TAETGTGEAEKCDTEDQQLQENQDTAVESPPANEELLTDED : 389

BIN1_HUMAN : QLKAGDVVLVLPFQNPPEEQDEGWLMGVKESDWNQHKLEKCRG : 443
AMPHII_HUM : QLKAGDVVLVLPFQNPPEEQDEGWLMGVKESDWNQHKLEKCRG : 580
AF_GEOCY   : REQNVASPLKTPPPKPAARISSE----- : 413

SH3

BIN1_HUMAN : VFPENFTERVV : 454
AMPHII_HUM : VFPENFTERVV : 591
AF_GEOCY   : ----- : -

```

Abb. 6: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz AF_GEOCY aus *Geodia cydonium* [Accession number AJ311598] mit Sequenzen aus Datenbanken. Für den Vergleich wurden folgende Sequenzen herangezogen: Amphiphysin IIc2 aus *Homo sapiens* [AMPHII_HUM; Accession number AAC39712.1 (Ramjaun und McPherson, 1998)], BIN1 [BIN1_HUMAN (*bridging integrator protein*); Accession number U84004 (Wechsler-Reya *et al.*, 1992)]. Die konservierten Aminosäuren sind jeweils unterlegt (schwarz: 100%; dunkelgrau: 60%; hellgrau: 40%). Farblich markiert sind die glycin-reiche Region (grün), die N-Glykosilierungsstelle (violett), das Kernlokalisationsignal (orange), die Prolin-reiche Region (blau) und die SH3-Domäne (rot).

5.1.5. Phylogenetische Analyse

Konstruiert man aus den verwandten Sequenzen einen phylogenetischen Stammbaum (Kap. 4.24.), so bilden die Metazoen eine Gruppe, die von *Saccharomyces cerevisiae* und *Arabidopsis thaliana* getrennt ist. Innerhalb dieser Gruppe sind Mensch und Schwamm zusammen angeordnet (**Abb. 7**). Dieses ist vor allem bedingt durch die große Ähnlichkeit im N-terminalen Bereich.

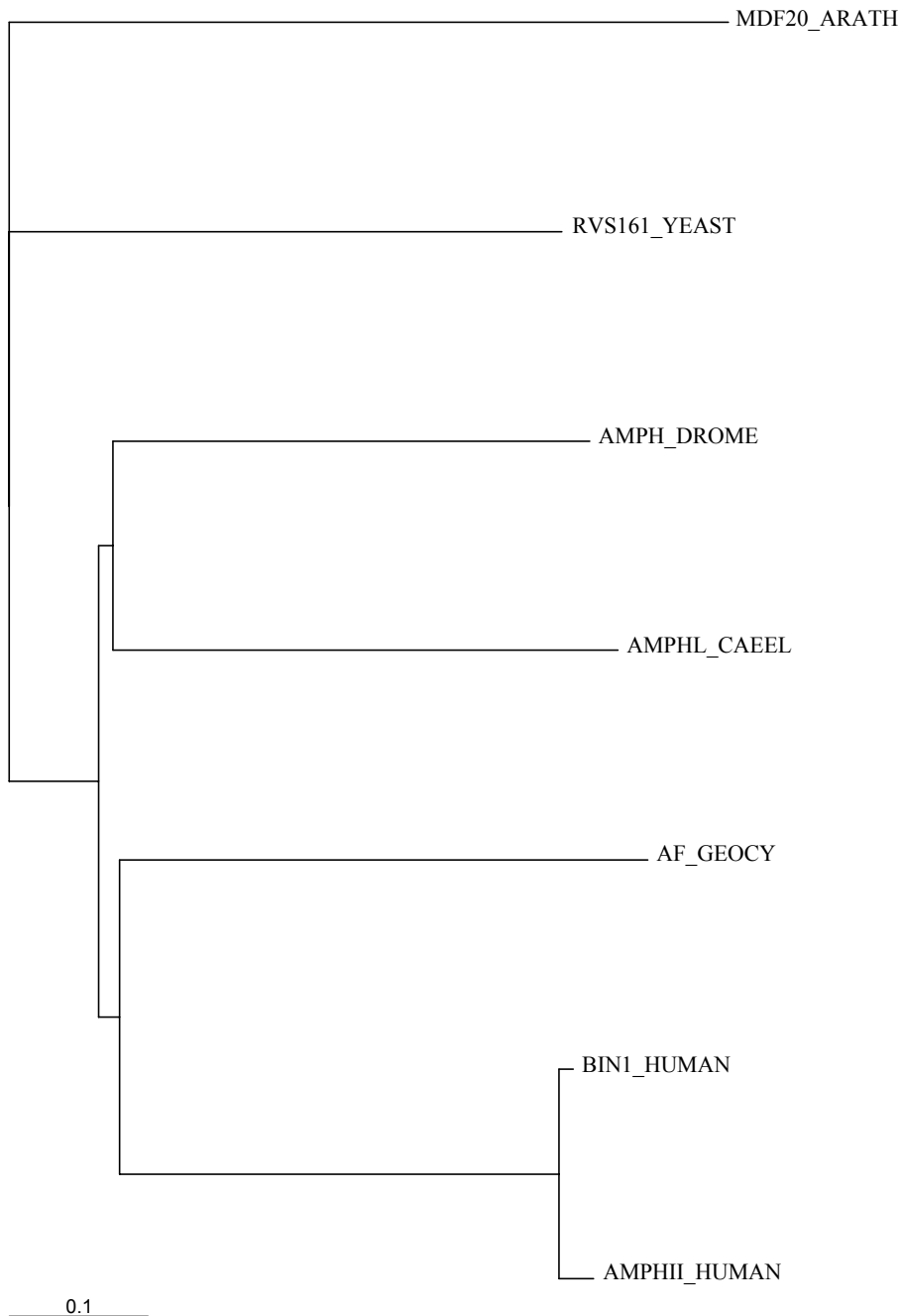


Abb.7: Phylogenetischer Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz AF_GEOCY aus *Geodia cydonium* [Accession number AJ311598] mit Sequenzen aus Datenbanken. Für den Vergleich wurden folgende Sequenzen herangezogen: Amphiphysin Ilc2 aus *Homo sapiens* [AMPH_HOMO; Accession number AAC39712.1 (Ramjaun und McPherson, 1998)], BIN1_HUMAN [BIN1_HUMAN (*bridging integrator protein*); Accession number U84004 (Wechsler-Reya et al., 1992)], Amphiphysin aus *Drosophila melanogaster* [AMPH_DROME; Accession number AJ242855.1, Razzaq et al., 2000; Genebank submission)],

Amphiphysin aus *Caenorhabditis elegans* [AMPH_CAEEL; Accession number CAB60945.1 (Sluston, Genebank submission)], RVS161 aus *Saccharomyces cerevisiae* [RVS161_YEAST; Accession number NP_009935 (Sato *et al.*, 1998)] und MDF20 aus *Arabidopsis thaliana* [MDF20_ARATH; Accession number AB009050-BA000015].

5.1.6. Expression von AF_GEOCY

Um Aggregationsfaktor zu exprimieren wurde das pGEX-System (AMERSHAM-PHARMACIA, Freiburg) verwendet (Kap. 4.17.). Das rekombinante Protein wurde dabei als Fusionsprotein an Gluthathion-S-Transferase gekoppelt. Über diesen Fusionsteil ließ es sich sowohl aufreinigen als auch nachweisen. Um die cDNA in den Expressionsvektor einzuklonieren, wurde zunächst ein DNA-Fragment aus der cDNA-Bank mittels PCR amplifiziert und in pGEMTM-T ligiert. Die beiden dabei verwendeten Primer *afpsma1* und *afmecor1* besaßen an ihren Enden als sogenannte Adapter die Erkennungssequenzen für die beiden Restriktionsenzyme Sma I und EcoR I. Mit einer Sequenzierung (Kap. 4.12.) des Plasmids wurde kontrolliert, ob es sich um die gewünschte cDNA handelte. Das in pGEMTM-T einklonierte PCR-Produkt konnte anschließend aus diesem Vektor ausgeschnitten (Kap. 4.9.) und aufgereinigt werden (Kap 4.4.). Danach wurde es in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Expressionsvektor pGEX-2T gerichtet einkloniert. Das Plasmid wurde zur Kontrolle mit dem pGEX-spezifischem Primer *pGEX5seq* sequenziert (Kap. 4.12.). Das die cDNA im korrekten Leserahmen enthaltende Plasmid wurde in BI21-Zellen transformiert und das Protein exprimiert (Kap. 4.17.3.). Die Aufreinigung erfolgte über eine Gluthathion-Sepharose-Säule. Das rekombinante Protein konnte direkt für weitere Versuche eingesetzt werden. Alternativ konnte die Gluthathion-S-Transferase mit Thrombin abgespalten werden (Kap. 4.17.4.). Zur Kontrolle wurden Bakterienextrakte und gereinigtes Protein mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Kap. 4.18.) analysiert (**Abb.8**). Aus der Gelelektrophorese ist zu erkennen, daß es gelungen ist, aus dem Bakterienextrakt über die affinitätschromatographischen Aufreinigung ein Protein zu gewinnen. Die Größe von ungefähr 62 kDa entspricht derjenigen, die man von dem Fusionprotein erwartet. Da in der Proteinaufreinigung kaum weitere Baden sichtbar sind, kann man von einer erfolgreichen Aufreinigung des rekombinanten

Proteins ausgehen. Das rekombinante Protein wird im folgenden als rAF_GEOCY bezeichnet.

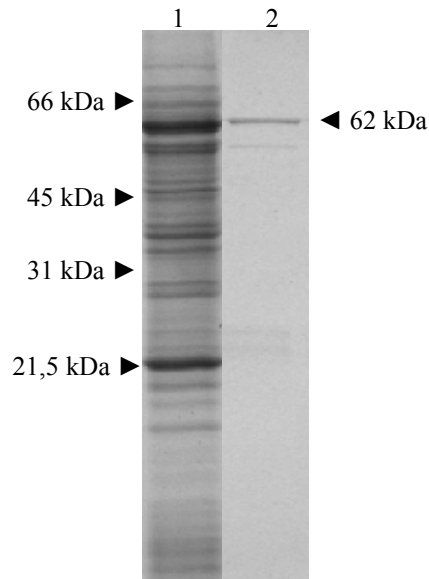


Abb.8: SDS-Polyacrylamidgellelektrophorese mit Bakterienlysate der Expressionskultur (Spur 1) und aufgereinigtem rekombinanten Protein (Spur2). Links sind die Größen des Proteinmarkers aufgetragen.

5.1.7. Western-Blot mit Proteinextrakt und rAF_GEOCY

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem rekombinanten Protein tatsächlich um einen Bestandteil des Aggregationsfaktors handelt, wurde rekombinantes Protein zunächst mit Thrombin verdaut und damit die Gluthathion-S-Transferase abgespalten (Kap. 4.17.4.). Danach wurde das prozessierte Protein in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (Kap. 4.18.). Der Nachweis erfolgte dann mit Hilfe des Antikörpers PoAb-AF und eines sekundären Anti-Kaninchen-Antikörpers. Zum Vergleich wurde ein Proteinextrakt aus *Geodia cydonium* analog aufgetrennt und behandelt. Zum Nachweis des Aggregationsfaktors im Schwammextrakt wurden die Antikörper PoAb-AF und 1D2 verwendet, die beide gegen den Aggregationsfaktor gerichtet sind. Die sekundären Antikörper waren jeweils mit alkalischer

Phosphatase gekoppelt. Die Detektion erfolgte mit NBT und X-Phosphat (1 und 2) bzw. mit CDP-Star® (3).

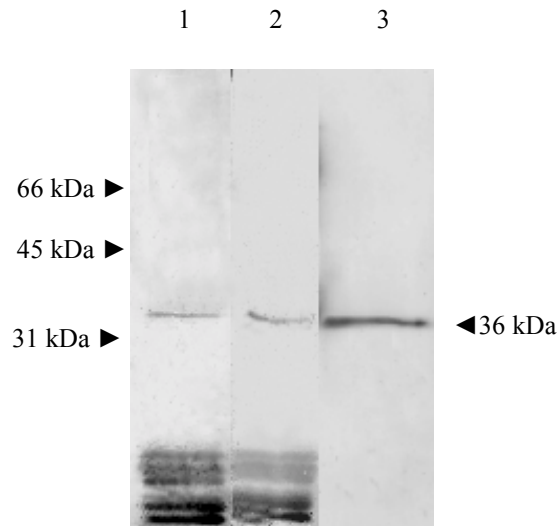


Abb. 9: Western-Blot mit Schwamm-extrakt und den Antikörpern PoAb-AF (Spur 1) bzw. 1D2 (Spur 2), bzw. mit rekombinanten AF_GEOCY mit PoAb-AF (Spur 3). Links sind die Größen des Längenstandard aufgetragen.

Mit beiden Antikörpern läßt sich im Proteinextrakt aus *Geodia cydonium* ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von ungefähr 36 kDa nachweisen (**Abb.9**). Zusätzlich sind sechs weitere Banden mit einer Größe von weniger als 20 kDa sichtbar. Diese Banden entsprechen den im Schwammextrakt vorhandenen Lektinen, mit denen die Antikörper kreuzreagieren. Der Antikörper PoAb-AF erkennt außerdem das prozessierte rekombinante Protein. Die Größen der detektierten Proteine im Schwammextrakt und des rekombinanten Proteins sind gleich. Daraus läßt sich schließen, daß die Proteine identisch sind.

5.1.8. Aggregationsassay

Die Funktionalität des rekombinanten Proteins wurde mit einem Aggregationsassay überprüft (Kap. 4.22.). Dazu wurden dissoziierte Zellen von *Geodia cydonium* (Kap. 4.22.3.) in einer Dichte von 25×10^6 Zellen/ml in ein 3 ml

Glasröhrchen gegeben. Je nach Ansatz verwendete man verschiedene Medien, bzw. rekombinantes Protein (Kap. 5.1.6.) und/oder Fab-Fragmente (Kap. 4.22.1.) des Antikörpers PoAb-AF (Kap. 3.10.) zugegeben. Nach 30 - 60 min Beobachtungszeit auf dem Rolleninkubator konnten die Ergebnisse dokumentiert werden (**Abb.10**). Einzelzellsuspensionen von *Geodia cydonium* in Seewasser bildeten zunächst kleine Zellaggregate (A). Nach Zugabe von 100 µg AF-Fraktion 6B waren größere makroskopisch sichtbare Aggregate zu erkennen (B). Diese verstärkte Aggregation wurde durch den Aggregationsfaktor in der AF-Fraktion 6B bewirkt. Gab man sowohl 100 µg AF-Fraktion 6B als auch 100 µg Fab-Fragmente des Antikörpers PoAb-AF zu den Zellen, so fielen die gebildeten Zellaggregate kleiner aus, da der Antikörper an den Aggregationsfaktor band und so inaktivierte. Eine Bildung von ebenfalls kleineren Aggregaten war zu beobachten, wenn man zu den Zellen zunächst rekombinanten Aggregationsfaktor (3 µg rAF_GEOCY) zugab, und anschließend 100 µg AF-Fraktion 6B. Dieses ist dadurch erklärbar, daß das rekombinante Protein die Bindungsstellen auf der Zelle blockierte und diese nicht mehr für den Aggregationsfaktor-Komplex zugänglich waren.

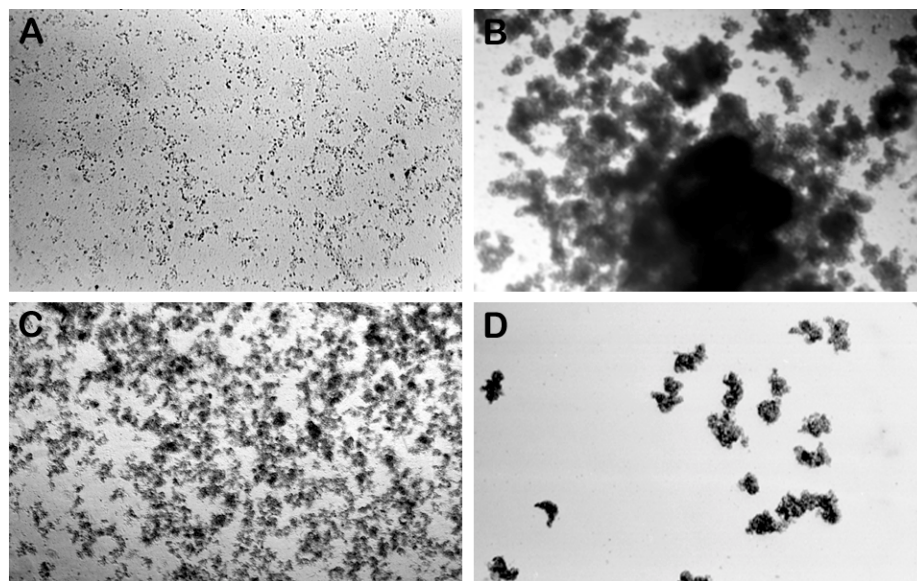


Abb. 10: Versuche zur Zellaggregation. Eine Einzelzellsuspension von *Geodia cydonium* (A). Nach Inkubation mit 100 µg AF-Fraktion 6B sind Zellaggregate sichtbar (B). Zugabe von sowohl 100 µg AF-Fraktion 6B als auch 100 µg Fab-Fragmenten des Antikörpers PoAb-AF führt zu kleineren Aggregaten (C). Zellen, die man vor Zugabe von 100 µg AF-Fraktion 6B mit 3 µg rAF_GEOCY inkubierte, bilden ebenfalls kleinere Aggregate (D). Vergrößerung: A: x 50; B - D: x 5.

5.1.9. Lektin-AF-Western-Blot

Mit Hilfe eines modifizierten Western-Blot (Kap. 4.21.) sollte überprüft werden, ob das durch die klonierte cDNA kodierte Protein mit Lektinen interagieren kann. Dazu wurde aufgereinigtes rekombinantes Protein (Kap. 5.1.6.) gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einem Proteinextrakt aus *Geodia cydonium* mit einer Konzentration von 400 µg/ml inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis mit dem monoklonalen Antikörper IIIc8, der gegen das Galektin aus *Geodia cydonium* gerichtet ist, und einem sekundären Anti-Maus-Antikörper. Die Detektion erfolgt mit NBT und X-Phosphat.

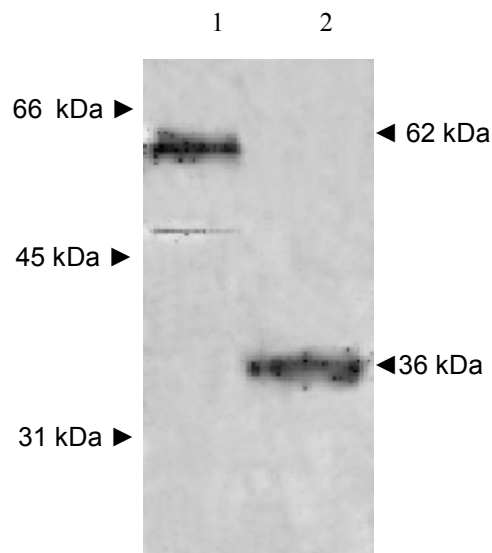


Abb. 11: Western-Blot mit Anti-Lektin-Antikörper. Elektrophoretisch aufgetrennt und auf die Membran transferiert wurde unprozessiertes (Spur 1) bzw. mit Thrombin verdautes rekombinantes Protein (Spur 2). Linksstehend sind die Größen der Markerbanden aufgetragen.

In der ersten Spur (**Abb. 11**) ist rekombinantes Protein als Fusionsprotein aufgetragen, in der zweiten Spur rekombinantes Protein, welches durch einen Verdau mit der Protease Thrombin von der Gluthathion-S-Transferase getrennt wurde. In beiden Spuren ist eine Bande zu sehen, deren Größe dem Fusionsprotein aus Aggregationsfaktor und Gluthathion-S-Transferase (M_r 62 kDa; Spur 1), bzw. dem prozessierten Protein (M_r 36 kDa; Spur 2) entspricht. Da der Antikörper das Galektin erkennt, kann dieses Ergebnis nur bedeuten, daß eine

Bindung des Galektins sowohl an das rekombinante Fusionsprotein als auch an die prozessierte Form erfolgt ist.

5.1.10 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zum Nachweis des Aggregationsfaktors im Gewebe wurden histologische Schnitte von *Geodia cydonium* angefertigt und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (Kap. 4.23.). Dabei wurde als primärer Antikörper der gegen die AF-Fraktion 6B gerichtete polyklonale Antikörper PoAb-AF (Kap. 3.10.) verwendet. Als Sekundärantikörper setzte man einen FITC-gekoppelten Anti-Kaninchen Antikörper ein.

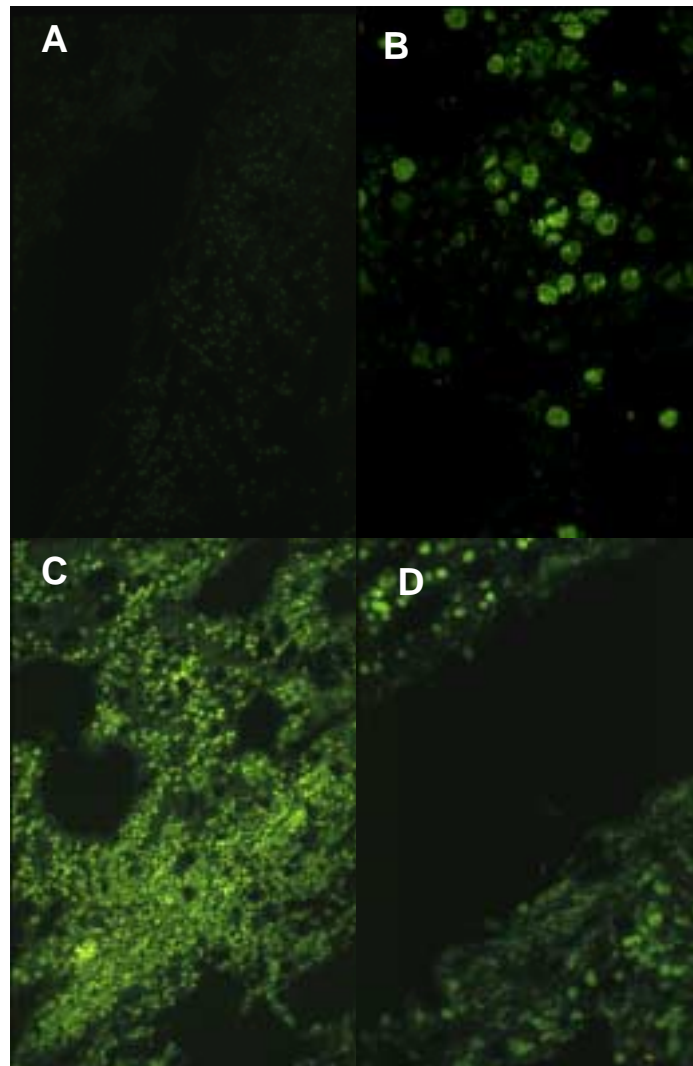


Abb. 12: Immunfluoreszenzmikroskopie zum Nachweis des AF. A ist die Negativkontrolle mit dem Sekundärantikörper, B zeigt sphäkulöse Zellen im Gewebe, in C ist normales Schwammgewebe, D zeigt die Verwachsungszone zweier Gewebestücke eines Autotransplantationsexperimentes.

Die Aufnahmen (**Abb. 12**) zeigen zum einen eine deutliche Anfärbung der im Schwammgewebe verteilten sphäkulösen Zellen (B). Die Übersicht zeigt eine gleichmäßige Verteilung über das gesamte Schwammgewebe (C). Die Negativkontrolle (A), bei der lediglich der Sekundärantikörper eingesetzt wurde, läßt hingegen nur eine schwache Hintergrundfärbung erkennen. Die Aufnahme der Verwachsungszone des Autotransplantationsexperimentes zeigt eine eindeutige Anfärbung besonders in dem Bereich, in dem die beiden Gewebe aneinandergrenzen. Offensichtlich ist an dieser Stelle eine besonders große Menge an Aggregationsfaktor lokalisiert.

5.2. Dermatopontin aus *Suberites domuncula*

5.2.1. Screening der cDNA-Bank

Die Vorgehensweise zur Suche der vollständigen Dermatopontin-cDNA glich der für den Aggregationsfaktor beschriebenen. Anhand des vorliegenden cDNA-Fragmentes aus *Suberites domuncula* wurden die genspezifischen Reverse-Primer *Derm-m1* und *Derm-m2* (Kap. 3.8.) konstruiert, die zusammen mit dem für den Vektor pBK-CMV spezifischen Primer T3 in einer PCR (Kap. 4.1.) eingesetzt wurden, bei der die cDNA-Bank aus *Suberites domuncula* als Matrize eingesetzt wurde.

PCR Ansatz:		PCR-Bedingungen:
<i>Aqua bidest.</i>	37,5 µl	95 °C, 5 min
10 x Puffer	5 µl	35 Zyklen:
dNTP-Mix	2 µl	95 °C, 30 sec
Primer 1	2 µl	T _a , 30 sec
Primer 2	2 µl	72 °C, 30 sec
cDNA-Bank	1 µl	1 Zyklus:
Taq-Polymerase	0,5 µl	72 °C, 10 min

Die entstandenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt, mit dem Vektor pGEMTM-T ligiert, in Bakterien transformiert und sequenziert (Kap. 4.5. – 4.12.)

5.2.2. Analyse der Sequenz

Ein Vergleich mit der bereits vorliegenden Sequenz ergab eine völlige Übereinstimmung im überlappenden Bereich, sodaß die komplette Nukleotidsequenz ermittelt werden konnte. Mit Hilfe zweier genspezifischer Primer, die jeweils zu dem 3' und bzw. 5'-Bereich der Sequenz komplementär sind, konnte anschließend ein vollständiger Klon aus der cDNA-Bank amplifiziert werden. Der Klon wurde *SDDERM* (*Suberites domuncula*-Dermatopontin) genannt. Der Klon ist 723 bp lang und hat einen offenen Leserahmen von 552 Nukleotiden. Ein mögliches Startcodon für Methionin findet sich an Position 19. Die umliegende Sequenz weicht von der für eukaryotische mRNAs charakteristischen

Kozak-Sequenz (KOZAK, 1991; -3:A, +4:G) ab. An Position 574 befindet sich ein erstes Stopcodon. Die Länge des aus der cDNA abgeleiteten Proteins DERM_SD beträgt 184 Aminosäuren (**Abb. 13**). Das errechnete theoretische Molekulargewicht beträgt 21,698 kDa und der isoelektrische Punkt liegt bei 8,5. Am N-Terminus läßt sich Signalsequenz identifizieren, die potentielle Schnittstelle liegt zwischen den Aminosäuren 23 und 24 (PC/GENE, 1995). Dieses läßt darauf schließen, daß das Protein in den Extrazellularraum sekretiert wird. Anhand der in der abgeleiteten Aminosäuresequenz vorliegenden Cysteinreste können potentiell vier Disulfidbrücken innerhalb des Proteins gebildet werden.

