

**Entschlüsselung des Carotinoid-Metabolismus im marinen  
Schwamm *Suberites domuncula***

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Michael Binder

geb. in Heidelberg

Mainz, 2007

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2007

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Herkunft und Funktion der Carotinoide</b> .....	<b>1</b>
1.2	<b>Retinoide sind physiologisch wichtige Carotinoid-Spaltprodukte</b> .....	<b>2</b>
1.2.1	Carotinoxxygenasen sind für die Entstehung der Retinoide verantwortlich .....	2
1.2.2	Retinoid-Dehydrogenasen regulieren die Funktion des Vitamin A .....	5
1.2.2.1	Beteiligte Alkoholdehydrogenasen am Retinoidstoffwechsel .....	6
1.2.2.2	Beteiligte <i>short chain</i> Dehydrogenasen (SDR) am Retinoidstoffwechsel .....	7
1.2.2.3	Aldehyddehydrogenasen (ALDHs) des Retinoidstoffwechsels erzeugen das wichtige Morphogen Retinsäure .....	7
1.3	<b>Porifera</b> .....	<b>8</b>
1.4	<b>Monophylie der Metazoa</b> .....	<b>11</b>
1.5	<b>Motivation</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>13</b>
2.1	<b>Chemikalien</b> .....	<b>13</b>
2.2	<b>Verbrauchsmaterial und Laborzubehör</b> .....	<b>13</b>
2.3	<b>Geräte</b> .....	<b>13</b>
2.4	<b>Enzyme und Antikörper</b> .....	<b>14</b>
2.5	<b>Kits</b> .....	<b>14</b>
2.6	<b>Vektoren</b> .....	<b>15</b>
2.7	<b>Primer</b> .....	<b>15</b>
2.7.1	Vektorspezifische Primer .....	15
2.7.2	<i>Real-Time</i> PCR Primer: .....	15
2.7.3	Genspezifische Primer .....	16
2.7.3.1	Primer der $\beta$ -Carotinoxxygenase (BCO) .....	16
2.7.3.2	Primer der alternativen Carotinoxxygenase (BCO-II) .....	16
2.7.3.3	Primer der Retinaldehydrogenase .....	17
2.7.3.4	Primer der Alkoholdehydrogenase (ADH) .....	17
2.7.3.5	Primer der Retinaldehyd-dehydrogenase (RALDH).....	17
2.8	<b>Verwendete Bakterienstämme und Phagen</b> .....	<b>18</b>
2.9	<b>Bakterienkulturmedien</b> .....	<b>18</b>
2.10	<b>Computerprogramme</b> .....	<b>19</b>
2.11	<b>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)</b> .....	<b>20</b>
2.11.1	Normalphase.....	20
2.11.2	<i>Reversed Phase</i> HPLC .....	20
2.12	<b>Dünnschichtchromatographie</b> .....	<b>20</b>
2.13	<b>Schwämme</b> .....	<b>21</b>

<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung genspezifischer Primer .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2</b>	<b>Herstellung degenerierter Primer .....</b>	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>23</b>
3.3.1	Standard PCR .....	23
3.3.2	Kolonie PCR.....	24
3.3.3	<i>Nested</i> PCR.....	24
3.3.4	PCR-Screening .....	25
3.3.5	Labeling PCR – Herstellung der DNA-Sonden .....	25
3.3.6	RT-PCR .....	25
<b>3.4</b>	<b><i>Rapid amplification of cDNA Ends</i> .....</b>	<b>26</b>
<b>3.5</b>	<b><i>Real-time quantitative PCR</i> .....</b>	<b>27</b>
3.5.1	Durchführung: .....	28
3.5.1.1	Erstellung der Standard-Kurve .....	28
3.5.2	Erstellung der Quantifizierungskurven.....	29
3.5.3	Erstellung der Schmelzkurve.....	30
<b>3.6</b>	<b>Gelelektrophorese.....</b>	<b>31</b>
3.6.1	Gelherstellung.....	31
3.6.2	Gelfärbung.....	32
<b>3.7</b>	<b>DNA-Aufreinigung .....</b>	<b>32</b>
3.7.1	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	32
3.7.2	Plasmidaufreinigung.....	32
<b>3.8</b>	<b>Restriktionsverdau .....</b>	<b>33</b>
<b>3.9</b>	<b>Ligation und Klonierung.....</b>	<b>33</b>
<b>3.10</b>	<b>Transformation.....</b>	<b>35</b>
3.10.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	35
3.10.2	Transformationsansatz.....	35
3.10.3	Selektion der transformierten Bakterien (Blau-Weiß-Selektion).....	36
<b>3.11</b>	<b>Sequenzierung.....</b>	<b>36</b>
3.11.1	Herstellung des Sequenziergels.....	37
3.11.2	Sequenzierreaktion (Cycle-Sequencing) .....	37
3.11.3	Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	38
3.11.4	Sequenzanalyse.....	38
<b>3.12</b>	<b>Homologiescreening.....</b>	<b>39</b>
3.12.1	Bestimmung des Phagentiters.....	39
3.12.2	Primärscreening.....	40
3.12.3	Phagentransfer und Detektion .....	40
3.12.4	Sekundärscreening.....	42
<b>3.13</b>	<b>In vivo-Excision.....</b>	<b>42</b>
<b>3.14</b>	<b>Isolierung der Schwamm-RNA .....</b>	<b>43</b>

3.14.1	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren .....	43
3.14.2	Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäuren .....	44
<b>3.15</b>	<b>Northern Transfer .....</b>	<b>44</b>
3.15.1	Analytische RNA-Gele .....	44
3.15.2	Northern-Transfer .....	45
<b>3.16</b>	<b>Expression rekombinanter Proteine in Prokaryoten .....</b>	<b>46</b>
3.16.1	Herstellung der Expressionsklone .....	47
3.16.2	Expression des rekombinanten Proteins .....	47
3.16.3	Aufreinigung der Expressionsproteine .....	47
3.16.3.1	Extraktion unter nativen Bedingungen .....	48
3.16.3.2	Extraktion unter denaturierenden Bedingungen .....	48
<b>3.17</b>	<b>Isolierung von Proteinen aus Schwammgewebe .....</b>	<b>49</b>
<b>3.18</b>	<b>Bestimmung der Proteinkonzentration .....</b>	<b>49</b>
<b>3.19</b>	<b>SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE).....</b>	<b>50</b>
<b>3.20</b>	<b>Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie .....</b>	<b>51</b>
<b>3.21</b>	<b>Western Transfer.....</b>	<b>51</b>
<b>3.22</b>	<b>Herstellung polyklonaler Antikörper .....</b>	<b>52</b>
3.22.1	Immunisierung und Serumzubereitung .....	52
3.22.2	Bestimmung des Antikörpertiters.....	53
<b>3.23</b>	<b><i>In-situ</i> Hybridisierung.....</b>	<b>54</b>
<b>3.24</b>	<b>Schwammprimmorphie.....</b>	<b>55</b>
3.24.1	Primorphenherstellung .....	55
3.24.2	Inkubationsansätze .....	56
3.24.3	Immunhistologische Untersuchung der Schwammprimmorphie .....	56
3.24.3.1	Vorbereitung und immunocytochemische Färbung der Gewebeschnitte .....	57
3.24.3.2	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	57
<b>3.25</b>	<b>HPLC Analysen - Normalphase .....</b>	<b>57</b>
3.25.1	Vorbereitungen der Proben zur Extraktion.....	58
3.25.2	Pigmentextraktion aus Bakterienpellets .....	58
3.25.2.1	Extraktion von Retinoiden und unpolare (Apo-) Carotinoide .....	58
3.25.2.1.1	Extraktion mit Umsetzung der Aldehyde in Oxime.....	59
3.25.2.1.2	Extraktion mit Verseifung.....	59
3.25.2.2	Extraktion kürzerkettiger, polarer Apocarotinoide .....	60
3.25.3	In vitro Enzymtest .....	60
3.25.3.1	Vorbereitung des $\beta$ -Carotins .....	60
3.25.3.2	Herstellung der $\beta$ -Carotin Micellen .....	61
3.25.3.3	Aufschluss der BCO-Expressionskultur .....	61
3.25.3.4	Durchführung des Enzymtests .....	61
<b>3.26</b>	<b><i>Reversed Phase</i> HPLC .....</b>	<b>61</b>
<b>3.27</b>	<b>Quantifizierung des <math>\beta</math>-Carotingehalts in <i>S. domuncula</i>.....</b>	<b>62</b>
3.27.1	Vorbereitung der Proben .....	62
3.27.2	Berechnung des $\beta$ -Carotingehalts.....	63

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>64</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifizierung und Klonierung der Carotinoxigenase (BCO).....</b>	<b>64</b>
4.1.1	Identifikation eines Teilstücks der Carotinoxigenase (BCO).....	64
4.1.2	Homologiescreening.....	64
4.1.3	Isolierung einzelner Phagenklone über das Sekundärscreening.....	65
4.1.4	Analyse der BCO Sequenz. ....	65
4.1.5	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz der BCO.....	67
4.1.5.1	Homologie zur BCO-II anderer Organismen.....	69
4.1.5.2	Homologie zur RPE65 Proteinfamilie .....	69
<b>4.2</b>	<b>Identifizierung und Klonierung einer weiteren Carotinoxigenase (BCO-II).....</b>	<b>70</b>
4.2.1	Analyse der BCO-II-Sequenz.....	70
4.2.2	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz der BCO-II.....	72
<b>4.3</b>	<b>Klonierung und Charakterisierung von Enzymen der SDR-Familie mit potentieller Beteiligung am Vitamin A Stoffwechsel.....</b>	<b>73</b>
4.3.1	Identifizierung der entsprechenden Gene.....	73
4.3.1.1	Analyse der potentiellen Retinal-Dehydrogenase (RA-DH) .....	74
4.3.1.2	Analyse der potentiellen Alkoholdehydrogenase (ADH) .....	76
4.3.1.3	Analyse der potentiellen Retinsäuredehydrogenase (RALDH).....	78
<b>4.4</b>	<b>Prüfung möglicher Regulierungsmechanismen der Carotinoxigenase (BCO) .....</b>	<b>82</b>
4.4.1	Inkubationsexperimente mit potentiellen Regulatoren der BCO und Nachweis der mRNA-Transkripte mittels Northern-Transfer.....	82
4.4.2	<i>Real-Time</i> -PCR-Analyse der differentiellen BCO-Expression im Anschluss an Inkubationsexperimente .....	84
<b>4.5</b>	<b>Nachweis der Retinaldehydrogenase (RA-DH) Transkripte in Exemplaren von <i>S. domuncula</i> verschiedener Färbung .....</b>	<b>85</b>
4.5.1	Potentielle Regulierungen der Expression der Retinaldehydrogenase (RA-DH) auf mRNA-Ebene .....	85
4.5.2	Analyse der differentiellen Genexpression mittels <i>Real-Time Quantitative PCR</i> .....	86
<b>4.6</b>	<b>Expression der rekombinanten Proteine.....</b>	<b>87</b>
<b>4.7</b>	<b><i>In-situ</i> Nachweis der differentiellen Genexpression.....</b>	<b>88</b>
4.7.1	<i>In-situ</i> Hybridisierung mit der BCO .....	88
4.7.2	Nachweis der differentiellen BCO Expression auf mRNA- und Proteinebene ...	89
4.7.3	Nachweis der differentiellen RA-DH Expression auf mRNA-Ebene .....	91
<b>4.8</b>	<b>Phylogenetische Analyse der Enzyme mit konservierter RPE65-Domäne .....</b>	<b>92</b>
<b>4.9</b>	<b>Analyse der farbgebenden Komponenten aus <i>S. domuncula</i> .....</b>	<b>93</b>
4.9.1	Identifizierung von Carotinoiden mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC .....	93
4.9.2	Identifizierung von Carotinoiden mittels HPLC .....	94
4.9.3	Quantifizierung des $\beta$ -Carotingehaltes in <i>S. domuncula</i> .....	97
<b>4.10</b>	<b>Das Carotinoid-Bindeprotein von <i>S. domuncula</i> .....</b>	<b>97</b>
4.10.1	Dünnschichtchromatographie (DC).....	97

4.10.2	Spektrometrische Untersuchung des Carotin-Proteinkomplexes und des Carotinoids .....	98
<b>4.11</b>	<b>Überprüfung der Enzymfunktion der beiden Carotinoxigenasen .....</b>	<b>99</b>
4.11.1	Überprüfung im Bakterientestsystem .....	99
4.11.2	Nachweis der $\beta$ -Carotin-Spaltprodukte der BCO mittels HPLC.....	101
4.11.3	Nachweis der Zeaxanthin-Spaltprodukte der BCO mittels HPLC .....	102
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>104</b>
<b>5.1</b>	<b>Identifizierung der beiden Carotinoxigenasen BCO und BCO-II .....</b>	<b>104</b>
5.1.1	Sequenzanalyse der $\beta$ -Carotin-Oxygenase (BCO).....	105
5.1.2	Sequenzanalyse der alternativen Carotinoxigenase (BCO-II).....	106
5.1.3	Proteinbiochemische Untersuchung der $\beta$ -Carotinoxigenase (BCO).....	107
5.1.3.1	Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz.....	107
5.1.3.2	Untersuchung der Enzymaktivität.....	109
5.1.3.3	Das Enzym BCO aus <i>S. domuncula</i> ist eine 7,8(7',8')-Carotinoxigenase.....	110
5.1.4	Untersuchung der alternativen Carotinoxigenase (BCO-II).....	113
5.1.5	Identifikation der Schwammcarotinoide als mögliche Enzymsubstrate .....	116
5.1.6	Funktion der Spaltprodukte .....	118
<b>5.2</b>	<b>Bedeutung der Carotinoxigenase (BCO) für <i>S. domuncula</i>.....</b>	<b>120</b>
5.2.1	Regulation der mRNA-Transkripte der Carotinoxigenase (BCO) .....	120
5.2.2	<i>In-situ</i> Nachweis der differentiellen $\beta$ -Carotinoxigenase (BCO)-Expression...	122
<b>5.3</b>	<b>Identifizierung der Enzyme mit potentieller Beteiligung am Retinsäurestoffwechsel.....</b>	<b>123</b>
5.3.1	Die potentielle Retinaldehydrogenase (RA-DH).....	124
5.3.1.1	Charakterisierung der Retinaldehydrogenase .....	124
5.3.1.2	Interpretation des Expressionsmusters der Retinaldehydrogenase .....	126
5.3.2	Identifizierung einer weiteren Alkoholdehydrogenase (ADH) .....	128
5.3.3	Identifizierung einer potentiellen Retinaldehyd-Dehydrogenase (RALDH) .....	129
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>133</b>
<b>8</b>	<b>APPENDIX.....</b>	<b>141</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>146</b>
<b>10</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>147</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 HERKUNFT UND FUNKTION DER CAROTINOIDE

Als Carotinoide ( $C_{40}$ -Isoprenoide) wird eine Gruppe von mehr als 600 fettlöslichen Pigmenten bezeichnet, die ausschließlich in Pflanzen, bestimmten Pilzen und einigen Bakterien synthetisiert werden (LEE *et al.* 1999; BOUVIER *et al.* 2005; LINTIG *et al.* 2005). In der Natur sind sie weit verbreitet und verantwortlich für die gelb-, orange-, rot- und violette Färbungen vieler Blüten, Früchte, Vögel, Insekten und mariner Tiere (DURING und HARRISON 2004; ELLIOT 2005; LINTIG *et al.* 2005). Innerhalb der Carotinoide werden die polareren Vertreter mit mindestens einer Hydroxylgruppe (R-OH) als Xanthophylle, und solche, die als Vorstufe in der Vitamin A Synthese dienen, als Provitamin A-Carotinoide bezeichnet. Von den ästhetischen Aspekten abgesehen, stellen sie akzessorische Pigmente des Photosyntheseapparats dar und schützen Bakterien, Algen und höhere Pflanzen sowohl vor endogener (Chlorophyll) als auch exogener Photosensibilisierung (BIESALSKI und OBERMÜLLER-JEVIC 2001; DEMMIG-ADAMS und ADAMS 2002).

Obwohl Carotinoide in Tier und Mensch nicht *de novo* synthetisiert werden können, erfüllen sie dort wichtige Aufgaben. Deshalb sind sie auf die Aufnahme dieser Substanzen aus Nahrungsmitteln, welchen dadurch eine gesundheitsfördernde Wirkung zugesprochen wird (z.B. Obst und Gemüse), angewiesen (zusammengefasst in: KRINSKY und JOHNSON 2005). Die in unserer täglichen Nahrung enthaltenen Carotinoide sind wichtige Antioxidantien (z.B. HALLIWELL 1996; EVANS und HALLIWELL 2001) und gewähren Zellen, Geweben und Lipoproteinen unter den richtigen Bedingungen einen gewissen antioxidativen Schutz (LOWE *et al.* 1999; PORRINI und RISO 2000; COLLINS 2001). Diese Wirkung beruht hauptsächlich auf dem Abfangen von schädlichen Sauerstoffradikalen (ROS; *reactive oxygen species*) und der damit einhergehenden Auswirkung auf den redox-Status von Zellen. Dadurch besitzen sie einerseits immunmodulatorische Eigenschaften und steuern andererseits auf molekularer Ebene redox-sensitive Signaltransduktionswege (detailliert zusammengefasst in: CHEW und PARK 2004). Aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften beeinflussen Carotinoide zudem die Membranfluidität und die Zell-Zell-Kommunikation über *gap-junctions* (ZHANG *et al.* 1991). Durch diese vielseitigen Effekte wird ein Teil ihrer anti-kanzerogenen Eigenschaften erklärt. Einen ebenso wichtigen Beitrag dazu liefern Carotinoid-Spaltprodukte, vor allem die Retinoide (LOTAN 1996; TAKATSUKA 1996; HANSEN *et al.* 2000)



## 1.2 RETINOIDE SIND PHYSIOLOGISCH WICHTIGE CAROTINOID-SPALTPRODUKTE

Carotinoid-Spaltprodukte (Apocarotinoide) sind in Lebewesen weit verbreitet und besitzen Schlüsselrollen in vielen biologischen Prozessen. Pflanzen nutzen sie als Hormone, zur Pigmentierung, als Lock- und Aromastoffe oder zur Abwehr (MACTAVISH *et al.* 2000; SIMKIN *et al.* 2004). Auch Tieren dienen sie in Form von Sehpigmenten, Vitamin A und Signalmolekülen (GIULIANO *et al.* 2004). Besondere Bedeutung unter den Apocarotinoiden kommt den Retinoiden (Retinol, Retinal und Retinsäure) zu, sämtlich C<sub>20</sub>-Isoprenoide, die aus der enzymatischen, oxidativen Spaltung einer Gruppe von ca. 50-60 verschiedenen Provitamin A-Carotinoiden resultieren (OLSON und KRINSKY 1995; PARKER 1996; LINTIG und WYSS 2001; WYSS 2004). Ihre physiologische Funktion lässt sich dabei in zwei Bereiche unterteilen: (i) Retinal, oder dessen Derivate wie z.B. 3-hydroxy-Retinal, dienen als Chromophor visueller Systeme in Bakterien, Algen und Tieren (HAGEMANN 1997; BÉJÀ *et al.* 2001; JUNG *et al.* 2003; RUCH *et al.* 2005); (ii) Als Ligand von Kernrezeptoren steuern Retinoide (hauptsächlich Retinsäure) die Expression von Genen während Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen (ROHWEDEL *et al.* 1999; MEHTA 2003; ISKEN *et al.* 2007).

Die Spaltung der Carotinoide und deren anschließende Modifikation werden in den folgenden Kapiteln eingehender betrachtet.

### 1.2.1 Carotinoxxygenasen sind für die Entstehung der Retinoide verantwortlich

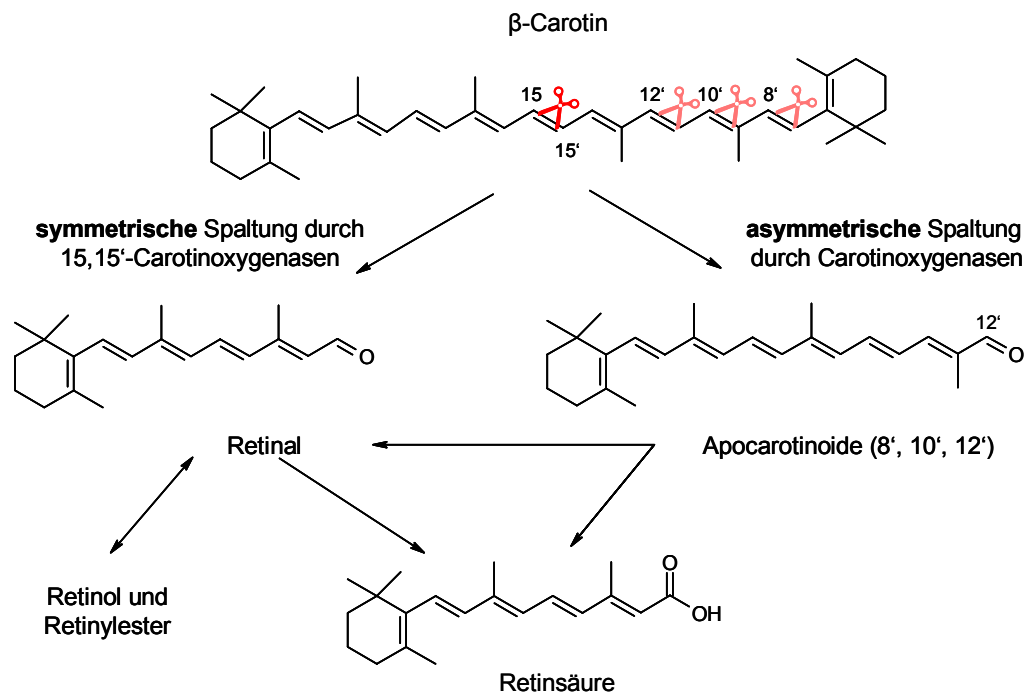
Unabhängig davon, ob ein Organismus Vitamin A durch die Nahrung aufnimmt oder es selbst erzeugt, entsteht dieses durch die Spaltung von Carotinoiden, welche die einzige natürliche Quelle dafür darstellen (LINTIG *et al.* 2005). Die Entschlüsselung dieses Stoffwechselwegs findet ihren Ursprung Anfang des letzten Jahrhunderts, indem PALMER (1919) einen Zusammenhang zwischen diesen Substanzen vermutet. Es sollte dennoch über 80 Jahre in Anspruch nehmen (Chronologie der Entwicklung siehe Tab. 1), bis es zwei unabhängigen Gruppen gelang, ein dafür verantwortliches Enzym auf molekularer Ebene zu identifizieren und rekombinant herzustellen (VON LINTIG und VOGT 2000; WYSS *et al.* 2000; VON LINTIG und WYSS 2001). Carotinoid spaltende Enzyme wurden anfangs – aufgrund der hohen Sequenzhomologie zu einem **Retinapigmentepithel**-Protein mit **65 kD** Molekulargewicht – zur RPE65-Proteinfamilie gezählt. Die Funktion dieser Proteine war lange Zeit unbekannt, nur eine zentrale Rolle in der Regeneration des Vitamin A im visuellen Zyklus von Vertebraten galt als sicher (Übersicht des visuellen Zyklus in: SAARI 2000). MATA *et al.* (2004) klärten die

Funktion des Carotinoxygenasen-homologen Proteins und zeigten, dass es Retinylester der Isomerase im visuellen Zyklus zur Verfügung stellt, die daraus Vitamin A generiert.

**Tab. 1:** Chronologie der Entschlüsselung des Vitamin A Stoffwechselwegs:

1919	PALMER vermutet erstmals einen Zusammenhang zwischen Carotinoiden und der Entstehung von Vitamin A
1920	PALMER und KENNEDY widerlegen scheinbar die Hypothese, dass Carotinoide die Vorstufe von Vitamin A darstellen
1930	MOORE erbringt den Beweis, dass „Carotin“ die Vorstufe von Vitamin A ist, und verweist in Bezug auf PALMER und KENNEDY (1920) auf Carotinoide (von ihm Polyene genannt), die keine Vitamin A Synthese zulassen
1930	KARRER <i>et al.</i> postulieren kurz darauf einen symmetrischen Spaltmechanismus der Carotinoide an der zentralen 15,15'-Doppelbindung, der zu zwei Molekülen Vitamin A führt
1954	GLOVER und REDFEARN postulieren eine asymmetrische Spaltung der Carotinoide, die zu einem Molekül Vitamin A führt
1965	GOLDMAN und HUANG bzw. OLSON und HAYAISHI belegen erstmals die zugrunde liegende enzymatische Aktivität der Carotinoidspaltung in zellfreien Homogenisaten aus Rattendünndarmgewebe
1969	FIDGE <i>et al.</i> gelingt der Nachweis dieser enzymatischen Reaktion in einem weiteren Säugetier, dem Schwein
1994	NAGAO und OLSON weisen die Spaltung für mehrere Stereoisomere des $\beta$ -Carotins nach
2000	VON LINTIG und VOGT bzw. WYSS <i>et al.</i> gelingt die molekulare Identifizierung und Klonierung des verantwortlichen Enzyms
2001	VON LINTIG und WYSS gelingt erstmals die erfolgreiche Expression und Charakterisierung einer rekombinanten $\beta$ -Carotin 15,15' Dioxygenase

Bereits vor der molekularen Identifizierung von Carotinoxygenasen in verschiedenen Organismen entbrannte eine Kontroverse zwischen symmetrischer (z.B. SCHWARTZ *et al.* 1997; LINTIG und VOGT 2000; YAN *et al.* 2001) und asymmetrischer Spaltung (z.B. GROLIER *et al.* 1997; KIEFER *et al.* 2001) der Carotinoide (Abb. 1). Mittlerweile sind beide Spaltmechanismen anerkannt und symmetrisch- bzw. asymmetrisch spaltende Carotinoxygenasen in zahlreichen Organismen identifiziert (zusammengefasst in: BOUVIER *et al.* 2005; VON LINTIG *et al.* 2005; KLÖR und SCHULZ 2006). Nach wie vor umstritten bleibt dabei die Funktion der Enzyme als Mono- bzw. Dioxygenasen (Abb. 41). Es gibt eindeutige Studien, die den ursprünglich vermuteten Dioxygenasemechanismus belegen (z.B. SCHMIDT *et al.* 2006), aber auch solche, die dies widerlegen und eine Monooxygenasereaktion beweisen (z.B. WOGGON 2002). KLÖR und SCHULZ (2006) analysierten die Vorgehensweise in diesen widersprüchlichen Studien und decken mögliche Schwachpunkte (z.B. Pufferbedingungen und Inkubationsdauer) in der Methodik auf. Ihre Prüfungen schlussfolgernd betrachtet, sprechen die Indizien eher für eine Dioxygensereaktion, doch bedarf es weitergehender Studien, die sich dem zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus widmen.



**Abb. 1:** Übersichtsschema der oxidativen Spaltung des  $\beta$ -Carotins durch Carotinoxygenasen: (**links**) Die symmetrische Spaltung führt zu zwei Molekülen Retinal, die reversibel zu Retinol (Vitamin A) reduziert oder irreversibel zu Retinsäure oxidiert werden können. (**rechts**) Durch asymmetrische Spaltung entstehen, je nach Enzym, Apocarotinoide mit unterschiedlicher Kettenlänge. Durch schrittweise Verkürzung, ähnlich der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, entsteht daraus ein Molekül Retinsäure oder Retinal. Der molekulare Mechanismus dafür ist bislang unbekannt. Scherensymbole kennzeichnen die möglichen Spaltstellen der Enzyme wobei die hellere Rotschattierung die asymmetrischen Varianten von den symmetrischen abgrenzt.

Die symmetrische Spaltung des  $\beta$ -Carotins führt zu zwei Molekülen Retinal (Abb. 1). Diese können entweder reversibel zu Retinol reduziert, oder irreversibel zu Retinsäure oxidiert werden. Retinol ist die „inaktive Form“ des Vitamin A und kann so im Organismus proteingebunden transportiert oder nach Veresterung (z.B. Retinylester) gespeichert werden (BLANER 1989; LIDÉN und ERIKSSON 2006). Bei Vitamin A-armer Nahrung wird es aus den Speichern mobilisiert und dem Retinoidstoffwechsel erneut zugeführt. So ist sichergestellt, dass jederzeit der Chromophor Retinal oder das Morphogen Retinsäure erzeugt werden können.

Bei der asymmetrischen Spaltung entsteht zunächst ein Apocarotinoid, dessen Kettenlänge von der Angriffsstelle des jeweiligen Enzyms abhängt (Abb. 1). Auf diese Weise kann nur ein Molekül Retinsäure entstehen. Für die Verkürzung der Polyenkette des Apocarotinoide wird ein Mechanismus ähnlich der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren angenommen; ist bislang aber nicht geklärt (SHARMA *et al.* 1977; NAPOLI und RACE 1988; WANG *et al.* 1996).

Allen Carotinoxygenasen gemeinsam sind ähnliche physiko-chemische Eigenschaften (zusammengefasst in: VON LINTIG *et al.* 2005). Die nativen, bzw. rekombinant hergestellten Enzyme besitzen ein pH-Optimum im leicht alkalischen Milieu und benötigen  $\text{Fe}^{2+}$  als



Dabei entscheidet der beteiligte Cofaktor über die Funktion der Enzyme als Oxidasen (NADH; Umwandlung des Alkohols in den Aldehyd) oder Reduktasen (NADPH; Umwandlung des Aldehyds in den Alkohol). Retinal kann von Mitgliedern der Aldehyddehydrogenasen irreversibel zur Retinsäure oxidiert werden, die alle NADH als Cofaktor verwenden (Abb. 2).

### 1.2.2.1 Beteiligte Alkoholdehydrogenasen am Retinoidstoffwechsel

Alkoholdehydrogenasen (ADHs) gehören zur Familie der *medium chain* Dehydrogenasen (MDRs). Sie bilden Homodimere, deren Untereinheiten für gewöhnlich 350 Aminosäuren lang sind (JÖRNVALL und HÖÖG 1995). Es handelt sich dabei um cytosolische Enzyme, deren aktives Zentrum ein katalytisches Zinkion enthält (PERSSON *et al.* 1994). ADHs besitzen eine große Substratvielfalt und sind verantwortlich für die Metabolisierung von Ethanol, Retinoiden und vieler anderer Alkohole und Aldehyde, die von physiologischer Bedeutung sind (DUESTER *et al.* 1999).