```

      10      19      28      37      46
GAC ATA TAG CAG GCT GTC ATG AAG ATG TTT GTG AAT GCT ACT GTC GGA CTC TTT
-----
      M   K   M   F   V   N   A   T   V   G   L   F

      64      73      82      91      100      109
GTC CTT GTT TTG GCA CTC CAT GCT GTT GCT GCA TTC CAG TAT CAG AAT GAT TAC
-----
      V   L   V   L   A   L   H   A   V   A   A   F   Q   Y   Q   N   D   Y

      118      127      136      145      154      163
GAT AAA CCC TTG CAC GTT GAG TGC CCA GAC AAG CAG GCT CTG TAT TAC GTA CAG
-----
      D   K   P   L   H   V   E   C   P   D   K   Q   A   L   Y   Y   V   Q

      172      181      190      199      208      217
AGC ATC CAT AGC AAC CGT CAT GAA GAT CGT CGC TTT CGA TTC AAT TGC AAG CAC
-----
      S   I   H   S   N   R   H   E   D   R   R   F   R   F   N   C   K   H

      226      235      244      253      262      271
GCT GCC AAC AAA AAA ATG TCA CAT TGT TTC TGG ACT GGT CAT CTC AAC AAC TAC
-----
      A   A   N   K   K   M   S   H   C   F   W   T   G   H   L   N   N   Y

      280      289      298      307      316      325
GAT GGT GTC CTC AAT TAT CAG TGT CCT CCC AAT AAC CTA ATG ACT GGT GTA AAG
-----
      D   G   V   L   N   Y   Q   C   P   P   N   N   L   M   T   G   V   K

      334      343      352      361      370      379
AGC GAG CAC AGC AAC CAC CAT GAA GAT AGG AGG TGG AGT TTT AAG TGT TGC AAA
-----
      S   E   H   S   N   H   H   E   D   R   R   W   S   F   K   C   C   K

      388      397      406      415      424      433
GCT AAT GGT TAC CAC ACA AAG AGT TGT CTG ATG ACA GGT TAC ATC AAC AGC TAT
-----
      A   N   G   Y   H   T   K   S   C   L   M   T   G   Y   I   N   S   Y

      442      451      460      469      478      487
GAC AAC CCT ATG CAT CAT GCT GCC CAT TAC AAC CAT TTC TTT GCT GGA GCT TAC
-----
      D   N   P   M   H   H   A   A   H   Y   N   H   F   F   A   G   A   Y

      496      505      514      523      532      541
AGC GTG CAC AGC AAC CAC CAT GAG GAC AGG ATT TGG AAG ATG TAT GAA TGT AAA
-----
      S   V   H   S   N   H   H   E   D   R   I   W   K   M   Y   E   C   K

```

```

          550          559          568          577          586          595
TAC AGC AAA ATA TAT ACT GAG TCA TTG ACA TGA TGG AAA ATA GGA ATT GAA ACT
-----
Y   S   K   I   Y   T   E   S   L   T   ■

          604          613          622          631          640          649
CTG AAC TGG AAT TTA GAA TTA GTA TAG TAG ATA CAA CGT ACT CTA GTA GTA TAG

          658          667          676          685          694          703
AAG AAT CAT TAC AAC GGT AGT TGT AGT ATA TAG TAG TAT TAT AGT AGT ATA GTC