Die Einteilung der ADHs in unterschiedliche Klassen ist schwierig, da ein Teil der Enzyme verschiedene Substrate umsetzen kann, wenn auch mit unterschiedlichen Effizienzen (YANG *et al.* 1994; KEDISHVILI *et al.* 1995). Die Erkenntnisse über die Funktion dieser Enzyme stützen sich ausschließlich auf *in vitro* Studien, die keine verlässlichen Aussagen darüber zulassen, ob auch unter physiologischen Bedingungen im Organismus dieselben Reaktionen katalysiert werden (MOLOTKOV *et al.* 2002; DUESTER *et al.* 2003). Das heißt, es ist nicht geklärt, inwiefern und in welchen Konzentrationen die möglichen Substraten den Enzymen an ihrem „Einsatzort“ zur Verfügung stehen und wie sie mit diesen verfahren. Zusätzlich ist ihre Namensgebung verwirrend und folgt keiner logischen Gliederung, da oft nicht zwischen Isoformen eines Enzyms oder verschiedenen Enzymklassen (im Sinne von Substratklassen) unterschieden wird.

ADHs katalysieren, bis auf wenige Ausnahmen, die Reduktion des Retinols zu Retinal. Enzyme, deren Funktion *in vitro* bestätigt werden konnte, sind in Abb. 2 aufgeführt, bzw. in DUESTER (2000) zusammengefasst charakterisiert. Aufgrund der Fülle an unterschiedlichen ADHs sowohl zwischen verschiedenen als auch innerhalb desselben Organismus fällt es schwer, einen direkten Bezug zwischen diesen Enzymen und dem Retinsäurestoffwechsel herzustellen. Anders formuliert findet eine Beteiligung der ADHs am Retinsäurestoffwechsel durch mangelnde *in vivo*-Erkenntnisse nur wenig Unterstützung.

### 1.2.2.2 Beteiligte *short chain* Dehydrogenasen (SDR) am Retinoidstoffwechsel

Im Gegensatz zu den cytosolischen Alkoholdehydrogenasen weisen die microsomalen *short chain* Dehydrogenasen eine wesentlich größere Substratspezifität für Retinoide auf (CHAI *et al.* 1997; WANG *et al.* 1999). Genetische Studien von Augenkrankheiten bzw. der Entwicklung von Zebrafischen weisen auf eine Schlüsselrolle dieser Enzyme in der physiologischen Oxidation des Retinols hin (LIDÉN und ERIKSSON 2006).

Die SDRs sind ebenfalls Homodimere, deren Untereinheiten mit 250 Aminosäuren jedoch wesentlich kleiner als die der ADHs sind. Ihr aktives Zentrum enthält ein konserviertes Y-[XXX]-K-Motiv (X = eine beliebige Aminosäure), aber kein katalytisches Metallion (JÖRNVALL *et al.* 1995). In Nähe des N-Terminus befindet sich die konservierte Cofaktor-Bindestelle G-[XXX]-G-[X]-G, die in Abhängigkeit bestimmter konservierter Aminosäuren über die Bindung von NADH oder NADPH entscheidet (DUESTER 2000). Dadurch wird die Funktion des Enzyms als Oxidase (Coenzym NADH) oder Reduktase (Coenzym NADPH) festgelegt. Die Enzyme der SDR-Familie weisen eine ähnliche Domänenorganisation auf und besitzen dadurch höchstwahrscheinlich ein gemeinsames Faltungsmuster (LIDÉN und ERIKSSON 2006). Wie anhand bereits kristallisierter Enzyme gezeigt werden konnte, ist insbesondere die Faltung der katalytischen Domäne innerhalb der SDR-Familie nahezu identisch (LIDÉN und ERIKSSON 2006).

Wichtige Retinoiddehydrogenasen sind in Abb. 2 aufgeführt. DUESTER (2000) und LIDÉN und ERIKSSON (2006) beschreiben detailliert die bisherigen Erkenntnisse über diese Enzyme und geben eine Übersicht, in welchen Tieren sie bereits identifiziert und funktionell zugeordnet wurden.

### 1.2.2.3 Aldehyddehydrogenasen (ALDHs) des Retinoidstoffwechsels erzeugen das wichtige Morphogen Retinsäure

Eine besondere Stellung unter den Retinoiden kommt der Retinsäure zu. Sie entsteht aus der irreversiblen Oxidation des Retinals (Abb. 2) und reguliert in Chordaten die Expression von Zielgenen über die Aktivierung zweier Gruppen von Kernrezeptoren: Die Retinsäurerezeptoren (RAR) und die Retinoid-X-rezeptoren (RXR). Dadurch beeinflussen die Retinoide eine Reihe an physiologischen Prozessen, wie Embryonalentwicklung, Reproduktion, postnatales Wachstum, Differentiation und Erhaltung zahlreicher Gewebe und Immunantwort (WOLF 1984; MORRIS-KAY und WARD 1999).

Für die Aldehyddehydrogenasen gibt es keine einheitliche Nomenklatur und es existieren Mehrfachbezeichnungen für ein und dasselbe Enzym (DUESTER 2000). Die Bezeichnung

RALDH stand z.B. ursprünglich für *rat*-ALDH (LABRECQUE *et al.* 1995; PENZES *et al.* 1997), wird aber mittlerweile synonym für *retinoid*-ALDH aus Mensch, Huhn und Maus verwendet. Aus diesem Grund fasst man inzwischen orthologe Enzyme aus Säugetieren, Vögeln und Amphibien unter dem Begriff ALDH1 zusammen, um die einheitliche Funktion dieser Enzyme zu beschreiben (DUESTER 2000).

Die ALDHs sind durch Untereinheiten von 500 Aminosäuren gekennzeichnet und besitzen einen katalytischen Cysteinrest (PEROZICH *et al.* 1999). Enzyme des Retinoidstoffwechsels sind evolutiv hochkonserviert und nutzen NADH als Coenzym (DUESTER *et al.* 2003). Außerhalb des Retinoidstoffwechsels wandeln ALDHs physiologisch wichtige Aldehyde (z.B. Acetaldehyd) in die entsprechenden Carbonsäuren um (LINDAHL 1992)

Aufgrund ihrer Aktivität in der Musterbildung embryonaler Achsen wurde die morphogenetische Rolle der Retinsäure als Innovation der Chordaten bezeichnet und mit dem Ursprung Chordaten-spezifischer Merkmale gleichgesetzt (SHIMELD 1996; MANZANARES *et al.* 2000; SHILLING und KNIGHT 2001; WADA 2001; HOLLAND 2005). In Vertebraten wird die Funktion der Retinsäure auf zwei Ebenen reguliert: Metabolismus und Signaltransduktion (CANESTRO *et al.* 2006). Die Enzymmaschinerie zur Steuerung des Retinsäuremetabolismus beinhaltet sowohl die aufbauenden Enzyme des Retinoidstoffwechsels (Abb. 2) als auch Retinsäure-abbauende Enzyme (z.B. Cyp26), die gemeinsam die räumlich-zeitliche Verteilung der Retinsäure während der Embryogenese regulieren (NIEDERREITHER *et al.* 2002; REIJNTJES *et al.* 2005). Die Regulation der Signalwirkung von Retinsäure umfasst die Bindung an Hormonrezeptoren (z.B. RAR und RXR) im Zellkern und die dadurch bedingte Aktivierung von Zielgenen (z.B. *Hox*-Gene; MARSHALL *et al.* 1994).

### 1.3 PORIFERA

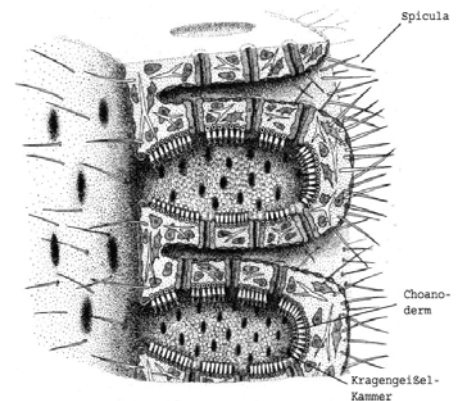
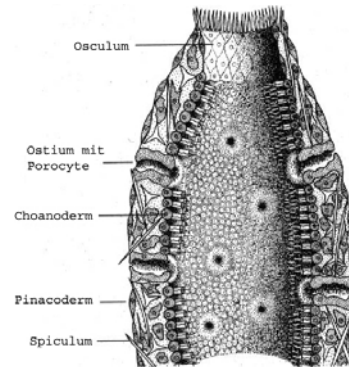
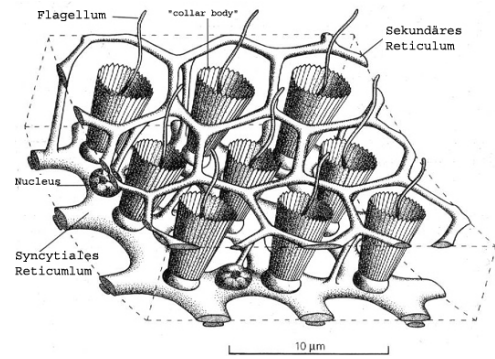
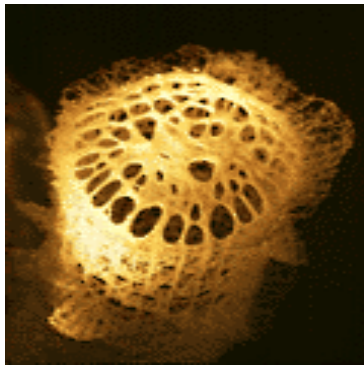
Schwämme, Porifera (lat. = Porenträger), sind sessile, ausschließlich im Wasser lebende Metazoa. Sie gehören zu den ältesten mehrzelligen Organismen, die aufgrund paläontologischer, morphologischer und embryonaler Studien auf ein Alter von ca. 600 Mio. Jahren geschätzt werden (WESTHEIDE und RIEGER 1996; MÜLLER 2001). Molekularbiologische Untersuchungen datieren die ersten Vertreter sogar auf ein Alter von über 800 Mio. Jahren (WILLMER 1994; MÜLLER 1995). Die Mehrheit der etwa 8000 rezent vertretenen Arten siedelt in marinen Habitaten und etwa 150 im Süßwasser (WESTHEIDE und RIEGER 1996) Anzutreffen sind sie sowohl im Flachwasser als auch in tiefen Ozeangraben. Die Vielzahl der Arten lässt sich in drei übergeordnete Gruppen einordnen, die sich anhand ihrer Spiculae unterscheiden:

- Hexactinellida* (Glasschwämme): besitzen Kieselspicula, die drei- oder sechssachsig gestaltet sein können
- Calcarea* (Kalkschwämme): weisen kalkhaltige Spiculae auf
- Demospongiae* (Hornschwämme): mit ein- oder vierachsigen Kieselspicula

Lebende Vertreter dieser drei Gruppen und mögliche Organisationsstufen des Kanalsystems sind in Abb. 3 dargestellt. In älteren Lehrbüchern wird noch von einem vierten Taxon, den *Sclerospongia*, berichtet. Neuere Studien beweisen jedoch, dass es sich hierbei um eine Gruppe innerhalb der *Demospongiae* handelt, die ein festes basales Kalkskelett aufweisen (WESTHEIDE und RIEGER, 1996). *Hexactinellida* werden als Vertreter der *Symplasma*, mit syncytial organisierten epithelartigen Schichten, oft den *Cellularia* gegenübergestellt, zu denen die *Demospongiae* und *Calcarea* zählen (LAFAY *et al.*, 1993).

Schwämme, als festsitzende Strudler, nehmen Wasser durch ein System zahlreicher mikroskopisch kleiner Öffnungen (Ostien) auf und filtrieren es innerhalb ihrer Kanäle und Geißelkammern. Durch ihre erstaunliche Filtrierleistung (ein Schwamm von 10 cm Länge und 4 cm Durchmesser kann 80 L in 24 h filtrieren) bilden sie einen wesentlichen Bestandteil mariner Nahrungsketten (WEHNER und GEHRING, 1995). Der gesamte Körperbau ist von der Filtriertätigkeit gekennzeichnet mit dem Ziel, den Schwamm mit Sauerstoff sowie Nahrung in Form von kleinen Zellen (Pico- und Nanoplankton) und kolloidal gelösten organischen Makromolekülen zu versorgen (Abb. 3). Das filtrierte Wasser verlässt den Schwamm meist zentral über eine große Ausfuhröffnung, das Osculum. Epithelartige Pinacocyten schließen den Schwamm nach außen hin ab und ziehen sich bis ins Innere der Kanäle hinein. Die epithelartigen Choanocyten (Kragengeißelzellen) in den Geißelkammern (bei manchen Vertretern auch in den Kanälen) bilden das Choanoderm im Innern des Schwammes. Trotz dieser epithelartigen Schichten besitzt der Schwamm keine „echten“ Gewebe, Organe, Gonaden, Nervensysteme oder Blutgefäße (WESTHEIDE und RIEGER, 1996). Choanoderm und Pinacoderm gleichen zwar funktionell der Gastrodermis und Epidermis, es gibt jedoch keine Hinweise, dass sie homolog entstanden sind. Zwischen beiden befindet sich das so genannte Mesohyl, eine extrazelluläre Matrix, mit zahlreichen Zellen unterschiedlicher Morphologie und Funktion. Diese Einzelzellen übernehmen dabei wichtige Körperfunktionen wie Nahrungstransport, Kollagen- und Skelettabscheidungen und Hormonproduktion (WESTHEIDE und RIEGER, 1996).





**Abb. 3:** Beispiel der unterschiedlichen Organisationsformen von Schwämmen: **Links:** Jeweils ein Beispiel eines lebendes Exemplars der drei Schwammtypen. Von oben nach unten: *Hexactinellida* mit *Euplectella aspergillum*; *Calcarea* mit *Sycon raphanus* und *Demospongiae* mit *Suberites domuncula*. **Rechts:** Repräsentative Organisationsformen des Kanalsystems im Schema. Das syncytiale Kanalsystem der *Hexactinellida*, der röhrenförmige Ascon-Typ einfacher Schwämme, und der Sycon-Typ, wie ihn die dargestellten Exemplare der *Calcarea* und *Demospongiae* besitzen (Fotos: W. E. G. Müller; Zeichnungen verändert nach WESTHEIDE und RIEGER, 1996).

Im Lebenszyklus der Porifera wechselt sich eine sessile Adultform mit einer mikroskopischen Wimperlarve ab. Die sexuelle Fortpflanzung beginnt mit der Umbildung von Körperzellen zu Gameten (Spermatozoen und Eizellen), von denen entweder beide oder lediglich die Spermatozoen zur Befruchtung ins Außenmedium abgegeben werden. Die Befruchtung der Eizellen und die sich anschließende Larvalentwicklung erfolgt innerhalb des Schwammkörpers (WESTHEIDE und RIEGER, 1996).

Aufgrund ihrer „Immobilität“ wurden Schwämme erst um 1766 als Tiere identifiziert (WEHNER und GERING, 1995), dennoch sind sie durch koordinierte, gerichtete

Kriechbewegungen einzelner Zellen bedingt lokomotionsfähig (WESTHEIDE und RIEGER 1996). Eine Flucht vor Fraßfeinden ist dadurch allerdings nicht möglich. Schutz verschaffen sie sich durch ihre Spiculae und die zahlreich vorhandenen chemischen Verteidigungsmittel, die aus einer Fülle an Sekundärmetaboliten resultieren (MÜLLER *et al.* 1986). Im allgemeinen lassen sich Schwämme als „photonegativ, rheophil, euryhalin, eurytherm und eurybath“ beschreiben, was ihr Vorkommen in mäßig bis stark durchströmten, eutrophen, dämmrigen und oft etwas trüben Bereichen erklärt (WESTHEIDE und RIEGER 1996).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Art *Suberites domuncula* gehört zur Familie der Hornschwämme (Abb. 3). Einzigartig für diese Art ist die Gemeinschaft mit einem Einsiedlerkrebs, auf dessen Gehäuse sie siedelt und dadurch eine „passive Mobilität“ erlangt. Das Farbspektrum von *S. domuncula* reicht von weiß über gelb-orange zu intensiv rot, aber auch blaue Exemplare sind vereinzelt zu finden. Die Färbung ist auf eine Komposition unterschiedlicher Carotinoide zurückzuführen (LIAAEN-JENSEN 1991), wie unter anderem in dieser Arbeit gezeigt wird.

#### 1.4 MONOPHYLIE DER METAZOA

Der Ursprung der Metazoa schien lange Zeit ein nahezu unlösbares phylogenetisches Problem (MÜLLER 2001). Aufgrund ihres einfachen Baues und ihrer Funktion (Abb. 3) wurden Schwämme als „lebende Fossilien“ lange Zeit als Parazoa den Metazoa gegenübergestellt (MÜLLER 2001). In den letzten Jahren ergab eine Vielzahl molekularbiologischer Analysen in marinen Schwämmen, vor allem *Suberites domuncula* und *Geodia cydonium*, dass alle Metazoa monophyletischen Ursprungs sind (REITNER und MEHL 1995; CAVALIER-SMITH *et al.* 1996) und auf einen gemeinsamen Vorfahren, das Urmetazoon, zurückgehen (MÜLLER 2001). Dies kann anhand des Kollagens, das als autapomorphes Merkmal gewertet wird, und zahlreicher anderer Bestandteile der Porifera bewiesen werden. Zu diesen gehören unter anderem das Rezeptorprotein Integrin (PANCER *et al.* 1997), die Zelladhäsionsmoleküle Fibronectin (PAHLER *et al.* 1998), Galektin (WAGNER-HÜLSMANN *et al.* 1996) und Lectin (GUNDACKER *et al.* 2001), die V-Domäne der Immunglobuline (SCHÄCKE *et al.* 1994; BLUMBACH *et al.* 1999), Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (SCHÄCKE *et al.* 1994), Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen (MÜLLER *et al.* 2001), AIF-1 (*Allograft inflammatory factor*) und GPX (*Glutathione Peroxidase*) als Bestandteile des Immunsystems (KRUSE *et al.* 1999), die bisher nur aus Vertebraten bekannte (2'-5') Oligoadenylat-Synthetase (WIENS *et al.* 1999) und Komponenten des Rhesus-Systems (SEACK *et al.* 1997). Im Inneren der Zelle fand man ferner Moleküle von Signaltransduktionprozessen, z.B. eine Ser/Thr-Kinase (SCHÜTZE *et al.* 1999),

die PKC (Kruse et al. 1996) sowie die p38 MAPK (BÖHM *et al.* 2000) und ein heterotrimeres G-Protein (SEACK *et al.* 1998).

## 1.5 MOTIVATION

Carotinoidspaltprodukte sind wichtige Mediatoren physiologischer Prozesse, die sowohl in den primitiven Prokaryoten als auch in hoch entwickelten Organismen wie dem Mensch essentielle Funktionen übernehmen. Im Tierreich ist vor allem das Retinoid Retinsäure von besonderem Interesse. Es gilt als autapomorphes Merkmal der Chordaten, da es in diesen Lebewesen vor allem Entwicklungsprozesse steuert.

Schwämme, als ältestes rezent vertretenes Phylum der Metazoa, besitzen bereits einen komplex organisierten Körperplan, vor allem in Bezug auf das wasserführende Kanalsystem und die Spiculaebildung. Eine Ausbildung solcher Strukturen ist den Schwämmen nur möglich, da sie ein sequentielles Differenzierungsmuster besitzen, das von den toti-/omnipotenten Archeozyten ausgeht (vergleiche KOZIOL *et al.* 1998) und diese zu funktionell festgelegten Zellen differenziert (z.B. Sklerozyten zur Spiculaebildung; URIZ *et al.* 2000). In unserer Arbeitsgruppe konnten bereits einige morphogenetische Faktoren nachgewiesen werden, die intrazellulär oder extrazellulär die Differenzierung der Zellen veranlassen (zusammengefasst in: SCHRÖDER *et al.* 2000; MÜLLER *et al.* 2002). Auch Homöobox-Proteine (z.B. LIM/homöobox-Protein; WIENS *et al.* 2003) und ein Retinoid-X-Rezeptor (WIENS *et al.* 2003) wurden im Schwamm *S. domuncula* identifiziert. Dieser reagiert auf die Zugabe von Retinsäure unter anderem durch Bildung asexueller Reproduktionseinheiten (Gemmulae oder Knospenbildung) und Gewebereduktion.

Alle diese Gegebenheiten weisen darauf hin, dass Retinsäure bereits in den ältesten Metazoa als Morphogen tätig ist. Die vorliegende Arbeit will dies anhand *S. domuncula* beweisen, indem (i) das Schlüsselenzym des Carotinoidstoffwechsels identifiziert; (ii) dessen Funktion anhand des rekombinanten Enzyms belegt; (iii) das Expressionsmuster dieses Enzyms *in-situ* untersucht (unter anderem in Reaktion auf Metabolite des Carotinoid- bzw. Retinoidstoffwechsels) wird und (iv) potentielle Enzyme des nachgeschalteten Retinoidstoffwechsels identifiziert und charakterisiert werden sollen.

## 2 MATERIAL

### 2.1 CHEMIKALIEN

Alle Standard-Laborchemikalien und Antibiotika wurden, je nach Verfügbarkeit, von den Firmen Applichem (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Für HPLC-Analysen wurden ausschließlich die qualitativ entsprechenden Chemikalien und Lösungsmittel von Sigma (Deisenhofen) verwendet. Spezielle Fertiglösungen und Reagenzien sind im Folgenden aufgelistet:

Blockingreagenz	Roche, Mannheim
CDP-Star™ ready to use	Roche, Mannheim
DigEasyHyb	Roche, Mannheim
DNA-Leiter GeneRuler	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP-Mix	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
GelCode® <i>Blue Stain reagent</i>	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Glycergel™	DAKO Diagnostika, Hamburg
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Hydroxylamin	Sigma, Deisenhofen
OPA ( <i>One-Phor-All</i> )-Puffer	Amersham-Pharmacia, Freiburg
OTG (1-S-Octyl-β-D-Thioglucopyranoside)	ThermoFisher Scientific, Schwerte
Proteinase-Inhibitor-Cocktail <i>Complete-Mini</i>	Roche, Mannheim
Protein-Marker IV <i>Prestained</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
RNAlater	Ambion, Bad Soden
RNA-Marker I, DIG-gekoppelt	Roche, Mannheim
<i>RNase Away</i>	Roth, Karlsruhe
Roti-Quant R250	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Invitrogen, Karlsruhe
Sequagel complete	über BIOZYM, Hess.Oldendorf
Sequagel XR	über BIOZYM, Hess.Oldendorf
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.2 VERBRAUCHSMATERIAL UND LABORZUBEHÖR

Einwegmaterial aus Kunststoff wurde von den Firmen Brand (Wertheim), Braun (Melsungen), Nunc (Wiesbaden) und Eppendorf (Hamburg) bezogen. Weiteres Verbrauchsmaterial stammte aus einem laborinternen Lager.

### 2.3 GERÄTE

Brutschrank TypBK 2/56	Ehret, Emmerdingen
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg

Heizplatte	IKA Labortechnik, Staufen
Kolbenhubpipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson, Frankreich
Laminar Flow, Sterilbank	Slee, Mainz
Li-Cor Sequenzierer	MWG-Biotech, Ebersberg
Mini Protean II	Bio-Rad, München
pH-Meter Typ CG 840	Schott, Mainz
Powersupply	Bio-Rad, München
Rollinkubator	eigene Anfertigung
Schüttelinkubator CertomatH	CertomatR Braun, Melsungen
Spectrophotometer DU 64	Beckmann, München
Sterilbank	Köttermann, Hängingen
Thermocycler:	
Bio-Rad i-cycler	Bio-Rad, München
Hybaid Touchdown	MWG-Biotech, Ebersberg
Perkin Elmer Geneamp 9600	Applied Biosystems, Weiterstadt
Primus 96 <sup>Plus</sup>	MWG-Biotech, Ebersberg
Transilluminator/Geldokumentationssystem	UVP Limited, Cambridge, UK
UC Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Vortexer	Labotech, Wiesbaden
Wasserbad mit Thermostat und Schüttler	Köttermann, Hängingen
Zentrifugen:	
Sorvall RC 5B	DuPont, Bad Nauheim
Eppendorffzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg

## 2.4 ENZYME UND ANTIKÖRPER

Anti-(DIG) Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche, Mannheim
Anti- <i>Mouse</i> -IgG-Alkalische-Phosphatase (Ziege)	Sigma, Deisenhofen.
Anti- <i>Rabbit</i> -IgG-Alkalische-Phosphatase (Ziege)	Sigma, Deisenhofen
Anti- <i>Rabbit</i> -IgG-Cy2 (Ziege)	Dianova, Hamburg
Anti- <i>Rabbit</i> -IgG-Cy3 (Ziege)	Dianova, Hamburg
Pwo-DNA-Polymerase, SAWADY	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SuperScript <sup>TM</sup> III (Reverse Transkriptase)	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase, SAWADY	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

## 2.5 KITS

5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends	Invitrogen, Karlsruhe
E.Z.N.A. <sup>®</sup> Plant RNA Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
iScript <sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
iScript <sup>TM</sup> SYBR <sup>®</sup> Green RT-PCR Kit	Bio-Rad, München
Ni-NTA Agarose	Qiagen, Hilden
Ni-NTA Spin Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
PCR DIG Labeling Mix <sup>PLUS</sup>	Roche, Mannheim
pGEM <sup>®</sup> -T Vektor System	Promega, Madison, USA

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse Transkription Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR <sup>®</sup> Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Rapid Excision Kit	Stratagene, Heidelberg
Sequagel Complete	National Diagnostics, Atlanta, USA
SuperScript <sup>™</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe
Thermo Sequenase Kit	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Histo-Technik-Set 8100	Kulzer; ThermoFisher Scientific, Schwerte

## 2.6 VEKTOREN

pBAD TOPO <sup>®</sup> TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe
pBAD/gIII A, B, and C	Invitrogen, Karlsruhe
pBAD/Myc-His A, B, and C	Invitrogen, Karlsruhe
pBK-CMV	Stratagene, Heidelberg
pBlueskript <sup>®</sup> II SK+	Stratagene, Heidelberg
pCR <sup>®</sup> II TOPO TA Clonig <sup>®</sup> Kit	Invitrogen, Karlsruhe
pGEM <sup>®</sup> -T	Promegea, Madison, USA
pGEX-4T-2	Amersham-Pharmacia, Freiburg
pSTBlue-1 AccepTor Vector Kit	Merck, Darmstadt
pTrcHis TOPO <sup>®</sup> TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe
pTrcHis2 TOPO <sup>®</sup> TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe
pTriplEx2	Clontech, Heidelberg

## 2.7 PRIMER

### 2.7.1 Vektorspezifische Primer

BK:	5' ACA GGA AAC AGC TAT GAC CTT G 3'	T <sub>m</sub> = 64 °C
BKCMV:	5' GGT CTA TAT AAG CAG AGC TGG T 3'	T <sub>m</sub> = 64 °C
CMV-F:	5' CTT GAT TAC GCC AAG CTC 3'	T <sub>m</sub> = 58 °C
CMV-R:	5' TAG GGC GAA TTG GGT ACA C 3'	T <sub>m</sub> = 58 °C
M13-20:	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'	T <sub>m</sub> = 59 °C
pBAD-F:	5' TAT GCC ATA GCA TTT TTA TCC 3'	T <sub>m</sub> = 55 °C
pBAD-R:	5' GAT TTA ATC TGT ATC AGG 3'	T <sub>m</sub> = 50 °C
pGex for:	5' ATA GCA TGG CCT TTG CAG G 3'	T <sub>m</sub> = 56 °C
pGex rev:	5' GAG CTG CAT GTG TCA GAG G 3'	T <sub>m</sub> = 58 °C
pTrc-F	5' GAG GTA TAT ATT AAT GTA TCG 3'	T <sub>m</sub> = 54 °C
pTrc-R	5' GAT TTA ATC TGT ATC AGG 3'	T <sub>m</sub> = 48 °C
SP6:	5' TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C 3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
T3:	5' CGG AAT TAA CCC TCA CTA AAG 3'	T <sub>m</sub> = 60 °C
T7:	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'	T <sub>m</sub> = 64 °C

### 2.7.2 Real-Time PCR Primer:

Real-BC-F1:	5' TGC GCA ACA AGA TTC TAA ACA AA 3'	T <sub>m</sub> = 55 °C
Real-BC-R1:	5' CCA GAC AAG GTG ACG TAA CAA ACT 3'	T <sub>m</sub> = 60 °C

Real-BC-F2:	5' TGC ACG TTC TCA TCA CAA TCA AT 3'	$T_m = 57\text{ °C}$
Real-BC-R2:	5' TGC ACA TAA TAC TCC CGT CAC TCT 3'	$T_m = 61\text{ °C}$
Real-RA-F:	5' TCT GCC AAT TTT GAA ACC CGA CT 3'	$T_m = 59\text{ °C}$
Real-RA-R:	5' CCT GCT TCC AAT AAT GCC TCC TT 3'	$T_m = 60\text{ °C}$
new-Tub-RT-F:	5' AGC CGT GGA TCT CAG CAA TAC 3'	$T_m = 60\text{ °C}$
new-Tub-RT-R:	5' TGA CAT ACG GCC ACG GAA CA 3'	$T_m = 60\text{ °C}$

### 2.7.3 Genspezifische Primer

#### 2.7.3.1 Primer der $\beta$ -Carotinoxygenase (BCO)

##### Interne Primer

BCO-II-F1*:	5' TTT GGA ACA TTG GGA GTG CCT GAT 3'	$T_m = 61\text{ °C}$
BCO-II-F2:	5' ACG GCA ACG GCT CAC CCT CAC 3'	$T_m = 65\text{ °C}$
Geodox F3:	5' ACG TCA CCT TGT CTG GTC C 3'	$T_m = 59\text{ °C}$
BC-5'-F2:	5' ATG GCG TTG CTG AGA GCA C 3'	$T_m = 58\text{ °C}$
Sd-Ox-R1:	5' TGC ACA TAA TAC TCC CGT CAC TCT G 3'	$T_m = 63\text{ °C}$
Sd-Ox-R2*:	5' TCT GAA ACA TTG CAA CCA TCC TCT G 3'	$T_m = 61\text{ °C}$
BCO-II-R1:	5' GGT GAG CCG TTG CCG T 3'	$T_m = 57\text{ °C}$
BCO-II-R2:	5' GCT GAT CCA TCC TTG TGT GC 3'	$T_m = 59\text{ °C}$
BC-MonoX <sub>IR800</sub>	5' TCA ATG TGT ACC CTG CTG GAG AC 3'	$T_m = 62\text{ °C}$

\* Primerpaar zur Erstellung der DIG-markierten Sonden für Northern Transfer *in-situ* Hybridisierung und Homologiescreening

##### Expressionsprimer

Ex-BC-F1*:	5' ATT GGA ATT CGC GTT GCT GAG ACC ACC CAA G 3'	$T_m = 69\text{ °C}$
Ex-BC-R1*:	5' ATA CTC GAG GTT CTT GGC AGG TAC AAA TA 3'	$T_m = 64\text{ °C}$
Exp-pBAD-F:	5' ATT CTC GAG CGC GTT GCT GAG AGC ACC CAA G 3'	$T_m = 72\text{ °C}$
Exp-pBAD-R:	5' ATA GAA TTC GTT CTT GGC AGG TAC AAA TA 3'	$T_m = 61\text{ °C}$
Ex-TOPO-F1:	5' GCG TTG CTG AGA CCA CC	$T_m = 55\text{ °C}$
Ex-TOPO-R1:	5' GTT CTT GGC AGG TAC AAA TA 3'	$T_m = 56\text{ °C}$

\* Primerpaar zur Klonierung in ungeschnittene Vektoren. Den Adapterbasen folgt das Palindrom der Restriktionsendonuklease EcoR1 bzw. XhoI (grau schattiert).

##### Degenerierter Primer:

Cado-D:	5' RTC ITC YTC RWA NGC RTT 3'	$T_m = 58\text{ °C}$
	Konsensussequenz aus dem Aminosäurealignement: INAFED	

#### 2.7.3.2 Primer der alternativen Carotinoxygenase (BCO-II)

##### Expressionsprimer

Exp-Ligno-F	5' GCT CAT GCA GCT TCT CCA GGT 3'	$T_m = 62\text{ °C}$
Exp-Ligno-R	5' AAG CTT TGC ACT TGC TTT AGG CAC 3'	$T_m = 61\text{ °C}$
Lig-Int-R*	5' CGG CTA CCA CTC CAA AGC ACA C 3'	$T_m = 64\text{ °C}$

\* Primer zur Vervollständigung des 5'-Endes

### 2.7.3.3 Primer der Retinaldehydrogenase

#### Expressionsprimer

Ret-DH-F:	5' CAT GTG CTG CTA GAA TTT TTG C 3'	$T_m = 57\text{ °C}$
Ret-DH-R:	5' GTC TTT CTT GAC TCT TCC TCT G 3'	$T_m = 58\text{ °C}$
RA_Exp_F1:	5' TAT CTC GAG CAT GTG CTG CTA GAA TTT TTG C 3'	$T_m = 66\text{ °C}$
RA_Exp_R1:	5' TAT AAG CTT GTC TTT CTT GAC TCT TCC TCT G 3'	$T_m = 65\text{ °C}$

#### Sondenprimer/Interne Primer

RA-DH-F	5' TGG CAG TGG TAT AGG GAG ACT AA 3'	$T_m = 60\text{ °C}$
RA-DH-R	5' TCC CAG TGT CAA TAA AGA AAG GA 3'	$T_m = 58\text{ °C}$
RA-Int-F	5' CAA TGA TAG CCA AGA ACC ACG GTC 3'	$T_m = 63\text{ °C}$
RA-Int-R	5' TGC AGC TGT GTT GAC TTG GAA TGT GA 3'	$T_m = 63\text{ °C}$

#### Degenerierter Primer:

RA-Deg:	5' GAY TAY TGY GCI TGI AAR TTY 3'	$T_m = 50\text{ °C}$
	Konsensussequenz aus dem Aminosäurealignment: DYCASKF	

### 2.7.3.4 Primer der Alkoholdehydrogenase (ADH)

#### Expressionsprimer

Exp-ADH-F	5' ATG TCT GTC TGG ACT TTA CTT TCA TG 3'	$T_m = 60\text{ °C}$
Exp-ADH-R	5' ACC CAG TCC CAC CAA TCT AC 3'	$T_m = 59\text{ °C}$

#### Interne Primer

ADH-Int-F	5' TTC TGC CCG TGT TGT AAC AG 3'	$T_m = 58\text{ °C}$
ADH-Int-R	5' CTG TTA CAA CAC GGG CAG AA 3'	$T_m = 58\text{ °C}$

#### Degenerierter Primer:

ADH-Deg:	5' ATH AAY AAY GCN GGN ATH TTY 3'	$T_m = 52\text{ °C}$
	Konsensussequenz aus dem Aminosäurealignment: INNAGIF	

### 2.7.3.5 Primer der Retinaldehyd-dehydrogenase (RALDH)

#### Expressionsprimer

Ex-RALDH-F	5' ACC GAG CCA GTA CCA AAA AAG C 3'	$T_m = 60\text{ °C}$
Ex-RALDH-R	5' CCT CTG TGT ACT GCT GAA GAC CAT AC 3'	$T_m = 64\text{ °C}$

#### Sondenprimer

RALDH-Int-F	5' CAT CGA GCG TGA CCG TGG AAT ACC 3'	$T_m = 64\text{ °C}$
RALDH-Int-R	5' CAG GAC AAT GTT GGG GCT CTT ACC 3'	$T_m = 66\text{ °C}$



## 2.8 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME UND PHAGEN

<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Stratagene, Heidelberg
Genotyp: RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )] relA1 lac	
BL21	Merck, Darmstadt
Genotyp: F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm	
ExAssist-Helferphage (704)	Stratagene, Heidelberg
LMG194	Invitrogen, Karlsruhe
Genotyp: F- Δ lacX74 galE thi rpsL Δ phoA ( Pvu II) Δ ara714 leu::Tn 10	
NovaBlue	Merck, Darmstadt
Genotyp: endA1 hsdR17(r <sub>K12</sub> <sup>-</sup> m <sub>K12</sub> <sup>+</sup> ) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'[proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lacI <sup>q</sup> ZΔM15::Tn10(Tc <sup>R</sup> )]	
TOP10	Invitrogen, Karlsruhe
Genotyp: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara- leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	
XL0LR	Stratagene, Heidelberg
Genotyp: Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )] Su <sup>-</sup> , λ <sup>r</sup>	
XPORT	Stratagene, Heidelberg
Genotyp: Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]	

## 2.9 BAKTERIENKULTURMEDIEN

### LB-Medium

10	g/l	Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl
x	ml	NaOH (pH 7)

### LB-Agar

10	g/l	Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl
15	g/l	Agar
x	ml	NaOH (pH 7)

### NZY-Broth

10	g/l	Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl
2	g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
x	ml	NaOH (pH 7,5)

### 2 x TY-Medium

16	g/l	Trypton
10	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl
x	ml	NaOH (pH 7)

### LB-Top-Agar

10	g/l	Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl
7,5	g/l	Agar oder Agarose
x	ml	NaOH (pH 7)

### NZY-Agar

10	g/l	Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl
2	g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
15	g/l	Agar
x	ml	NaOH (pH 7,5)

**NZY-Top-Agar**

10	g/l	Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl
2	g/l	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
7,5	g/l	Agar
x	ml	NaOH (pH 7,5)

**Einfriermedium**

50	%	Glycerin
50	%	LB-Medium

Alle Medien wurden nach dem Ansetzen autoklaviert. Die angegebenen Mengen beziehen sich auf einen Liter Endvolumen in *Aqua bidest*. Je nach verwendeten Bakterien (2.8) bzw. Vektoren (2.6) wurden den Medien Antibiotika zugesetzt: Kanamycin 20 mg/l; Chloramphenicol 30 mg/l; Carbenicillin 50 mg/l; Tetracyclin 50 mg/l.

**2.10 COMPUTERPROGRAMME**

BLAST service	NIH-NCBI, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a> (Altschul <i>et al.</i> , 1997)
analySIS V 3.0	Olympus, Hamburg
CLUSTAL V1.81	EMBL, (Thompson <i>et al.</i> )
DNASIS V5.0	Hitachi Software engineering
DNASStar V4.04	DNASStar Inc.
ELM	The Eukaryotic Linear Motif resource for Functional Sites in Proteins: <a href="http://elm.eu.org/">http://elm.eu.org/</a>
e-Seq V2.0 DNA Sequenzier und Analysesoftware	LI-COR, über MWG Ebersberg
ExpASy ProtParam tool	<a href="http://www.expasy.org/tools/protparam.html">http://www.expasy.org/tools/protparam.html</a>
GENEDOC V2.6.002	Nicholas und Nicholas, <a href="http://www.cris.com">www.cris.com</a>
Genescan	Intron/Exon Splice Sites <a href="http://genes.mit.edu/GENSCAN.html">http://genes.mit.edu/GENSCAN.html</a>
iCycler™iQ V3.0a für Real Time PCR	BIO-RAD, München
Pfam	Protein families database of alignments and HMMs: <a href="http://sanger.ac.uk/cgi-bin/pfam/">http://sanger.ac.uk/cgi-bin/pfam/</a>
PLOC	Protein localisation prediction: (PARK und KANEHISA 2003) <a href="http://www.genome.ad.jp/SIT/plocdir/">http://www.genome.ad.jp/SIT/plocdir/</a>
Primer3 V0.3.0	Pick a Primer from a DNA Sequence: <a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi</a>
Prosite	<a href="http://www.ebi.ac.uk/searches/prosite.input.html">http://www.ebi.ac.uk/searches/prosite.input.html</a> (BAIROCH, 1988)
PSORT II	<a href="http://psort.nibb.ac.jp">http://psort.nibb.ac.jp</a>
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool: <a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>
TreeView V1.6.6	<a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html</a>

## 2.11 HOCHLEISTUNGSFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE (HPLC)

Die HPLC-Analysen wurden an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg am Institut für Biologie I (Zoologie) in der Abteilung Neurobiologie-Tierphysiologie in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD. Dr. Johannes von Lintig durchgeführt.

### 2.11.1 Normalphase

Pumpe:	System Gold, Programable Solvent Modell 116, (Beckmann; Genauigkeit $\pm 0,003\%$ )
Detektor:	System Gold, Diode Array Detector Module 168 (Beckmann) mit 512 Dioden, Spektrum 190-600 nm Multichannel (Genauigkeit $\pm 1\text{nm}$ )
Säule:	Hypersil Silicium Säule (Knauer Säulentechnik GmbH): Länge 250 mm, Innendurchmesser 2 mm, Korngröße 3 $\mu\text{m}$
Vorsäule:	Hypersil Silicium Säule (Knauer Säulentechnik GmbH): Länge 30 mm, Innendurchmesser 4 mm, Korngröße 5 $\mu\text{m}$
Software:	32 Karat (Beckmann)
Laufmittel Apo-Carotinoide	99,5 % (v/v) n-Hexan, 0,5 % (v/v) Ethanol
Laufmittel apolarer Carotinoide	81% (v/v) n-Hexan, 19 % (v/v) Ethylacetat, 15 $\mu\text{L}$ Essigsäure pro 100 mL Laufmittel
Laufmittel polare Carotinoide	79 % (v/v) n-Hexan, 20 % (v/v) Diethylether, 1 % (v/v) Ethanol

### 2.11.2 Reversed Phase HPLC

Pumpe:	System Gold, Programable Solvent Modell 116, (Beckmann; Genauigkeit $\pm 0,003\%$ )
Detektor :	System Gold, Diode Array Detector Module 168 (Beckmann) mit 512 Dioden, Spektrum 190-600 nm Multichannel (Genauigkeit $\pm 1\text{nm}$ )
Säule	YMC-Säule (C <sub>30</sub> ; Knauer Säulentechnik GmbH): Länge 250 mm, Innendurchmesser 4,6 mm, Korngröße 5 $\mu\text{m}$
Vorsäule:	keine
Software:	32 Karat (Beckmann)
Laufmittel A:	50 % Methanol (v/v), 50% Tetrabutylmethylether
Laufmittel B:	Methanol/Tetrabutylmethylether/Wasser im Verhältnis 60:12:12

## 2.12 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Chromatographieplatten:	Kieselgel 60 HPTLC-Platten 10 x 10 cm mit Konzentrierungszone 10 x 2,5 cm (#113748, Merck Darmstadt)
LM* Carotinoidtrennung	Dichlormethan/Ethylacetat Verhältnis 7:3 (v/v)
LM Carotinoidreinigung	Petrolether/Diethylether/Aceton Verhältnis 40:10:5 (v/v)
LM Carotenoprotein	Petrolether/Diethylether/Aceton Verhältnis 20:5:5 (v/v) alternativ wurde Chloroform verwendet

---

\*LM = Laufmittel

### 2.13 SCHWÄMME

Die untersuchten Exemplare von *Suberites domuncula* wurden in der nördlichen Adria in der Nähe von Rovinj (Kroatien) aus einer Tiefe von 20-30 m gesammelt. Gehalten wurden sie in Aquarien bei 16°C der Arbeitsgruppe W.E.G. Müller am Institut für Physiologische Chemie, Universität Mainz, die mit künstlichem Seewasser gefüllt waren.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche **cdNA-Banken** von *S. domuncula* verwendet. Eine wurde von Herrn Dr. Kruse der Arbeitsgruppe W.E.G. Müller am Institut für Physiologische Chemie der Universität Mainz in den ZAP Express™-Vektor (Stratagene, Heidelberg) inkloniert. Die andere wurde von Herrn Dr. Krasko (gleiche Arbeitsgruppe) in den TriplEx2-Vektor (Clontech, Heidelberg) inkloniert.

### 3 METHODEN

#### 3.1 HERSTELLUNG GENSPEZIFISCHER PRIMER

Ein Primer ist ein kurzes Oligonukleotid, welches stabile, hochspezifische Dimere mit seiner Zielsequenz (DNA/RNA) bildet. Mit Hilfe eines solchen Adapters können Nukleinsäuren spezifisch markiert (3.3.5), sequenziert (3.11), vervollständigt (3.4) oder amplifiziert (3.3.1) werden. Wichtige Kriterien zur Erstellung von Primern sind in RYCHILK und RHODES (1989); SAIKI (1989) und RYCHILK (1995) detailliert beschrieben und wurden hier beachtet. Dazu zählt die Vermeidung der Ausbildung von Sekundärstrukturen (z.B. *hairpins*, *loops*), ein optimaler G:C-Gehalt für die Hybridisierstabilität (40-60 %), keine 3'-terminale Komplementarität und eine adäquate Schmelztemperatur ( $T_m$  55-65 °C). Falls möglich wurde die Bindungsspezifität durch die Wahl von „schwach-paarenden“ Nukleotiden (A:T) am 3'-Ende erhöht. Die Schmelztemperatur wurde nach THEIN *et al.* (1986) wie folgt berechnet:

$$T_m = (\text{Anzahl an G+C}) \times 4 + (\text{Anzahl an A+T}) \times 2 \quad \text{Formel 1}$$

Die nach diesen Prinzipien erstellten Primer sind unter (2.7) aufgelistet. Spezielle Primer, z.B. mit Restriktionsschnittstellen oder für die RTQ-PCR, wurden manuell oder computergestützt (DNASar; Primer3; 2.10) ermittelt.

#### 3.2 HERSTELLUNG DEGENERIERTER PRIMER

Weitestgehend folgt das Design degenerierter Primer den Prinzipien von genspezifischen (3.1). Die Basenabfolge des Oligonukleotids wurde dabei anhand einer Aminosäuresequenz abgeleitet, die aus einem konservierten Bereich eines Aminosäurealignments resultierte. Degenerierte Basen werden dabei in der Primersequenz durch international einheitliche Buchstaben ersetzt (Tab. 2). Die resultierende Primersequenz steht nicht für ein einzelnes Oligonukleotid, sondern repräsentiert ein Gemisch von identischen Oligonukleotiden, die sich jeweils nur in der Basenabfolge der degenerierten Stellen unterscheiden. Über die intramolekulare Komplementarität der 3'-Enden hinaus wurden bei der Entwicklung Bereiche mit Polypurinen und Polypyrimidinen vermieden. Es wurde darauf geachtet, dass am 3'-Ende die letzten fünf Basen nicht degeneriert sind und der Degenerationsgrad des Oligonukleotids das 96fache nicht überschritt. Dieser Wert ergibt sich aus der Multiplikation der Anzahl an degenerierten Basen pro Aminosäure. Nach diesen Prinzipien wurden die degenerierten

Primer für die Carotinoxygenase, Retinaldehydrogenase und Alkoholdehydrogenase erstellt (2.7.3).

**Tab. 2:** Aufschlüsselung der nach I UB kodierten degenerierten Basen:

Kodierung	Basenaufschlüsselung	Kodierung	Basenaufschlüsselung
M	A oder C	R	A oder G
W	A oder T	S	C oder G
Y	C oder T	K	G oder T
V	A oder C oder G	H	A oder C oder T
D	A oder G oder T	B	C oder G oder T
X oder N	G oder A oder T oder C		

### 3.3 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Mit Hilfe dieser Technik ist es möglich, spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren, sofern deren flankierende Regionen bekannt sind (SAIKI *et al.* 1985; MULLIS *et al.* 1986). Sie wurde erstmals von KARY MULLIS 1984 vorgestellt und umfasst drei Schritte: Einer Strangtrennung folgt ein Anlagerungsschritt spezifischer Oligonukleotide, welche mit den benachbarten Regionen der Zielsequenz hybridisieren. Enzymatisch werden diese Primer zu vollständigen DNA-Sequenzen verlängert. Das Resultat ist ein doppelsträngiges Produkt, welches lediglich die Sequenz zwischen den beiden eingesetzten Primern enthält.

Diese Methode ermöglicht es, Zielsequenzen aus einem komplexen DNA-Gemisch zu selektionieren und/oder in hohen Konzentrationen für weitere Verfahren (z.B. Subklonierung) zur Verfügung zu stellen.

#### 3.3.1 Standard PCR

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für die spätere Identifizierung, bzw. zur Vervollständigung eines Gens wurde eine hitzestabile Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) in unten aufgeführtem Ansatz verwendet. Die Elongationszeit für die Strangsynthese richtet sich nach der Prozessivität des eingesetzten Enzyms und beträgt für die Taq ca. 1min/kb.

Die Taq-Polymerase weist zwar eine hohe Prozessivität, aber gleichfalls eine Fehlerhäufigkeit von  $10^{-5}$  je eingebauter Base auf. Das heißt, dass bei 30 Zyklen und einer Produktlänge von 1 000 bp 25% aller Fragmente mindestens eine Mutation aufweisen (MÜLHARDT 2003). Für Expressionsstudien verwendet man deshalb korrekturfähige Polymerasen mit 3'-5'-Exonucleaseaktivität. Die Fehlerhäufigkeit solcher *proofreading* Enzyme liegt bei  $10^{-6}$

je eingebauter Base, bzw. 3% mutierter Fragmente (CLINE *et al.* 1996). Die Prozessivität solcher Enzyme (z.B. **Pfu** aus *Pyrococcus furiosus*; **Pwo** aus *Pyrococcus woesei*) ist wesentlich geringer und die Elongationszeit beträgt ca. 2 min/kb (CLINE *et al.* 1996; MÜLHARDT, 2003). Da *proofreading* Polymerasen auch die Primer abbauen, wurde eine Antikörper inaktivierte Polymerase (2.4) verwendet, die durch die initiale Denaturierung (s.u.) aktiviert wird. Gleichzeitig bietet sie den Vorteil der Taq, indem sie an das jeweilige 3'-Ende des PCR-Fragments ein einzelnes Adenin anfügt. Folgendes allgemeines Pipettierschema fand für die Herstellung von PCR-Ansätzen Verwendung:

Reaktionsansatz:	PCR-Bedingungen
5 µl 10 x Puffer (enthält MgCl <sub>2</sub> )	1 x 95 °C 5 min
1,5 µl 10 mM dNTPs	30 - 35 x { 95 °C 30 sec T <sub>m</sub> 30 sec 72 °C 1-2 Min/1kb
1,5 µl 10 pM Primer 1	
1,5 µl 10 pM Primer 2	
x µl Template (max. 5 µg)	1 x 72 °C 10 min
1-3 U DNA-Polymerase	
x µl <i>Aqua bidest.</i> auf 50 µl auffüllen	

### 3.3.2 Kolonie PCR

Hierbei handelt es sich um eine Standard PCR (3.3.1), welche zur schnellen Überprüfung eines Inserts in einem Plasmid herangezogen wurde. Durch die Wahl je eines vektor- bzw. genspezifischen Primers ließ sich überdies die Orientierung des Inserts im Vektor überprüfen. Speziell nach Klonierungen in TOPO-TA Expressionsvektoren (3.9) wurden so die *in-frame* klonierten Plasmide identifiziert. Als Template diente ein Teil der transformierten Bakterienkolonie (3.10). Das Reaktionsvolumen betrug 1/3 einer Standard-PCR (3.3.1) und die resultierenden Fragmente wurden auf einem Agarosegel (3.6.2) visualisiert.

### 3.3.3 Nested PCR

Vor allem bei sogenannten *low-copy-genes* kann es vorkommen, dass durch eine Standard PCR kein Produkt identifizierbar ist. Die *nested* („verschachtelte“) PCR nutzt ein Standard PCR-Produkt für eine weitere Amplifikation mit Primern (= *Nested-Primer*), die in unmittelbarer Nachbarschaft *downstream* zwischen den zuvor eingesetzten Primern liegen. So konnten auch Transkripte auf geringstem Niveau identifiziert werden, ein Vorgang, der als illegitime Transkription bekannt ist (CHELLY *et al.* 1989)

### 3.3.4 PCR-Screening

Die Technik der PCR wurde auch zum Suchen unbekannter Gene innerhalb einer cDNA-Bank/cDNA eingesetzt. Dieser Vorgang wird als PCR-Screening bezeichnet und verwendet einen vektorspezifischen-/Oligo-d(T)-Primer und einen degenerierten Primer, semi-spezifisch für das zu isolierende Gen. Ziel war es, eine in anderen Organismen bereits bekannte Sequenz im Zielorganismus nachzuweisen. Amplifiziert wurden DNA-Abschnitte zwischen dem Vektor-/Oligo-d(T)-Primer und den semi-spezifischen Bindungsstellen des degenerierten Primers. Die so erhaltenen PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel nachgewiesen, subkloniert und durch Sequenzierung charakterisiert.

### 3.3.5 Labeling PCR – Herstellung der DNA-Sonden

Die DNA-Sonden wurden mit Hilfe des „PCR DIG Labeling Mix<sup>PLUS</sup>“ (2.5) markiert. Zugrunde liegt eine PCR, bei der neben den dNTPs zusätzlich auch DIG-11-UTP (ein Thyminanalogon) in den synthetisierten Strang eingebaut wird. Dieses ließ sich später durch einen Antikörper nachweisen. Als Matrize zur Erstellung der Sonden diente entweder cDNA oder ein entsprechendes Plasmid. Das Protokoll entspricht dem einer Standard-PCR (3.3.1).

Sonden für *in-situ* Hybridisierungen sind Einzelstrangsonden, zum Nachweis von mRNA-Transkripten innerhalb von Zellen eines Gewebes. Die Markierung obliegt dem oben geschilderten Prinzip, lediglich wird anstelle eines Primerpaares nur jeweils ein Primer eingesetzt. Die Sonde des Reversprimers ist komplementär zur mRNA des Zielgens und dient als Positiv (*sense*), während die Sonde des Forwardprimers als Negativkontrolle (*antisense*) fungiert.

Auf einem Agarosegel wurden die Reaktionsansätze nochmals hinsichtlich Größe und Spezifität der entstandenen Sonden überprüft. Die DIG-Markierung beeinflusst die Laufeigenschaften des Produkts und ließ es größer erscheinen. Die entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und gemäß (3.7.1) aufgereinigt.

### 3.3.6 RT-PCR

Unter der „*reverse transcription polymerase chain reaction*“ (RT-PCR) versteht man die Umschreibung einer RNA-Matrize in eine zu ihr komplementäre, einzelsträngige cDNA. Schlüsselenzym dieser Reaktion ist eine aus einem Retrovirus gewonnene Reverse Transkriptase (hier „SuperScript<sup>TM</sup> III“). Zur Durchführung einer RT-PCR wurde das



„SuperScript™ *First-Strand Synthesis System for RT-PCR*“ (2.5) mit folgenden Bedingungen verwendet:

<b>RNA/Primer-Mix</b>	<b>Reaktionsansatz</b>
x µl RNA (max. 5 µg)	2 µl 10 x Puffer
1 µl 10 mM dNTPs	4 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub>
1 µl Oligo(dT) Primer od. GSP auf 10 µl mit DMPC-H <sub>2</sub> O auffüllen	2 µl 0,1 M DTT
	1 µl RNASEOUT-RNase Inhibitor

Zunächst wurde der RNA/Primer-Mix für 5 min bei 65 °C denaturiert und umgehend auf Eis abgekühlt. Zu je einem RNA/Primer-Mix wurden 9 µl des Reaktionsansatzes hinzugegeben und 2 min bei 42 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl *SuperScript III* wurde für weitere 50 min bei 42 °C inkubiert. Nachfolgend wurde die Reaktion durch 15minütiges Erhitzen auf 70 °C beendet (= Inaktivierung der Enzyme). Auf einen enzymatischen Abbau der RNA (durch RNase H) wurde zum Schutz der sscDNA verzichtet. Nach Quantifizierung des Nukleinsäuregehalts (3.14.1) wurde die sscDNA für die RTQ-PCR (3.5) oder zur Amplifizierung der Zielsequenz mittels Standard PCR (3.3.1) eingesetzt.

### 3.4 RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS

Die Amplifizierung von cDNA-Enden (RACE = *rapid amplification of cDNA ends*) ermöglicht die Identifizierung und Charakterisierung unbekannter Nukleinsäuresequenzen am 5'- oder 3'-Ende eines Gens. Oft sind die Gene einer cDNA-Bank vor allem am 5'-Ende unvollständig. Dies ist auf deren Herstellungsmethode zurückzuführen. Die Umschreibung durch die reverse Transkriptase ist von der Integrität der mRNA abhängig. Fehlt die schützende Cap-Struktur am 5'-Ende, erfolgt ein rascher Abbau und die mRNAs werden nicht vollständig zu cDNAs konvertiert. Um dieses Problem zu beheben, bedient man sich im 5'-RACE der mRNA als Matrize.

Die Vervollständigung der 5'-Enden wurde mit dem *5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* laut Herstellerprotokoll (2.5) durchgeführt. Die Umschreibung der mRNA durch die reverse Transkriptase (hier *SuperScript III*, 2.4) beginnt an der Bindungsstelle des **genspezifischen Reversprimers** (GSP1). In den nachfolgenden Schritten wird die eingesetzte mRNA enzymatisch verdaut und an das 3'-Ende des aufgereinigten cDNA-Transkripts eine homopolymere Nukleinsäuresequenz (Poly-C) durch die *Terminale-deoxynukleotidyl-Transferase* angefügt. Diese erlaubt die Bindung eines zu ihr komplementären, im Kit enthaltenen universellen Primers (*Abridged Anchor Primer*). Durch Kombination mit einem

weiteren genspezifischen Reversprimer (GSP2; *upstream* von GSP1) kann die Zielsequenz in einer PCR (3.3.1) selektiv amplifiziert werden. Das resultierende PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel (3.6) aufgetrennt. War die Ausbeute der PCR zu gering, wurde eine *Nested* PCR (3.3.3) angeschlossen.

### 3.5 REAL-TIME QUANTITATIVE PCR

Die quantitative Echtzeit-PCR (*real-time quantitative PCR*; **RTQ-PCR**) ist die modernste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren und basiert auf einer konventionellen PCR (3.3.1). Bislang wurde noch keine einheitliche Abkürzung eingeführt, und sie wird fälschlicherweise oft mit RT-PCR abgekürzt und dadurch mit der *reverse transcription*-PCR (3.3.6) verwechselt. Das einzelsträngige Produkt der RT-PCR ist die Ausgangsmatrize für die RTQ-PCR. Das hier verwendete System (iCycler, BIO-RAD) der RTQ-PCR nutzt einen Farbstoff, SYBRGreen<sup>®</sup>, der Basen doppelsträngiger DNA interkaliert. Während der RTQ-PCR bietet er die Möglichkeit direkt das Entstehen doppelsträngiger DNA zu verfolgen, indem eine UV-Lampe den RTQ-PCR Ansatz bestrahlt und eine CCD-Kamera die resultierende Fluoreszenz (490 nm) registriert.

Zur Kalibrierung der Kamera über den einzelnen Reaktionsgefäßen ist dem RTQ-PCR Ansatz ein Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Fluorescein) beigemischt, der eine Basal- oder Hintergrundfluoreszenz aufweist. Sobald ausreichend doppelsträngige DNA-Moleküle erzeugt und durch den Interkalator gefärbt wurden, übersteigt das Signal (angegeben in *relative fluorescence units*, **RFU**) diese Hintergrundfluoreszenz. Den PCR-Zyklus, in dem dieser Schwellenwert überschritten wird, bezeichnet man als *threshold cycle* ( $C_T$ ). Er dient der Berechnung der absoluten oder relativen Menge an Ausgangsmaterial. Bei der absoluten Quantifizierung wurde die Anzahl der initialen Transkripte anhand der Standardkurve errechnet, welche anhand eines genau definierten Plasmidstandards (in mehreren Verdünnungen) erstellt wurde. Die relative Quantifizierung dagegen bewertet den Unterschied zwischen dem Zielgen und einem konstitutiv exprimierten, dem *house-keeping* Gen, in den verschiedenen Reaktionsansätzen. Die relative Quantifizierungsmethode wurde in dieser Arbeit verwendet, um Einflüsse der Inkubationsversuche auf die generelle Expression der Zellen zu erfassen.

Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurden die SYBR<sup>®</sup>Green Kits von BioRad und Quiagen verwendet (2.5). Letzteres wurde für Primmorphe (spezielle dreidimensionale Aggregate proliferierender Zellen; 3.24) mit geringen RNA-Ausbeuten verwendet.