          712          721
ACT ATG ACT GTA CAC ATG

```

Abb. 13: Darstellung der Nukleotidsequenz von *SDDERM* und der abgeleiteten Aminosäuresequenz *DERM_SD*. In grün unterlegt das mutmaßliche Startmethionin, in rot das erste im Leserahmen erscheinende Stopkodon. Gelb unterlegt sind die beiden Aminosäuren, zwischen denen die Schnittstelle zur Abspaltung der Signalsequenz liegt; blau unterlegt die Aminosäure Cystein.

5.2.3. Northern-Blot

Zur Bestimmung der Länge der mRNA wurde ein Northern-Blot (Kap. 4.16.) durchgeführt. Dazu wurde zunächst mit dem PCR-DIG-Probe-Synthesis Kit (ROCHE, Mannheim) eine Sonde hergestellt (Kap. 4.16.1.). Dabei wurden die Primer *Derm 3* und *Derm 4* (Kap. 3.8.) verwendet. Auf diese Weise entstand eine mit Digoxigenin markierte Sonde. Für den Blot wurden 5 µg bzw. 10 µg aus *Suberites domuncula* isolierter RNA eingesetzt (Kap. 4.14.).

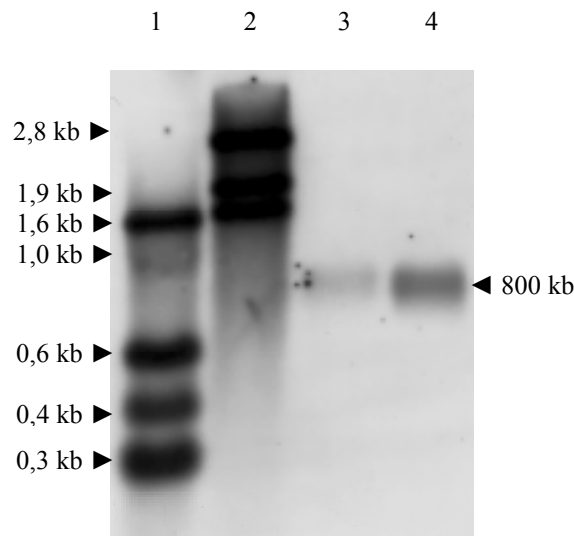


Abb. 14: Northern-Blot mit 5 µg (Spur 3) bzw. 10 µg (Spur 4) RNA aus *Suberites domuncula*. Der Längen-standard ist in Spur (Spur 1) (RNA-Marker II, ROCHE) und (Spur 2) (RNA-Marker III, ROCHE) gezeigt.

Als Ergebnis ergab sich eine Bande, mit einer Länge von ungefähr 800 kb (**Abb. 14**). Diese Länge stimmt mit der Länge des Klons *SDDERM* überein, wenn man berücksichtigt, daß das Transkript polyadenyliert ist und daher länger ist als die cDNA-Sequenz, die aus der cDNA-Bank isoliert wurde. Dieses bedeutet, daß die isolierte cDNA vollständig ist.

5.2.4. Datenbankanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Die Vergleich der Sequenz des Klons *SDDERM* als auch der abgeleiteten Aminosäuresequenz *DERM_SD* mit Datenbanken ergab Similaritäten zu dem humanen Protein Dermatopontin (*Accession number* NP_001928; Superti-Furga *et al.*, 1993) und dem bovinen Dermatopontin (*Accession number* P19427; Neame *et al.*, 1989). Beide Sequenzen besitzen zu 22 % identische und zu 37 % ähnliche Aminosäuren. Ein noch höhere Similarität ergibt sich zu dem aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* isolierten Limulus-Aggregationsfaktor LAF (*Accession number* Q01528; Fujii *et al.*, 1992). Der Anteil der identischen Aminosäuren beträgt 30 % und derjenige der ähnlichen Aminosäuren 50 %. Aus *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* sind dagegen keine derartigen Proteine beschrieben. Eine geringe Ähnlichkeit besteht weiterhin zum murinen Early Quiescence-1-Gen (*Accession number* AAD54221; Tzen *et al.*, Genbank submission). Ein Vergleich der Sequenzen (**Abb. 15**) zeigt außerdem, daß die Positionen der Aminosäure Cystein konserviert ist. Dieses ist für die Ausbildung der Disulfidbrücken von Bedeutung.

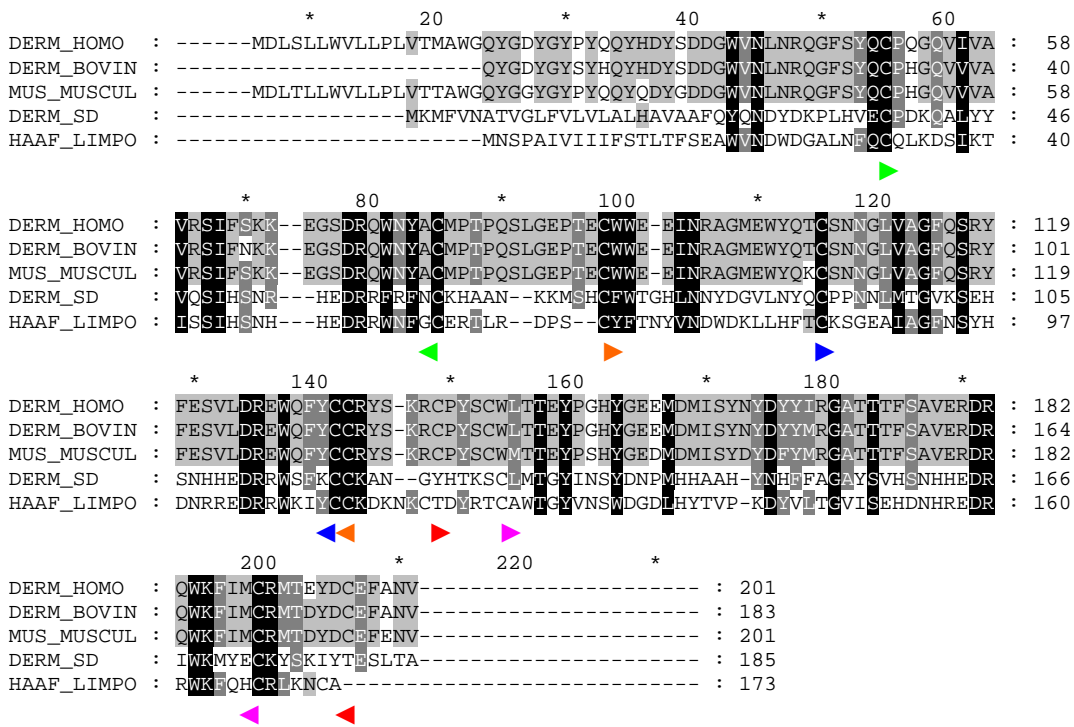


Abb. 15: Sequenzvergleich von SDDERM [Accession number AJ299722] mit Sequenzen aus folgenden Organismen: Dermatopontin Precursor aus *Homo sapiens* [DERM_HOMO; Accession number NP_001928 (Superti-Furga *et al.*, 1993)], Dermatopontin aus *Bos taurus* [DERM_BOVIN; Accession number P19427 (Neame *et al.*, 1989)], Early Quiescence-1-Gen aus *Mus musculus* [MUS_MUSCUL; Accession number AAD54221 (Tzen *et al.*, Genbank submission)], Amöbocyten-Aggregationsfaktor aus *Limulus polyphemus* [HAAF_LIMPO; Accession number Q01528 (Fujii *et al.*, 1992)]. Die konservierten Aminosäuren sind jeweils unterlegt (schwarz: 100%; dunkelgrau: 60%; hellgrau: 40%). Mit farbigen Pfeilen sind die Disulfidbrücken markiert.

5.2.5. Phylogenetische Analyse

Ausgehend von dem Sequenzvergleich wurde ein phylogenetischer Baum erstellt, um die verwandtschaftlichen Beziehungen aufzuzeigen (**Abb. 16**). Dabei zeigt sich die große Nähe zwischen *Suberites domuncula* und *Limulus polyphemus* einerseits und den Vertebraten andererseits.

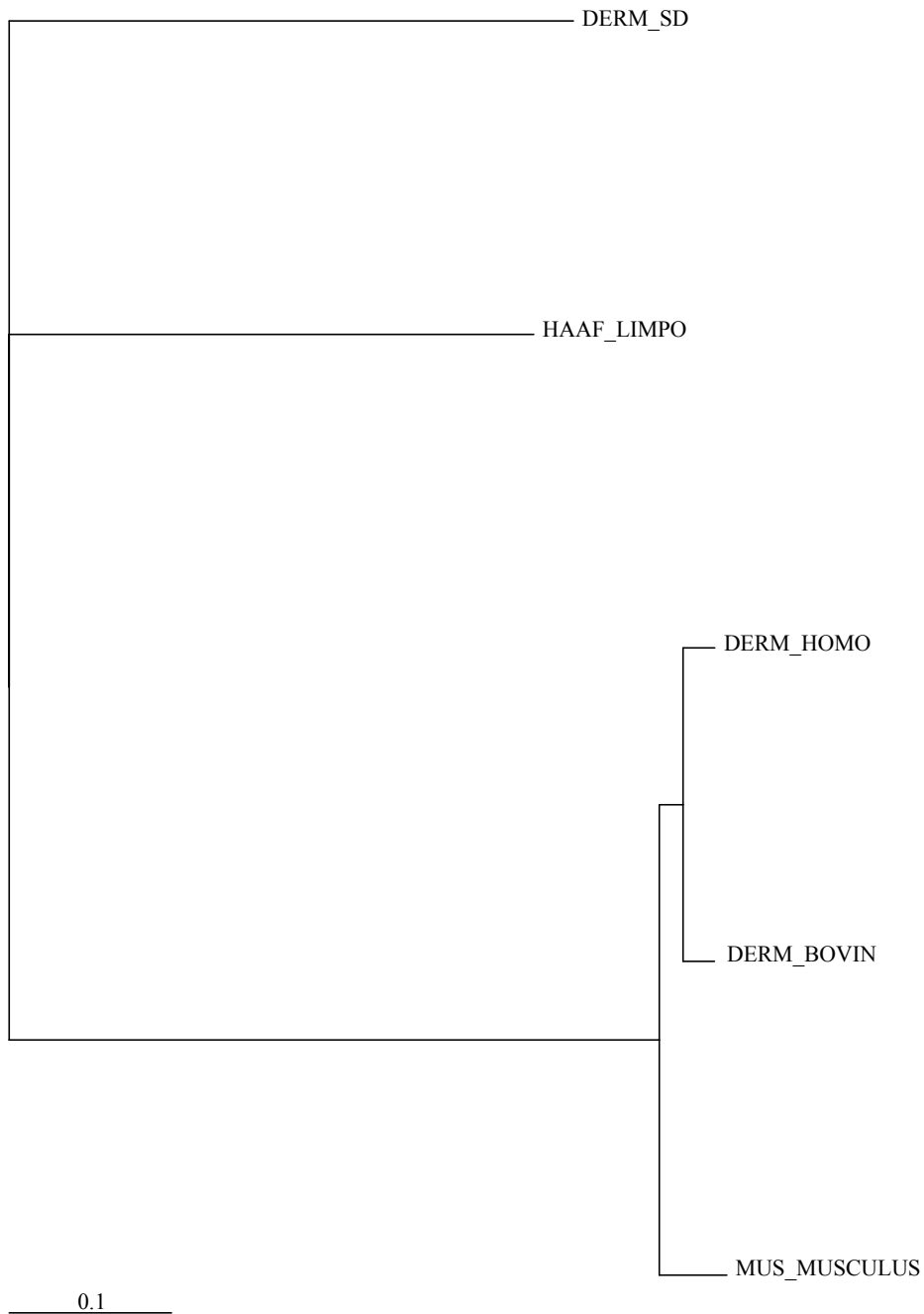


Abb. 16: Phylogenetischer Vergleich von SDDERM [Accession number AJ299722] mit Sequenzen aus folgenden Organismen: Dermatopontin Precursor aus *Homo sapiens* [DERM_HOMO; Accession number NP_001928 (Superti-Furga *et al.*, 1993)], Dermatopontin aus *Bos taurus* [DERM_BOVIN; Accession number P19427 (Neame *et al.*, 1989)], Early Quiescence-1-Gen aus *Mus musculus* [MUS_MUSCUL; Accession number AAD54221 (Tzen *et al.*, Genbank submission)], Amöbocyten-Aggregationsfaktor aus *Limulus polyphemus* [HAAF_LIMPO; Accession number Q01528 (Fujii *et al.*, 1992)].

5.2.6. Domänenstruktur von SD_DERM

Das Dermatopontin aus *Suberites domuncula* zeigt einen Aufbau aus drei Domänen. Dabei reicht Domäne 1 von Aminosäure 1- 66, Domäne 2 von Aminosäure 67 – 121 und Domäne 3 von 122 – 184. Alle drei Domänen zeigen eine große Ähnlichkeit zueinander und sind durch das Sequenzmotiv Asp-Arg-Xxx-Trp gekennzeichnet (Abb. 17). In der ersten Domäne weicht dieses Motiv allerdings von der Konsensussequenz ab und zeigt an der vierten Stelle ein Isoleucin anstelle eines Tryptophan.

```

DERM_SD2 : -----AANKKMSHCFWTCGLNNDGVLNYQCPNLMTGTV : 35
DERM_SD3 : -----NGYHTKSCLMTGYINSYDNEMHAAHYNHFFACA : 34
DERM_SD1 : MKMFVNATVGLFVLVLAHAVAAFQMQNDYDKPLEVECDKQALYYV : 47

DERM_SD2 : KSEHSNHEDRRMSKCKA----- : 55
DERM_SD3 : YSVHSNHEDRIRKMYECKYSKIYTESLT : 63
DERM_SD1 : QSIHSNRHEDRRFRF-NCKH----- : 66

```

Abb. 17: Sequenzvergleich der drei Domänen von SDDERM. Domäne 1 ist als DERM_SD1, Domäne 2 als DERM_SD2 und Domäne als DERM_SD3 bezeichnet. Die konservierten Aminosäuren sind jeweils unterlegt (schwarz: 100%; dunkelgrau: 60%; hellgrau: 40%) Das Sequenzmotiv Asp-Arg-Xxx-Trp ist rot unterlegt.

5.2.7. Phylogenetischer Vergleich der Domänen

Ausgehend vom Vergleich der Domänen wurde ein Stammbaum der einzelnen Domänen aus DERM_SD aus *Suberites domuncula* und dem Limulus-Aggregationsfaktor (LAF) erstellt (**Abb. 18**).

Wie zu ersehen, besteht die größte Ähnlichkeit nicht zwischen den Domänen einer Spezies, sondern zwischen jeweils zwei Domänen aus unterschiedlichen Arten. Dabei fällt auf, daß die Domänen 1 aus *Suberites domuncula* und *Limulus polyphemus* zusammen angeordnet sind, aber jeweils die Domäne 2 aus dem einen Organismus mit Domäne 3 aus dem anderen Tier eine Gruppe bildet.

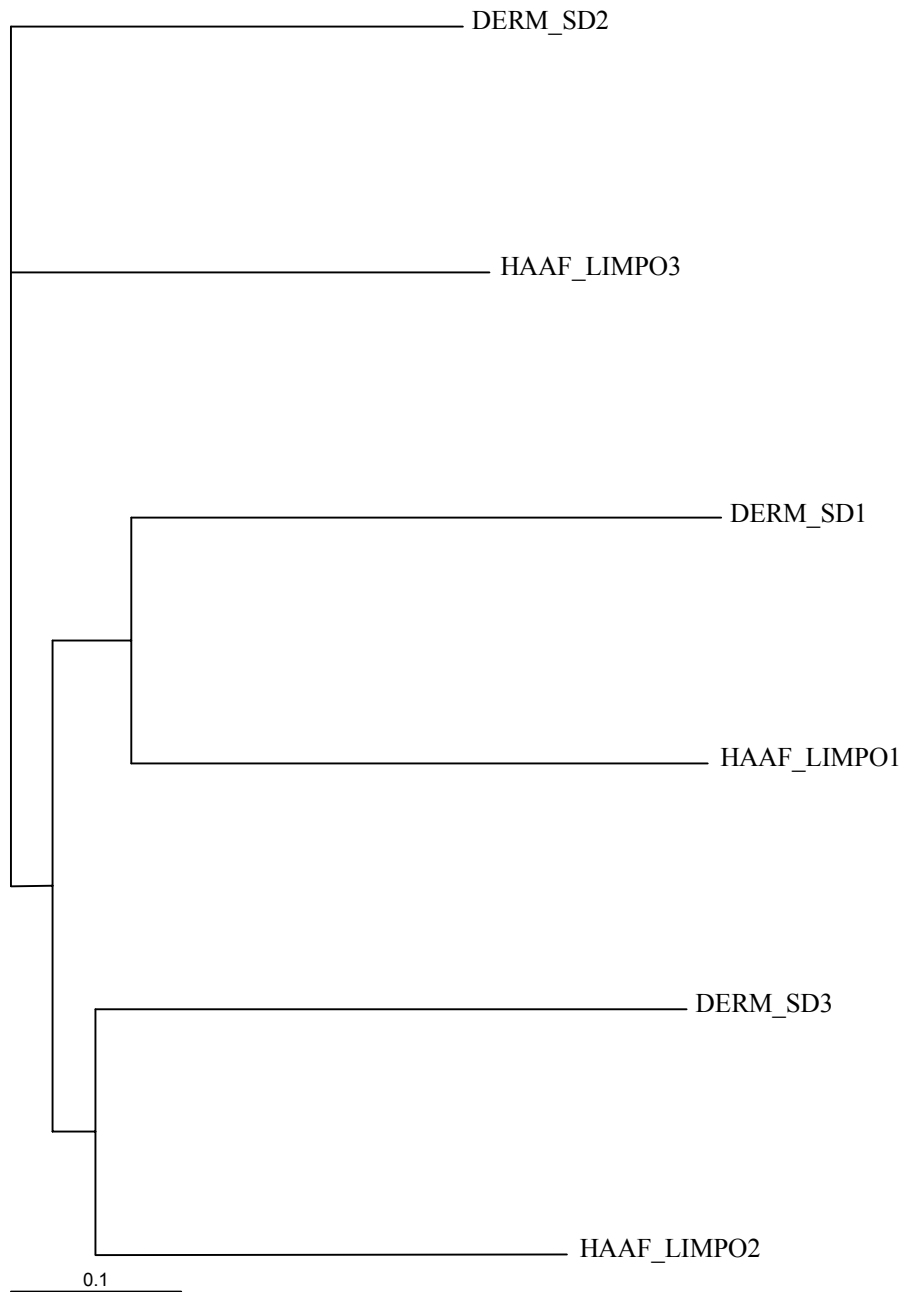


Abb. 18: Phylogenetischer Vergleich der Domänen von SD_DERM mit den Domänen des *Limulus*-Aggregationsfaktors LAF. DERM_SD1: Domäne 1 aus *Suberites domuncula*, DERM_SD2: Domäne 2 aus *Suberites domuncula*, DERM_SD3: Domäne 3 aus *Suberites domuncula*, HAAF_LIMPO1: Domäne 1 aus *Limulus polyphemus* (As1-As 60), HAAF_LIMPO2: Domäne 2 aus *Limulus polyphemus* (As 61 – 113), HAAF_LIMPO3: Domäne 3 aus *Limulus polyphemus* (As 114 – 172).

5.2.8. Expression des DERM_SD

Zur Expression des DERM_SD wurde das pQE-System (QIAGEN, Hilden) (Kap. 4.17.) gewählt. Hierbei werden an das exprimierte Protein sechs Histidin angefügt, die zur Aufreinigung und zum Nachweis des rekombinanten Proteins dienen. Um die cDNA in den Expressionsvektor einzuklonieren, wurde zunächst ein DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert (Kap. 4.1.), wobei die in pGEMTM-T einklonierte cDNA als Matrize diente. Die beiden dabei verwendeten Primer *pDe2bam* und *mdesma* (Kap. 3.8.) besaßen an ihren Enden als sogenannte Adapter die Erkennungssequenzen für die beiden Restriktionsenzyme BamH I und Sma I. Die Position der Primer war so gewählt, daß der für die potentielle Signalsequenz kodierende Bereich nicht amplifiziert wurde. Das entstandene PCR-Produkt konnte nach dem Restriktionsverdau (Kap. 4.9.) in den ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen Expressionsvektor pQE30 einkloniert werden. Das Plasmid wurde anschließend zur Kontrolle mit dem pQE-spezifischem Primer *pQE-F* und *pQE-R* sequenziert (Kap. 4.12.). Das die cDNA im korrekten Leserahmen enthaltende Plasmid wurde anschließend in M15-Zellen transformiert (Kap. 4.6.) und das Protein exprimiert (Kap. 4.17.1.). Anschließend wurde das rekombinante Protein mit Hilfe von Ni-NTA-Säulen affinitätschromatographisch aufgereinigt (Kap. 4.17.2.). Für die nachfolgenden Aggregationsassays wurde das rekombinante Protein gegen Calcium-Magnesium-freies Seewasser dialysiert (Kap. 4.22.2.). Zur Kontrolle der Expression und der Aufreinigung wurden Bakterienextrakte und gereinigtes Protein mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Kap. 4.18.). Aus der Gelelektrophorese (**Abb. 19**) war zu ersehen, daß es gelungen war, das rekombinante Protein aufzureinigen.

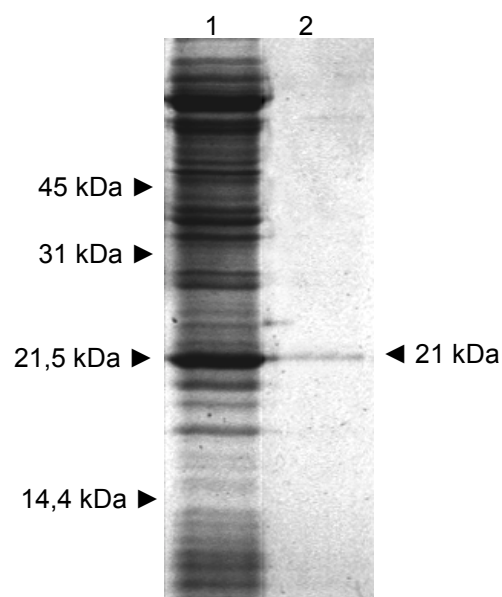


Abb. 19: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Bakterienlysat der Expressionskultur (Spur 1) und aufgereinigtem rekombinanten Protein (Spur 2). Links sind die Größen des Proteinmarkers aufgetragen.

5.2.9. Aggregationsassay

Um zu überprüfen, ob daß aus dem *Suberites domuncula* klonierte Dermatopontin DERM_SD einen Einfluß auf die Adhäsion der Zellen untereinander hat, wurde ein Aggregationsassay (Kap. 4.22.) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Einzelzellsuspension (Kap. 4.22.3.) von *Suberites domuncula*-Zellen (A) in Calcium-Magnesium-haltiges Seewasser gegeben. Nach 30 min auf dem Rolleninkubator hattenen sich in der Suspension Zellaggregate gebildet (B). Gab man zusätzlich 5 µg/ml rekombinantes Dermatopontin aus *Suberites domuncula* (rDERM) dazu (C) (Kap. 5.2.8.), so nahm die Größe der gebildeten Aggregate nach 30 min Inkubation deutlich zu (Abb. 20). Dieser Versuch zeigt, daß das rekombinante Protein zu einer verstärkten Adhäsion von dissoziierten Schwammzellen *in vitro* führt.

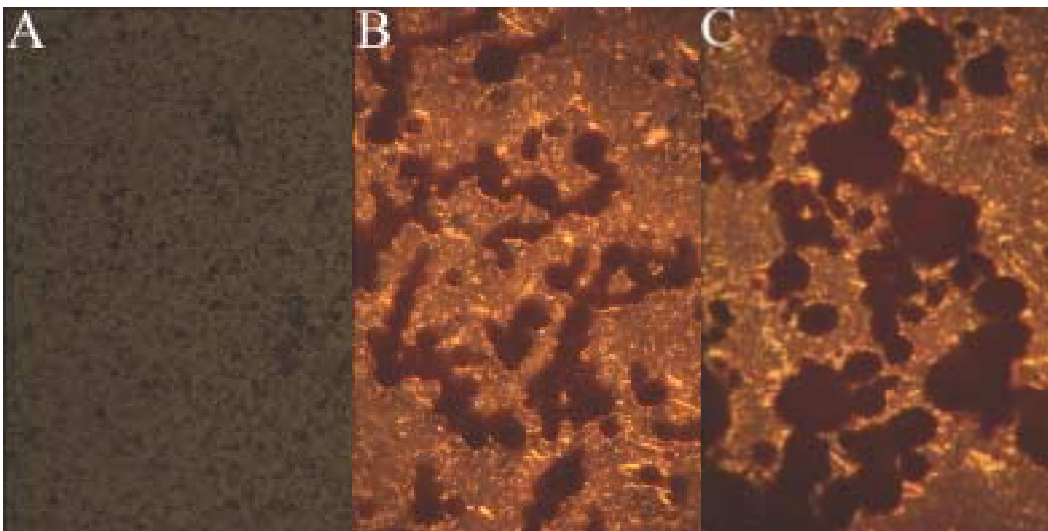


Abb. 20: Einfluß von Dermatopontin auf die Zellaggregation. Einzelzellen in Calcium-Magnesium-haltigen Seewasser (A), nach 30 min Inkubation (B) und nach 30 min Inkubation bei Zugabe von 5 µg/ml rDERM (C); Vergrößerung, x 15.

6. Diskussion

6.1. Der Aggregationsfaktor aus *Geodia cydonium*

Der Aggregationsfaktor ist einer der wesentlichen Bestandteile des Zellaggregationssystems der Porifera. Die ersten Versuche zu seiner Struktur und Funktion wurden bereits sehr früh (Wilson, 1907) durchgeführt. Bis heute konnten zwar viele Aspekte aufgeklärt werden, aber die molekularen Grundlagen sind nach wie vor unklar, auch wenn es gelungen ist, mit proteinchemischen Methoden einige Bestandteile des Aggregationsfaktors und assoziierter Proteine zu charakterisieren (z. B. Gramzow *et al.*, 1986; Varner *et al.*, 1988; Varner *et al.*, 1996). Auch gelang es, die cDNA für das sog. Core-Protein des Aggregationsfaktors aus *Microciona prolifera* (Fernandez-Busquets *et al.*, 1996) und aus *Geodia cydonium* (Müller *et al.*, 1999) zu klonieren. Dabei handelt es sich aber nicht um die einzigen Proteinbestandteile des Aggregationsfaktors. Es bietet sich daher an, mit molekularbiologischen Methoden weitere Gene zu finden, die für die an der Zellaggregation beteiligten Proteine kodieren, um so die Struktur des Aggregationsfaktors weiter aufzuklären.

6.1.1. Klonierung des Aggregationsfaktors

Bei der als Ausgangspunkt dieser Arbeit dienenden cDNA-Sequenz handelte es sich um einen unvollständigen Klon aus der cDNA-Bank des Schwammes *Geodia cydonium*. Dieser Klon war auf dem Weg eines Immunoscreenings gefunden worden. Die cDNA-Bank liegt in Form von Bakteriophagen vor. Mit diesen Phagen wird eine Bakterienkultur infiziert und auf einem Nährboden ausplattiert. Der Vorteil des verwendeten System λ -ZAP-Express (STRATAGENE) besteht nun darin, daß man in dieser cDNA-Bank nicht nur mit einer DNA-Sonde nach komplementären cDNA-Sequenzen suchen kann, sondern auch mit Antikörpern nach den durch die cDNA-kodierten Proteinen, die von den Bakterien exprimiert werden (Sambrook *et al.*, 1996). Als Antikörper wurden der polyklonale Antikörper PoAb-AF und der monoklonale Antikörper 1D2 verwendet. Zur Generierung beider

Antikörper wurde die AF-Fraktion 6B verwendet, das heißt sie sind gegen den Aggregationsfaktor gerichtet (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996). Eine Analyse der Klone ergab, daß sie nur einen Teil der cDNA repräsentierten, und im 5'-Bereich unvollständig waren. Die Gründe dafür sind in der Art begründet, wie die cDNA-Bank hergestellt wurde. Dabei wird die mRNA vom 3'-Bereich ausgehend in eine cDNA umgeschrieben und schließlich in den Vektor inkloniert. Es ist dabei nicht ausgeschlossen, daß die reverse Transkription der mRNA unvollständig abgelaufen ist oder daß eine bereits degradierte mRNA transkribiert und nachfolgend kloniert wird. Es ist daher notwendig, zu überprüfen, ob die isolierte cDNA auch die vollständige mRNA repräsentiert. In einem ersten Schritt wurde daher mit Hilfe der PCR-Technik in der cDNA-Bank nach weiteren Klonen gesucht, die eine vollständige cDNA enthielten. Dieses gelang mit den beschriebenen Primern (Kap. 3.8. und 4.1.). Es konnte ein cDNA-Klon gefunden werden, der im Gegensatz zu den bisher vorliegenden DNA-Fragmenten einen längeren 5'-Bereich aufwies. Der Klon wurde *GEOCYAF* (*Geodia cydonium*-Aggregationsfaktor) genannt, da es sich bei dem durch die Nukleotidsequenz kodierten Protein mutmaßlich um einen wesentlichen Bestandteil des Aggregationsfaktors handelt

6.1.2. Nukleotidsequenz von *AF_GEOCY*

Wie die Northern-Blot-Analyse (Kap. 5.1.3.) zeigt, stimmen die Länge der klonierten cDNA *GEOCYAF* und die Länge des Transkriptes überein. Dabei ist natürlich der Bestimmung der Länge der RNA anhand eines Northern-Blot bezüglich der Genauigkeit eine Grenze gesetzt. Zum einen aufgrund der Ableseungenauigkeit, zum anderen, weil durch die Polyadenylierung der mRNA diese länger ist, als die aus der cDNA-Bank isolierte cDNA. Über die Länge dieser Polyadenylierung in Schwämmen ist aber erst relativ wenig bekannt. Anhaltspunkte für die Länge der cDNA könnten sich auch aus der genomischen Sequenz ergeben. Auf eine Isolierung dieser wurde im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit aber verzichtet. Aufgrund der Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz und des Northern-Blot kann man aber von einer vollständigen cDNA ausgehen.

Die cDNA (Kap. 5.1.2.) zeigt am vermuteten Startmethionen nicht die typische Kozak-Sequenz, die man bei den meisten eukaryotischen mRNAs findet. Daraus kann man aber nicht schlußfolgern, daß es sich um ein nicht funktionelles Startmethionin handelt (Kozak, 1991).

6.1.3. Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Wie beschrieben zeigt die abgeleitete Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung mit Amphiphysin, bzw. Amphiphysin-ähnlichen Molekülen (Kap. 5.1.4.). Amphiphysin ist ein Protein, welches eine Rolle bei der Exocytose synaptischer Vesikel spielt und nur intrazellulär vorkommt. Zumindest für Vertebraten ist diese Funktion relativ gut untersucht (Wigge und McMahon, 1998). Auch in *Saccharomyces cerevisiae* kommt ein amphiphysin-ähnliches Molekül vor (Balguerie *et al.*, 1999). Aus dem Pflanzenreich ist lediglich aus *Arabidopsis thaliana* ein hypothetisches Protein, welches Amphiphysin ähnelt, bekannt (Sato *et al.*, 1998). Es stellt sich nun die Frage, wieso ein Teil des Aggregationsfaktors aus Schwämmen eine so hohe Ähnlichkeit mit einem Protein zeigt, welches in anderen Tierstämmen eine völlig andere Funktion besitzt. Bei der Beantwortung dieser Frage ist zu berücksichtigen, daß zunächst einmal die Sequenzen aus dem Schwamm und aus den anderen Organismen vor allem im N-terminalen Bereich eine Übereinstimmung zeigen (Kap. 5.1.4.). Hierin besteht eine Parallele zu Amphiphysin aus *Drosophila melanogaster*, das auch vor allem im N-Terminus eine Übereinstimmung zu Vertebraten zeigt. Für das Amphiphysin aus *Drosophila melanogaster* wird spekuliert, ob sich seine Funktion von der in Vertebraten unterscheidet, worin diese Unterschiede liegen sollen, ist aber noch nicht aufgeklärt. Diese Vermutungen stützen sich auf die Unterschiede in den Sequenzen im mittleren Bereich (Razzaq *et al.*, 2000). Der N-Terminus hat im humanen Amphiphysin II die Funktion die Bildung von Dimeren zu vermitteln (Ramjaun *et al.*, 1999). Es besteht die zumindest die theoretische Möglichkeit, daß diese Funktion auch bei dem AF aus *Geodia cydonium* durch den N-Terminus vermittelt wird. Experimentelle Belege dafür liegen aber nicht vor. Interessanterweise besitzt aber das Protein aus *Geodia cydonium* in diesem Bereich eine Glycin-reiche Region, die in Amphiphysin fehlt. Die Funktion dieser Region ist aber unklar. Im mittleren Bereich des Proteins fehlt beim Schwammolekül dagegen die prolin-reiche Region, die für die Interaktion zwischen Amphiphysin und weiteren an der Endocytose beteiligter Proteine verantwortlich ist (Grabs *et al.*, 1997). Im C-terminalen Bereich besitzt das Schwammprotein nicht die für Amphiphysin typische SH3-Domäne, die selbst in *Drosophila melanogaster* zu finden ist (Razzaq *et al.*, 2000). Diese SH3-Domäne ist für Protein-Protein-Wechselwirkungen notwendig (Grabs *et al.*, 1997). Wie bereits

erwähnt, wird der Komplex des Aggregationsfaktors möglicherweise in der Zelle zusammengesetzt und gelangt dann über Exocytose (Müller, 1982) oder Sulfat-vermittelten Transport in den Extrazellularraum (Kuhns *et al.*, 1995). Möglicherweise sind Amphiphysin und der AF aus einem gemeinsamen Vorfahren hervorgegangen, der an einem exocytotischen Prozeß beteiligt war. Da die Sequenzen vor allem im N-Terminus übereinstimmen, für den eine mögliche Bindung an Membranen diskutiert wird (Ramjaun *et al.*, 1999), könnte hierin eine Funktion liegen, die von beiden Proteinen ausgeübt wird. Ein weiterer Punkt ist das Fehlen einer Signalsequenz, so daß sich hieraus keine Schlüsse über mögliche Sekretionsmechanismen ziehen lassen.

6.1.4. Phylogenetische Analyse

Die phylogenetische Analyse (Kap. 5.1.5.) zeigt eindeutig die größere evolutionäre Nähe des Moleküls aus *Geodia cydonium* zu den humanen Sequenzen wie zu den Proteinen aus *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*. Ein Ergebnis, welches für sehr viele Moleküle aus Schwämmen typisch ist. Eine Erklärung dafür ist, daß im Laufe der Evolution bei einigen Tiergruppen die entsprechenden Gene verloren gegangen sind, wohingegen sie bei den ursprünglichen Schwämmen noch vorhanden sind (Gamulin *et al.*, 2001). Erwartungsgemäß ist der evolutionäre Abstand zu *Arabidopsis thaliana* und *Saccharomyces cerevisiae* größer. Die größere Nähe zu *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* deckt sich mit früheren Ergebnissen, wonach die Metazoen den Pilzen näher stehen als den Pflanzen (Müller, 2001). Interessanterweise fällt der phylogenetische Vergleich in der dargestellten Weise aus, obwohl sich die Sequenzhomologie lediglich auf den N-terminalen Teil der Sequenz erstreckt. Im mittleren und C-Terminalen Bereich sind hingegen große Abweichungen zu erkennen, zumal insbesondere funktionell wichtige Bereiche wie die SH3-Domäne fehlen. Aufgrund dieser Unterschiede in den Aminosäuresequenzen und der nur teilweisen Übereinstimmung, erscheint es als unwahrscheinlich, daß es sich bei dem Protein aus *Geodia cydonium* und Amphiphysin aus anderen Metazoen um Proteine handelt, die eine identische Funktionen haben.

6.1.5. Expression von AF_GEOCY