Für die RTQ-PCR wurde folgender Standardansatz verwendet:

Reaktionsansatz (50µl)			PCR-Bedingungen		
29,5 µl	H <sub>2</sub> O		95 °C	5 min	1 x
25,5 µl	SYBR® Green Mastermix		95 °C	30 sek	} 50 x
1,5 µl	GSP I (15 pM)		T <sub>M</sub>	30 sek	
1,5 µl	GSP II (15 pM)		72 °C	30 sek	
2 µl	sscDNA-Matrize		Schmelzkurve		

Kontaminationen der RNA durch genomische DNA bergen das Risiko, dass die Bindungsstellen der verwendeten GSPs innerhalb eines Exons liegen und Amplikons produzieren, die das RTQ-PCR Ergebnis verfälschen. Aus diesem Grund wurde diese vor der Umschreibung (Reverse Transkription; 3.3.6) der Template RNA (Total RNA-Extrakt aus Schwämmen oder Primmorphen) in sscDNA entfernt.

### 3.5.1 Durchführung:

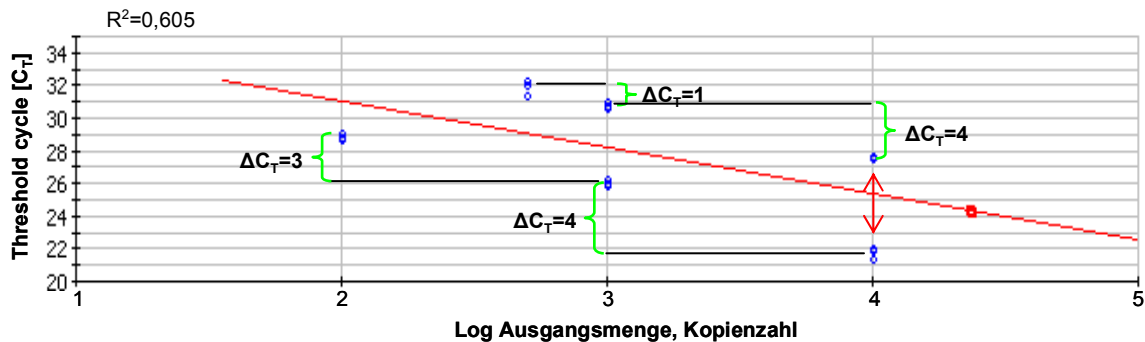
Für die RTQ-PCR wurden genspezifische Primerpaare verwendet (2.7.2), die in der Nähe des 3'-Endes der entsprechenden Gene binden und ein Produkt von ca. 150 bp amplifizieren. Die verwendeten Primerpaare eines RTQ-PCR Laufs wurden bezüglich ihrer T<sub>M</sub> und physikalisch/chemischen Eigenschaften so aufeinander abgestimmt, dass die unterschiedlichen Gene mit nahezu identischer Effizienz amplifiziert wurden. Weiterhin wurde die Matrizenmenge pro Gen in zwei Konzentrationen (meist 200 ng respektive 20 ng pro Ansatz) eingesetzt, um sicherzustellen, dass die Amplifizierung innerhalb des exponentialen Bereichs erfolgt. Das bedeutet, dass Matrize und Primerpaar in einem optimalen Verhältnis zueinander stehen und die PCR nicht durch Mangel/Überschuss einer Komponente beeinflusst wird.

#### 3.5.1.1 Erstellung der Standard-Kurve

Die Amplifikationskurve eines PCR-Laufs beschreibt einen sigmoidalen Verlauf durch das Missverhältnis an Primer und Matrize zu Beginn und Ende eines PCR-Laufs. Dazwischen befindet sich der **lineare Bereich**, in welchem pro Zyklus die maximale Ausbeute an PCR-Produkten erzielt wird (Verdopplung = exponentielles Wachstum). Die PCR-Effizienz beträgt damit 100 %. Vergleicht man verschiedene Gene innerhalb eines RTQ-PCR Laufs miteinander, muss die PCR-Effizienz für alle Gene nahezu identisch sein (ideal ca. 100 %), um eine verlässliche Beurteilung zu ermöglichen.

Für die absolute Quantifizierung an Transkripten wurden in dieser Arbeit Plasmidstandards mit definierter Kopienzahl in einer Verdünnungsreihe verwendet und daraus die

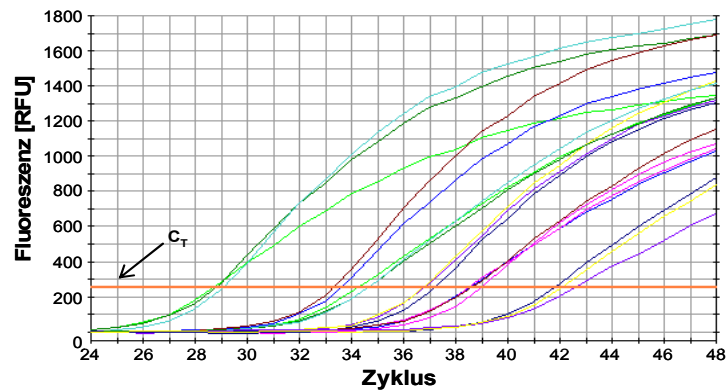
Standardkurve erstellt. Beträgt die PCR-Effizienz 100 %, ist der Abstand der  $C_T$ s zwischen den Verdünnungen gleich groß (z.B.  $C_{T2} - C_{T1} = C_{T3} - C_{T2}$ ). Ist dies nicht gegeben (Abb. 4), ist die Amplifizierungsrate in den verschiedenen Verdünnungen unterschiedlich groß, wodurch der Wert des Korrelationskoeffizienten ( $R^2$ ) deutlich geringer als 1 ist. In diesem Fall sind die Ergebnisse eines solchen Laufs nicht verwertbar.



**Abb. 4:** Negativbeispiel der Standardkurve einer RTQ-PCR: Dargestellt sind die Standards (**blaue Punkte**) zweier Gene mit identischer Kopienzahl (laut Konzentrationsbestimmung) in drei Verdünnungen ( $10^2$ ,  $10^3$  und  $10^4$  Kopien). Die Standards beider Gene werden durch die Regressionsgerade getrennt. Zum einen wird deutlich, dass die Ausgangsmenge beider Gene voneinander abweicht (**roter Pfeil**) und demnach die Amplifizierung nicht linear erfolgte; d.h. die Differenz der  $C_T$ s zwischen den Verdünnungen ist unterschiedlich (**geschweifte Klammern**). Der angegebene Korrelationskoeffizient ( $R^2$ ) ist ein Mittelwert aus der Amplifizierung beider Gene.

### 3.5.2 Erstellung der Quantifizierungskurven

Aufgrund der hohen Sensitivität dieser Methode wurden die RTQ-PCR Reaktionsansätze der gleichen Probe mindestens zweifach, optimal dreifach bestimmt. So konnten Fehler (Pipettierungenauigkeiten, Ausfall eines Ansatzes etc.) erkannt und entsprechende Proben aus der Quantifizierung ausgeschlossen werden. Aufgezeichnet wurden die Fluoreszenzeinheiten (RFU) jedes Reaktionsansatzes im Anschluss an den Elongationsschritt eines PCR-Zyklus. Entscheidend ist nicht die finale Höhe des Signals, sondern der Wert bei Überschreitung der Hintergrundfluoreszenz. Dieser wird als Schwellenwert oder *threshold-cycle* ( $C_T$ ) bezeichnet (s.o.). Er ist für alle untersuchten Proben gleich und wird so gewählt, dass alle Proben sich am Anfang des linearen Bereichs befinden (Abb. 5).



**Abb. 5:** Beispiel einer Quantifizierungskurve der RTQ-PCR: Dargestellt ist die Fluoreszenz der unterschiedlichen Reaktionsansätze (eine Kurve = ein Reaktionsansatz). Der Schwellenwert ( $C_T$ ) ist ebenfalls angegeben.

Die relative Expression wurde anhand der Differenz zwischen den  $C_T$ -Werten des Kontrollgens (*house keeping gene*; HKG) und dem Zielgen (*gene of interest*; GOI) berechnet. Im unbehandelten Kontrollansatz wird der Wert dieser Differenz ( $HKG_{CT} - GOI_{CT}$ ; entspricht  $K_{\Delta CT}$ ) als Normalexpression festgesetzt (100 %, da  $E_T = 1$ , weil  $P_{\Delta CT} = K_{\Delta CT}$ ). Die Differenz  $HKG_{CT} - GOI_{CT}$  wird auch für die Probenansätze bestimmt (entspricht  $P_{\Delta CT}$ ), wobei sich die relative Expression aus der Subtraktion dieses Wertes und dem Wert aus der Kontrolle ( $P_{\Delta CT} - K_{\Delta CT}$ ) wie folgt berechnet:

$$E_r = \begin{cases} 2^{-(P_{\Delta CT} - K_{\Delta CT})} & \forall K_{\Delta CT} > P_{\Delta CT} \\ 2^{-(-(P_{\Delta CT} - K_{\Delta CT}))} & \forall K_{\Delta CT} < P_{\Delta CT} \end{cases} \quad \begin{array}{l} P_{\Delta CT} \text{ Werte der Probe} \\ K_{\Delta CT} \text{ Werte der Kontrolle} \end{array} \quad \text{Formel 2}$$

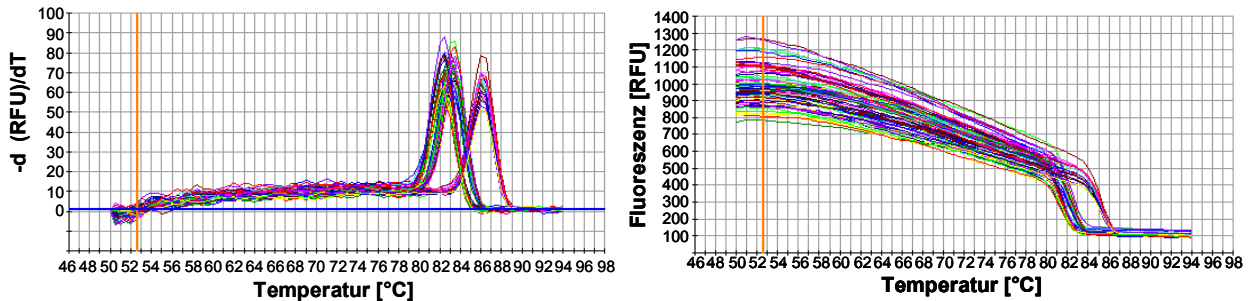
Der Fehler der relativen Expression errechnet sich dann wie folgt:

$$\Delta E_r = \sqrt{\left( \frac{1}{2^{\frac{P_{\Delta CT}}{E_r}} \cdot \Delta P_{\Delta CT}} \right)^2 + \left( \frac{1}{2^{\frac{K_{\Delta CT}}{E_r}} \cdot \Delta K_{\Delta CT}} \right)^2} \quad \Delta P_{\Delta CT} \text{ und } \Delta K_{\Delta CT} \text{ sind Standardabweichungen von } P_{\Delta CT} \text{ und } K_{\Delta CT} \quad \text{Formel 3}$$

### 3.5.3 Erstellung der Schmelzkurve

Anhand der Schmelzkurve (Abb. 6) lässt sich die Anzahl und die Qualität der während der RTQ-PCR entstandenen Produkte verifizieren. Hierfür werden die Reaktionsansätze im Anschluss an den RTQ-PCR Lauf graduell (hier 0,5 °C/Zyklus; von 50 auf 98 °C) erhitzt und die Abnahme der Fluoreszenz pro Zyklus ermittelt. Sobald sich die doppelsträngigen PCR-Produkte eines jeden untersuchten Gens bei ihrer spezifischen  $T_M$  trennen, fällt die Fluoreszenz schlagartig ab. So lässt sich feststellen, ob die Synthese der PCR-Produkte

spezifisch (ein definiertes Produkt) oder unspezifisch erfolgt ist (z.B. Primerdimerisierung etc.). Dies lässt sich auch als Funktion  $\Delta\text{RFU}/\Delta\text{Temp}$  vs. die Temperatur darstellen (Abb. 6), wodurch man einen Peak des jeweiligen Schmelzpunktes erhält.



**Abb. 6:** Beispiel einer Schmelzkurve aus der RTQ-PCR: **Links:** Darstellung als Funktion  $\Delta\text{RFU}/\Delta\text{Temp}$  vs. die Temperatur. **Rechts:** Abnahme der Fluoreszenz mit zunehmender Temperatur. Anhand der Schmelzkurven lassen sich zwei spezifische PCR-Produkte identifizieren, die je ein untersuchtes Gen repräsentieren.

### 3.6 GELELEKTROPHORESE

Die Gelelektrophorese erlaubt es Nukleinsäuren verschiedener Größen aufzutrennen und durch anschließendes Färben nachzuweisen. Grundlage ist eine poröse Matrix (hier Agarose), welche die Durchlaufgeschwindigkeit der Fragmente entsprechend ihrer physikalischen Eigenschaften und Nettoladung unterschiedlich beeinflusst. Die Laufgeschwindigkeit der Nukleinsäurefragmente ist reziprok proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes (HELLING *et al.*, 1974; MCDONELL und STUDIER, 1977). Zur Größenbestimmung der einzelnen Fragmente dient ein sogenannter Molekulargewichtsstandard (2.1), ein Gemisch verschiedener DNA-Fragmente bekannter Größe.

#### 3.6.1 Gelherstellung

Standardmäßig wurde für Fragmente  $>500$  bp ein 1 %iges, für Fragmente  $<500$  bp ein 2 %iges Agarosegel (w/v) verwendet. Die Agarose wurde mit der entsprechenden Menge an Laufpuffer versetzt, aufgeköcht und das Gel gegossen. Die Proben und der Marker wurden mit dem Probenpuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die angelegte Spannung betrug 10 V/cm Gel. Anhand der Bromphenolblau-Front des Ladepuffers (entspricht der Größe eines Nukleinsäurefragmentes mit 500 bp) wurde die Migration der DNA im Gel verfolgt.

Die verwendeten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

**Laufpuffer 1 x TBE:**

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

**6 x Probenpuffer:**

1 Kristall Bromphenolblau  
40 % (w/v) Saccharose  
in *Aqua bidest.*

### 3.6.2 Gelfärbung

Die während der Gelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäurefragmente können durch eine Färbung, z.B. mit Ethidiumbromid, sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde dafür 10 - 15 min (je nach Geldicke) in eine Ethidiumbromidlösung (2 mg/l in *Aqua bidest.*) gelegt. Ethidiumbromid interkaliert die Basenpaare doppelsträngiger DNA. Durch anschließende Anregung des Ethidiumbromids mit UV-Licht fluoreszieren die Banden mit einer Wellenlänge von ca. 590 nm. Mit einem Geldokumentationssystem (2.3) konnte diese fotografiert werden. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz proportional zur Konzentration der DNA im Gel. Anhand der Bandenstärke des Markers wurde die Menge an aufgetragener DNA abgeschätzt.

## 3.7 DNA-AUFREINIGUNG

### 3.7.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Durch PCR erzeugte DNA-Fragmente wurden vor ihrer weiteren Verwendung grundsätzlich aufgereinigt. Dies entfernt die Kontamination durch unverbrauchte dNTPs und Primer. Des Weiteren werden DNA-Fragmente <100 bp (z.B. Primerdimere) entfernt. Die entsprechenden PCR-Ansätze wurden zunächst in einem Agarosegel aufgetrennt und gefärbt (3.6). Unter UV-Licht wurden die relevanten Banden ausgeschnitten und mit dem „NucleoSpin Extract II PCR Kit“ (2.5) laut Herstellerprotokoll aufgereinigt. Das Elutionsvolumen wurde entsprechend der weiteren Verwendung individuell angepasst und betrug zwischen 20 und 40 µl. Alternativ wurden PCR-Ansätze direkt aus dem Reaktionsansatz aufgereinigt, wenn zuvor mittels Gelelektrophorese sichergestellt wurde, dass nur ein spezifisches Produkt amplifiziert wurde.

### 3.7.2 Plasmidaufreinigung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus einer gesättigten Bakterienkultur wurde das „NucleoSpin Extrakt Plasmid Kit“ (2.5) verwendet, welcher auf einer alkalischen Lyse der

Zellen basiert. Nach diesem Aufschluss der Wirtszelle wurde die bakterielle RNA durch Zugabe von RNase H verdaut. Störende Zellfragmente und Proteine wurden präzipitiert und durch Zentrifugation entfernt, bevor die Bindung der DNA unter chaotropen Bedingungen (Guanidinhydrochlorid) an die in den Filtrationsgefäßen enthaltene Glasfasermatrix erfolgte. Durch eine Reihe kurzer Wasch- und Zentrifugationsschritte wurde die Plasmid-DNA von störenden Bakterienbestandteilen gereinigt und konnte nach Elution direkt weiterverwendet werden. Dies ermöglichte Isolierungen von bis zu 15 µg an Plasmid-DNA pro Ansatz.

### 3.8 RESTRIKTIONSVERDAU

Restriktionsenzyme erkennen spezifische Basenabfolgen (z.B. Palindrome) innerhalb von DNA-Molekülen und „zerschneiden“ sie an diesen Stellen, indem sie die Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleotiden hydrolysieren. Dies erlaubt eine vielseitige Verwendung, indem z.B. PCR-Produkte, die mit solchen Restriktionsschnittstellen versehen wurden, gerichtet in Vektoren, die mit denselben Enzymen geschnitten wurden, kloniert werden können (3.9). Umgekehrt zeigt ein Restriktionsverdau von bereits transformierten Plasmiden, ob eine Ligation erfolgreich war, und durch Verwendung eines Enzyms innerhalb der Zielsequenz und innerhalb der MCS des Vektors, wie das Gen im Vektor orientiert ist. Je nach Vektor unterscheiden sich sowohl die Restriktionsenzyme als auch die Anzahl von möglichen Schnittstellen. Für die hier verwendeten Vektoren eignete sich folgender Ansatz:

6	µl	zu schneidende DNA (ca. 100 ng)
1,5	µl	10x Enzympuffer oder 10x OPA-Puffer
1	µl	Restriktionsenzym 1
1	µl	Restriktionsenzym 2
4,5	µl	<i>Aqua bidest.</i>

Die verwendeten Restriktionsenzyme richteten sich nach den Vektorspezifikationen der Hersteller (2.6) und der Nukleotidsequenz der zu klonierenden DNA-Fragmente. Der Restriktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend aufgereinigt (3.7.1). Wurde ein Plasmid zur Überprüfung eines Inserts restringiert, erfolgte eine unmittelbare Gelelektrophorese ohne Aufreinigung.

### 3.9 LIGATION UND KLONIERUNG

Zur Insertion eines DNA-Fragments in einen linearisierten Vektor wurde ein Ligationsansatz mit dem Vektor und dem Fragment erstellt. Diese Ligation wurde durch eine aus dem T4-



Phagen gewonnene DNA-Ligase katalysiert. Das Enzym bewirkt die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei DNA-Ketten durch Verknüpfung einer freien OH-Gruppe am 3'-Ende der einen DNA-Kette und einer Phosphatgruppe am 5'-Ende der anderen. In der Ligation vorangeschalteten PCR wird an das 3'-Ende des jeweiligen cDNA-Stranges durch die Taq-DNA-Polymerase ein einzelnes Adenosin angehängt (CLARK, 1988). Aus diesem Grund bietet sich zur Ligation ein Vektor an, der an den jeweiligen Enden ein komplementäres Thymin enthält (so genannte **T-A-Ligation**). Die Verknüpfung durch solche kohäsiven Enden ist spezifischer, obwohl die Orientierung des Fragments im Vektor nicht vorhergesagt werden kann.

Um eine **gerichtete Klonierung** vorzunehmen, wurden mit Hilfe von Primern (denen Restriktionsschnittstellen angefügt wurden) PCR Fragmente erzeugt und diese mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut (3.8). Der Zielvektor wurde ebenfalls mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten. Nach Aufreinigung der geschnittenen PCR-Produkte bzw. des Vektors wurden beide Moleküle durch Ligation miteinander verknüpft. Diese Methode wendet man hauptsächlich für die Expression (3.16) an, welche eine *in-frame* Orientierung des PCR-Produkts erfordert.

Die **TOPO-TA-Klonierung** stellt die schnellste Methode zur Ligation eines PCR-Produktes in einen Vektor dar. Anstelle einer Ligase wird ein mit *Vaccinia* Topoisomerase I aktivierter Vektor verwendet. Die Topoisomerase erkennt die Schnittstelle (C/T)CCTT, schneidet die DNA und bleibt über eine 3'-Phosphotyrosyl-Bindung kovalent gebunden. Der Vektor besitzt zwei benachbarte Schnittstellen, die die Topoisomerase blockieren, um eine Selbstligation zu verhindern. Die Topoisomerase wird durch die Verknüpfung des freien 3'-Adenosins des PCR-Produkts mit dem Thyminüberhang des Vektors freigesetzt.

Reaktionsansätze der verschiedenen eingesetzten Systeme:

<b>T-A-Ligation</b>	<b>Gerichtete Klonierung</b>	<b>TOPO-TA-Klonierung</b>
10 µl 2 x Ligasepuffer	10 µl 2 x Ligasepuffer	4,5 µl gereinigtes PCR-Produkt
1 µl pGEM-T-Vektor	1 µl geschnittener Vektor	0,5 µl TOPO-TA-Vektor
8 µl gereinigtes PCR-Produkt	8 µl geschnittenes PCR-Produkt	
1 µl T4-DNA-Ligase	1 µl T4-DNA-Ligase	

Für die T-A-Ligation bzw. die gerichtete Klonierung wurden die aufgeführten Komponenten in der angegebenen Reihenfolge in einem Reaktionsgefäß gemischt und anschließend 30 Min bei RT inkubiert. Bei der TOPO-TA-Klonierung wurde das aufgereinigte PCR-Fragment zum Vektor gegeben und 5 Min bei RT inkubiert. Alle Ansätze konnten ohne Weiterbehandlung für die Transformation (3.10.2) verwendet werden.

### 3.10 TRANSFORMATION

Als Transformation bezeichnet man die genetische Veränderung eines kompetenten Bakteriums durch die Aufnahme von DNA (HANAHAH 1983; CYPIONKA 1999). Ist das Plasmid erfolgreich in die Bakterienwirtszelle eingeschleust, wird es durch Replikation vervielfältigt. Bakterien sind von Natur aus in der Lage, DNA-Moleküle aus der Umgebung in geringem Maße aufzunehmen. Um jedoch die Effizienz der Transformation zu erhöhen, bedient man sich sogenannter kompetenter Zellen, welche durch physikalische und chemische Behandlung (3.10.1) in der Lage sind, Plasmide leichter aufzunehmen.

#### 3.10.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Unabhängig vom Bakterienstamm (2.8) ist es für die Transformation notwendig, dass die Rezipientenzelle auf die Einschleusung des Plasmids vorbereitet wird. Die Bakterien erfahren dabei eine chemische Behandlung, welche die Beschaffenheit der Zellmembran beeinflusst. Voraussetzung der Plasmidaufnahme ist ein Hitzeschock, der die Membranporosität so weit erhöht, dass die Fremd-DNA diese durchdringen kann.

Die kompetenten Bakterien zur Transformation eines Ligationsansatzes wurden käuflich erworben (2.8), aber für Plasmidtransformationen nach eigenem Protokoll hergestellt. Zu diesem Zweck wurde von der entsprechenden *E. coli* Übernachtskultur eine Tageskultur angesetzt und diese nach Erreichen einer  $OD_{600} = 0,6$  bei 4 °C und 4500 x g abzentrifugiert. Auf Eis wurde das Pellet in 1 ml 50 mM  $CaCl_2$  durch Pipettieren gelöst. Nach Zugabe von 9 ml 50 mM  $CaCl_2$  wurde invertiert und 5 Min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 4000 x g wurde das flockige Pellet in 1 ml 20 % Glycerin in 50 mM  $CaCl_2$  auf Eis resuspendiert und zu je 100 µl in vorgekühlte 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Bakterien wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 3.10.2 Transformationsansatz

Bei den käuflich erworbenen kompetenten Zellen unterscheiden sich, je nach Hersteller (2.8), die Protokolle zur Transformation bezüglich der Inkubationsdauer auf Eis und beim Hitzeschock. Generell wurde ein Aliquot kompetenter Bakterien von -80 °C auf Eis überführt und für 5 min aufgetaut. Ein vollständiger Ligationsansatz (3.9) bzw. 1 ng Plasmid wurde zu den Zellen hinzugegeben und 15-30 Min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 30-120 sec bei 42 °C wurden die Bakterien erneut für 2 min auf Eis gestellt. 250 µl auf RT äquilibriertes SOC-Medium wurde zugegeben und 45 Min bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

150 µl des Ansatzes wurden auf einer entsprechenden Selektionsplatte (3.10.3) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.10.3 Selektion der transformierten Bakterien (Blau-Weiß-Selektion)

Nur ein geringer Anteil der Bakterien wird durch die Fremd-DNA transformiert, und es ist notwendig, die transformierten von den übrigen Zellen zu trennen. Die hier verwendeten Vektoren (bis auf pTrcHis und pTrcHis2) enthalten zusätzlich zu den Antibiotikaresistenzgenen auch das Gen der  $\beta$ -Galactosidase des LacZ-Gens in der *multiple cloning site* des Vektors. In den Selektionsplatten ist X-Gal enthalten, ein Substrat der  $\beta$ -Galactosidase, welche dieses zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Der Induktor, vektorabhängig, induziert die Expression des LacZ-Gens. Innerhalb dieses Gens befindet sich die Insertionsstelle des zu ligierenden PCR-Produkts. Wird ein solches eingefügt, verliert das Enzym die Fähigkeit, X-Gal umzusetzen (= Insertionsinaktivierung). Die resultierenden Kolonien auf den Selektionsplatten bleiben weiß. Da zusätzlich ein Antibiotikum verwendet wird, können sich nur solche Bakterien vermehren, die durch Plasmidtransformation eine Resistenz dagegen erworben haben. So kann man die weißen, inserttragenden Bakterienkolonien isolieren und vermehren.

#### Herstellung der Selektionsplatten

Zunächst wurde LB-Agar (2.9) autoklaviert und auf 56 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur konnten die entsprechenden Antibiotika (2.9) der Induktor (IPTG oder l-Arabinose) und das Substrat (X-Gal; 80 µg/ml, in DMF gelöst) zugegeben werden. Nach dem Ausgießen von ca. 25 ml dieses Mediums je Petrischale (Ø 85 mm) ließ man den Agar 30 min gelieren und lagerte die Platten bei 4 °C luftdicht verpackt, bis zur weiteren Verwendung.

### 3.11 SEQUENZIERUNG

Unter Sequenzierung versteht man die Bestimmung der Nukleotidreihenfolge innerhalb einer Nukleinsäurekette. Die hier verwendete Didesoxy-Methode wurde erstmals durch SANGER *et al.* (1977) vorgestellt. Grundlage ist die Unterbrechung der enzymatischen Replikation, in welcher das hier verwendete Enzym (DNA-Polymerase I) die Kopie einer unbekanntem Einzelstrang-DNA erzeugt. In der sogenannten Sequenzierreaktion (3.11.2) werden neben den herkömmlichen dNTPs auch Didesoxynukleotide eingebaut. Dabei handelt es sich um 2',3'-Didesoxyanaloga der dNTPs, welche zu einer Termination der Kettenreaktion führen. Da der

Einbau in die Nukleinsäurekette zufällig erfolgt, erhält man nach genügend Zyklen ein Gemisch aus Nukleotidfragmenten, die sich in ihrer Länge jeweils nur um ein Nukleotid unterscheiden. Durch gelelektrophoretische Auftrennung kann deren Abfolge anhand der Laufweite bestimmt werden. Zur Detektion der Banden bedient man sich entweder der Autoradiographie, oder – wie in dieser Arbeit – der Fluoreszenzdetektion. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt dabei kovalent an die eingesetzten Oligonukleotide (sogenannte *gelabelte* Primer). Um die vier Basen der DNA unterscheiden zu können, erstellt man vier unterschiedliche Reaktionsansätze, die nur jeweils eines der vier Didesoxynukleotide enthalten (3.11.2). Die Ansätze wurden anschließend in der Reihenfolge GATC aufs Gel aufgetragen. Die Laufweiten der Banden ergeben ein charakteristisches Leiternmuster, aus dem die Basenabfolge abgelesen werden kann. Im verwendeten System LI-COR 4200 (2.3) sind die Primer mit einem Infrarotfarbstoff (IR<sub>800</sub>) gekoppelt. Während ihrer elektrophoretischen Auftrennung werden die Produkte beim Passieren eines Lasers angeregt, wodurch sie Licht (790 nm) emittieren, das computergestützt erfasst wird. Mit Hilfe dieser Technik war es möglich, bis zu 1000 Basen pro Durchgang zu ermitteln.

### 3.11.1 Herstellung des Sequenziergels

Träger der Gelmatrix waren speziell angefertigte Glasplatten, die eine Laserdetektion bei IR<sub>800/700</sub> erlaubten. Zur Herstellung des hochauflösenden 6 %igen Polyacrylamidgels (Länge 41 cm; Dicke 0,25 mm) wurde das Zweikomponentensystem *Sequagel complete* verwendet (2.1). Komponente I (enthält Harnstoff, Acrylamid und Bis-Acrylamid) und Komponente II (enthält 5 x TBE und TEMED) wurden im Verhältnis 4:1 gemischt und mit 300 µl 10 %igem Ammoniumperoxodisulfat (APS) polymerisiert. Für ein solches Gel wurden 30 ml Polyacrylamidgel benötigt, das gleichmäßig zwischen die Glasplatten gegossen wurde. Ein Vorkamm sorgte für die Bildung der Geltaschen. Diese Matrix polymerisierte über einen Zeitraum von zwei Stunden aus.

### 3.11.2 Sequenzierreaktion (Cycle-Sequencing)

Eine Sequenzierreaktion enthält das zu sequenzierende Plasmid, den markierten Primer, dNTPs, die Polymerase und für jede Base das entsprechende ddNTP. In dieser Arbeit wurde das Thermo Sequenase Kit (2.5) verwendet, das alle Komponenten für je eins der ddNTP, bereitstellt und nur die Primer und das zu sequenzierende Plasmid zuzugeben sind. 1,5 µl der vier verschiedenen ddNTP-Ansätze wurden in ein separates 200 µl PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt und je 4,5 µl der Primer-Plasmidlösung (s. u.) hinzugegeben.