Wie beschrieben (Kap. 4.17.), wurde die cDNA in den Expressionsvektor pGEX2T (AMERSHAM-PHARMACIAia) einligiert, in *E. coli* als Fusionsprotein exprimiert und anschließend aufgereinigt. Vorherige Versuche, das Protein mit Hilfe anderer Systeme zu exprimieren, bei denen kein Fusionsteil, sondern lediglich mehrere Aminosäuren Histidin an das rekombinante Protein angefügt werden, waren gescheitert. Möglicherweise war das rekombinante Protein toxisch für Bakterien. Dieses Problem läßt sich oftmals umgehen, indem man ein rekombinantes Protein als Fusionsprotein exprimiert. Aus diesen Gründen fiel die Wahl auf das genannte Expressionssystem. Wie ersichtlich, war die affinitätschromatographische Aufreinigung erfolgreich, es ist eine Bande zu sehen, deren Größe dem Fusionsprotein entspricht.

Um nachzuweisen, daß es sich bei dem durch die cDNA kodiertem Protein tatsächlich um das von den Antikörpern detektierte Protein handelt, wurden ein Western-Blot durchgeführt. Dabei wurden ein Proteinextrakt aus *Geodia cydonium* und aufgereinigtes rekombinantes Protein mit den Antikörpern PoAb-AF und 1D2 nachgewiesen (Kap. 5.1.7.). In allen drei Spuren ist eine Bande derselben Größe zu erkennen. Dieses bedeutet, daß der gefundene cDNA-Klon tatsächlich für einen Bestandteil des Aggregationsfaktors kodiert. Da von dem rekombinanten Protein vorher mit dem Enzym Thrombin die Gluthathion-S-Transferase abgespalten wurde, ist eine Kreuzreaktion der Antikörper mit diesem Teil des rekombinanten Proteins ausgeschlossen. Interessant sind weiterhin die im unteren Bereich sichtbaren Banden, bei denen es sich um die im Schwammextrakt in großer Menge vorhanden Lektine handelt. Es handelt sich um eine Kreuzreaktion mit den Lektinen, ein Sachverhalt, der bereits früher beschrieben wurde (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996).

Betrachtet man das apparente Molekulargewicht sowohl des rekombinanten als auch des im Schwammextrakt identifizierten Proteins, welches in der Gelelektrophorese und im Western-Blot mit ungefähr 36 kD bestimmt wurde, so fällt auf, daß es von dem auf Grundlage der Sequenz vorhergesagten Gewicht von 47 kD abweicht. Erklären läßt sich diese Diskrepanz nur durch ein ungewöhnliches Laufverhalten sowohl des rekombinanten als auch des nativen Proteins, eventuell bedingt durch noch vorhandene Sekundärstrukturen, obwohl die Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde.

6.1.6. Funktionelle Charakterisierung

Zur funktionellen Charakterisierung des rekombinanten AF wurde ein Aggregationsassay durchgeführt. Dieses Testsystem stellt eine etablierte Methode dar, mit der man die Zellaggregation bei Schwämmen in einem einfachen *in vitro*-Versuch untersuchen kann (Müller und Zahn, 1973). Sie beruht darauf, daß dissoziierte Schwammzellen unter geeigneten Bedingungen makroskopisch sichtbare Zellaggregate bilden. Im Versuch (Kap. 5.1.8.) zeigte sich nun deutlich der Einfluß des rekombinanten AF (rAF_GEOCY). Zur Kontrolle wurden zunächst Einzelzellen mit AF-Fraktion 6B versetzt. Hier sieht man große Zellaggregate, da der zugefügte Aggregationsfaktor, der in der Fraktion 6B enthalten ist, die Zellen aggregieren läßt. Für diesen Vorgang ist die Anwesenheit von Ca^{2+} im Medium erforderlich. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit des Aggregationsprozesses ist vielfach gezeigt worden. Fehlt hingegen Ca^{2+} im Medium ist keine Zellaggregation zu beobachten (u.a. Wilson, 1907; Müller, 1982). Erwartungsgemäß ist die Größe der gebildeten Aggregate geringer, wenn man den Antikörper PoAb-AF zusätzlich hinzugibt. Dieser gegen den AF gerichtete polyklonale Antikörper bindet an den in der Fraktion 6B vorhandenen AF. Damit ist die Zellaggregation wirksam unterbunden. Inkubiert man die Zellen mit rekombinanten AF und fügt erst nach einem Waschschrift die AF-Fraktion 6B dazu, ist die Größe der gebildeten Aggregate kleiner als im vorher geschilderten Vergleichsversuch. Dieses Ergebnis läßt sich durch eine Bindung des rekombinanten AF an den Teil auf der Zelloberfläche erklären, an den normalerweise der Aggregationsfaktor der Fraktion 6B binden würde. Da diese Bindungsstellen durch das rekombinante Protein belegt sind, kann der Aggregationsfaktor aus der Fraktion 6B nicht binden und die Zellaggregation unterbleibt. Es läßt sich aus diesem Versuch schließen, daß rAF_GEOCY die Verbindung zwischen Aggregationsfaktorkomplex und Strukturen, die mit der Zelle verbunden sind, herstellt. Da die Aggregation nicht völlig unterbunden wurde, ist darin begründet, daß die Konzentration der Zellen, als auch des rekombinanten Proteins und der Fraktion 6B möglicherweise nicht exakt einander entsprachen. Eventuell spielen aber auch noch andere Faktoren eine Rolle bei der beobachteten Aggregation.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand eines Western-Blot-Experimentes gezeigt werden, daß der rekombinante Aggregationsfaktor an Lektin bindet (Kap. 5.1.9.). Da es sich um das rekombinante Protein, welches in einem prokaryotischen System exprimiert wurde, handelt, kann die Bindung nicht über

glykosilierte Aminosäuren im Aggregationsfaktor erfolgt sein, obwohl Lektine als Zucker-bindende Proteine charakterisiert sind (Hirabayashi und Kasai, 1993), zudem ist in der abgeleiteten Aminosäuresequenz GEOCY_AF eine Glykosilierungsstelle zu finden. Da die dem Transfer vorangehende Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde, lag das rekombinante Protein zunächst nicht in der nativen Form vor. Es ist aber beschrieben worden, daß es während des notwendigen Blockierungsschrittes der Membran zu einer teilweise Renaturierung der Proteine kommt (Carr und Scott, 1992). Ausschließen kann man die Möglichkeit einer Kreuzreaktion zwischen dem Lektin und dem Gluthathion-S-Transferase-Anteil des Fusionsproteins, da auch unter Verwendung des prozessierten rekombinanten Proteins ein Signal zu sehen ist.

6.1.7. Immunfluoreszenzmikroskopie

Mit der Immunfluoreszenzfärbung (Kap. 5.1.10.) war ein eindeutiger Nachweis des Aggregationsfaktors im Gewebe möglich. Insbesondere die sphäkulösen Zellen sind angefärbt. Dieser Zelltyp wird auch in immunhistologischen Untersuchungen mit Antikörpern gegen das Lektin (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996) und den mutmaßlichen Aggregationsrezeptor (Blumbach *et al.*, 1998) angefärbt. Offensichtlich sind die Komponenten des Aggregationssystems an diesem Zelltyp besonders zahlreich vorhanden. Dieses ist auch ein Hinweis auf die funktionelle Zusammengehörigkeit aller drei Proteine.

6.1.8. Die Zellaggregation in *Geodia cydonium*

Aufgrund der Ergebnisse läßt sich das Modell der Zellaggregation in *Geodia cydonium* vervollständigen. Nach der bisherigen Vorstellung bindet ein in der Zellmembran verankerter Aggregationsrezeptor (AR) über Lektin an den Aggregationsfaktorkomplex (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996; Müller *et al.*, 1999). Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse konnte das Protein GEOCY_AF als der Bestandteil des Aggregationsfaktors identifiziert werden, über den die Verbindung

zwischen Lektin und Kernstruktur des Aggregationsfaktors erfolgt. Dabei ist die Bindung zwischen Lektin und GEOCY_AF unabhängig von einer eventuellen Glykosilierung (**Abb. 21**). Die Rolle des aus *Geodia cydonium* (Müller *et al.*, 1999) und auch *Microciona prolifera* (Fernandez-Busquets *et al.*, 1996) gefundenem Bestandteil des Aggregationsfaktors bleibt dabei unklar, eventuell bildet er die Kernstruktur des Komplexes.

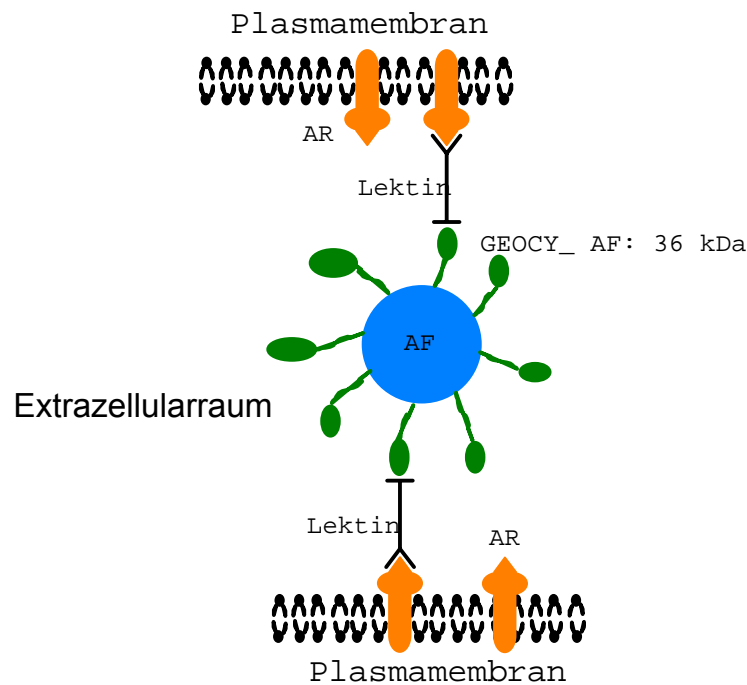


Abb. 21: Schematische Darstellung des Aggregationsprozesses in *Geodia cydonium*. Der Aggregationsrezeptor (AR) ist in der Plasmamembran verankert. Das Lektin verbindet den AR über den Aggregationsfaktor (GEOCY_AF) mit der Kernstruktur des Aggregationsfaktors (AF) (Verändert nach Schütze *et al.*, 2001)

6.2. Dermatopontin aus *Suberites domuncula*

6.2.1. Nukleotidsequenz von *SDDERM*

Ausgehend von einem Teilstück der cDNA, die für ein Dermatopontin-ähnliches Protein kodiert, ließen sich mit Hilfe der PCR-Technik mehrere Klone aus der cDNA-Bank von *Suberites domuncula* isolieren. Ein Vergleich der verschiedenen Klone ergab mehrere Sequenzen, die sich im 5'-Bereich bezüglich ihrer Länge unterschieden, aber im überlappenden Bereich identisch waren. Man kann davon ausgehen, daß es sich bei den kürzeren Klonen um unvollständige cDNA handelt. Die möglichen Gründe dafür wurden bereits erwähnt (Kap. 6.1.1.). Wie die Northern-Blot-Analyse (Kap. 5.2.3.) zeigt, entspricht die Länge des längsten cDNA-Klons der Länge des Transkriptes. Das bedeutet, die cDNA repräsentiert die vollständige mRNA. Auch diese cDNA zeigt am vermuteten Startmethionen nicht die typische Kozak-Sequenz (Kozak, 1991).

6.2.2. Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Die Übersetzung der Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz ergab einen offenen Leserahmen (Kap. 5.2.2.). Diese abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte im Datenbankvergleich Ähnlichkeiten zu einem aus *Limulus polyphemus* isolierten Aggregationsfaktor (Fujii *et al.*, 1992) und zu dem aus mehreren Säugetieren gefundenem Protein Dermatopontin (Kap. 5.2.4.). An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß zwischen dem Limulus-Aggregationsfaktor (LAF) und dem in dieser Arbeit beschriebenen Aggregationsfaktor aus Schwämmen trotz der identischen Bezeichnung kein Zusammenhang besteht. Das Protein aus *Limulus polyphemus* erhielt diesen Namen wegen seiner Fähigkeit Amöbocyten und Erythrozyten zu aggregieren (Fujii *et al.*, 1992). Die Bezeichnung Aggregationsfaktor bezieht sich bei Schwämmen auf den an der Zellaggregation beteiligten löslichen Faktor. Ausgehend von der Similarität zu Dermatopontin wurde die Sequenz als *SDDERM* und die abgeleitete Aminosäuresequenz als *DERM_SD* (*Accession number* AJ299722) bezeichnet. Die Übereinstimmung der Sequenzen bezüglich ihrer Länge und Primärstruktur sind ein weiteres wichtiges Indiz für die Vollständigkeit der isolierten cDNA.

Der phylogenetische Vergleich (Kap. 5.2.5.; **Abb. 16**) zeigt erwartungsgemäß die gemeinsame Anordnung der Dermatopontinsequenzen aus Vertebraten einerseits und der beiden Proteine aus Invertebraten andererseits. Auf das Fehlen dieser Gene in den Modellorganismen *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* wurde bereits hingewiesen, so daß ein Vergleich mit diesen Organismen nicht möglich ist.

Der Vergleich der Sequenzen als auch die Computer-gestützte Analyse (Kap. 5.2.4.) von DERM_SD sprechen auch für das Vorhandensein einer Signalsequenz und einer potentiellen Schnittstelle zwischen Aminosäure 23 und 24 zum Abspalten dieser Signalsequenz. Dieses würde bedeuten, daß das Schwammprotein wie auch Dermatopontin und LAF sekretorische Proteine sind, die in den Extrazellularraum gelangen. Dieses konnte für die bovine Form experimentell gezeigt werden (Neame *et al.*, 1989).

Für die bovine Form des Dermatopontin ist das Vorhandensein von fünf Disulfid-Brücken beschrieben worden, wodurch im Protein mehrere Schleifen gebildet werden (Neame *et al.*, 1989). Im *Limulus*-Aggregationsfaktor können theoretisch vier Disulfid-Brücken ausgebildet werden (Fujii *et al.*, 1992). In der Sequenz von SD_DERM befindet sich an den entsprechenden Stellen ebenfalls die Aminosäure Cystein, so das man vier mögliche Disulfid-Brücken vorhersagen kann (**Abb. 22**) und das Protein vermutlich auf eine ähnliche Art Schleifen ausbildet.

Bei der Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz fällt der Aufbau aus drei Regionen auf, die eine große Ähnlichkeit zueinander aufweisen (Kap. 5.2.6.). Region 1 reicht von Aminosäure 1- 66, Region 2 von Aminosäure 67 - 121 und Region 3 von 122 - 184. Einen solchen Aufbau zeigen auch das bovine Dermatopontin (Neame *et al.*, 1989) und der *Limulus*-Aggregationsfaktor (Fujii *et al.*, 1992). Diese Struktur ist durch die Annahme einer Genduplikation erklärbar. Aus einem Vorläuferprotein, das nur aus einer Domäne bestand, wäre im Laufe der Evolution durch Verdoppelung einer Domäne zunächst ein, aus zwei Domänen bestehendes, Molekül und später durch die nochmalige Verdopplung einer Domäne das Protein in seiner heutigen Form entstanden. Unterzieht man die einzelnen Domänen des *Limulus*-Aggregationsfaktors und des SD_DERM einem phylogenetischen Vergleich (Kap. 5.2.7.), so sieht man, daß jeweils eine Domäne aus *Limulus polyphemus* und eine Domäne aus *Suberites domuncula* die höchste Übereinstimmung zeigen und nicht etwa alle drei Domänen aus einem Organismus die größte Ähnlichkeit zueinander besitzen. Eine mögliche Erklärung wäre, daß bereits bei einem gemeinsamen Vorfahren die beschriebenen Duplikationen stattgefunden hätten. Charakteristisch für alle drei Domänen ist ein hochkonserviertes Sequenzmotiv, welches aus vier Aminosäuren besteht und

Asp-Arg-Xxx-Trp lautet. Dieses Motiv findet sich in allen bisher untersuchten Dermatopontinsequenzen und auch in der Sequenz aus *Suberites domuncula*. Die Funktion ist nicht bekannt, aber der hohe Grad der Konservierung spricht für eine wichtige Rolle dieses Motivs. Vermutungen gehen dahin, es könne eine Schlüsselfunktion in der Erkennung eines Rezeptors auf der Zelloberfläche einnehmen (Fujii *et al.*, 1992).

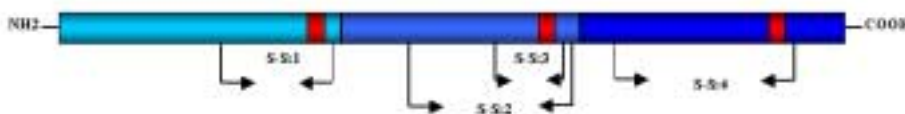


Abb.22: Schematische Darstellung des Dermatopontin aus *Suberites domuncula*. Farblich unterlegt sind die drei Domänen, rot unterlegt ist das Asp-Arg-Xxx-Trp-Motiv, eingezeichnet sind ebenfalls die theoretisch möglichen Disulfidbrücken.

6.2.4. Einfluß von SD_DERM auf die Zellaggregation