Die eigentliche Sequenzierreaktion gleicht einer Standard PCR (3.3.1), jedoch werden in diesem Fall einzelsträngige, primermarkierte Produkte unterschiedlicher Länge erzeugt. Anstelle genspezifischer Primer wird ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Vektorprimer (2.7.1) verwendet.

Für die Sequenzierung wurde folgender Standardansatz verwendet:

<b>Primer-Plasmid-Ansatz:</b>		<b>Cycle-Sequencing-Bedingungen:</b>	
5	µg Plasmid	1x	95 °C 5 min
x	µl <i>Aqua bidest.</i>		
1	µl 2 mM IR <sub>800</sub> gelabelter Primer	30 - 35x	{ 95 °C 30 sec T <sub>m</sub> 30 sec 72 °C 50 sec
1	µl 2 mM IR <sub>700</sub> gelabelter Primer		
20	µl Gesamtvolumen		

Zu den Ansätzen wurden nach der Reaktion 3 µl Ladepuffer (GE Healthcare) zugegeben und nochmals 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden bei dieser Temperatur dem Cycler entnommen und direkt auf Eis gestellt und anschließend aufs Sequenziergel aufgetragen oder bei -20 °C gelagert.

### 3.11.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese

Dem unter (3.11.1) hergestellten Gel wurde zunächst der Vorkamm entnommen und die ausgebildete Tasche von Gelresten befreit. Danach folgte ein ca. 45minütiger Vorlauf (1500 V), bei welchem das Gel auf 50 °C erwärmt und mit dem Laufpuffer äquilibriert wurde. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE (3.6) verwendet.

Nach dem Vorlauf wurde der Kamm (48 *well shark-tooth comb*) in die Geltasche eingesetzt und 1,3 µl der Proben in der Reihenfolge GATC auf das Gel pipettiert. Die Elektrophorese dauerte acht Stunden, und in der Regel konnten 800 Basen gelesen werden. Ein *Image-Analyse-Programm* (2.10) übersetzte die Banden automatisch in die Sequenz, welche jedoch manuell überprüft und korrigiert wurde.

### 3.11.4 Sequenzanalyse

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Gendatenbank BLAST verglichen (2.10). War eine Homologie zu bekannten Genen vorhanden, wurde die Sequenz computergestützt mit diesen verglichen (unter anderem Clustal X, DNA-Star, 2.10). Dadurch konnten Homologien in den Sequenzen und konservierte Domänen sichtbar gemacht werden.

### 3.12 HOMOLOGIESCREENING

Das Durchsuchen einer cDNA-Bank nach einem bestimmten Gen wird als Screening bezeichnet (BENTON und DAVIS, 1977). Voraussetzung ist eine markierte DNA-Sonde, die mit der Sequenz des gesuchten Gens hybridisieren kann. Ein Homologiescreening wird angewendet, wenn nur ein Teil der Zielsequenz bekannt ist und der Komplettklon aus der Bank isoliert werden soll. Zu diesem Zweck wird eine cDNA-Bibliothek auf einem Nährboden ausplattiert und ein Teil der entstandenen Phagenplaques (3.12.1) auf eine Nylonmembran transferiert. Durch Inkubation der Membran mit der denaturierten Sonde kann diese unter geeigneten Bedingungen mit den komplementären cDNAs der entsprechenden Plaques hybridisieren. Eine nachfolgende Farbreaktion mit einem gegen die markierten Sonden gerichteten Antikörper identifiziert die positiven Klone.

#### 3.12.1 Bestimmung des Phagentiters

Infiziert ein Phage ein Bakterium, wird dessen genetische Information in der Wirtszelle vermehrt, neue Phagenpartikel gebildet und die Lyse der Wirtszelle eingeleitet. Im Anschluss daran infizieren die freigesetzten Phagen ihrerseits die umliegenden Bakterien, und der Zyklus beginnt von neuem. Dieser Prozess lässt sich als Plaquebildung auf einem Bakterienrasen verfolgen. Die Auszählung dieser Plaques ermöglicht die Bestimmung des Phagentiters einer Suspension. Um sicher zu gehen, dass die gesamte genetische Information einer cDNA-Bank auf einer Screeningplatte vorhanden ist, muss der dafür notwendige Titer voneinander unabhängiger Phagen zunächst bestimmt werden. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe der Phagen-cDNA-Bank in SM-Puffer (3.12.3) angesetzt. 10 µl jeder Verdünnung wurden mit 100 µl Bakteriensuspension (3.12.2) versetzt und zur Anheftung der Phagen an die Bakterien für 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Suspension mit 3,5 ml auf 56 °C vorgewärmte *Top*-Agarose (2.9) vermischt und diese auf ebenfalls vorgewärmte (37 °C) LB-Agarplatten (2.9) gegossen. Nach einer Inkubation ü.N. bei 37 °C konnten die Plaques gezählt und die *plaques forming units* (pfu) pro Milliliter der Ursprungssuspension errechnet werden. Um sicherzugehen, dass ein Gen mit 99 %iger Wahrscheinlichkeit im Primärscreening (3.12.2) enthalten ist, wurde folgende auf der Poisson-Verteilung basierende Formel verwendet (CLARKE und CARBON, 1976):

$$N = \ln(1 - P) / \ln[1 - (F/G)]$$

Formel 4

N: Anzahl unabhängiger Klone  
P: Wahrscheinlichkeit, mit der die gesuchte Sequenz in der Anzahl von Klonen enthalten ist  
F: Durchschnittsgröße der im verwendeten Klonierungsvektor eingebauten DNA-Fragmente in Basenpaaren  
G: Gesamtgröße des untersuchten Genoms in Nukleotiden

Diese Formel bezieht sich auf das Screenen einer genomischen DNA-Bibliothek und wurde für eine cDNA-Bank entsprechend modifiziert. Anstelle der Gesamtgröße  $G$  wurde eine Schätzung über die Anzahl und durchschnittliche Größe der Gene einbezogen. Annahme waren  $1 \times 10^4$  Schwammgene mit einer durchschnittlichen Größe von 3 kb. Die Länge der klonierten Fragmente betrug in etwa 1,5 kb, was zu  $9,2 \times 10^4$  zu untersuchenden Klonen führte. Um Schätzfehler zu berücksichtigen, wurden nochmals 50 % zu dem errechneten Wert addiert, was zu  $1,84 \times 10^5$  zu untersuchenden Klonen führte.

### 3.12.2 Primärscreening

Wirt der cDNA-Bank von *Suberites domuncula* war eine XL1-blue Bakterienkultur, die in LB-Medium (2.9) mit 10 mM  $MgSO_4$  und 0,2 % Maltose über Nacht gezogen wurde. Vor der Infektion mit den Phagen, bei  $OD_{600}=0,5$ , erfolgte die Bestimmung des notwendigen Phagentiters (3.12.1). Das erste Phagenscreening wurde auf 21 x 21 cm LB-Agar-Platten durchgeführt, die vor dem Ausplattieren 1 h bei 37 °C äquilibrierten. 2 ml der Bakteriensuspension wurden zusammen mit 1,5  $\mu$ l Phagenlösung ( $\approx 1,5 \times 10^5$  Klone) bei 37 °C für 15 min inkubiert. 35 ml des auf 56 °C erwärmten Top-Agars wurden anschließend hinzugegeben, drei Mal invertiert und auf den LB-Agarplatten verteilt. Nach Erkalten des Top-Agars folgte eine 12-14 h dauernde Inkubation bei 37 °C. Dies führte zu einer nahezu vollständigen Lyse des Bakterienrasens durch  $\approx 1 \text{ mm}^2$  große Phagenplaques. Im Anschluss wurden die Platten mindestens 1 h bei 4 °C gelagert, um ein Anhaften der später aufgelegten Membran zu verhindern.

### 3.12.3 Phagentransfer und Detektion

Die Phagenplaques auf den Kulturplatten wurden durch Auflegen (ca. 1 min) einer positiv geladenen Hybond-N+-Membran (GE Healthcare) an diese gebunden. Nachfolgend wurde die Nylonmembran mit der phagenbehafteten Seite nach oben auf Filterpapier (Whatman 3 MM) jeweils für 7 min in die folgenden Lösungen gelegt:

1. Denaturierungslösung
2. Neutralisierungslösung
3. 2 x SSC

Zuerst erfolgte die Denaturierung der Phagen-DNA mit anschließender Neutralisierung des pH-Wertes. Die Behandlung mit 2 x SSC diente zur Äquilibrierung, um die erforderliche Salzkonzentration einzustellen. Unter UV-Bestrahlung ( $1200 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) wurde die Phagen-DNA im Cross-Linker irreversibel an die Nylonmembran gebunden. Dadurch wurden ihre Basen

zur Bindung an komplementäre Nukleinsäuremoleküle exponiert (BROWN, 1993). Im Anschluss eines zweistündigen Prähybridisierungsschrittes bei 42 °C folgte die Zugabe der Digoxigenin-markierten Sonde (5-25 ng/ml; 3.3.5), die vor der Zugabe in die Hybridisierungslösung (DIG-Easy-Hyb; 2.1) 5 min bei 95 °C denaturiert wurde. Über Nacht wurde die Membran mit dieser Sonden-Hybridisierungslösung bei 42 °C unter leichtem Schütteln in einem Wasserbad inkubiert. Überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde wurde am nächsten Tag in einer Reihe aufeinander folgender Waschschriffe entfernt: 2 x 10 min in 2 x SSC/0,1 % (w/v) SDS auf einem Schüttler bei RT, und 2 x 15 min in 0,1 x SSC/0,1 % (w/v) SDS in einem Wasserbad bei 58 °C. Nach einstündiger Inkubation der Membran in 1 x Blockierungsreagenz bei RT wurde die Lösung durch ein Gemisch aus 1 x Blockierungsreagenz mit Anti-DIG-Antikörper (1:10000; 2.4) für 30 min ersetzt. Nicht gebundener Antikörper wurde darauf durch zweimaliges Waschen über 15 min in P1/0,3 % Tween 20 (v/v) entfernt. Anschließend wurde die Membran in die Detektionslösung (45 µl/ml NBT und 35 µl/ml X-Phosphat in P3) gegeben. Die alkalische Phosphatase der Sonde setzte das darin enthaltene Substrat in einen dunkelvioletten Farbstoff um (BLAKE *et al.* 1984). Durch Vergleich dieser positiven Plaques mit denjenigen auf der Screeningplatte konnten die potentiellen Träger des gesuchten Gens identifiziert werden. Diese wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette aus dem Top-Agar isoliert und in 250 µl SM-Puffer und 30 µl Chloroform überführt. Über Nacht diffundierten die darin enthaltenen Phagen heraus, woraufhin deren Titer erneut bestimmt werden konnte (3.12.1).

Auflistung der hier verwendeten Medien:

#### **Denaturierungslösung**

200 mM NaOH  
1,5 M NaCl

#### **20 x SSC**

3 M NaCl  
300 mM Natriumcitrat, pH 7,0

#### **P1**

100 mM Maleinsäure  
150 mM NaCl

#### **P3**

100 mM Tris-HCl, pH 9,5  
100 mM NaCl

#### **Neutralisierungslösung**

400 mM Tris-HCl, pH 7,6  
1,5 M NaCl

#### **Hybridisierungslösung**

DIG-Easy-Hyb

#### **P2**

1 % (w/v) Blockingreagenz in P1  
zum Lösen unter Rühren erwärmen

#### **NBT-Stammlösung**

75 mg/ml in 70 % (v/v) N,N-Dimethylformamid



**SM-Puffer**

0,1 M NaCl  
80 mM MgSO<sub>4</sub>  
50 mM Tris-HCl, pH 8,0  
0,1 % (w/v) Gelatine

**X-Phosphat-Stammlösung**

50 mg/ml in 100 % N,N-Dimethylformamid

**3.12.4 Sekundärscreening**

Aufgrund der hohen Plaquedichte auf den Platten des Primärscreenings war es unmöglich, separate Klone zu isolieren. Deshalb wurde in einer weiteren Screeningrunde die Kontamination durch unerwünschte Phagen eliminiert. Die Vorgehensweise beim Sekundärscreening (2<sup>nd</sup> Screen) entsprach der in (3.12.2), wobei jedoch lediglich 400 - 500 der aus dem 1<sup>st</sup> Screen erhaltenen Phagen zu 250 µl Bakteriensuspension gegeben wurden. Weiterhin wurden nur 3 ml Top-Agarose eingesetzt und in Petrischalen (Ø 85 mm) ausplattiert. War die Plaquedichte auf den Screeningplatten erneut zu hoch, wurde das Screening nochmals mit geringerer Phagendichte (ca. 50) wiederholt. Man spricht dann von einem Tertiärscreening.

**3.13 IN VIVO-EXCISION**

Mit Hilfe des Homologiescreenings (3.12) ist es lediglich möglich, einen Phagenklon zu identifizieren, der die entsprechende cDNA innerhalb seines Phagenvektors (2.6) trägt. Die In vivo-Excision ermöglicht ein rasches Heraustrennen dieser cDNA-Sequenz (SHORT *et al.*, 1988). In dieser Arbeit wurde der *Rapid Excision* Kit verwendet (2.5), welcher mit Hilfe zweier Bakterienstämme (XPORT und XLOLR; 2.8) und des Helferphagen 704 (ExAssist; 2.8) die Zielsequenz aus dem ursprünglichen Vektor als Phagemid heraustrennt und damit den lambdaphagenresistenten Bakterienstamm XLOLR infiziert. Sowohl  $\lambda$ -Phage als auch Helferphage co-replizieren sich durch Infektion des XPORT Bakterienstamms. Der Helferphage synthetisiert jedoch ein bestimmtes Protein, welches die im  $\lambda$ -Phagen enthaltene Zielsequenz als einzelsträngiges Phagemid repliziert (Excision). Durch Lyse der XPORT-Zellen wird u.a. auch dieses Phagemid freigesetzt, und es ist in der Lage, den zweiten Bakterienstamm XLOLR zu transformieren. Dieser ist sowohl dem  $\lambda$ -Phagen als auch dem Helferphagen gegenüber resistent. Das Phagemid kann in ihm als Plasmid repliziert werden. Bei diesen Bakterien erfolgt keine Lyse, und ein LB-Nährmedium (2.9) kann damit inokuliert werden. Durch Zugabe entsprechender Antibiotika vermehren sich weiterhin nur XPORT Zellen, die durch Aufnahme des Phagemids eine Resistenz erworben haben. Nach dieser selektiven Amplifizierung konnte das Plasmid aufgereinigt werden (3.7.2).

**Durchführung:**

Zur Excision wurde zunächst eine Übernachtskultur von XPORT-Zellen in NZY-Medium (2.9) und XLOLR-Zellen in LB-Medium (2.9) bis zu einer  $OD_{600} \approx 1$  gezogen. 1  $\mu$ l der beim Sekundärscreening (3.12.4) isolierten  $\lambda$ -Phagen ( $\approx 10$ -10000 pfu) wurde mit 100  $\mu$ l XPORT-Zellen vermischt und mit 10  $\mu$ l Helferphagen ( $10^8$  pfu/ml) infiziert. Nach Zugabe von 10  $\mu$ l XLOLR-Zellen wurde die Suspension mit 3 ml NZY-Top-Agar (2.9) versetzt, 3 x invertiert und auf  $\varnothing$  85 mm NZY-Agarplatten (2.9) verteilt. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C. Anschließend inokulierte man ein LB-Medium (2.9) mit Abstrichen der positiven Plaques. Nachdem die Kultur für ca. 2 h bei 37 °C inkubiert worden war, wurde dem Medium 10 mg/ml Kanamycin zugesetzt, um die plasmidtragenden XPORT-Zellen mit entsprechender Resistenz selektiv zu amplifizieren. Anschließend konnten die Plasmide gemäß (3.7.2) aufgereinigt werden.

**3.14 ISOLIERUNG DER SCHWAMM-RNA**

Generell gilt bei Arbeiten mit RNA, dass alle Materialien und Flächen frei von Nukleasen (v.a. RNasen) zu halten sind. Deswegen wurden sie, sofern möglich, bei 180 °C sterilisiert oder mit *RNase Away* (2.1) behandelt. Lösungen wurden mit Diethyl-Pyrocbonat (DEPC 1 ml/L) versetzt und anschließend autoklaviert.

Zur Isolierung der Schwamm-RNA wurde ca. 1 g Schwammgewebe herangezogen, welches direkt dem Organismus entnommen wurde. Dieses wurde in mehrere Schichten Alufolie gewickelt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und durch Hämmern grob zerkleinert. Diesem Schritt folgte eine Homogenisierung des Gewebes in einem mit Flüssigstickstoff vorgekühlten Mörser. Während des gesamten Vorgangs wurde ein Auftauen durch ständige Zugabe von Flüssigstickstoff verhindert. Das pulverisierte Material wurde in ein 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt, mit 6 ml TRI<sup>®</sup>zol überschichtet und gründlich gevortext. Das weitere Vorgehen zur Separierung der RNA von den restlichen Zellbestandteilen und deren Fällung entsprach dem Herstellerprotokoll des TRI<sup>®</sup>zol-Reagens (2.1). Die resultierenden RNA-Pellets einer Probe wurden in 50  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen, vereint und deren Konzentration vor weiterer Verwendung bestimmt (3.14.1).

**3.14.1 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Nach

entsprechender Verdünnung der Nukleinsäurelösung wurde deren Extinktion ermittelt und die Konzentration nach AUSUBEL *et al.* (1994) errechnet.

Die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten sind wie folgt:

Extinktionskoeffizient doppelsträngiger	DNA	( $\mu\text{g/ml}$ ):	$50 \times \text{OD}_{260}$
Extinktionskoeffizient einzelsträngiger	DNA	( $\mu\text{g/ml}$ ):	$37 \times \text{OD}_{260}$
Extinktionskoeffizient einzelsträngiger	RNA	( $\mu\text{g/ml}$ ):	$40 \times \text{OD}_{260}$

### 3.14.2 Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Reinheit von Nukleinsäuren wird der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und 280 nm errechnet. Dabei gilt für reine DNA bzw. RNA ein Verhältnis von  $A_{260}/A_{280}$  mit ca. 1,8 - 2,0 bzw. 1,9 - 2,0 (BROWN, 1993). Nicht vollständig entfernte Phenolreste und Proteine, die unter anderem aus aromatischen Aminosäuren aufgebaut sind, absorbieren ebenfalls bei 280 nm und stellen so Kontaminationen dar, die durch obigen Quotienten herausgerechnet werden.

## 3.15 NORTHERN TRANSFER

Der Northern Transfer stellt eine weitere Methode der Nukleinsäurebestimmung dar. Dabei werden in einem Agarosegel aufgetrennte RNA-Moleküle auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert, immobilisiert und fixiert (ALWINE *et al.*, 1977). Die Namensgebung ist eine scherzhafte Anlehnung an die von E. M. SOUTHERN entwickelte analoge Methode zur Bestimmung von DNA. Ähnlich dem Homologiescreening (3.12) wird dabei eine markierte DNA-Sonde (3.3.5) verwendet, die mit der Zielsequenz hybridisiert. Das gesuchte Fragment kann in einer nachgeschalteten Reaktion (z.B. durch Chemilumineszenz) visualisiert werden. Mittels dieser Technik ist es möglich, Nukleinsäuren im Nanogrammbereich zu detektieren und zu identifizieren (LI *et al.*, 1987). Hauptsächlich wird diese Methode zur Identifikation und Größenbestätigung von Transkripten verwendet.

### 3.15.1 Analytische RNA-Gele

Im Prinzip gleicht die Auftrennung von RNA-Fragmenten in einem Agarosegel der von DNA (3.6). Der Lauf findet lediglich in speziell gereinigten Laufkammern unter Verwendung anderer Puffer (s.u.) statt. Zunächst wurden 0,5 g Agarose in 5 ml 10 x MOPS und 42,3 ml DEPC-H<sub>2</sub>O aufgekocht und nach Abkühlen auf 50 °C 2,7 ml 37 %iges deionisiertes Formaldehyd zugegeben (Verpuffungsgefahr) und das Gel gegossen. 5  $\mu\text{g}$  der zu analysierenden RNA bzw. 100 ng des RNA-Markers wurden im Verhältnis 1:4 mit

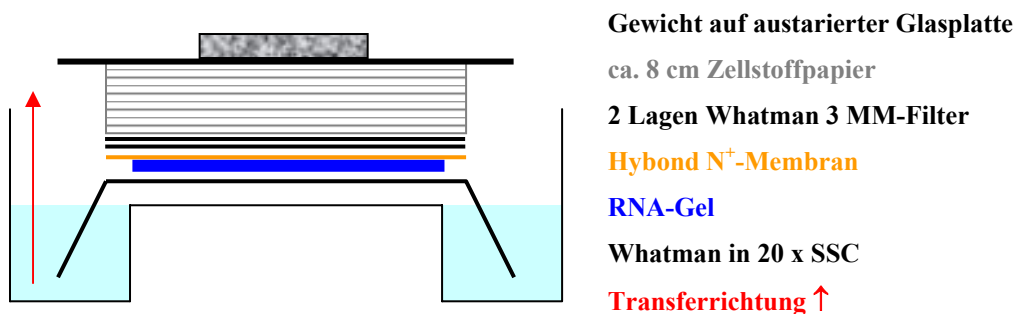
Probenpuffer versetzt, 15 min bei 65 °C denaturiert und nach Abkühlen auf Eis in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 3 V/cm<sup>2</sup> Gelfläche in 1 x MOPS als Laufpuffer.

Eingesetzte Pufferlösungen:

<b>Probenpuffer</b>	<b>10 x MOPS Puffer</b>
45,5 % (v/v) deionisiertes Formamid	0,2 M N-Morpholinopropan-sulfonsäure
15 % (v/v) deionisiertes Formaldehyd	0,05 M Natriumacetat, pH 7,0
10 % (v/v) 10 x MOPS	0,01 M EDTA
10 % (v/v) Glycerol	in DEPC-H <sub>2</sub> O
0,1 % (w/v) Bromphenolblau	

### 3.15.2 Northern-Transfer

Der eigentliche Transfer der aufgetrennten RNA auf eine Nylonmembran erfolgte kapillar über Nacht (Abb. 7). Das Gel wurde mit den Taschenöffnungen nach unten auf Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt, welches wiederum in die mit 20 x SSC gefüllten Reservoirs reichte. Auf das Gel platzierte man die Nylonmembran, gefolgt von 2 Lagen Whatman 3MM-Filter und ca. 8 cm Zellstoffpapier. Der dadurch entstandene kapillare Sog transferierte die RNA vom Gel zur Membran. Zur Erhöhung des Drucks wurde die Zellstoffschicht zusätzlich mit einer beschwerten, austarierten Glasplatte abgedeckt. Die gesamte Apparatur wurde mit Frischhaltefolie umwickelt, um die Evaporation des 20 x SSCs zu minimieren.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Northern-Blots. Das Gel wurde auf ein in 20 x SSC getauchtes Whatman 3MM-Filterpapier gelegt und mit der Nylonmembran bedeckt. Diese wird durch zwei Lagen Whatman 3MM-Filter von einem ca. 8 cm hohen Stapel aus Zellstoffpapier getrennt, welcher zusätzlich beschwert wurde. Der kapillare Sog transferierte die RNA vom Gel auf die Membran.

Am Folgetag wurde die Membran entnommen, die RNA unter einem UV-Crosslinker (2.3; 1200 mJ/cm<sup>2</sup>) irreversibel an die Membran gebunden und in vorgewärmter Prähybridisierlösung (1 ml/5cm<sup>2</sup>, 2 h, 42 °C) inkubiert. Die DIG-markierte DNA-Sonde (3.3.5) wurde 10 min bei 95 °C denaturiert und zur Prähybridisierlösung (*DIG-Easy-Hyb*, 2.1) zugegeben (2 µl/ml). Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 42 °C, nach welcher die Membran 2 x 5

min in 2 x SSC/0,1 % SDS (w/v) bei RT und 2 x 15 min bei 42 °C in 0,1 x SSC/0,1 % SDS (w/v) gewaschen wurde. Im Anschluss wurde die Membran kurz in P1 (3.12.3) äquilibriert, 30 min in P2 (3.12.3) geblockt und mit 1:10000 in P2 verdünntem Anti-Digoxigenin-Antikörper (2.4; gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) für 30 min inkubiert. Zwei Waschschritte von je 15 min in P1/0,1 % Tween 20 (v/v) entfernten ungebundene Antikörper, und die Detektion konnte nach einer Äquilibrierung 5 min in P3 (3.12.3) beginnen.

*CDP-Star*, ein 1,2-Dioxethan-Chemilumineszenz-Enzymsubstrat, ist für die Detektion von Konjugaten der Alkalischen Phosphatase, wie sie im Northern-Transfer verwendet werden, geeignet (BECK und KOESTER, 1990). Bei dieser enzymatischen Reaktion entsteht ein metastabiles Dioxethan Phenolat-Anion, welches bei Zerfall Licht emittiert. Durch Belichtung eines Röntgenfilms ist dieses visualisierbar. Zur Detektion wurden die Transfermembranen mit *CDP-Star* gleichmäßig beträufelt und nach 5 min in Folie eingeschweißt. In der Dunkelkammer wurden Röntgenfilmstücke mit variabler Expositionszeit (1-240 min), je nach Stärke des Signals, den Membranen aufgelegt und anschließend entwickelt.

Die auf die Membran transferierte RNA konnte optional im Anschluss durch Färbung mit Methylblau (0,02 % w/v in 0,05 M Natriumacetat pH 5,2) visualisiert werden. Dazu wurde sie 10 min mit der Methylblaulösung inkubiert und anschließend mit *Aqua. dest.* entfärbt, bis die Nukleinsäurebanden deutlich zu erkennen waren.

### 3.16 EXPRESSION REKOMBINANTER PROTEINE IN PROKARYOTEN

Neu identifizierte Gene lassen sich gezielt in Vektoren klonieren, die z.B. in Prokaryoten durch geeignete Promotoren die entsprechenden Proteine *in vivo* exprimieren. Die Besonderheit der verwendeten Vektoren liegt darin, dass sie z.B. ans C-terminale Ende des Proteins 6 Histidinreste anfügen (6 x His-tag), die eine spätere Aufreinigung über Affinitätschromatographie erlauben. Weiterhin unterscheiden sich die Vektoren bezüglich ihrer Regulierungsmöglichkeiten und der synthetisierten Proteinmenge. Vektoren (z.B. pBAD) mit streng regulierten Promotoren schalten die Expression erst nach Zugabe des entsprechenden Induktors an und stellen geringe Mengen an Protein her (man spricht von *tight* regulierten Vektoren). Der Vorteil ist, dass die resultierenden Proteine meist löslich und damit funktionell aktiv bleiben (LEE 1980; LEE *et al.* 1987), während bei hochexprimierenden Vektoren (z.B. pTrcHis2) eine Basalexpression auch ohne Zugabe des entsprechenden Induktors erfolgt (man bezeichnet diese als *leaky*). Dies führt unter Umständen zu großen Mengen an Protein, die dann in *inclusion-bodies* in unlöslicher, inaktiver Form innerhalb der

Bakterien gespeichert werden. Die hier hergestellten Proteine ließen sich aus lysierten Zellen mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufreinigen.

### 3.16.1 Herstellung der Expressionsklone

Das zu exprimierende Gen wurde aus der über RT-PCR (3.3.6) erhaltenen *S. domuncula*-cDNA mittels PCR (3.3.1) unter Verwendung genspezifischer Primer und einer *proof-reading* Polymerase (die ein freies 3'-Adenosin anknüpft) amplifiziert. Bei Verwendung eines TOPO-Vektors konnte das resultierende Fragment nach Aufreinigung (3.7.1) direkt für die Ligation (3.9) verwendet werden. Wurden Primer mit spezifischen Restriktionsschnittstellen (2.7.3.1) eingesetzt, wurde eine *proof-reading* Polymerase ohne terminale Transferaseaktivität gewählt. Die resultierenden Produkte sowie der dafür vorgesehene Vektor wurden mit den respektiven Endonukleasen geschnitten (3.8), aufgereinigt (3.7) und beide anschließend miteinander ligiert (3.9). Der Ligationsansatz wurde zunächst, unabhängig vom Vektortyp, in den Expressionshost transformiert (3.10.2) und auf Selektionsplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei den TOPO-Vektoren wurde mittels Kolonie-PCR (3.3.2) sowohl die Größe als auch die Orientierung der Inserts im Vektor überprüft. Alle in Frage kommenden Expressionsklone wurden mittels Sequenzierung (3.11) auf den Erhalt, Vollständigkeit und Korrektheit des Leserasters überprüft.

### 3.16.2 Expression des rekombinanten Proteins

Nachdem sichergestellt wurde, dass die Transformation mit einem Expressionsklon erfolgreich war (3.16.1), wurde aus der entsprechenden Bakterienvorkultur 200 ml LB/Carbenicillin (2.9) angeimpft und nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 mit dem entsprechenden Induktor (IPTG od. l-Arabinose) über Nacht auf einem Schüttler bei 37 °C/250 rpm induziert. Durch anschließende Zentrifugation (4000 x g/4 °C) wurden die Bakterien pellettiert.

### 3.16.3 Aufreinigung der Expressionsproteine

Im verwendeten Aufreinigungssystem (*QIAexpress-Expression-System 5<sup>th</sup> Edition*; 2.5) werden die rekombinant erzeugten Proteine an immobilisierte Ni<sup>2+</sup>-Ionen, die zusammen mit NTA (*Nitrilotriaceticacid*) einen Chelatkomplex ausbilden (HOCHULI *et al.* 1987), gebunden. Dieser ist an Agarose gekoppelt und stellt das Säulenmaterial dar. Daran gebundene His-Tag-Proteine können durch Absenken des pH-Wertes (Protonierung der Histidinreste), Zugabe von

Imidazol (konkurriert mit den Ni<sup>2+</sup>-Bindungsstellen des Ni-NTA) oder EGTA/EDTA (komplexiert die Ni<sup>2+</sup>-Ionen) von der Matrix abgelöst werden. Je nach Verwendung der Proteine wurde eine Extraktion unter nativen oder denaturierenden Bedingungen durchgeführt.

### 3.16.3.1 Extraktion unter nativen Bedingungen

Mit dieser Methode erhält man die Proteine, sofern es sich um lösliche Proteine handelt, in ihrer aktiven Form, um z.B. Enzymtests (3.25.3) durchzuführen. Abweichend vom Herstellerprotokoll (*QIAexpress-Expression-System 5<sup>th</sup> Edition*; 2.5) wurde das Bakterienpellet aus (3.16.2) in 6 ml Lysepuffer (BugBuster<sup>®</sup> + Benzonase + PI, s. u.) resuspendiert und 2 h bei 4 °C auf einem Schwapper lysiert. Die im Lysepuffer enthaltene Benzonase degradiert die DNA, während die Proteine durch Proteinaseinhibitoren geschützt werden. Der Zelldebris des Lysats wird durch 20 min Zentrifugation bei 10000 x g, 4 °C entfernt und dem Überstand Imidazol (10 mM Endkonzentration) zugegeben. 0,5 ml Ni-NTA-Agarose/4 ml Lysat wurde vor Verwendung 1 min bei 500 x g abzentrifugiert und dem Proteinüberstand beigemischt. Diese Suspension wurde 2 h bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4 °C auf einem Rotor, gemischt. Nach Beladen einer 5 ml Siebsäule folgten zwei kurze Waschschriffe (Waschpuffer s. u.), worauf die Proteine mit Elutionspuffer (s. u.) 2 x eluiert und die Ni-NTA-Agarose mit 250 µl 125 mM EDTA gestrippt wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Proteinlösung bei 4 °C verwahrt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

<b>BugBuster<sup>®</sup>Lysepuffer pH 8</b>	<b>Waschpuffer pH 8</b>	<b>Elutionspuffer pH 8</b>
Benzonase 25 U/ml	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 Tablette PI <i>Complete-Mini</i>	300 mM NaCl	300 mM NaCl
pro 50 ml	20 mM Imidazol	250 mM Imidazol
10 mM Imidazol		

### 3.16.3.2 Extraktion unter denaturierenden Bedingungen

Ein großer Teil der Proteine wird von Bakterien in unlöslicher, inaktiver Form in membranumschlossenen *inclusion bodies* gespeichert. Um diese aufzuschließen, wurde das Zelldebris pellet aus (3.16.3.1) mit 4 ml Puffer B resuspendiert. Im Solubilisierungspuffer ist 8 M Harnstoff enthalten, welcher die *inclusion bodies* auflöst und das enthaltene Protein entfaltet. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C auf einem Rotor wurde das Zellmaterial erneut abzentrifugiert (10000 x g, 20 min, RT). Der Überstand wurde – wie in (3.16.3.1)

beschrieben – mit der entsprechenden Menge Ni-NTA-Agarose versetzt und 2 h bei RT auf einem Rotor gemischt. Gemäß Herstellerprotokoll (*QIAexpress-Expression-System 5<sup>th</sup> Edition* 2.5) wurde damit eine 5 ml Siebsäule beladen, 2 x mit Puffer C gewaschen, 1 x mit Puffer D und 1 x mit Puffer E eluiert. Im Anschluss wurde die Ni-NTA-Agarose mit 250 µl 125 mM EDTA gestrippt.

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

<b>Lyse-Puffer B</b>	<b>Waschpuffer C</b>	<b>Elutionspuffer D</b>	<b>Elutionspuffer E</b>
100 mM NaH <sub>2</sub> P <sub>4</sub>	100 mM NaH <sub>2</sub> P <sub>4</sub>	100 mM NaH <sub>2</sub> P <sub>4</sub>	100 mM NaH <sub>2</sub> P <sub>4</sub>
10 mM Tris/HCl	10 mM Tris/HCl	10 mM Tris/HCl	10 mM Tris/HCl
8 M Harnstoff	8 M Harnstoff	8 M Harnstoff	8 M Harnstoff
pH 8,0	pH 6,3	pH 5,9	pH 4,5

### 3.17 ISOLIERUNG VON PROTEINEN AUS SCHWAMMGeweBE

Ähnlich den Arbeiten mit RNA setzt die Extraktion von Proteinen gewisse Handlungsroutinen voraus. Ständige Kühlung, die Zugabe von Proteinaseinhibitoren (PI) und Verwendung denaturierender Agenzien (optional) verhinderte den Proteinabbau durch endogene Proteinasen.

Für den Proteinrohextrakt aus Schwammgewebe wurde ca. 1 g schockgefrorenes Gewebe in einem vorgekühlten Mörser pulverisiert und mit der gleichen Menge an PBS+PI homogenisiert. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurde das Zellmaterial durch Zentrifugation (20 min, 12000 x g, 4 °C) entfernt und die Proteinkonzentration des Überstandes nach Bradford bestimmt (3.18).

Zusammensetzung der verwendeten Puffer:

#### **PBS + PI-Puffer**

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 8,1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1 Tablette PI *Complete-Mini* pro 50 ml auf pH 7,2 einstellen.

#### **2 × Laemmli-Probenpuffer**

- 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 20 % Glycerol (v/v)
- 4 % SDS (w/v)
- 0,2 % Bromphenolblau (w/v)
- 10 % β-Mercaptoethanol (v/v)
- 2 % Triton X 100 (v/v)

### 3.18 BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde photometrisch nach BRADFORD (1976) bestimmt. Das verwendete Coomassie Brilliant-Blue R250 (Roti-Quant; 2.1) ändert je nach Ladung (anionisch, neutral, kationisch) seine Absorptionseigenschaften. Durch Bindung, vor allem an basische Aminosäuren, wird es in den anionischen Zustand überführt, welcher bei 595 nm gemessen werden kann.



Die Extinktion wurde in einem ELISA-Reader bestimmt. Hierfür wurden 150 µl des Proteinextrakts, bzw. 150 µl verschiedener, definierter BSA-Verdünnungen, in einer 96 *well* Platte mit 150 µl Roti-Quant (2.1) gemischt (Blindproben enthielten nur Puffer ohne Protein) und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Alle Messungen erfolgten in dreifacher Ausführung, aus denen der Mittelwert berechnet wurde. Anhand der BSA-Verdünnungsreihe wurde eine Eichgerade zur Bestimmung der Konzentration der Proteinextrakte erstellt.

### 3.19 SDS-POLYACRYLAMID-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine gemäß ihres Molekulargewichts aufgetrennt (LAEMMLI 1970). Das SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert die Proteine und lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an diese an. Dadurch erhalten sie eine negative Nettoladung, die proportional zu ihrem Molekulargewicht ist (WEBER und OSBORN, 1969). Eventuell über Disulfidbrücken kovalent gebundene Untereinheiten der Proteine werden durch die Zugabe von β-Mercaptoethanol abgetrennt.

Für die Proteinelektrophorese werden Polyacrylamidgele als Trennmatrix verwendet. Je nach Molekulargewicht wird der Prozentanteil des Acrylamid/Bisacrylamid-Gemischs im Gel verändert. Je höher das Molekulargewicht des Proteins, desto geringer ist das Acrylamidkonzentration. Für die hier untersuchten Proteine wurden 10 %ige Polyacrylamidgele verwendet (s. u.). Zur Herstellung der Gele und für den späteren vertikalen Gellauf wurde das Mini-Protean II System (2.3) eingesetzt. Die Polymerisation der Gellösung wurde durch die Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat gestartet und durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) beschleunigt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte diskontinuierlich, da auf das Trenngel ein niederprozentiges Sammelgel (5 %) aufgegossen wurde.

<b>Trenngel 10 %</b>	<b>Sammelgel 5 %</b>
2,5 ml 40 % (19:1) Acrylamidlösung	0,39 ml 40 % (19:1) Acrylamidlösung
3,35 ml H <sub>2</sub> O	2,16 ml H <sub>2</sub> O
2,5 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8	0,39 ml 1,0 M Tris/HCl pH 6,8
1,25 ml Glycerin	30 µl 10 % SDS
0,1 ml 10 % SDS	3 µl TEMED
8 µl TEMED	30 µl APS
100 µl APS	

Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden diese mit reduzierendem Probenpuffer (5:1, s. u.) gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Der verwendete *pre-stained* Proteinmarker

(2.1) konnte direkt aufgetragen werden. Die angelegte Stromstärke für den Gellauf betrug 40 mA pro Gel (7 cm x 8 cm x 1 mm).

**5 ×SDS-Probenpuffer**

0,25 M Tris-HCl, pH 6,8  
50 % Saccharose (w/v)  
10 % SDS (w/v)  
0,2 % Bromphenolblau (w/v)  
12,5 % β-Mercaptoethanol (v/v)

**SDS-Laufpuffer**

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 % SDS (w/v)

### 3.20 FÄRBUNG DER SDS-POLYACRYLAMIDGELE MIT COOMASSIE

Die Detektion der Proteine in Polyacrylamidgelen erfolgte mit Coomassie. Im „GelCode<sup>®</sup> Blue Stain reagent“ ist der Farbstoff Coomassie G-250 kolloidal gelöst, wodurch er in die Gelmatrix eindringt und spezifisch die darin enthaltenen Proteine färbt. Durch anschließendes Waschen (*Water wash Enhancement*<sup>™</sup>) wird nicht proteingebundenes Reagenz entfernt und die Gelmatrix erscheint farblos.

Nach dem Gellauf (3.19) wurde das in den Gelen befindliche SDS durch 10 minütiges Waschen in H<sub>2</sub>O entfernt und mit dem GelCode<sup>®</sup>-Reagenz 40 min inkubiert. Im Anschluss wurde so lange gewaschen, bis die blauen Proteinbanden deutlich auf der farblosen Gelmatrix zu erkennen waren.

### 3.21 WESTERN TRANSFER

Beim Western Transfer werden analog zum Northern Transfer (3.15) die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine (3.19) auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran transferiert und durch immunologische Methoden nachgewiesen (TOWBIN *et al.*, 1979). Es handelt sich hierbei um einen indirekten Nachweis, in dem der Primärantikörper gegen das Zielprotein, das Antigen des Sekundärantikörpers darstellt. An diesen ist ein Enzym gekoppelt (hier alkalische Phosphatase), welches durch eine Reaktion die Proteinbande braun einfärbt. Der Transfer erfolgte im *Semi-Dry* Blotting Verfahren mit „Sandwich-Aufbau“ (WESTERMEIER *et al.*, 1989). Die Membran und die benötigten Blotting-Papiere wurden zunächst auf die Gelgröße zurechtgeschnitten und letztere direkt in Transferpuffer (s. u.) äquilibriert. Eins der Blotting-Papiere wurde auf der Anode platziert und das Gel luftblasenfrei darauf gelegt. Vor dem Auflegen der Membran wurde diese mit Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Zum Schluss folgte eine weitere Lage getränkter Blotting-Papiere

und die Kathode wurde aufgesetzt. Der Transfer der negativ geladenen Proteine erfolgte bei 1 mA/cm<sup>2</sup> für 90 min.

Die Effizienz des Transfers wurde durch anschließendes Färben des Gels (3.20) überprüft und die Banden des Proteinmarkers auf der Membran mit Kugelschreiber nachgezeichnet. Die Membran inkubierte über Nacht bei 4 °C in 5 % Blockierungsreagenz (s. u.), um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Am Folgetag wurde das Blockierungsreagenz 3 x 5 min lang mit TBS-T (s. u.) entfernt und mit dem Primärantikörper (1:5000 in TBS/0,5 % Blockierungsreagenz) für 2 h inkubiert. Nach erneuten Waschschritten (3 x 5 min in TBS-T) folgte die Zugabe des Sekundärantikörpers (1:5000 in TBS/0,5 % Blockierungsreagenz) für 40 min. Im Anschluss an weitere Waschschriffe (2 x 5 min in TBS-T, 2 x 5 min in TBS, s. u.) wurde die Membran kurz in P3 (3.12.3) äquilibriert und mit dem Substrat (NBT/X-Phosphat; 3.12.3) der an den Sekundärantikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase entwickelt.

#### **Transferpuffer**

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20 % Methanol (v/v)

#### **TBS**

10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
150 mM NaCl

#### **Blockierungsreagenz**

5 % Proteinlösung (hier Milchprotein) in TBS

#### **TBS-T**

0,05 % Tween®20 in TBS

### **3.22 HERSTELLUNG POLYKLONALER ANTIKÖRPER**

In der vorliegenden Arbeit wurde der polyklonale Antikörper durch mehrfache Immunisierung eines Kaninchens gewonnen (siehe auch AUSUBEL *et al.*, 1994). Er ist die Grundlage für den Nachweis des Antigens (hier  $\beta$ -Carotinoxigenase) mittels immunologischer Methoden, wie z.B. im Western Transfer (3.21) oder bei der immunocytochemischen Färbung von Gewebeschnitten (3.24.3).

#### **3.22.1 Immunisierung und Serumzubereitung**

Immunisiert wurde ein weibliches Kaninchen (Weiße Neuseeländer) mit einem im prokaryotischen System exprimierten, rekombinanten Protein (3.16) als Antigen. Vor der Immunisierung erfolgte die Abnahme von Blut zur Erzeugung des Präimmunserums. Das Antigen wurde dreimal im Abstand von vier Wochen subkutan an 8 verschiedenen Punkten dem Kaninchen injiziert. Um eine retardierte Freisetzung des Antigens zu erzielen und dadurch eine verstärkte Immunantwort (JOHNSTON *et al.*, 1991), wurde es vor der Verabreichung mit Freud'schem Adjuvans emulgiert (20 ng/ $\mu$ l rekombinantes Protein mit

0,5 ml Freud'schem Adjuvans *complete*; 2.1). Jeweils 12 Tage nach der zweiten und dritten Immunisierung wurde dem Versuchstier 15 ml Blut aus der Ohrvene entnommen, um den Antikörpertiter zu bestimmen (3.22.2). Zur Serumzubereitung dieses – wie auch des vor der Immunisierung entnommenen Blutes – wurde 1 h bei 37 °C, dann 1 h auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 16000 x g abzentrifugiert. Das Serum wurde von den geronnenen Blutbestandteilen getrennt und bei -20 °C gelagert.

### 3.22.2 Bestimmung des Antikörpertiters

Zur Bestimmung des Antikörpertiters wurden ELISA-Platten mit dem Carotinoxigenase-Antigen beschichtet und mit Antiserum (bzw. Präimmunserum als Kontrolle) inkubiert. Die Detektion des Primärantikörpers erfolgte indirekt über einen Sekundärantikörper, der den Antigen/Antikörper-Komplex erkennt und durch eine Farbreaktion markiert. Die *wells* der ELISA-Platten wurden dafür mit 100 µl Antigenlösung (1 µg/ml Carbonatpuffer, s. u.) beladen, 3 h bei RT getrocknet und nichtgebundene Komponenten durch Waschen (3 x PBS, s. u.) entfernt. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde mit 150 µl 3 %igem BSA (w/v) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach drei kurzen Waschschritten mit PBS wurden für die folgende Antikörperreaktion verschiedene Verdünnungen des Präimmun- und Antiserums in PBS eingesetzt (1:100 bis 1:2000; bei Serum nach der dritten Immunisierung bis 1:500 000). 100 µl der jeweiligen Verdünnungen wurden pro *well* 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und 3 x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl des mit Alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-*Rabbit*-Sekundärantikörpers (2.4 1:2000 in PBS) wurde 30 min bei RT inkubiert und erneut 3 x mit PBS gewaschen. Die enzymatisch katalysierte Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl der gebrauchsfertigen Substratlösung für 10 min im Dunkeln. Mit 25 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) wurde diese gestoppt und die Platten bei 450 nm im ELISA-Reader ausgewertet.

Verwendete Medien:

#### **PBS-Puffer**

137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
9,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
auf pH 7,2 eingestellt

#### **Carbonatpuffer**

0,1 M NaHCO<sub>3</sub>

#### **Substratlösung**

1,25 mM Tetramethylbenzidin  
2,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3.23 *IN-SITU* HYBRIDISIERUNG

Die Technik der *in-situ* Hybridisierung ermöglicht den Nachweis von mRNA-Transkripten innerhalb von Zellen eines Organismus, mit Hilfe einer markierten, einzelsträngigen DNA-Sonde. Diese ist komplementär zur mRNA des Zielgens und kann nach erfolgreicher Hybridisierung mit dem Zielgen nachgewiesen werden. Im hier verwendeten System wurde eine DIG-markierte Sonde (3.3.5) verwendet, die durch eine Antikörperreaktion (analog zum Western Transfer; 3.21) visualisiert wurde, und so die positiven Zellen markierte.

Für die *in-situ* Hybridisierung wurden 8 µm dicke Gewebeschnitte sowohl adulter als auch primmorpher Schwämme untersucht. Das Gewebe wurde bei -30 °C am Kryotom geschnitten, auf einen Objektträger aufgezogen, 1 h bei 45 °C getrocknet und anschließend bei -80 °C in luftdicht verpackten Objektträgerkästen gelagert.

Vor der Verwendung wurden die Objektträgerkästen 1 h auf Raumtemperatur (RT) äquilibriert und dann die Schnitte entnommen. Zur Fixierung wurden sie 30 min bei RT in 4 % PFA/1xPBS inkubiert und anschließend 2x mit 1 ml PBS abgespült. Zur Perforation der Zellwände wurden die Schnitte 30 min mit Proteinase K (1 mg/ml in PBS/1 mM MgCl<sub>2</sub>) verdaut und nachfolgend 10 min in 4 % PFA/1xPBS nachfixiert. Nach zwei Waschschritten mit 1 ml PBS, erfolgte die Entfärbung der Schnitte sukzessiv mit 1 ml 30 %, 50 %, 80 % und 100 % (v/v) Ethanol à 2 min. Trat keine vollständige Entfärbung auf, wurde zum letzten Schritt 1 ml 100 % Isopropanol (v/v) dazugegeben und darauf sukzessiv mit 1 ml 80 %, 50 % und 30 % (v/v) Ethanol rehydriert. Nach erneutem Waschen (2x mit 1 ml PBS) erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde über Nacht bei 48 °C. Dazu wurden 70 µl Hybridisierungspuffer (siehe unten) auf die Schnitte geträufelt, diese mit Parafilm eingedeckelt und mit Fixogum versiegelt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 20 min mit 2x SSC bei 52 °C und anschließend 3x 15 min mit 0,2x SSC bei 52 °C gewaschen. Vor der Detektion wurden die Schnitte 2x 5 min in PBS-T inkubiert, 15 min mit Blockierungsreagens geblockt und 1 h mit dem Anti-DIG-Antikörper (2.4) – verdünnt 1:1000 in Blockierungsreagens – inkubiert. Nach zwei Waschschritten (2x 5 min in PBS-T) und 5 min Äquilibrierung in P3, erfolgte die Substratreaktion mit NBT (87,5 µl/25 ml P3) und X-Phosphat (112,5 µl/25 ml P3) bei 37 °C für 30 min im Dunkeln. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Waschen (1x 5 min in PBS), woraufhin die Schnitte mit Glycergel™ (2.1) eingebettet und mit Deckgläsern verschlossen wurden. Die Ränder wurden nach Aushärtung mit Nagellack versiegelt.

Medien für die *in-situ* Hybridisierung – alle steril und DEPC-behandelt:

<b>Blockierungsreagens</b>			<b>PBS-T</b>		
2	% (w/v)	Blockierungsreagens in PBS	1x		PBS
0,1	% (v/v)	Tween <sup>20</sup>	0,1	% (v/v)	Tween <sup>20</sup>
<b>Paraformaldehyd (PFA) pH 7,4</b>			<b>X-Phosphat-Stock</b>		
4	% (w/v)	Paraformaldehyd in PBS NaOH	50	mg/ml	in 100 % N,N-DMF
<b>P3 pH 9,5</b>			<b>NBT-Stock</b>		
100	mM	Tris/HCl	75	mg/ml	in 70 % (w/v) N,N-DMF
100	mM	NaCl			
50	mM	MgCl <sub>2</sub>			
<b>10x PBS pH 7,4</b>			<b>Hybridisierlösung</b>		
136	mM	NaCl	50	% (v/v)	Formamid in
2,6	mM	KCl	2	x	SSC (3.15.2)
6,46	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O			
1,46	mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			

### 3.24 SCHWAMMPRIMMORPHE

Zellkulturen aus separierten Schwammzellen, die sich innerhalb weniger Tagen zu einem globulären Zellverband mit differenzierten Strukturen organisieren, nennt man Primmorphe (primmorphes Zellstadium). Mit fortschreitender Zeit organisieren sich die Zellen zu Gewebetypen, wie sie in adulten Schwämmen zu finden sind.

#### 3.24.1 Primorphenherstellung

Zunächst wurde Gewebe (ca. 1,5 cm<sup>2</sup>) einem adulten Schwamm entnommen und in Calcium-Magnesium-freies Seewasser (CMFSW) + EDTA + Gentamycin (1:1000 w/v) überführt. Optional war dem Medium ein Antimykotikum zugesetzt, um eine Pilzinfektion der Zellkultur zu verhindern. In der Regel wurde es nicht verwendet. Das Schwammstück wurde mit Hilfe eines Skalpell in einer Petrischale mit CMFSW + EDTA + Gentamycin (1:1000) in ca. 3 x 3 mm große Stücke zerschnitten und in ein mit 30 ml CMFSW + EDTA gefülltes Falconröhrchen überführt. In diesem wurden sie für 20 Minuten auf einem Rollinkubator bewegt, wobei das Medium nach 10 Minuten ausgetauscht wurde. Im Anschluss wurden die Schwammstücke in frischem Medium durch ca. 20 minütiges Auf- und Abpipettieren gelöst. Zum Entfernen der Silikaspiculae wurde die Zellsuspension sukzessiv durch ein doppeltes Netz mit 50 µm respektive 20 µm Maschengröße gegeben. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 2000 x g (dient der Entfernung toter und beschädigter Zellen) wurde das Zellpellet in 30 ml CMFSW ohne EDTA aufgenommen, erneut bei 2000 x g pelletiert und in 20 ml Seewasser (SW) resuspendiert. Das SW-Zellgemisch wurde in Petrischalen (Ø=8,5 cm) überführt und auf einem Schwapper bei 18 °C bis Versuchsende inkubiert.

Verwendete Lösungen:

	CMFSW:	CMFSW+EDTA:	SW:
	460 mM NaCl	CMFSW	Seewasser von Sigma
	7 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,5 mM EDTA	
	10 mM KCl		
	10 mM Hepes		
	4ml/l Streptomycin		

### 3.24.2 Inkubationsansätze

Für die Inkubationsansätze wurden die Schwammzellen – wie in 3.24.1 beschrieben – dissoziiert und in Petrischalen kultiviert. Täglich erfolgte ein Wechsel des Mediums und die Entnahme sich bildender Zellaggregate, die in eine separate Petrischale mit SW überführt wurden. Tote Zellen wurden mit einer Pipette aus den Kulturschalen entfernt. Ab dem 3. Tag wurde dem Seewasser 0,1 % RPMI (w/v; 2.1) als Nahrungsquelle zugesetzt und die zu testenden Substanzen in DMSO/0,1 % BSA beigemischt: a) 1 µM Citral, b) 1 µM Retinsäure, c) 1 µM Vitamin A, d) 1 µM β-Carotin, e) 1 µM Citral/Retinsäure. Die Stammlösung der Substanzen war 5 mM, so dass alle Ansätze die gleiche Menge an Lösungsmittel enthielten. Der Kontrolle wurde das entsprechende Volumen an DMSO/0,1 % BSA zugegeben.

Die Inkubationsansätze für Gewebestücke **adulter Schwämme** wurden in 300 ml Bechergläser durchgeführt. Im Gegensatz zu den Primmorphen, wurde auf BSA verzichtet, da eine Belüftung durch Sprudelsteine erfolgte (Schaumbildung). Für die 24 h Inkubation mit β-Carotin, Retinsäure und Retinylpalmitat in den Konzentrationen 1 µM und 50 µM wurden ca. 2 cm<sup>2</sup> große Gewebestücke desselben Schwamms inkubiert.

### 3.24.3 Immunhistologische Untersuchung der Schwammprimorphe

Das Expressionsmuster eines Proteins gibt Aufschluss über dessen Funktion und Bedeutung für den Organismus. In der immunhistologischen Untersuchung wird eine Antigen-Antikörper-Reaktion verwendet, um das Antigen (hier die BCO) in den Zellen des Zielgewebes zu lokalisieren. Hierfür bindet ein Primärantikörper an das gesuchte Protein, welcher wiederum durch einen Sekundärantikörper detektiert werden kann. Letzterer ist z.B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und kann durch Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge in der Immunfluoreszenzmikroskopie visualisiert werden.

### 3.24.3.1 Vorbereitung und immunocytochemische Färbung der Gewebeschnitte

Die Einbettung der unter (3.24.2) angefertigten Primmorphen in Kunststoff erfolgte mit dem Histo-Technik-Set 8100 (2.5) laut Herstellerprotokoll. Von den eingebetteten Primmorphen wurden jeweils 3 bzw. 10  $\mu\text{m}$  dicke Mikrotomschnitte angefertigt. Diese wurden in Wasser gestreckt, auf einen Objektträger aufgezogen und bei 40 °C getrocknet. Im Anschluss erfolgte zur Öffnung der Poren eine 30 minütige Behandlung mit 1 %igem Saponin in PBS, welches in drei Waschsritten à 15 Min mit PBS wieder entfernt wurde. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (1:2000 in 0,3 % BSA) wurde über Nacht in Feuchtkammern (Quadriperm; Sigma, Deisenhofen) bei 4 °C durchgeführt und anschließend durch Waschen (3 x 30 Min in PBS) beendet. Der sekundäre Indocarbocyanin [cy3] Rhodamin Antikörper Ziege-anti-Rabbit (Sigma; 2.4) wurde 1:100 in 0,3 % BSA verdünnt und für 90 Min bei RT im Dunklen appliziert. Dieser wurde erneut durch 3 Waschsritte à 30 Min mit PBS entfernt, bevor die 10 minütige Gegenfärbung mit 2  $\mu\text{M}$  DAPI in 0,3 % BSA erfolgte. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte mit dem Gel/Mount Antifading-Eindickmedium (Biomedica, Kalifornien) eingedeckelt und die Ränder der Deckgläser nach Aushärtung mit Nagellack versiegelt.

### 3.24.3.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Betrachtung der Objekte erfolgte mit dem Stereomikroskop AH3 (Olympus), welches sowohl die Analyse der Objekte im Hellfeld als auch die Anwendung der Epifluoreszenztechnik ermöglicht. Durch Anregung mit Licht definierter Wellenlänge (553 nm) kann die emittierte Fluoreszenz des an den Sekundärantikörper gekoppelten Farbstoffes (cy3; 575 nm) detektiert werden. Durch die Bestrahlung mit Licht von 344 nm ist es zusätzlich möglich, anhand der Doppelfärbung mit DAPI die Zellkerne der Gewebeschnitte anzufärben (emittiert 450 nm). Die Bilder wurden über eine CCD-Kamera digitalisiert und mit der Software Olympus analySIS (V 3.0) dokumentiert und bearbeitet.

## 3.25 HPLC ANALYSEN - NORMALPHASE

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) dient der präzisen Auftrennung von komplexen Stoffgemischen. Je nach Beschaffenheit der verwendeten Chromatographiesäule und Art des Laufmittels können die unterschiedlichsten Substanzen aufgetrennt und bei Bedarf fraktioniert werden.

Im hier verwendeten System ist das Trägermaterial der Säule (2.11) polarer als die mobile Phase (Laufmittel). Aufgrund ihrer geringeren Affinität zum Säulenmaterial passieren apolare



Substanzen (z.B.  $\beta$ -Carotin) die Säule schnell, während polare Substanzen (Retinoide) höhere Retentionszeiten besitzen. Die Retentionszeit wird zusätzlich über die Polarität des Laufmittels beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wird die Polarität verändert, um Substanzen einzelner Stoffklassen besser charakterisieren zu können. Die Flussrate betrug bei allen Versuchen in der Normalphase 1 ml pro Minute.

### **3.25.1 Vorbereitungen der Proben zur Extraktion**

Carotinoide und Retinoide sind photo- und sauerstoffsensitive Substanzen und daher instabil. Deswegen wurden alle Experimente mit diesen Substanzen unter Rotlicht und Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

#### **Bakterien**

Generell wurden jeweils 30 x OD<sub>600</sub> der zu analysierenden Bakterienkulturen abzentrifugiert und die Pellets gegebenenfalls bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Diese Mengenangabe bezieht sich auf alle untersuchten Bakterienkulturen, unabhängig von der Induktions- oder Inkubationsdauer.

#### **Schwammgewebe.**

Untersucht wurde jeweils ein in flüssigem Stickstoff schockgefrorener Vertreter eines blauen, roten und weißen *S. domuncula*. In vier Parallelansätzen wurde jeweils ein ca. 2 cm großes Stück entnommen, gewogen und grob zerkleinert (ca. 2mm<sup>2</sup>). Die resultierenden Stücke wurden in Alufolie verpackt, in Flüssigstickstoff gefroren und durch Hämmern pulverisiert. Der so entstandene Gewebestaub wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 3 ml Aceton versetzt, 2 min gevortext und über Nacht bei 4°C gelagert. Am Folgetag wurde das Aceton abgenommen und das Gewebe mit frischem Aceton durch Ultraschallstöße bis zur völligen Entfärbung gespült. Störendes Zellmaterial wurde durch Zentrifugation bei 16000 x g beseitigt und das Aceton-Farbstoffgemisch vor weiterer Verwendung unter Stickstoffatmosphäre auf ca. 500  $\mu$ l eingeeengt und bei -80 °C gelagert.

### **3.25.2 Pigmentextraktion aus Bakterienpellets**

#### **3.25.2.1 Extraktion von Retinoiden und unpolarer (Apo-) Carotinoide**

Mit dieser Methode wurden die lipophilen Farbstoffe, zu denen die Retinoide und Carotinoide gehören, aus den Proben isoliert. Man verwendet ein Phasengemisch aus wässriger und

organischer Phase, um die Zielstoffe in möglichst reiner Form zu erhalten und die Analysegeräte nicht zu schädigen.

Die Bakterienpellets wurden mit 200 µl PBS-Puffer resuspendiert in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Suspension wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an Methanol 10 min bei Raumtemperatur denaturiert. Nach Verdopplung des Volumens durch Aceton wurden zur Phasentrennung 500 µl Petrolether zugegeben. Die lipophilen Substanzen aus der wässrigen Acetonphase wurden durch 10 s Vortexen in die lipophile Petroletherphase überführt und das Phasengemisch durch kurzes Zentrifugieren getrennt. Die Epiphase wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und die Extraktion 2 Mal durch Zugabe von 500 µl Petrolether wiederholt. Die gesammelten Epiphasen wurden 1 min bei 8 000 x g abzentrifugiert und bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 70 µl in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. So wurde sichergestellt, dass kein eventuell verbleibender Rest der wässrigen Phase die Proben kontaminiert. Zum Abschluss wurde der Petrolether unter Stickstoffatmosphäre bis zur Trockene eingengt und die Proben in 100 µl des jeweiligen Laufmittels (s. u.) aufgenommen.