Im Rahmen dieser Arbeit konnten auch erste mögliche Funktionen von SD_DERM im Schwamm gezeigt werden. Ausgehend von der Eigenschaft des LAF aus *Limulus polyphemus* eine Zellaggregation zu bewirken (Fujii *et al.*, 1992), wurde ein Aggregationsassay mit dissoziierten Schwammzellen aus *Suberites domuncula* durchgeführt. Dieser Assay stellt ein etabliertes System zur Untersuchung der durch den Aggregationsfaktor vermittelten Zellaggregation dar (Müller und Zahn, 1973). Es bot sich an, diesen Test nun auch auf das aus *Suberites domuncula* klonierte Dermatopontin anzuwenden, obwohl es wie bereits erwähnt kein Bestandteil des eigentlichen Aggregationsfaktorsystems der Porifera ist. Der erste Schritt war die Herstellung des rekombinanten rSD_DERM in *E. coli* mittels des pQE-Expressionssystems und die anschließende Aufreinigung. Dabei wurde ein Teil der cDNA gewählt, dem der für die mutmaßliche Signalsequenz kodierende Bereich fehlt. Dieser Bereich sollte für die Funktion nicht notwendig sein, könnte aber bei der Expression in *E. coli* zu Problemen führen. Wie gezeigt (Kap 5.2.8.), konnte das Protein in *E. coli* exprimiert und anschließend auch erfolgreich aufgereinigt werden. Mit dem aufgereinigten Protein wurde dann ein

Aggregationsassay durchgeführt. Dabei wurden dissoziierte Zellen mit als auch ohne rSD_DERM inkubiert. Es zeigte sich eine deutlich stärkere Zellaggregation wenn man dem Aggregationsansatz zusätzlich rSD_DERM zugibt (Kap. 5.2.9.). Dieses Experiment zeigt, daß SD_DERM und der LAF nicht nur eine Homologie in der Sequenz zeigen, sondern auch Gemeinsamkeiten in der Funktion. Interessanterweise zeigt rSD_DERM die aggregierende Funktion, obwohl das rekombinante Protein nicht die posttranslationalen Modifikationen aufweisen dürfte wie das native Protein, da die Expression im prokaryotischen System erfolgte. Allerdings sind z. B. Glykosilierungen für Dermatopontin nicht nachgewiesen (Cronshaw *et al.*, 1993). Die Ergebnisse mit dem Dermatopontin aus *Suberites domuncula* lassen es nun aber möglich erscheinen, daß eine eventuell vorhandene posttranslationale Modifikation für eine Funktion zumindest nicht zwingend notwendig ist. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß die voraussichtlich vorhandenen Disulfidbrücken nicht ausgebildet sind, trotzdem ist eine aggregierende Wirkung zu beobachten. Allerdings ist auch für das aus dem Rind isolierte sequenzhomologe Protein beschrieben worden, daß es unabhängig von dem Vorhandensein der Disulfidbrücken an seinen Liganden bindet (Okamoto *et al.*, 1996).

Als mögliche Bindungspartner für Dermatopontin werden in der Literatur Mitglieder der Integrin-Familie diskutiert, da zum einen die Bindung des Dermatopontin an Zelloberflächen durch ein RGDS-enhaltendes Peptid gehemmt werden kann und zum anderen Dermatopontin aus Vertebraten die Aminosäureabfolge RGAT enthält, die der typischen RGDS-Sequenz, die an Integrine bindet entsprechen könnte. Ein endgültiger Nachweis dafür steht aber aus (Lewandowska *et al.*, 1991). Vergleicht man die Sequenzen mit dem Protein aus *Suberites domuncula*, so fällt auf, daß hier anstelle der Abfolge RGAT die Aminosäuren AGAY vorhanden sind. Noch stärker weicht allerdings die Sequenz von *Limulus polyphemus* ab (Fujii *et al.* 1992). Als Interpretation bieten sich zwei Möglichkeiten an. Es könnte sein, daß die Bindung an Integrine nur in Vertebraten vorkommt und bei Invertebraten fehlt, obwohl auch bei Schwämmen Integrine gefunden worden sind (Wimmer *et al.*, 1999) Die andere Variante wäre, daß die Ähnlichkeit in der RGAT-Sequenz zum RGDS-Motiv nicht bedeutet, daß diese funktionell aneinander entsprechen und Dermatopontin grundsätzlich nicht an Mitglieder der Integrin-Familie bindet.

Als weitere Proteine, die mit Dermatopontin interagieren, gelten der Transforming growth factor- β (TGF- β) und Decorin, ein Dermatansulfat-Proteoglycan (Okamoto *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 1996). Über welche Sequenzabschnitte des Dermatopontin dieses aber erfolgt, ist noch nicht untersucht. Bekannt ist lediglich,

daß Dermato pontin nicht an die Dermatan-Sulfat-Ketten, sondern an den Proteinkern des Decorin bindet. Ob auch im Schwamm ein ähnliches System existiert, konnte noch nicht geklärt werden. Versuche im Rahmen dieser Arbeit aus der cDNA-Bank von *Suberites domuncula* mit Hilfe degenerierter Primer sowohl TGF- β als auch Decorin-homologe Gene zu isolieren, waren nicht erfolgreich. Möglicherweise finden sich in der Zukunft im Rahmen einer Sequenzierung des funktionellen Genoms von *Suberites domuncula* entsprechende Gene.

Für die porkine Form des Dermato pontin, die als TRAMP bezeichnet wird, ist die Bindung an Kollagen gezeigt worden (Cronshaw *et al.*, 1993). TRAMP beeinflusst dabei *in vitro* die Bildung von Kollagen-Fibrillen. Die Aminosäuren über welche die Bindung erfolgt, konnten aber noch nicht identifiziert werden (McBeath *et al.*, 1993). Aus *Suberites domuncula* konnte bereits eine für Kollagen kodierende cDNA kloniert werden (Schröder *et al.*, 2000), womit ein Zusammenhang zumindest theoretisch möglich erscheint.

6.3. Ausblick

Mit der Klonierung der Gene für einen Bestandteil des Aggregationsfaktors aus *Geodia cydonium* und für Dermato pontin aus *Suberites domuncula* gelang es, zwei cDNAs zu finden und die entsprechenden Proteine funktionell zu charakterisieren, die an der Zellaggregation beteiligt sind. Um zu einem vollständigeren Bild zu kommen, ist es notwendig, weitere Bestandteile des Aggregationsfaktors zu identifizieren und die entsprechenden Gene zu klonieren. Möglicherweise nicht nur in *Geodia cydonium*, sondern auch in *Suberites domuncula*, da bei diesem Organismus mittlerweile große Fortschritte in der *in-vitro*-Kultivierung von Zellen gemacht worden sind (Custodio *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1999b), und sich so Ansätze für weitere Studien ergeben.

7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die vollständige cDNA-Sequenz eines mutmaßlichen Bestandteiles des Aggregationsfaktors aus *Geodia cydonium* kloniert werden. Dazu wurde mit Hilfe der PCR-Technik ein Screening einer cDNA-Bank dieses Organismus durchgeführt. Durch einen Northern-Blot konnte gezeigt werden, daß der gefundene Klon das vollständige Transkript repräsentiert. Ausgehend von der cDNA wurde das entsprechende Protein in *E. coli* als Fusionsprotein rekombinant hergestellt und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Mit einem Western-Blot-Experiment wurde der Nachweis geführt, daß es sich bei dem gefundenen Protein tatsächlich um einen Bestandteil des Aggregationsfaktors handelt. Der in diesem Western-Blot eingesetzte Antikörper wurde verwendet, um das Protein in histologischen Schnitten nachzuweisen. Das rekombinante Protein wurde in einem Aggregationsassay auf seine Funktionalität hin untersucht. Es stellt sich heraus, daß es einen Einfluß auf die Aggregation von Einzelzellen in einer Zellsuspension hat. Mit Hilfe eines modifizierten Western-Blot-Verfahrens wurde die Bindung des rekombinanten Aggregationsfaktors an das Lektin aus *Geodia cydonium* nachgewiesen.

Weiterhin konnte aus dem Schwamm *Suberites domuncula* eine vollständige cDNA kloniert werden. Das durch diese cDNA kodierte Protein zeigt eine hohe Übereinstimmung mit einem in Vertebraten und in *Limulus polyphemus* vorkommendem Protein der extrazellulären Matrix, welches dort eine Rolle bei der Zellaggregation spielt. Die Vollständigkeit des Klons konnte anhand eines Northern-Blot gezeigt werden. Das Protein wurde in *E. coli* rekombinant hergestellt und erfolgreich aufgereinigt. Es konnte gezeigt werden, daß das rekombinante Protein *in vitro* zu einer verstärkten Aggregation von dissoziierten Schwammzellen führt, damit konnte ein erster Hinweis auf die Funktion gefunden werden.

8. Literatur

Acheson, A. und Gallin, W. J. (1992). Generation und characterization of function-blocking anti-cell adhesion molecule antibodies. In *Cell-Cell Interactions*. (eds B.R. Stevenson und W.J. Gallin) pp. 31-54., IRL-Press, Oxford.

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

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

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

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.

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

Ausubel, F.M., Brent, R. et al. (ed.) (1987-2000). Current protocols in molecular biology Vol. 1-3. Wiley & Sons, Inc., New York.

Bairoch, A. (1992). Prosite: a dictionary of sites und patterns in proteins. *Nucl. Acids Res.*, **20**: 2013-2018.

Baldauf, S.L. und Palmer, J.D. (1993). Animal und fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **90**: 11558-11562.

Balguerie, A., Sivadon, P., Bonneu, M. und Aigle, M. (1999). Rvs167p, the budding yeast homolog of amphiphysin, colocalizes with actin patches. *J. Cell. Sci.* Aug., **112**: 2529-2537.

Bauerfeind, R., Nemoto, Y. und De, Camilli, P. (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature.*, **379**: 353-357.

Bauerfeind, R., Takei, K. und De, Camilli, P. (1997). Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates und undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J. Biol. Chem.*, **272**: 30984-30992.

Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J., Ouellette, B.F., Rapp, B.A. und Wheeler, D.L. (1999). GenBank. *Nucl. Acids Res.*, **27**: 12-17.

Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**: 1513-1522.

Blake, M.S., Johnston, K.H., Russel-Jone, G.J. und Gotschlich, E.C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.*, **136**: 175-179.

BLAST (1997). ncbi.nlm.nih.gov: 80/cgi-bin/BLAST/nph-blast., INTERNET.

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 und characterization of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains und short consensus repeats. *J. Cell Sci.*, **111**: 2635-2644.

Bradford M.M. (1976). A rapid und sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.

Brown, T.A. (1993). Gentechnologie für Einsteiger. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*.

Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N., und Hofmann, K. (1996). A flexible motif search technique based on generalized profiles. *Comput. Chem.*, **20**: 3-24.

Burger, M.M. und Jumblatt, J. (1977). Membrane involvement in cell-cell interactions: a two component model system for cellular recognition that does not require live cells. In *Cell und Tissue Interactions* (ed. J.W. Lash und M.M. Burger) pp. 155-172. Raven Press, New York.

Burnette N.W. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose und radiographic detection with antibody. *Anal. Biochem.*, **112**: 195-203.

Butler, MH., David, C., Ochoa, GC., Freyberg, Z., Daniell, L., Grabs, D., Cremona, O. und De, Camilli, P. (1997). Amphiphysin II (SH3P9., BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments und nodes of ranvier in brain und around T tubules in skeletal muscle. *J. Cell. Biol.*, **137**: 1355-1367.

Carr, D.W. und Scott, J.D. (1992). Blotting und bund-shifting: techniques for studying protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.*, **17**: 246-249.

Cauldwell, C., Henkart, P., und Humphreys, T. (1973). Physical properties of sponge aggregation factor: a unique proteoglycan complex. *Biochem.*, **12**: 3045-3055.

Cestra, G., Castagnoli, L., Dente, L., Minenkova, O., Petrelli, A., Migone, N., Hoffmuller, U., Schneider, Mergener, J. und Cesareni-G. (1999). The SH3 domains of endophilin und amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *J. Biol. Chem.*, **274**: 32001-32007.

Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159.

Clark, J.M. (1988). Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic und eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.*, **16**: 9677-9686.

Conrad, J., Uhlenbruck, G., Zahn, R. K., Kurelec, B., Jericevic, B. und Müller, W.E.G. (1984). The role of lectin I und of glycoconjugates in recognition of cells from the siliceous sponge *Geodia cydonium*. *Biol. Cell.*, **51**: 287-294.

Conway M.S. (1993). The fossil record und the early evolution of the Metazoa. *Nature*, **361**: 219-225.

Crownshaw, A.D., McBeath, J.R.E., Shackleton, D.R., Collins, J.F., Fothergill-Gilmore., L.A. und Hulmes , D.J.S. (1993). TRAMP (Tyrosine Rich Acidic Matrix Protein), a protein that co-purifies with LySyl Oxidase from porcine skin. *Matrix*, **13**: 255-266.

Custodio, M.R., Prokic, I., Steffen, R., Koziol, C., Borojevic, R, Brümmer, F., Nickel, M. und Müller, W.E.G. (1998). Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation an cell death. *Mech. Ageing Dev.*, **105**: 45-59.

David, C., McPherson, P.S., Mundigl, O. und de, Camilli-P. (1996). A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**: 331-335.

David, C., Solimena, M. und De-Camilli, P. (1994). Autoimmunity in stiff-Man syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a protein similar to the yeast proteins, Rvs167 und Rvs161. *FEBS-Lett.*, **351**: 73-79.

Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M. und Orcutt, B.C. (1978). A model of evolutionary change in protein. In: *Atlas of Protein Sequence und Structure* (ed. M.O. Dayhoff) pp. 345-352. Nat Biomed Res Foundation, Washington DC.

De-Camilli, P., Thomas, A., Cofield, R., Folli, F., Lichte, B., Piccolo, G., Meinck, H.M., Austoni, M., Fassetta, G. und Bottazzo-G. (1993). The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J. Exp. Med.*, **178**: 2219-2223.

de-Heuvel, E., Bell, A.W., Ramjaun, A.R., Wong, K., Sossin, W.S. und McPherson, P.S. (1997). Identification of the major synaptotagmin-binding proteins in brain. *J. Biol. Chem.*, **272**: 8710-8716.

Diehl-Seifert, B., Uhlenbruck, G., Geisert, M., Zahn, R.K., und Müller, W.E.G. (1985). Physicochemical und functional characterization of the polymerization process of the *Geodia cydonium* lectin. *Europ. J. Biochem.*, **147**: 517-523.

Doolittle R.F. (1995). Similar amino acid sequences revisited. *Trends Biochem. Sci.*, **14**: 244-245.

FASTA (1997). FASTA@ebi.ac.uk., INTERNET.

Felsenstein, J. (1993). PHYLIP, ver. 3.5. University of Washington, Seattle.

Fernandez-Busquets, X., und Burger, M.M. (1997). The main protein of the aggregation factor responsible for species-specific cell adhesion in the marine sponge *Microciona prolifera* is highly polymorphic. *J. Biol. Chem.*, **272**: 27839-27847.

Fernandez-Busquets, X., und Burger, M.M. (1999). Cell adhesion und histocompatibility in sponges. *Microsc. Res. Techn.*, **44**: 204-218.

Fernandez-Busquets, X., Gerosa, D., Hess, D., und Burger, M.M. (1998). Accumulation in marine sponge grafts of the mRNA encoding the main proteins of the cell adhesion system. *J. Biol. Chem.*, **273**: 29545-29553.

Fernandez-Busquets, X., Kammerer, R.A., und Burger, M.M. (1996). A 25 kDa protein is the basic unit of the core from the 2×10^4 -kDa aggregation factor responsible for species-specific cell adhesion in the marine sponge *Microciona prolifera*. *J. Biol. Chem.*, **271**: 23558-23565.

Floyd, S., Butler, M.H., Cremona, O., David, C., Freyberg, Z., Zhang, X., Solimena, M., Tokunaga, A., Ishizu, H., Tsutsui, K. und De-Camilli, P. (1998). Expression of amphiphysin I, an autoantigen of paraneoplastic neurological syndromes, in breast cancer. *Mol. Med.*, **4**: 29-39.

Forbes, E.G., Cronshaw, A.D., MacBeath, J.R. und Hulmes, D.J. (1994). Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) is a tyrosine-sulphated and widely distributed protein of the extracellular matrix. *FEBS-Lett.*, **351**: 433-436.

Fujii, N., Minetti, C.A., Nakhasi, H.L., Chen, S.W., Barbehenn, E., Nunes, P.H. und Nguyen, N.Y. (1992). Isolation, cDNA cloning, and characterization of an 18-kDa hemagglutinin and amebocyte aggregation factor from *Limulus polyphemus*. *J. Biol. Chem.*, **267**: 22452-22459.

(Gamulin, V., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (2000). Sponge proteins are more similar to those of *Homo sapiens* than to *Caenorhabditis elegans*. *Biol. J. Linnean Soc.*, **71**: 821-828.

Garnier, J., Osguthorpe, D.J. und Robson, B. (1978). Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, **120**: 97-120.

Ge, K. und Prendergast, G.C. (2000). Bin2, a functionally nonredundant member of the BAR adaptor gene family. *Genomics.*, **67**: 210-220.

Gold, E.S., Morrissette, N.S., Underhill, D.M., Guo, J., Bassetti, M. und Aderem, A. (2000). Amphiphysin II_m, a novel amphiphysin II isoform, is required for macrophage phagocytosis. *Immunity.*, **12**: 285-292.

Grabs, D., Bergmann, M. und Rager, G., (2000). Developmental expression of amphiphysin in the retinotectal system of the chick: from mRNA to protein, *Eur. J. Neurosci.*, **12**: 1545-1553.

Grabs, D., Slepnev, V.I., Songyang, Z., David, C., Lynch, M., Cantley, L.C. und De-Camilli, P. (1997). The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J. Biol. Chem.*, **272**: 13419-13425.

Gramzow, M., Bachmann, M., Uhlenbruck, G., Dorn, A. und Müller, W.E.G. (1986). Identification und further characterisation of the cell specific binding fragment from sponge aggregation factor. *J. Cell. Biol.*, **102**: 1344-1349.

Harlow, E. und Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Henikoff, S. und Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 10915-10919.

Henikoff, S. und Henikoff, J.G. (1994). Protein family classification based on searching a database of blocks. *Genomics* **19**: 97-107.

Henikoff, S., Henikoff, J.G. und Pietrokovski, S. (1999). Blocks+: a non-redundant database of protein alignment blocks derived from multiple compilations. *Bioinformatics*, **15**: 471-479.

Henkart, P., Humphreys, S. und Humphreys, T., (1973). Characterization of sponge aggregation factor. A unique proteoglycan complex. *Biochem.*, **12**: 3045-3050.

Hirabayashi, J. und Kasai, K. (1993). The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: Structure und molecular evolution. *Glycobiology*, **3**: 297-304.

Hondal R. und Schaeffer C. (1995). *Escherichia coli*: transformation und storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **86**: 2172-2175.

Humphreys, T. (1994). Rapid allogeneic recognition in the marine sponge *Microciona prolifera*. Implications for evolution of immune recognition. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 712342-712345.

Humphreys, S., Humphreys, T. und Sato, J. (1977). Organization und polysaccharides of sponge aggregation factor. *J. Supramol. Struct.*, **7**: 339-351.

Isrec-Server (2001). Distributed by INTERNET., http://www.isrec.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN_form_parser.

Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Yamamoto, R., Kilimann, M.W. und Copelund, N.G. (1995). Amphiphysin (Amph) maps to the proximal region of mouse chromosome 13. *Genomics*, **28**: 363-365.

Kadlec, L. und Pendergast, A.M. (1997). The amphiphysin-like protein 1 (ALP1) interacts functionally with the cABL tyrosine kinase und may play a role in cytoskeletal regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 12390-12395.

Kaestner A. (1993). Lehrbuch der speziellen Zoologie. Bund I: Wirbellose Tiere, Gruner H.E. (Hrsg.). 1.Teil: Einführung Protozoa, Placozoa, Porifera. Gustav Fischer Verlag Jena, 5. Auflage, 251-297.

Klein, P., Kanehisa, M. und DeLisi, C. (1985). The detection und classification of membrane-spanning proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **815**: 468-476.

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., Leys, S.P., Müller, I. und Müller, W.E.G. (1998). Phylogenetic position of the Hexactinellida within the phylum Porifera based on amino acid sequence of the protein kinase C from *Rhabdocalytus dawsoni*. *J. Mol. Evol.*, **46**: 721-728.

Kuhns, W.J., Popescu, O., Burger, M.M., und Misevic, G. (1995). Sulfate restriction induces hypersecretion of the adhesion proteoglycan und cell hypomotility associated with increased $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ uptake und expression of a bund 3 like protein in the marine sponge *Microciona prolifera*. *J. Cell. Biochem.*, **57**: 71-89.

Kumar, S. und Rzhetsky, A. (1996). Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. *J. Mol. Evol.*, **42**: 183-193.

Kuroda, K., Okamoto, O. und Shinkai, H. (1999). Dermatopontin expression is decreased in hypertrophic scar und systemic sclerosis skin fibroblasts und is regulated by transforming growth factor-beta1, interleukin-4, und matrix collagen. *J. Invest. Dermatol.*, **112**: 706-710.

Kyhse-Undersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**: 203-209.

Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**: 105-132.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

Lee, C., Kim, S.R., Chung, J.K., Frohman, M.A., Kilimann, M.W. und Rhee, S.G. (2000). Inhibition of phospholipase D by amphiphysins. *J. Biol. Chem.*, **275**: 18751-18758.

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.

Leprince, C., Romero, F., Cussac, D., Vayssiere, B., Berger, R., Tavitian, A. und Camonis, J.H. (1997). A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis und signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.*, **272**: 15101-15105.

Lewandowska, K., Choi, H.U., Rosenberg, L.C., Sasse, J. Neame, P.J. und Culp, A.L. (1991). Extracellular matrix adhesion-promoting activities of a dermatan sulfate proteoglycan-associated protein (22K) from bovine fetal skin. *J. Cell Sci.*, **99**: 657-668.

Li, J.Y., De-Camilli, P. und Dahlstrom, A. (1997). Intraneuronal trafficking und distribution of amphiphysin und synaptojanin in the rat peripheral nervous system und the spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, **9**: 1864-1874.

Lichte, B., Veh, R.W., Meyer, H.E. und Kilimann, M.W. (1992). Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles [published erratum appears in *EMBO J.* 1992 Oct.,11(10):3809] *EMBO. J.*, **11**: 2521-2530.

Lipke P. N. (1996). Cell adhesion proteins in the non-vertebrate eukaryotes. *Progr. Molec. Subcell. Biol.*, **17**: 119-157.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Rundall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.

Marks, B. und McMahon, H.T. (1998). Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr. Biol.*, **8**: 740-749.

Marsh, M. und McMahon, H.T. (1999). The structural era of endocytosis. *Science*, **285**: 215-220.

McBeath, J.R.E., Shackleton, D.R. und Hulmes, D.J.S. (1993). Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) accelerates collagen fibril formation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **268**: 19826-19832.

McClure, S.J. und Robinson, P.J. (1996). Dynamin, endocytosis und intracellular signalling (review). *Mol-Membr-Biol.*, **13**: 189-215.

McMahon, H.T., Wigge, P., Smith, C. (1997). Clathrin interacts specifically with amphiphysin und is displaced by dynamin. *FEBS-Lett.*, **413**: 319-322.

McPherson, P.S., Garcia, E., Slepnev, V.I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W.S., Bauernfeind, R., Nemoto, Y., und De Camilli, P. (1996). A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, **379**: 353-357.

McPherson, P.S Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis. *Cell. Signal.*, **11**: 229-238.

Mehl D., Müller I. und Müller W.E.G. (1998). Molecular biological und palaeontological evidence that Eumetazoa including Porifera (sponges) are of monophyletic origin. In: *Sponge Science- Multidisciplinary Perspectives*.

Mehl, D. und Reiswig, H.M. (1991). The presence of flagellar vanes in choanomes of Porifera und their possible phylogenetic implications. *Z. zool. Syst. Evolut.-Forsch.*, **29**: 312-319.

Micheva, K.D., Kay, B.K. und McPherson, P.S. (1997). Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin und amphiphysin. *J. Biol. Chem.*, **272**: 27239-27245.

Micheva, K.D., Ramjaun, A.R., Kay, B.K. und McPherson, P.S. (1997). SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin [published erratum appears in FEBS Lett 1997 Dec 8.,419(1):150] *FEBS-Lett.*, **414**. 308-312.

Misevic, G. N. (1999). Molecular self-recognition und adhesion via proteoglycan to proteoglycan interactions as a pathway to multicellularity: atomic force microscopy und color coded bead measurements in sponges. *Microsc. Res. Techn.*, **44**: 304-309.

Misevic, G. N., Jumblatt, J.E. und Burger, M. M. (1982). Cell binding fragments from a sponge proteoglycan-like aggregation factor. *J. Biol. Chem.*, **257**: 46931-46936.

Morrisette, N.S., Gold, E.S., Guo, J., Hamerman, J.A., Ozinsky, A., Bedian, V. und Aderem, A.A. (1999). Isolation und characterization of monoclonal antibodies directed against novel components of macrophage phagosomes. *J. Cell. Sci.*, **112**: 4705-4713.

Morton, C.J. und Campbell, I.D. (1994). SH3 domains. Molecular "Velcro". *Curr. Biol.*, **4**. 615-617.

Moscona A.A. (1968). Cell aggregation: properties of specific cell-ligands und their role in the formation of multicellular systems. *Dev. Biol.*, **18**. 250-277.

Müller, W.E.G. (1982). Cell membranes in sponges. *Intern. Rev. Cytol.*, **77**: 129-181.

Müller W.E.G. (1998). Origin of Metazoa: sponges as living fossils. *Naturwiss.*, **85**: 11-25.

Müller, W.E.G. (1995). Molecular phylogeny of Metazoa (animals): Monophyletic origin. *Naturwiss.* **82**, 36-38.

Müller, W.E.G., und Zahn, R.K. (1973). Purification und characterization of a species-specific aggregation factor in sponges. *Exp. Cell Res.*, **80**. 95-104.

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.

Müller, W.E.G., Koziol, C., Müller, I.M. und Wiens, M. (1999). Towards an understanding of the molecular basis of immune responses in sponges: The marine demosponge *Geodia cydonium* as a model. *Microsc. Res. Techn.*, **44**: 219-236.

Müller, W.E.G., Müller, I., Zahn, R. K. und Kurelec, B. (1976). Species-specific aggregation factor in sponges. VI. Aggregation receptor from the cell surface. *J. Cell Science*, **21**: 227-241.

Müller, W.E.G., Rottmann, B., Diehl-Seifert, B., Kurelec, B., Uhlenbruck, G. und Schröder, H.C. (1987). Role of the aggregation factor in the regulation of phosphoinositide metabolism in sponges. Possible consequences on calcium efflux on mitogenesis. *J. Biol. Chem.*, **262**: 9850-9858.

Müller, W.E.G., Zahn, R.K., Arendes, J., Kurelec, B., Steffen, R. und Müller, I. (1979). Aggregation of sponge cells. Self-aggregation of the circular proteid particle. *Biochim. Biophys. Acta* , **551**: 363-367.

Müller, W.E.G., Zahn, R.K., Bernd, A., Dawes, K., Müller, I., Uhlenbruck, G. und Dorn, A. (1982). Molecular basis for cell-cell recognition: isolation, synthesis und function of an aggregation complex from the sponge *Geodia cydonium*. In *Cellular Recognition* (eds. W.A. Frazier, L. Glaser und D.J. Gottlieb) pp. 809-816. UCLA Symposia on Molecular und Cellular Biology, New Series, Vol. 3, A. Liss, New York.

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.

Mundigl, O., Ochoa, G.C., David, C., Slepnev, V.I., Kabanov, A. und De-Camilli, P. (1998). Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, **18**: 93-103.

Neame, P.J., Choi, H.U. und Rosenberg, L.C. (1989). The isolation und primary structure of a 22-kDa extracellular matrix protein from bovine skin. *J. Biol. Chem.*, **264**: 5474-5479.

Nemoto, Y., Arribas, M., Haffner, C. und De-Camilli, P. (1997). Synaptojanin 2, a novel synaptojanin isoform with a distinct targeting domain und expression pattern. *J. Biol. Chem.*, **272**: 30817-30821.

Nicholas, K.B., und Nicholas, H.B.Jr. (1997). GeneDoc: a tool for editing und annotating multiple sequence alignments. Version 1.1.004. Distributed by the author., cris.com/~ketchup/genedoc.shtml, INTERNET.

Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. und Sugino, Y. (1990). A rapid und highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl. Acids Res.*, **18**: 6169.

Okamoto, O., Fujiwara, S., Abe, M. und Sato, Y. (1999). Dermatopontin interacts with transforming growth factor beta und enhances its biological activity. *Biochem. J.*, **337**: 537-541.

Okamoto, O., Suzuki, Y., Kimura, S. und Shinkai, H. (1996). Extracellular matrix 22-kDa protein interacts with decorin core protein und is expressed in cutaneous fibrosis. *J. Biochem. (Tokyo)*, **119**: 106-114.

Owen, D.J., Vallis, Y., Noble, M.E., Hunter, J.B., Dafforn, T.R., Evans und P.R., McMahon, H.T. (1999). A structural explanation for the binding of multiple ligands by the alpha-adaptin appendage domain. *Cell*, **97**: 805-815.

Owen, D.J., Wigge, P., Vallis, Y., Moore, J.D., Evans, P.R. und McMahon, H.T. (1998). Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain und its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO. J.* Sep 15., **17**: 5273-5285.