#### **3.25.2.1.1 Extraktion mit Umsetzung der Aldehyde in Oxime**

Manche Retinoide und Apocarotinoide sind durch ihre Aldehydgruppe sehr reaktiv oder durch Ausbildung einer Schiff-Base z.B. an Proteine gebunden (z.B. Retinal an Rhodopsin). Durch Umwandlung dieser Substanzen in das jeweilige Oxim (funktionelle Gruppe: C = NOH), können diese zur Verfügung gestellt und/oder geschützt werden. Hierfür wurden die Bakterienpellets anstelle des PBS-Puffers mit 200 µl 2M Hydroxylamin (wässrig, pH 6,7) resuspendiert und wie unter 3.25.2.1 weiter behandelt.

#### **3.25.2.1.2 Extraktion mit Verseifung**

Im Organismus entstehende Carotinoidspaltprodukte können auf „Vorrat“ produziert werden und z.B. in Form von Estern gespeichert werden. Um dies zu bestimmen, wurde ein Teil der Proben zusätzlich verseift (Hydrolyse des Esters führt zur Freisetzung des Retinoid-Alkohols). Zunächst wurde mit den Bakterienpellets wie unter (3.25.2.1) beschrieben verfahren. Die Extrakte wurden statt in Laufmittel zunächst mit 500 µl 50 mM ethanolischer KOH 30 min bei 70 °C verseift, anschließend mit 500 µl 30 mM HCl neutralisiert und 3 x mit 500 µl Petrolether/Diethylether (Verhältnis 1:1) ausgeschüttelt. Die gesammelten Epiphasen wurden mit 200 µl *Aqua dest.* durch Vortexen so lange gewaschen, bis keine Eintrübung des Wassers zu erkennen war, und dann 2 min bei 8 000 x g abzentrifugiert. Die organische Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, unter Stickstoffatmosphäre eingengt und in 100 µl entsprechendem Laufmittel (2.11.1 bzw. 2.11.2) aufgenommen.

### 3.25.2.2 Extraktion kürzerkettiger, polarer Apocarotinoide

Je nach Polarität des Lösungsmittels lassen sich unterschiedliche Substanzen aus den Bakterienpellets isolieren. Da die Natur der Spaltprodukte anfangs unbekannt war, wurde die Polarität des Extraktionsmediums erhöht, um polarere und kürzerkettige Apocarotinoide identifizieren zu können.

Prinzipiell wird wie in (3.25.2.1) beschrieben verfahren. Unabhängig, ob als Oxim oder nativ extrahiert wird, erfolgt nach Verdopplung des Volumens mit Aceton die Zugabe von 250 µl Diethylether. Nach kurzem Vortexen wird 250 µl Petrolether zugegeben, gevortext und kurz anzentrifugiert, um die organische Epiphase in ein anderes Reaktionsgefäß zu überführen. Anschließend wird 500 µl Petrolether zugegeben, gevortext, anzentrifugiert und die Epiphase abgenommen. Zu diesen gesammelten Epiphasen wird 400 µl Petrolether gegeben und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Bis auf einen ca. 70 µl verbleibenden Rest wird der Inhalt in ein neues Reaktionsgefäß transferiert, unter Stickstoffatmosphäre eingeengt und in Laufmittel aufgenommen.

### 3.25.3 In vitro Enzymtest

Die Funktion von Enzymen kann durch Inkubation mit ihrem Substrat überprüft werden. Die hier untersuchte Carotinoxygenase spaltet unter anderem  $\beta$ -Carotin, was sich durch die Abnahme der Extinktion bei 450 nm verfolgen lässt. In einem Vorabversuch wurden mit nach (3.16.3.1) aufgereinigtem BCO-Eluat  $\beta$ -Carotinmicellen (3.25.3.2) inkubiert und die Extinktion bei 450 nm vor und nach der Inkubation gemessen.

#### 3.25.3.1 Vorbereitung des $\beta$ -Carotins

Beta-Carotin kann zum einen synthetisch nicht in Reinform hergestellt werden und ist zum anderen photoaktiv und leicht oxidierbar. Zur Beseitigung der Verunreinigungen wurde zunächst eine Spatelspitze in 5 ml Ethanol gegeben, gevortext und abzentrifugiert. Das Ethanol wurde abgeschüttet und der Schritt zwei Mal wiederholt. Das so vorgereinigte  $\beta$ -Carotin wurde anschließend in n-Hexan gelöst und auf eine DC-Platte (2.12) aufgetragen. Als Laufmittel diente Petrolether/Aceton/Diethylether (Verhältnis 5:1:1). Die Hauptbande – entspricht dem  $\beta$ -Carotin – wurde von der Platte abgekratzt und in Aceton aufgenommen. Dieses Gemisch wurde zentrifugiert, um die Rückstände der Platte zu entfernen. Der abgenommene Überstand wurde bis zur Trockene unter Stickstoffatmosphäre eingeengt und das gereinigte  $\beta$ -Carotin in n-Hexan gelöst.

### 3.25.3.2 Herstellung der $\beta$ -Carotin Micellen

Zuerst wurde die Konzentration des aufgereinigten und in n-Hexan gelösten  $\beta$ -Carotins photometrisch bestimmt (Extinktionskoeffizient  $\epsilon = 0,8873$ ) und anschließend 2 nM unter Stickstoffatmosphäre eingengt. Dieses wurde mit 1 ml 4 % OTG (w/v; 2.1) in Ethanol versetzt und 1 min gevortext. Jeweils 100  $\mu$ l dieser Suspension wurde für den Enzymtest benötigt und in einem 2 ml Reaktionsgefäß unter Stickstoffatmosphäre eingengt.

### 3.25.3.3 Aufschluss der BCO-Expressionskultur

Eine 100 ml Top10-Bakterienkultur – transformiert mit einem BCO-Gen tragenden pTrcHisII-Plasmid – wurde bei  $OD_{600} = 0,8$  mit 100  $\mu$ l 0,5 M IPTG für 3 h bei 26 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden bei 5 000 x g abzentrifugiert und das Pellet in 3 ml Puffer (50 mM Tricin/100 mM NaCl mit Proteinaseinhibitoren, Roche) auf Eis resuspendiert. Mit Hilfe der *French-Press* wurden die Zellen aufgebrochen und anschließend bei  $V_{max}$  in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand enthält die Proteinlösung und wurde mit Katalase (Endkonzentration 1 mg/ml) versetzt.

### 3.25.3.4 Durchführung des Enzymtests

100  $\mu$ l der in (3.25.3.3) hergestellten Enzymlösung wurden in ein unter (3.25.3.2) vorbereitetes Reaktionsgefäß pipettiert und die  $\beta$ -Carotin Micellen durch Vortexen gelöst. Die Enzymsuspension wurde 1 h bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Nachfolgend wurde aus den Enzymtestansätzen, wie bereits für die Bakterien- und Schwammextrakte beschrieben (3.25.2.1), die Spaltprodukte isoliert.

## 3.26 REVERSED PHASE HPLC

Zur Charakterisierung von Carotinoiden und der Quantifizierung des  $\beta$ -Carotingehalts in *S. domuncula* wurde zusätzlich eine *reversed-phase* HPLC durchgeführt. Laut des Namens handelt es sich um eine „umkehr HPLC“, was bedeutet, dass die polaren und apolaren Substanzen ihr Verhalten bezüglich der Affinität zur Säule (hier  $C_{30}$ , 2.11.2) vertauschen. So ist es möglich die apolaren Carotinoide präziser aufzutrennen. Die Flussrate für alle *reversed-phase* HPLC-Läufe betrug 1 ml/min

Um Carotinoide des Schwammextrakts mit ähnlichen Eigenschaften präziser aufzutrennen, wurde in einer zusätzlichen Analyse ein Laufmittelgradient (Gradienten-*reversed-phase* HPLC) mit variierender Flussrate verwendet (Tab. 3).

**Tab. 3:** Protokoll der gradienten *reversed-phase* HPLC: Die prozentuale Zusammensetzung der Mobilphase aus den beiden Lösungsmitteln (LM) A und B ändert sich linear über die angegebenen Zeitintervalle. Dargestellt ist die prozentuale Änderung des Laufmittel B am Gesamtgehalt der mobilen Phase.

Laufzeit		Ausgangskonzentration	Zeitintervall	Endkonzentration	Flussrate
0-45	Min	100 % LM B	45 Min	43 % LM B	1 ml/Min
45-60,4	Min	43 % LM B	15,4 Min	24 % LM B	1 ml/Min
60,4-61	Min	24 % LM B	0,6 Min	0 % LM B	2 ml/Min
61-70	Min	0 % LM B	1 Min	0 % LM B	2 ml/Min
70-71	Min	0 % LM B	1 Min	100 % LM B	2 ml/Min
71-80,8	Min	100 % LM B	9,8 Min	100 % LM B	1 ml/Min

### 3.27 QUANTIFIZIERUNG DES $\beta$ -CAROTINGEHALTS IN *S. DOMUNCULA*

#### 3.27.1 Vorbereitung der Proben

Das Schwammgewebe wurde wie unter (3.25.1) beschrieben vorbereitet und der resultierende Acetonextrakt zur Quantifizierung herangezogen. Im Unterschied zur Bakterienextraktion (3.25.2) entfiel die Denaturierung mit Methanol und begann mit Zugabe des Petrolethers. Dabei wird das Acetongemisch bis zur völligen Entfärbung mit Petrolether ausgeschüttelt. Die gesammelten Petroletherphasen wurden zwischenzeitlich im selben Gefäß unter Stickstoffatmosphäre eingeeengt, um den Pipettierfehler zu minimieren. Final betrug das Volumen ca. 500  $\mu$ l. In diesem Extrakt wurde, vor weiteren Analysen, der Anteil an störenden lipophilen Substanzen, wie z.B. Kollagen, reduziert. Hierfür wurde drei Mal mit 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gewaschen (Zugabe des Wassers, Vortexen und Abnehmen der Petroletherphase). Abschließend wurde das Petrolethergemisch 2 min bei 8000 x g 2 min zentrifugiert und bis auf einen verbleibenden Rest von ca. 70  $\mu$ l in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Nach Einengen bis zur Trockene unter Stickstoffatmosphäre wurde erneut 200  $\mu$ l Petrolether zugegeben als Berechnungsbasis für die Quantifizierung (3.27.2).

Der quantitative, organische Farbextrakt wurde zusätzlich zur Bestimmung des absoluten  $\beta$ -Carotiningehalts genutzt, um evtl. Spaltprodukte (Retinoiden und Apo-Carotinoiden) im Schwammgewebe aufzuspüren. Dabei wurde analog zu den Bakterienextrakten einmal als Oxim (3.25.2.1.1) extrahiert oder verseift (3.25.2.1.2).

### 3.27.2 Berechnung des $\beta$ -Carotingehalts

Berechnet wurde der  $\beta$ -Carotingehalt anhand der Peak-Integrale im Absorptionsspektrum. Zuvor wurde 1 nM  $\beta$ -Carotin in einen *normal-phase* HPLC-Lauf injiziert und das Flächenintegral berechnet (hier: 4 736 524,287 Flächeneinheiten). Für die Kalkulation der Schwammextrakte wurden jeweils 10  $\mu$ l der Petrolethergemische aus 3.27.1 injiziert und deren Peaks integriert. Die angegebenen Werte (Tab. 7) sind ohne Fehlereinschätzung der Messgeräte wiedergegeben, da der tatsächliche Gehalt an  $\beta$ -Carotin höher ist und die Farbextrakte sich während der verschiedenen Schritte (3.27.1) nicht verlustfrei handhaben ließen. Die Messgenauigkeit der Geräte ist in 2.11 wiedergegeben.

## 4 ERGEBNISSE

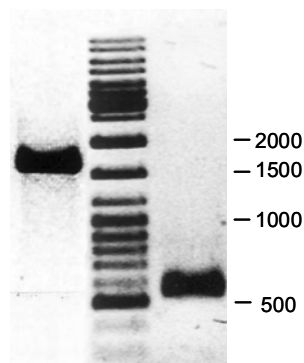
### 4.1 IDENTIFIZIERUNG UND KLONIERUNG DER CAROTINOXYGENASE (BCO)

#### 4.1.1 Identifikation eines Teilstücks der Carotinoxygenase (BCO)

Anhand konservierter Regionen innerhalb eines Alignments von Aminosäuresequenzen der Carotinoxygenase verschiedener Organismen wurde der degenerierte reverse Primer Cado-D (2.7.3.1) erstellt. In Kombination mit einem *forward* Bankprimer konnte ein ca. 530 bp langes DNA-Fragment (= BCO-deg) durch PCR-Screening aus der cDNA-Bank von *S. domuncula* isoliert werden. Nach dessen Aufreinigung und Ligation in den pGEM-T-Vektor (2.6) wurde es durch Transformation in *E. coli* (3.10) amplifiziert. Die Größe des Plasmidinserts wurde mittels PCR (3.3.1) überprüft und der Klon in beiden Richtungen sequenziert (3.11). Ein *Alignment* der daraus resultierenden, komplementären cDNA-Sequenzen diente zur Fehlerkorrektur. Durch Vergleich der erhaltenen Sequenz mit Gendatenbanken im Internet (z.B. BLAST; 2.10) wurde der Klon „BCO-deg“ eindeutig als Teilsequenz einer Carotinoxygenase identifiziert.

#### 4.1.2 Homologiescreening

Aufgrund der Tatsache, dass der cDNA-Klon „BCO-deg“ nur einen Teil der gesuchten Sequenz enthielt, wurde eine DIG-markierte Sonde durch die *Labeling* PCR (3.3.5) hergestellt, um damit die cDNA-Bank zu durchsuchen. Zur Erstellung der Homologie-Sonde wurde das Primerpaar Geodox F3/Sd-Ox-R2 (2.7.3.1) eingesetzt. Eine Kontrolle im Agarosegel zeigte, dass die Markierung der Sonde (Abb. 8) erfolgreich war.



**Abb. 8:** Agarosegel zur Überprüfung der DIG-markierten DNA-Sonde für das Homologiescreening (Spur 3) und einen durch das Homologiescreening identifizierten Klon der BCO (Spur 1). Spur 2 zeigt den Marker (Größe der Hauptbanden in bp)

Mit dieser wurden im Primärscreening 8 potentiell positive Klone auf der Membran identifiziert. Die entsprechenden Plaques wurden aus den LB-Agarplatten ausgestochen und in einer Kolonie PCR (3.3.2) überprüft.

#### 4.1.3 Isolierung einzelner Phagenklone über das Sekundärscreening

Isolierte Phagenklone aus einem Primärscreening sind stets, aufgrund der hohen Plaquedichte, durch andere Klone kontaminiert. Deswegen wurden die erhaltenen positiven Phagensuspensionen einem Sekundärscreening (3.12.4) unterzogen. Nach erneuter Hybridisierung mit der DIG-Sonde waren auf zwei Membranen insgesamt ca. 150 positive Signale zu erkennen. Einige der positiven Phagenklone wurden den LB-Agarplatten entnommen und durch *in vivo*-Excision (3.13) als Plasmide in XPORT-Zellen vermehrt. Nach Plasmidpräparation (3.7.2) wurden die Klone mit den pBK-CMV respektive pTriplEx2 spezifischen, gelabelten Vektorprimern (2.7.1) sequenziert. Nahezu alle untersuchten Klone (Abb. 8) wiesen die vollständige Sequenz der gesuchten Carotinoxygenase (BCO) auf, wie eine Analyse mit Similaritätssuchprogrammen von Internet Gendatenbanken (z.B. BLAST; 2.10) zeigte.

#### 4.1.4 Analyse der BCO Sequenz.

Die Gesamtlänge der BCO cDNA beträgt, exklusive des Poly(A)-Schwanzes, 1789 bp und umfasst einen offenen Leserahmen von 1620 bp, der für ein potentielles Protein von 539 AS kodiert. Flankiert wird diese Sequenz vom untranslatierten Bereich der am 5'-Ende 53 bp und 115 bp am 3'-Ende umfasst (exklusive Poly(A)). Die Effizienz der Translationsinitiation wird durch die das Startcodon (ATG)<sub>NT1-3</sub> umgebende Sequenz bestimmt und entspricht hier nicht vollständig der aus Vertebraten bekannten und für eukaryotische Systeme optimalen Konsensussequenz GCC A/G CCA**ATGG** (KOZAK, 1991). Die Sequenz CTA GCC**ATGG** weicht geringfügig davon ab, beinhaltet aber sowohl die minderwichtige Pyrimidinbase C an Position -1 als auch die überaus wichtige Purinbase G an Position -3 und + 4. Die 3'-UTR weist kein bekanntes Polyadenylierungssignal auf, enthält jedoch einen relativ hohen Anteil der Basen A und T (25 % bzw. 42 %).



-53	ATTACGTGTATATGTGATGTAAC TATTTGTTGCTCTTGATCTTTTAGCTAGCC	-1
1	<b>M</b> A L L R P P K R L S W Y L P L Q L R L	20
1	<b>ATG</b> CGTTGCTGAGACCACCCAAGAGACTAAGCTGGTACTTACCGCTCCAAC TTCGTCTA	60
21	C L S T S A S T R A E L F K S V P E Q P	40
61	TGCCTGTCTACATCAGCCTCCACCAGAGCGGAAC TATTC AAGTCTGTACCTGAACAACCT	120
41	I P V E G T V K G C V P D W V N G K L I	60
121	ATCCCAGTAGAGGGAACAGTAAAAGGTTGTGTACCTGACTGGGTAAACGGCAAGTTGATT	180
61	R N G P G Q F E F G D M K Y N H Y F D G	80
181	CGAAATGACCTGGTCAGTTTGAGTTTGGAGATATGAAGTACAACCATTACTTTTGATGGT	240
81	Q A L L H S F T I Q S G K V T Y T S K F	100
241	CAGGCACTCCTTCACAGTTTACTATTTCAGTCAGGAAAGTGACCTACACTAGCAAGTTC	300
101	L Q S D T Y K R N M A A N R I V V S E F	120
301	CTACAAAGTGATACCTACAAGCGTAACATGGCAGCCAATAGGATTGTGGTCTCTGAATTT	360
121	G T L G V P D P C Q T I F Q R F R S Y F	140
361	GGAACATTGGGAGTGCCTGATCCATGTCAAACAATCTTTCAGAGATTTTCGGTCATACTTC	420
141	S S L T D P S H D M S D N C M V N V Y P	160
421	TCTTCTTAACAGACCCCTTCCCATGACATGTCAGATAATTGTATGGTCAATGTGTACCCT	480
161	A G D K Y I A A T E T D F V H V I S P E	180
481	GCTGGAGACAAGTACATTGCTGCTACAGAGACTGACTTTGTTCATGTGATCTCACCAGAA	540
181	T L E S E E R I Q L S K H V A V N T A T	200
541	ACTTTGGAGTCTGAAGAGAGGATCCAATTGTCTAAGCATGTAGCTGTCAACACGGCAACG	600
201	A H P H W E P D G T V Y N F G F S S G G	220
601	GCTCACCCCTCACTGGGAACCAGATGGAACAGTCTACAAC TTTGGATTTTCTTCAGGCGGT	660
221	Y T L I K I P P S Q H H V M D K A S V L	240
661	TATACTCTTATAAAAAATACCACCAAGTCAGCATCATGTAATGGACAAAGCCAGTGTGCTC	720
241	C N V P P K N R L R P G Y N H S F G A T	260
721	TGTAATGTGCCACCCAAGAATAGGTTAAGACCTGGATAACAACCACAGTTTTTGGTGCTACA	780
261	E N Y L I F L E Q P F Q M D I S N I L R	280
781	GAGAACTATCTCATCTTCTTGAGCAACCTTTTCAGATGGATATTTCTAACATCTTGCGC	840
281	N K I L N K G V L A K D F F M W D D N T	300
841	AACAAGATTCTAAACAAAGGCGTCTCGCAAAGACTTTTTTATGTGGGATGACAATACA	900
301	Q V R F Y V V E K N T G K V L D T K F V	320
901	CAGGTTTCGATTTTACGTTGTTGAAAAAACACTGGCAAAGTTCCTTGACACAAAGTTTGTT	960
321	T S P C L V L H H I N A Y E D N G H I V	340
961	ACGTCACCTTGCTGGTCCCTTCATCACATCAATGCTTATGAAGACAATGGACACATTGTT	1020
341	L D V C A H K D G S A Y F T L D V D D L	360
1021	CTTGATGTTTGTGCACACAAGGATGGATCAGCATATTTTACACTCGATGTAGACGACTTG	1080
361	N A D A R S H H N Q F I V K P K R F V L	380
1081	AATGCAGATGCACGTTCTCATCACAAATCAATTCATAGTCAAACCAAACGTTTGTCTT	1140
381	P I G L L D S T D G G N L V S L D Y T T	400
1141	CCTATTGGACTGCTGGACTCCACTGACGGTGGTAACCTTGTGAGTCTAGACTACACTACA	1200
401	A T A E L Q S D G S I M C K P E I I S D	420
1201	GCTACTGCTGAGCTACAGAGTGACGGGAGTATTATGTGCAAGCCTGAAATAATCTCAGAT	1260
421	R D F E L P R I N Y D Q Y N G K P Y Q F	440
1261	AGAGATTTTGAGTTACCTCGTATCAACTATGACCAGTACAATGGAAAGCCTTACCAGTTT	1320
441	A Y G M S G T F E G L V K A D L K T K K	460
1321	GCATATGGGATGAGTGGAACCTTTGAGGGACTTGTCAAAGCCGACTTGAAGACTAAGAAG	1380

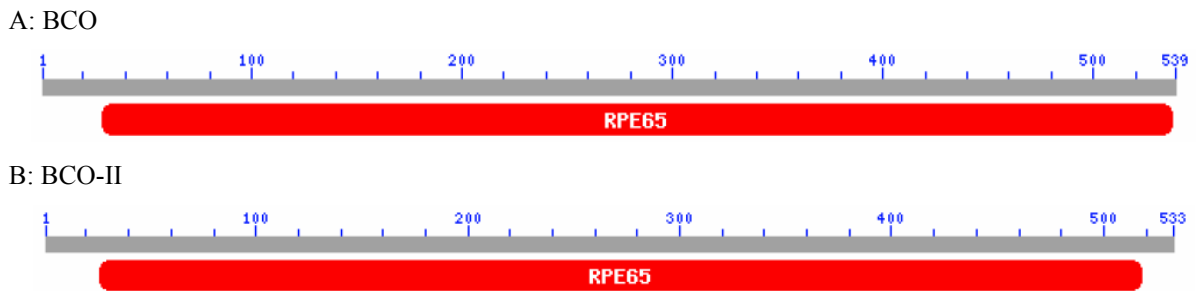
461	S L F W A E D G C N V S E P V F V G K P	480
1381	AGTCTGTTCTGGGCAGAGGATGGTTGCAATGTTTCAGAACCTGTGTTTGTGGGTAAACCA	1440
481	G C S Q E D E G V I L S A V L Q Y E E N	500
1441	GGATGCAGCCAAGAAGATGAAGGAGTGATATTGTCTGCCGTGCTTCAATATGAAGAGAAC	1500
501	K P P F L L V L D A Q S F T E L S R V E	520
1501	AAACCACCATTTTTGTTGGTACTGGATGCGCAGTCATTCACTGAACTTAGTCGAGTTGAG	1560
521	F P G I Q M H R D V H G I F V P A K N *	539
1561	TTCCCTGGTATCCAGATGCACAGAGATGTCCATGGGATATTTGTACCTGCCAAGAAC TGA	1620
1621	CAGTAAATGTTAGCAGCTGTTAATTTTTTGTGTGTTGTGTGTAAGTATTATTTTTTAGTATA	1680
1681	CCAATCTGATTGTGACACAATGTAGCATGTTTTTCTATTTTGGGAAGTCAAGTCCTGC (A) <sub>n</sub>	1736

**Abb. 9:** Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz der BCO. Untranslatierte Bereiche am 5'-, bzw. 3'-Ende der Sequenz sind in orange, kodierende dagegen schwarz eingefärbt. Das Start- und Stopp-Codon ist in roten, fettgedruckten Lettern dargestellt. Die Nummerierung sowohl der kodierenden Nukleotide als auch der davon abgeleiteten Aminosäuren beginnt mit + 1, wobei die erste nichtkodierende Base am 5'-Ende mit - 1 beziffert ist. Die ersten 28 AS stellen das pot. Signalpeptid dar und sind braun eingefärbt.

#### 4.1.5 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz der BCO

Die Basen der BCO-Sequenz kodieren für ein Protein mit 539 AS, welches ein errechnetes Molekulargewicht von 60,57 kD (pI= 5,84) aufweist. Die Halbwertszeit *in vivo* errechnet sich anhand der N-terminalen AS des Proteins (der *N-End-Rule*; VARSHAVSKI, 1997), welche den ubiquitinmarkierten proteolytischen Abbau veranlasst, und wird für Methionin auf 30h geschätzt (nach BACHMAIR *et al.* 1986). Der Instabilitätsindex bezieht sich auf die Eigenschaften des Proteins *in vitro* und klassifiziert das Protein mit 40,46 als instabil. Eine Analyse der Sequenz mit PROSITE (2.10) ergab allgemeine Motive potentieller posttranslationaler Modifikationen, die jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit in Sequenzen vorkommen. Darunter fanden sich Phosphorylierungen von Serin- oder Threoninresten durch die cAMP/cGMP abhängige Protein Kinase, die Proteinkinase C und der Casein Kinase II. Weiterhin enthielt die Sequenz Signaturen für N-Glykosylierung von Asparaginresten und N-Myrostylierung von Glycinresten. Da alle dieser Signaturen innerhalb der globulären Domäne liegen (siehe unten) und die Kristallstruktur des Proteins unbekannt ist, sind sie rein spekulativ und wurden nicht berücksichtigt.

Mit **Pfam** (2.10) wurde die Sequenz auf konservierte Domänen untersucht und eine Homologie zur konservierten RPE65-Domäne (Pfam *Acc. No.* PF03055; E-Wert = 4<sup>-70</sup>) gefunden (Abb. 10). Dabei handelt es sich um ein Membranprotein (65 kD) innerhalb des Pigmentepitheliums der Retina (RPE = *retinal pigment epithelium*; siehe auch 1.2.1).



**Abb. 10:** Vorhergesagte Homologie zur konservierten Proteindomäne RPE65 (*Acc. No.* PF03055) der beiden Carotinoxygenasen (BLAST); A: Vergleich der RPE65 Proteinfamilie zur BCO (E-Wert =  $4^{-70}$ ); B: Vergleich der RPE65 Proteinfamilie zur BCO-II (E-Wert =  $3^{-49}$ ).

Diese Proteinfamilie beinhaltet neben den tierischen Carotinoxygenasen auch die der Pflanzen und Bakterien, wodurch die BCO auch Sequenzhomologien zu diesen aufweist. Weitere Sequenzanalysen ergaben, dass es sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 89 % um ein cytosolisches Enzym handelt, das keine transmembranen Segmente aufweist.