Pancer, Z., Kruse, M., Müller, I. und Müller, W.E.G. (1997). On the origin of adhesion receptors of metazoa: cloning of the integrin α -subunit cDNA from the sponge *Geodia cydonium*. *Molec. Biol. Evol.*, **14**: 391-398.

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 Adhesion Commun.*, **4**: 327-339.

PC/GENE (1995). *Data Banks CD-ROM., Release 6.85.* [A. Bairoch, University of Geneva, Switzerland] IntelliGenetics, Inc. Mountain View, CA).

Pearson W.R. und Lipman D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 2444-2448.

Pfeifer, K., Haasemann, M., Gamulin, V., Bretting, H., Fahrenholz, F. und Müller, W.E.G. (1993). S-type lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiol.*, **3**: 179-184.

Ramjaun, A.R., Micheva, K.D., Bouchelet, I. und McPherson, P.S. (1997). Identification und characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J. Biol. Chem.*, **272**: 16700-16706.

Ramjaun, A.R. und McPherson, P.S. (1998). Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J. Neurochem.*, **70**: 2369-2376.

Ramjaun, A.R., Philie, J., de-Heuvel, E. und McPherson, P.S. (1999). The N-terminus of amphiphysin II mediates dimerization und plasma membrane targeting. *J. Biol. Chem.*, **274**: 19785-19789.

Reitner, J. und Mehl, D. (1996). Monophyly of the Porifera. *Verh. naturwiss. Ver.Hamburg*, **36**: 5-32.

Razzaq, A., Su, Y., Mehren, J.E., Mizuguchi, K., Jackson, A.P., Gay, N.J. und O'Kane, C.J. (2000). Characterisation of the gene for *Drosophila* amphiphysin. *Gene.*, **241**: 167-174.

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.*

Ringstad, N., Nemoto, Y. und De-Camilli, P. (1997). The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: binding partners for synaptojanin und dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **94**: 8569-8574.

Rosales, J.L., Nodwell, M.J., Johnston, R.N. und Lee, K.Y. (2000). Cdk5/p25(nck5a) interaction with synaptic proteins in bovine brain. *J. Cell. Biochem.*, **78**: 151-159.

Rosin, L., DeCamilli, P., Butler, M., Solimena, M., Schmitt, H.P., Morgenthaler, N. und Meinck, H.M. (1998). Stiff-man syndrome in a woman with breast cancer: an uncommon central nervous system paraneoplastic syndrome. *Neurology.*, **50**: 94-98.

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 und restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1350-1354.

Sakamuro, D., Elliott, K.J., Wechsler-Reya, R. und Prendergast, G.C. (1996). BIN1 a novel MYC-interacting protein with features of a tumor suppressor. *Nature Genetics*, **14**: 69-77.

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.

Schmierer, K., Valdueza, J.M., Bender, A., DeCamilli, P., David, C., Solimena, M. und Zschenderlein, R. (1998). Atypical stiff-person syndrome with spinal MRI findings, amphiphysin autoantibodies, und immunosuppression [see comments] *Neurology.*, **51**: 250-252.

Schütze, J., Krasko, A., Diehl-Seifert, B. und Müller., W.E.G. (2001) Cloning und expression of the putative aggregation factor from the marine sponge *Geodia cydonium* *J. Cell Sci.* in press.

Shupliakov, O., Low, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De, Camilli, P. und Brodin, L. (1997). Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science*, **276**: 259-263.

SignalP Server (2001). SignalP V2.0.b2 World Wide Web Prediction Server, Distributed by INTERNET., <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP V2.0/>.

Simpson, F., Hussain, N.K., Qualmann, B., Kelly, R.B., Kay, B.K., McPherson, P.S. und Schmid, S.L. (1999). SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. *Nat. Cell. Biol.*, **1**: 119-124.

Sivadon, P., Bauer, F., Aigle, M. und Crouzet, M. (1995). Actin cytoskeleton und budding pattern are altered in the yeast *rvs161* mutant: the Rvs161 protein shares common domains with the brain protein amphiphysin. *Mol. Gen. Genet.*, **246**: 485-495.

Slepnev, V.I., Ochoa, G.C., Butler, M.H. und De-Camilli, P. (2000). Tandem arrangement of the clathrin und AP-2 binding domains in amphiphysin 1 und disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J. Biol. Chem.*, **275**: 17583-17589.

Slepnev, V.I., Ochoa, G.C., Butler, M.H., Grabs, D. und Camilli, P.D (1998). Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes. *Science*, **281**: 821-824.

So, C.W., Sham, M.H., Chew, S.L., Cheung, N., So, C.K., Chung, S.K., Caldas, C., Wiedemann, L.M. und Chan, L.C. (2000). Expression und protein-binding studies of the EEN gene family, new interacting partners for dynamin, synaptojanin und huntington proteins. *Biochem. J.*, **348**: 447-458.

Superti-Furga, A., Rocchi, M., Schafer, B.W. und Gitzelmann, R. (1993). Complementary DNA sequence und chromosomal mapping of a human proteoglycan-binding cell-adhesion protein (dermatopontin). *Genomics*, **17**: 463-467.

Takei, K., Haucke, V., Slepnev, V., Farsad, K., Salazar, M., Chen, H. und De, Camilli, P (1998). Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. *Cell.*, **94**: 131-41.

Takei, K., Slepnev, V.I., Haucke, V. und De-Camilli, P. (1999). Functional partnership between amphiphysin und dynamin in clathrin-mediated endocytosis [see comments] *Nat. Cell. Biol.*, **1**: 33-39.

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 und 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 und some applications. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350-4354.

Traub, L.M., Downs, M.A., Westrich, J.L. und Fremont, D.H. (1999). Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly [see comments] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 8907-8912.

Tsutsui, K., Maeda, Y., Tsutsui, K., Seki, S. und Tokunaga, A. (1997). cDNA cloning of a novel amphiphysin isoform und tissue-specific expression of its multiple splice variants. *Biochem-Biophys-Res-Commun.*, **236**: 178-183.

Vacelet, J. und Boury-Esnault, N. (1995). Carnivorous sponges. *Nature*, **373**: 333-334.

Vallis, Y., Wigge, P., Marks, B., Evans, P.R. und McMahon, H.T. (1999). Importance of the pleckstrin homology domain of dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Curr-Biol.*, **9**: 257-260.

Vandesande F. (1983). Immunohistochemical double staining techniques. In: *Immunohistochemistry*, Cuella A.C. (Hrsg.), Wiley, New York, 257-272.

Varner, J.A. (1996). Isolation of a sponge-derived extracellular matrix adhesion protein. *J. Biol. Chem.*, **271**: 16119-16125.

Varner, J.A. (1995). Cell adhesion in sponges: potentiation by a cell surface 68 kDa proteoglycan-binding protein. *J. Cell. Sci.*, **108**: 3119-3126.

Varner, J., Burger, M.M. und Kaufman, J. (1988). Two cell surface proteins bind the sponge *Microciona prolifera* aggregation factor. *J. Biol. Chem.*, **263**: 8498-8508.

Vogelstein B. und Gillespie D. (1979). Preparative und analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 615-619.

Volchuk, A., Narine, S., Foster, L.J., Grabs, D., De-Camilli, P. und Klip, A. (1998). Perturbation of dynamin II with an amphiphysin SH3 domain increases GLUT4 glucose transporters at the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes. Dynamin II participates in GLUT4 endocytosis. *J. Biol. Chem.*, **273**: 8169-8176.

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.

Wang, Y.T. und Linden, D.J. (2000). Expression of cerebellar long-term depression requires postsynaptic clathrin-mediated endocytosis. *Neuron.*, **25**: 635-647.

Wechsler-Reya, R., Sakamuro, D., Zhang, J., Duhadaway, J. und Prendergast, G.C. (1997). Structural analysis of the human BIN1 gene. Evidence for tissue-specific transcriptional regulation und alternate RNA splicing. *J. Biol. Chem.*, **272**: 31453-31458.

Wehner G. und Gehring W. (1990). Zoologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Weinbaum, G. und Burger, M.M. (1973). A two-component system for surface guided reassociation of animal cells. *Nature*, **244**: 510-512.

Westheide W. und Rieger R. (1996). Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 75-119.

Wigge, P., Kohler, K., Vallis, Y., Doyle, C.A., Owen, D., Hunt, S.P. und McMahon, H.T. (1997). Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell.*, **8**: 2003-2015.

Wigge, P. und McMahon, H.T. (1998). The amphiphysin family of proteins und their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci.*, **21**: 339-344.

Wigge, P., Vallis, Y. und McMahon, H.T. (1997). Inhibition of receptor-mediated endocytosis by the amphiphysin SH3 domain. *Curr. Biol.*, **7**: 554-560.

Wilson, H.V. (1907). On some phenomena of coalescence und regeneration in sponges. *J. Exptl. Zool.*, **5**: 245-258.

Wimmer, W., Perovic, S., Kruse, M., Krasko, A., Batel, R. und Müller, W.E.G. (1999). Origin of the integrin-mediated signal transduction: functional studies with cell cultures from the sponge *Suberites domuncula*. *Europ. J. Biochem.*, **260**: 156-165.

Yamamoto, R., Li, X., Winter, S., Francke, U. und Kilimann, M.W. (1995). Primary structure of human amphiphysin, the dominant autoantigen of paraneoplastic stiff-man syndrome, und mapping of its gene (AMPH) to chromosome 7p13-p14. *Hum. Mol. Genet.*, **4**. 265-268.

Young, R. A. und Davis, R. W. (1983). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 1194-1198.

Zahn, R.K., Müller, W.E.G., Reinmüller, J., Geisert, M., Michaelis, M., Pondeljak, V. und Beyer, R. (1976). Species-specific aggregation factor in sponges. Characterization of the large circular proteid particle. *Cell. Diff.*, **5**. 129-137.

Zarkower D., Stephenson P., Sheets M. und Wickens M. (1986). The AAUAAA sequence is required both for cleavage und for polyadenylation of simian virus 40 pre-mRNA *in vitro*. *Molec. Cell. Biol.*, **6**: 2317-2323.

9. Abkürzungsverzeichnis

9.1. Abkürzungen

(v/v)	<i>volume per volume</i>
(w/v)	<i>weight per Volume</i>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
AF	Aggregationsfaktor
Ak	Antikörper
ALP	Amphiphysin-like-protein
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
AP-2	Clathrin-Adapter-Molekül 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
AR	Aggregationsrezeptor
As	Aminosäure
ASW	Artifizielles Seewasser
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl Phosphat
bp	Basenpaare (<i>base pair(s)</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
Ca	Calcium
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i> (mRNA Abschrift)
CMF	Calcium-Magnesium-freies Seewasser
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukeosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
Dig-UTP	Digoxigenin markiertes Desoxyuridintriphosphat

DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanin
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
IPTG	β -D- Isopropyl-Thiogalactopyranosid
kb	<i>kilobase(s)</i> ; KiloBasen
kD	kilo-Dalton
l	Liter
LAF	Limulusaggregationsfaktor
LB	<i>Luria Bertani</i> - Medium
M	Mol
MAF	<i>Microciona-Aggregationfactor</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Molekulargewicht
NBT	4-Nitro-Tetrazoliumblausäurechlorid
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
NTA	Nitrilo-Tri-Essigsäure
OD	Optische Dichte
OPA-Puffer	<i>One-Phor-All-Puffer</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
pfu	<i>Plaque forming unit</i>

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Rnase A	Ribonuklease A
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde
SM	<i>Suspension medium</i>
SSC	<i>sodium citrat chlorid</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Thymin
T _a	<i>Annealingtemperatur</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris buffered</i>)
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenediamine
TGF	<i>Transforming-growth-factor</i>
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperatur</i>)
TRAMP	<i>Tyrosin rich acidic matrix protein</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transformations- und Aufbewahrungslösung
U	<i>Unit</i>
üN	über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-d-Galactopyranosid

9.2. Abkürzungen für Aminosäuren und Basen

Aminosäuren

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

Basen

Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U

Publikationsliste

Pahler, S., Krasko, A., Schütze, J., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (1998). Isolation and characterization of a cDNA encoding a potential morphogen from the marine sponge *Geodia cydonium* that is conserved in higher Metazoans. *Proc. R. Soc. Lond.*, **265**: 421-425.

Schütze, J., Krasko, A., Custodio, M.R., Efremova, S.M., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (1999). Evolutionary relationships of metazoa within eukaryotes based on molecular data from Porifera. *Proc. R. Soc. Lond.*, **266**: 63-73.

Schütze, J., Skorokhod, A., Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (2001). Molecular evolution of the metazoan extracellular matrix: Cloning and expression of structural proteins from the Demosponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium*. *J. Mol. Evol.* **53(4-5)**: 402-415.

Schütze, J., Krasko, Diehl-Seifert, B. und Müller, W.E.G. (2001). Cloning and expression of the putative aggregation factor from the marine sponge *Geodia cydonium*. *J. Cell. Sci.*, **114**: 3189-3198.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für physiologische Chemie, Abteilung für angewandte Molekularbiologie, der Johannes Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. X bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die ständige Möglichkeit zu konstruktiver Diskussion.

Herrn Prof. Dr. X danke ich für sein Interesse an der Arbeit und die Bereitschaft, sich als Gutachter zur Verfügung zu stellen.

Herrn Prof. Dr. X. danke ich für die Bereitschaft sich als Prüfer zur Verfügung zu stellen.

Frau X und Dr. X danke ich für die stets freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, insbesondere bei der Anfertigung der histologischen Schnitte.

Dr. x gilt mein besonderer Dank für seine bereitwillige und geduldige Unterstützung während der letzten Jahre.

Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für das angenehme Arbeitsklima.

X danke ich für vieles.