BCO - SPONGE	-----MALLRPPKRLSWYLPQLRLCLSTSASTRAEELFKSVPEQPI	41
BCO II - HUMAN	-----MVYRLPVFKRYMGNTPOKKAVFGQCRGLPCVAPLLTTVEEAPR	43
BCO II - MONKEY	-----MVHPLPVFKRYTGNTHQKKAIFGQCRGLPCVAPLLTTVEEAPR	43
BCO II - DOG	MFSQTFLLHFVSNLSTIAVGFLSVVVHWLPVLLKYMEGTHQKKAVFHKRERLPCIAPELLTTVEEMPQ	66
BCO II - MOUSE	-----MLGPKQSLPCTIAPLLTTAEBTSL	23
BCO II - FERRET	-----MEGTDQKKAAVGTREGLPCIAPELLTTVEETPQ	32
BCO II - FROG	-----MRVVGASQFLRNGAACLKKLFN---RQQVYFSSQAQLECIAPLFTQVABTPQ	49
	* *	
BCO - SPONGE	PVEGTVKGCVPDQVWNGKLIKRGPGQFQFEGDMKYNHYFDGQALLHSFTIQSGKVTYTSKFLQSDTYK	107
BCO II - HUMAN	GISARVWGHFPPKWLNGSLLRIGPGKFEFGKDKYNHWFDGMALLHOFRMAKGTVTYRSKFLQSDTYK	109
BCO II - MONKEY	GISARVWGHFPPKWLNGSLLRIGPGKFEFGKDKYNHWFDGMALLHOFRMAKGTVTYRSKFLQSDTYK	109
BCO II - DOG	MVSAQVRGQFPEWLSGYLLRIGPGKFEFGKDEYSHWFDGMALLHOFRMEKGTVTYRSKFLQSDTYK	132
BCO II - MOUSE	AVSARVRGHIPEWLNGLYLLRIGPGKFEFGKDRYNHWFDGMALLHOFRMEKGTVTYRSKFLQSDTYK	89
BCO II - FERRET	VVSAQVRGHIPEWLSGYLLRIGPGKFEFGKDKYNHWFDGMALLHOFRMEKGMVTYRSKFLQSDTYK	98
BCO II - FROG	PVQAAVLGTIPAWINGSLLRNGPGQFQFEGDDKYNHWFDGMALMHQFKIKNGSVTYMSKFLQSDVYN	115
	* *	
BCO - SPONGE	RNMAANRIVVSEFGTLGVPDPCQTIIFORFRSYFSSITDPSHDMSDNCMVNVYPAGDKYIAAETDF	173
BCO II - HUMAN	ANSAKNRIVISEFGTLALPDPCKNVFERFMSRF-ELPGKAAAMDNTNINVYVRYKGDYYLCTETNF	174
BCO II - MONKEY	ANSAKNRIVMSEFGTLALPDPCKNVFERFMSRF-ELPGKAAAMDNTNINVYVRYKGDYYLCTETNF	174
BCO II - DOG	ANSAHDRIVISEFGTLALPDPCKNVFERFMSKF-ELP----ATDNTNINVYVQYKGDYYVSTETNF	193
BCO II - MOUSE	ANSAGGRIVISEFGTLALPDPCSKIFERFMSRF-EPP----TMTDNTNINVYVQYKGDYYVSTETNF	150
BCO II - FERRET	TNSVHDRIVISEFGTLALPDPCKNVFERFMSKF-ELP----ATDNTSINVYVRYKGDYYVSTETNF	159
BCO II - FROG	VNKSKNRIVVSEFGTLASSDPCSKSLYDRFMSKF-KID----STDNCSINVYVLYKGDYYVSTETNF	175
	* *	
BCO - SPONGE	VHVTISPETLESEERTQLSKHVAVNTATAHPHWE PDGTVYNEGESSG----GYTLIKIPPSQ---HH	232
BCO II - HUMAN	MNKVDIETLEKTEKVDWSKFIAVNGATAHPHYDDPGTAYNMGNSFGPYCFYSYKVIKRVPPPEKVDLGE	240
BCO II - MONKEY	MNKVDIETLEKTEKVDWSKFIAVNGATAHPHYDDPGTAYNMGNSFGPFCFYSYKVIKRVPPPEKVDLGE	240
BCO II - DOG	MNKVDIKIETLEKTEKVDWSKFIAVNGATAHPHYDDPGTAYNMGNSYCPHCSCYNYIQTIPPEKVDLGE	259
BCO II - MOUSE	MNKVDIEMLERTEKVDWSKFIAVNGATAHPHYDDPGTAYNMGNSYGPRESYNYITRVPPKKEPGE	216
BCO II - FERRET	MNKVDIETLEKTEKVDWSKFIAVNGATAHPHYDDPGTAYNMGNSYGLHSCYNYITRVPPPEKVDLGE	225
BCO II - FROG	MRKVDPELSTLEKVDWTKFIAVNGATAHPHYDDPGTAYNMGNSYKQCTRYNYIKVPPVQKSGTEE	241
	* *	
BCO - SPONGE	VMDKASVLCNVPPKRLRPGVNHVSFGATENYLI FLEQPFQMDISNILLRNKILNKVLAKDFFMWDD	298
BCO II - HUMAN	TIHGVOVICSIASTEKMGKPSYHVSFGVTRNYIIFIEQPLKMNLWKIATSKIRGK--AFSDGISWEP	304
BCO II - MONKEY	TIHGAVVICSIAPTEKMGKPSYHVSFGVTRNYIIFIEQPLKMNLWKIATSKIRGK--AFSDGISWEP	304
BCO II - DOG	TVHGAOVICSIASAERMKPSYHVSFGVTRNYIIFIEQPLKMNLWKIVTSRIRGK--AFSDGISWEP	323
BCO II - MOUSE	TIHGAVLCSIASTEKMGKPSYHVSFGVTRNYIIFVEQPVKMLWKIITTSKIRGK--PFADGISWEP	280
BCO II - FERRET	TIHGAVVICSIASSTERMKGKPSYHVSFGVTRNYIIFIEQPLKMNLWKMITSRIRGM--AFSDGISWEP	289
BCO II - FROG	NLEGAOVICSIILPQNKMGKPSYHVSFGVTRNYIIFLELPLKLNLLKILINQIKGK--AFSDGISWEP	305
	* <b>XXXXXXXX</b>	
BCO - SPONGE	NTQVRFYVVEKNTGKVLDTKFEVTSPCVLLHINAYEDNGHIVLDVCAHKDGSAYFTLDVDDLNADA	364
BCO II - HUMAN	QCNTRFHVVEKRTGQLLPGRYYSKPFVTFHQINAFEDQGCVIIDLCCQDNGRTLEVYQLONLRKAG	370
BCO II - MONKEY	QCNTRFHVVDKHTGQLLPGRYYSKPFVTFHQINAFEDQGCVIIDLCCQDNGRILEVYQLONLRKAG	370
BCO II - DOG	QYNTRFHVVDKHTGQLLPGMYYSKPFVTFHQINAFEDQGCVIDLCCQDGRSLLEVYQLONLRKAG	389
BCO II - MOUSE	QYNTRFHVVDKHTGQLLPGMYYSMPFLTYHQINAFEDQGCVIDLCCQDGRSLDLYQLONLRKAG	346
BCO II - FERRET	QYNTRFHVVDKNTGQLLPGMYYSKPFVTFHQINAFEDQGCVVLDLCCQDGRSLLEVYQLONLRKAG	355
BCO II - FROG	DLPTLFLFVVNKHTGEPHEVTFCAQPFMSFHQINAYEDQDCIVLDLCSMDGGGAINMFSLONLRSK	371

BCO-SPONGE	RSHHNQIVK---PKRFVLPGL-LDSTDGGNIVSLDYTTATAELQSDGSSIMCKPEIISDRIF--	423
BCO II-HUMAN	EGLDQVHNSAAKSFPRRFVLPVSLNAPFEGDNLSELSYTSASAVKQADGTIWCSENLHQEDLEK	436
BCO II-MONKEY	EGLDQVNSAGRSFPRRFVLPVSLNAPFEGDNLSELSYTSASAVKQADGTIWCSENLHQEDLEK	436
BCO II-DOG	EGLDQVNSVGRSFPRRFVLPVSLNAPFEGDNLSELSYSSASAVKHADGKIWCAYENLHPEDLEE	455
BCO II-MOUSE	EGLDQVELKAKSFPRRFVLPVSLNAPFEGDNLSELSYSSASAVKQADGGEIWCSENLHHEEDLEE	412
BCO II-FERRET	AGLDQVNSVGRSFPRRFVLPVSLNAPFEGDNLSELSYSSASAVKQANGKIWCSENLHPEDLEE	421
BCO II-FROG	QALTEIYQKVPKSYPRRFVLPVSLNADTNSKQ--ETKYLNYSSATAVRKADGKVVCTHEKLLDDTUKY	435
BCO-SPONGE	---ELPRINVDYNGKPYQFAYGMSG---TFEGLVKADLKTAKSLFMAEDGCNVSEPVFVGKPGC	482
BCO II-HUMAN	EGGIEFPOIYYDRFSGKKYRFFYGCGRHLVGDSLIKVDVVKTLKVVREDGFYFSEPVFVFPAGT	502
BCO II-MONKEY	EGGIEFPOIYYGQFSGKKYRFFYGCGRHLVGDSLIKVDVVKTLKVVREDGFYFSEPVFVFPAGT	502
BCO II-DOG	EGGVEFPOINYGQFSGKKYRFFYGCGRHLVGDSLIKVDVVKTLTIWREDGFYFSEPVFVFPAGT	521
BCO II-MOUSE	EGGIEFPOINYGRFNGKKYSFFYGCGRHLVGDSLIKVDVTKTLRWRREDGFYFSEPVFVFPAGA	478
BCO II-FERRET	EGGVEFPOINYGQFSGKKYRFFYGCGRHLVGDSLIKLDVVKTLMIWREDGFYFSEPVFVFPAGA	487
BCO II-FROG	--GIEFPOINYSKYNTKKYRYYYACGQHILIGDSLVKVDIETKQTKVWKEGCFYFSEPIFVVEYDS	499
BCO-SPONGE	SQEDGCVILSAVLOYEENKPPFLLVLDAQSFTELSRVEFPGIOMHRDVHGIQVPAKN-	539
BCO II-HUMAN	NEEDGGVILSVVITPNQNESNFFLLVLDAKNEELGRAEVP-VQMPYGFHGTFTPI---	556
BCO II-MONKEY	NEEDGGVILSVVITPNQNESNFFLLVLDAKNEELGRAEVP-VQMPYGFHGTFTPI---	556
BCO II-DOG	REEDGGVILSVVITPDQENNNFFLLVLDAKNEELGRAEVP-VRMPYGFHGTFTVAT---	575
BCO II-MOUSE	DEEDSGVILSVVITPNQNESNFFLLVLDAKSFTELGRAEVP-VQMPYGFHGTFTVPI---	532
BCO II-FERRET	SEEDGGVILSVVITPDQENNNFFLLVLDAKNEELGRAEVP-VRMPYGFHGTFTVTV---	541
BCO II-FROG	AEDNGVILSAVLTPEHEKNIFFLLVLDAKDEVEIGRAEVP-VKMPYGFHGTFTPQNSK	556

**Abb. 11:** Aminosäuresequenzvergleich der asymmetrisch spaltenden BCO verschiedener Organismen: *Suberites domuncula* (BCO-sponge; *homo sapiens* (BCO\_II-human; Acc. No. Q9BYV7); *Macaca fascicularis* (BCO\_II-monkey; Acc. No. Q8HXG8); *Canis familiaris* (BCO\_II-dog; Acc. No. XP\_536572.2) *Mus musculus* (BCO\_II-mouse; Acc. No. AAI07008.1); *Mustela putorius furo* (BCO\_II-ferret; Acc. No. AAS20392.1); *Xenopus tropicalis* (BCO\_II-frog; Acc. No. AAH75500.1). Die Position des degenerierten Primers AS<sub>330-335</sub> ist mit roten x gekennzeichnet. Asterisken zeigen die 6 konservierten Histidinreste die evtl. an der Bindung des Eisen-Cofaktors beteiligt sind. Die nach der BLOSUM 62 Matrix (HENIKOFF und HENIKOFF, 1992) vorgenommene Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung (schwarz ≥ 95 %, dunkelgrau ≥ 85 %, hellgrau ≥ 60 % konservierte AS). Das Alignment wurde mit ClustalX 1.8 (2.10) erstellt und mit Genedoc 2.6.002 (2.10) bearbeitet.

#### 4.1.5.1 Homologie zur BCO-II anderer Organismen

Die Aminosäuresequenz der asymmetrisch spaltenden Carotinoxygenase verschiedener Organismen ist hoch konserviert (Abb. 11). Die Homologie zur dargestellten *S. domuncula*-Sequenz beträgt durchschnittlich 59,7 % an gleichartigen Aminosäuren (bezüglich ihrer physikalischen/chemischen Eigenschaften), davon sind 43,1 % identisch. Die Sequenz wies höchste Homologie zum Mäuseenzym (60 % zu 44 %; E-Wert = 3<sup>-119</sup>) auf. Die Position der sechs konservierten Histidinreste, die evtl. an der Bindung des Fe<sup>2+</sup>-Cofaktors beteiligt sind, sind mit Asterisken markiert.

#### 4.1.5.2 Homologie zur RPE65 Proteinfamilie

Die konservierte Domäne des RPE65 (= *retinal pigment epithelium*), eines Proteins (65 kD) mit bislang ungeklärter Funktion innerhalb des Pigmentepithels der Retina, stellt eine Proteinfamilie dar, die nicht nur Proteine der Retina einschließen, sondern auch die Neoxanthin/Carotin spaltenden Enzyme der Pflanzen (z.B. VP14), die Lignostilben- $\alpha$ , $\beta$ -dioxygenase der Bakterien und die symmetrische (BCO-I) und asymmetrisch spaltende Carotinoxygenase (BCO-II) der Tiere. Demzufolge weist die BCO aus *S. domuncula* signifikante Homologien zu diesen Gruppen auf. Zur symmetrischen Carotinoxygenase

besitzt sie durchschnittlich eine Übereinstimmung von 54,4 % an ähnlichen AS, davon 36,1 % an identischen. Zu RPE65 beträgt diese 56 % an ähnlichen AS, davon 37 % an identischen.

#### 4.2 IDENTIFIZIERUNG UND KLONIERUNG EINER WEITEREN CAROTINOXYGENASE (BCO-II)

Im Homologiescreening (3.12) auf der Suche nach der BCO wurde u.a. ein Klon identifiziert, der nach Sequenzanalyse eine Homologie zur RPE65-Proteinfamilie und den damit verwandten Carotinoxygenasen aufwies. Die Sequenz unterschied sich von der BCO und erwies sich, nach vollständiger Sequenzierung, als introntragend und unvollständig. Von frisch isolierter RNA (3.14) wurde mittels eines genspezifischen Primers ein 5'-RACE durchgeführt (3.4), das Produkt amplifiziert (3.3.1), sequenziert (3.11) und dadurch die Vollständigkeit und Richtigkeit des Leserasters der BCO-II überprüft.

##### 4.2.1 Analyse der BCO-II-Sequenz

Die Gesamtlänge der BCO-II beträgt (exklusive Poly(A)) 1766 bp mit einem offenen Leseraster von 1599 bp, die für ein potentielles Protein von 533 AS kodieren. Der kodierende Bereich wird am 5'-Ende von 47 bp und am 3'-Ende von 120 bp flankiert. Die Kozak-Konsensussequenz um das Startmethionin ist bei diesem Gen nicht vorhanden. Der 3'-untranslatierte Bereich besitzt dagegen das Polyadenylierungssignal AATAAG (NT<sub>1700-1706</sub>), wobei der Gehalt an A/T insgesamt hoch ist (32 %/38 %).

```

-47          GGCACCTAGCTAGCTGTCTAGGAAAACCAATCACATGAATCAGCATG          -1
  1  M  A H A A S P G E S S A N P D L S K P I          20
  1  ATG GCTCATGCAGCTTCTCCAGGTGAATCCTCAGCCAACCCAGATCTGTCAAAGCCTATT  60

21  D V K K L R K G W H A S P K E E Y D Y W          40
61  GATGTTAAAAAGTTGAGGAAAGGCTGGCATGCTTCTCCAAAGAAGAGTATGATTATTGG  120

41  V P D A D I E G S V P L D L K G T F L R          60
121 GTTCCAGATGCAGACATAGAAGGATCTGTACCCTTGGACCTCAAAGGCACATTTCTCAGA  180

61  N G P G L L E V Y G T K L K H P I D G D          80
181 AATGGTCCCTGGACTACTGGAAGTGTATGGAACCAAACCTGAAGCACCCCTATTGATGGTGT  240

81  G M V V A L T F I E G R V H L R A K F V          100
241 GGCATGGTGGTAGCTCTGACATTTATTGAGGGAAGAGTGCATCTCCGTGCAAAGTTTGT  300

101 A T K E R L E E Q R E R K L I Y R G Q M          120
301 GCAACAAAAGAGAGGTTGGAAGAACAGAGGGAGAGGAAGCTTATCTATCGTGGGCAGATG  360

121 G T N P N S A V R D T A V L M K N F L T          140
361 GGAACAAACCCAAACAGTGCAGTCAGGGATACAGCCGTTTTGATGAAGAACTTTCTCACC  420

141 L S W P T L R F R N P S N T N V F Y W G          160
421 CTGTCGTGGCCAACTCTGAGGTTTCGTAATCCTTCAAACACCAATGTATTTTACTGGGGA  480
    
```

161	G K I L T V Y E T K Y P H C L D P H T L	180
481	GGGAAGATCTTGACTGTGTATGAGACCAAGTACCCACATTGTCTGGATCCCCATACATTG	540
181	E T L G E E T L N G A L T L K A F A A H	200
541	GAGACACTAGGAGAGGAAACATTGAATGGAGCTCTCACTCTTAAAGCATTGTGCTCAC	600
201	F R L D M R N K R L V C F G V V P G V G	220
601	TTCAGACTGGACATGAGGAATAAGCGTCTGGTGTGCTTTGGAGTGGTACCCGGTGTGGT	660
221	S R K P S L A I Y E F D D K W N L M Q Y	240
661	TCTCGAAAAGCCCTCTCTAGCCATTTATGAATTTGACGACAAGTGAATCTAATGCAATAT	720
241	Q M H H I D G L N Y A H D F L L L R D Y	260
721	CAAAATGCACCACATCGATGGGCTTAACTATGCTCAGACTTTCTGTTGCTTCGGGACTAC	780
261	Y V F H M T P F A D M T F T A G L K V F	280
781	TATGTGTTTCACATGACTCCCTTTGCTGACATGACGTTTACAGCTGGACTGAAGGTATTT	840
281	A G L S S P G E L M K Y Y S H M P S R F	300
841	GCTGGTCTGTCTCTCCTGGTGAGTTGATGAAGTACTACTCACACATGCCGTCTCGGTTT	900
301	V V I P R H K G A A H Q D I K L L N T E	320
901	GTGGTCATTCCAAGACATAAGGGAGCTGCTCATCAGGACATCAAACCTCTCAATACTGAA	960
321	P C H I F H F G N A V Q K D N D T I T F	340
961	CCTTGTCATATTTTCCATTTTGGGAATGCTGTCCAGAAAGACAATGATAACAATCACTTTC	1020
341	N A V C L G P K F N M T F E R E C G Y P	360
1021	AATGCTGTCTGCTTGGGTCCAAAGTTCAACATGACATTTGAACGGGAATGTGGTTATCCA	1080
361	M R R L L L V T C T S S P W T C P R V L	380
1081	ATGCGTCGGTTGCTCCTGGTAACATGTACAAGTTCACCCTGGACCTGTCCAAGAGTACTT	1140
381	V C D P R I L L T Q P M W N S Q L S I L	400
1141	GTGTGTGATCCAAGGATCCTGCTGACCCAGCCAATGTGGAATTCCCAAGTGTCCATCCTT	1200
401	T D M A C Q L P R Y S Y L M S S D R T G	420
1201	ACAGACATGGCTTGTCAACTTCCCAGATATTCGTATTTGATGTCTAGTGACCGTACTGGA	1260
421	Y K L P Y R D V V K H D L K G E T R Q V	440
1261	TACAAACTACCCTACAGAGATGTTGTCAAGCATGACTTGAAGGGAGAGACAAGACAAGTG	1320
441	W Y S H G C V G E P V F V P R L G W A S	460
1321	TGGTACTCTCATGGGTGTGTAGGTGAGCCTGTCTTTGTTCCACGATTGGGCTGGGCAAGT	1380
461	I D L G D D D D G Y V V V Q L Y I P E K	480
1381	ATCGACCTGGGTGATGATGATGATGGCTATGTGGTGGTCCAGCTATATATCCCTGAGAAA	1440
481	H I T E F A V L D A K H V D Q G P L A R	500
1441	CACATCACAGAGTTTGCTGTGTTGGATGCCAAGCATGTTGATCAAGGGCCTCTTGCAAGG	1500
501	I K L K H H I P Y G F H G T F T P E V F	520
1501	ATCAAATAAGCACCACATTCCTATGGGTTCATGGTACATTCCTCCAGAGGTGTTT	1560
521	V G D S H V P K A S A K L *	533
1561	GTGGGTGATAGCCATGTGCCTAAAGCAAGTGCAAAGCTT <b>TAGATAATGACCAAATAAT</b>	1620
1621	<b>GTTTAGAAATAGGTATATAATGTTACGTCACCTTAAGCTTCCTTGTATCACTTGTATGT</b>	1680
1681	<b>TGATGTGTACATTGTCAATGAATAAGTGTGTCATTGT (A)<sub>n</sub></b>	1719

**Abb. 12:** Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz der BCO-II. Untranslatierte Bereiche am 5'-, bzw. 3'-Ende der Sequenz sind in orange, kodierende dagegen schwarz eingefärbt. Das Start- und Stopp-Codon ist in roten, fettgedruckten Lettern dargestellt. Die Nummerierung sowohl der kodierenden Nukleotide als auch der davon angeleiteten Aminosäuren beginnt mit +1, wobei die erste nichtkodierende Base am 5'-Ende mit -1 beziffert ist.

4.2.2 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz der BCO-II

BCO II-S.D.	-----MAHAASPGESSANPDLKSKIDVKKLRKGCWHASPKBEYDYWVPDADITGSSVLELDKGTFLFRN	61
OXYG-N.P.	-----MHLKSQESPVTEKSYSTRADYQGGYQSLT-OEFDYW--IDDIHGQIPRELEGLTFRN	53
OXYG-T.E.	-----MTNLQIQP-----KSYTSKDYQGGYKSSQP-OEYNW--IDDIHGQIPEDLNGTFFRN	50
OXYG-A.V.	MQNNPFLKPTFFNMQSYKYQOKETSEKSYSTRADYQGGYKSLT-OEFDYW--IDDIHGQIPRELEGLTFRN	67
OXYG-G.V.	-----MTAAQDSRS-----PYASADWAGGYRTLE-AEQAV--IDDIHGQIPRELEGLTFRN	49
OXYG-S.S.	-----MTVAPAR-----PYNRSDWASSFVNVD-EELTDVA-LTPVRCVVPABEIQGTFYRN	48
OXYG-TS.E.	-----MTGVLDLDR-----PYTMADWRGGTESLT-OEYDYW--IEEVEGTVPTDLVGLTYRN	47
▼		
BCO II-S.D.	GPGLLEVYGTKLKHFDGDMVVALTFIEGRVHLRAKFAVATKERLEEQRERKLIYRCQMGTNPNSAVRDT	131
OXYG-N.P.	GPGLLDVNGQFLHHPFDGDMISKIIITNGRAHFNRNRFVRTIGYLAEOKAGKILYRGTFGTQKPGGWRVN	123
OXYG-T.E.	GPGLLDINGQLIAHFPDGDGMVCAISFKNRRAHFQNRVFRTEGYVAEKAKAGKILYRQVFGTQHTGGWLAN	120
OXYG-A.V.	GPGLLDIKGQSIHHPFDGDMISRIISFVNGRAHYRNSFVKTAGYLAEKNAAGKILYRQVFGTQKPGGWRVN	137
OXYG-G.V.	GPGRFERGGVSYKHPFDGDMISAVRFAGGRAHFQNRVFRTEGFIQESAAGRILSKNVFGTLPGGFWAN	119
OXYG-S.S.	GPGRLERDGQRVHHPFDGDMIAAMRFIDNQRVQLTNRVFRTEGWLAEKADKVLVYRQVFGSQKPGGRLAN	118
OXYG-TS.E.	GPGLLEBGGVPLAHFPDGDGMICAFRFIEKGRVHFRNRYVRTAGFLEEEKANRLLYRQVFGTQKPGGFWAN	117
*		
BCO II-S.D.	AVLMLNFLTLSWPTLRFNPSNTNVFYWGGKILIVYETKYPHCLDPHILETLGEEITLNGALT-LKFAFAAH	200
OXYG-N.P.	IFDFK-----LKNIAANTNVIYWGKLLALWEASEAYCLDPYILETLGNEYFNCAISAGEAFAAH	182
OXYG-T.E.	LFDFK-----LKNIAANTGITIYWGDKLLALWEGGQPHRLNPQNETIIGLNDLDGLLQPGQAFSAH	179
OXYG-A.V.	IFDFK-----LKNIAANTNVIYWGDKLLALWEAAEPHRLDPKILETLGKEYFDDVLSAGEAFAAH	196
OXYG-G.V.	AFDFG-----FKNVANTGVVYHGGRRLLALWEAAPHRLDPASLETFGLLDLAGALCGGKPFSAH	178
OXYG-S.S.	AFDLR-----LKNIAANTNVVRLGQDLLALWEAAEPHALDPOLETGRGLSRLDGVLKKGAFSAH	177
OXYG-TS.E.	FLDTR-----VKNIAANTHVIYWAGKLLALWEASLPHRLDPVILETLGDLNLDGLLNRERDAFAAH	176
*		
BCO II-S.D.	FRLDMR-----NKRLVCFGVVPGVGRSRKPSLAIFYEFD---DKWNLMQYQMHHDGLNYAHDFLLLRDY	260
OXYG-N.P.	PRLQRNCEQDGGEPRLVNFSLKPGLS---TITIFELN---LAGEIVRQQAHVDFCFIHDVITPNY	245
OXYG-T.E.	PRIDK--GKDGKGDVLVNFSSVKPGLSS---TITIFEFN---SQKLEKRYSNSIPGFAFLHDMVITPNY	240
OXYG-A.V.	PRFDPSCQDNGAPCLVNFSSVKPGLST---KITIFELN---LAGEVVRKHAHVVPGFCFIHDVITPNY	259
OXYG-G.V.	PRLDL---ATG---DLISFVVRTGLQI---VLYLIRLS---PDGGVVRVES-EHTVPGFAFVHDFAITPNY	235
OXYG-S.S.	PRFDP---GHNGRPSMVTFGVKTGPRS---TIRLMEFATEGPDACTLLHRSDSFPGFAFLHDFAITPNY	241
OXYG-TS.E.	PRFDP---QTQRLVNFVQVQPLNT---RIRLYEFD---ANGQCVSQPTFQIPGFAFLHDFAITPNY	233
*		
BCO II-S.D.	YVFHMTFADMTFTAGLKVFAGLSSPCELMKYYSHMPSRFVVI PRHKGAHQ---DIKLNTEPECHIFH	326
OXYG-N.P.	CIFFNQPVTFN---PIPFALGIRAAEGEIKFQNPQTKIILIPRFPKEGQE---EIKFLETQSGFVVFH	307
OXYG-T.E.	CIFFNQPVAFN---PFPLLLGLRTPGQCLEFPLNNSIQVILIP---RDGSK---AIKILKTKPCFVVFH	299
OXYG-A.V.	CIFFNQPVSN---PIPFALGLRGAEGEIQVKNPQPTRIILIPRFPQSGQK---EIKLETVRSQFVVFH	321
OXYG-G.V.	WVFFQNPALD---PLPFVLFKKAAGEGLRLAPGEPTRILIP---RNGG---PVQIATEPEFVVFH	293
OXYG-S.S.	AVFLQNAIAFN---PLPFVTGKGAACQLQSKPGGKGRFVLLIP---RDSGEFAGQKPRILEAPEFVVFH	304
OXYG-TS.E.	AIIVFQNPVQFN---PLPYLLGLRGAAQCLQFNQAQEPTRVWLLP---RRGGP---PQMLTMPPECFVVFH	291
▼		
BCO II-S.D.	FGNAVAKDNDTITFNAVCLGPKFNMTFEREMWLSNASVAP-CNMYKFTLDSLKSTCVRSKDPADPANVEF	395
OXYG-N.P.	HVNAFVEVG-EEVLDISICYQDLPEVEPKSDFROVDREASSPQLWRFYLLNLKNG--TVQRELIDSRCCCF	374
OXYG-T.E.	HANAWEKD-GETYVDSICYESVSQTDLDGNFLEVDREDSMTECKLWRFKINLSEN--NVEHKLIESRCCCF	366
OXYG-A.V.	HVNAFVVG-DEILDVDSICYDSLPEVEPESDFROVDREAIAPQLWRFYLLNLKDG--TVQKLLIESRCCCF	388
OXYG-G.V.	HVNAFERE-GRIVVDSIRYEEYITTEQEDRFROVDREAIAPQLWRFYLLNLKDG--TVQKLLIESRCCCF	360
OXYG-S.S.	HLNAFEDG-DHVVESIVYDDFPSIGDDDAEVDREDTVPECILHRCRLDLSRE--IVNTERISERTCEF	371
OXYG-TS.E.	HANAWEVG-DETHVESIAYSHFPNLEPGMDFREVNFAALPASLLWRIOQLNPKTK--AVDQWVSDRPPCEF	358
*		
BCO II-S.D.	PTVHPYRHGLSTSRYSYLMSSDRGTGYKLPYRDVVKHDLKGETROVWYSH--GCVEPVPVPLG---WA	459
OXYG-N.P.	PSIDPANVGHF-YRYLYIGAHAESGNAPLQALLKIDLHSGEKQFWSAAPRGFVGEPIFVPR-----	435
OXYG-T.E.	PTLNPNVNGKA-YRYLFI GAADKPSGNAPLQAILKIDLHTGKROTFSVAPRGFACEPLFVVP-----	427
OXYG-A.V.	PAIHPRNVGRS-YRYLYMGAHRDSDGNAPLQALLKIDLESQEIWSAAPRGFTGEPFVPR-----	449
OXYG-G.V.	QVHEDRVGRP-YRFAFAAAVHAEGGNAPLQAIKIDLVETGRAEFHSAFSCFVSEPIFVPR-----	421
OXYG-S.S.	AMVNPERQGLS-AQFAWMAVAERETGNDPLOAVQKLDLSSGATHTWSAAPRGFVSEPLMVR-----	432
OXYG-TS.E.	BVVHBAKVGQP-YRYTYLAAGHDPKTNAPLQALWRCDROTCBEQFWSAAPRGFVSEPIVVPGLQKGDFL	427
*		
BCO II-S.D.	SIDLGGDDGQVYVQLYIPEKHI TEFAVLDKAKHVDQGPLARIKLKHHPYGFHGTFTPEVFGVSDSHVPKA	529
OXYG-N.P.	-PDSEKEDDGWVLAIVYNAAHHRSDVILLDASDFSKGTIARLHLKHHIPYGLHGSFTSEVFGEI-----	498
OXYG-T.E.	-PNGVNEEDGWLLMVMYDAAHHRSDVILLDARDLNKKPVARLHLKHHIPYGLHGSFTPNYFQE-----	489
OXYG-A.V.	-PGSEKEDDGWVLAIVYDAAHHRSDVILLDASDFTKGAIARLHLQHVVYPYGLHGNFTPQVQV-----	510
OXYG-G.V.	-PDGTAEDDGWLLAMVYDARRDRSDVILLDGRDLT--CLTRIGLKHHPVYSLHGTFVPEVVFH-----	482
OXYG-S.S.	-PGAEEDDGWVLDVWNGARRASDVILLNARDLS--EVAVLELPLAVPHGLHGSWAAEI-----	489
OXYG-TS.E.	WQGAQGEEDGWLLQVYDASCHKSQLLIFDAAAIASAGPVARLHLKHHIPYGLHGSFTTAV-----	487

Abb. 13: Aminosäuresequenzvergleich der alternativen Carotinoxigenase (BCO-II) mit Apocarotinoidoxygenasen aus Cyanobakterien. *S. domuncula* (BCO\_II-S.D.); *Nostoc punctiforme* PCC 73102 (Nostoc: Acc. No. ZP\_00112423); *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (OXYG-T.E.: Acc. No. ZP\_00673332.1); *Anabaena variabilis* ATCC 29413 (OXYG-G.V.: Acc. No. YP\_321755.1); *Goleobacter violaceus* PCC7421 (OXYG-G.V.: Acc. No. BAC91630.1); *Synechococcus* sp. 7942 (OXYG-S.S.: Acc. No. ACC12875); *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (OXYG-TS.E.: Acc. No. NP\_680806.1). Die nach KLÖR und SCHULZ (2006) identifizierten, konservierten Histidin- (\*) und Glutamatreste (▼) sind gekennzeichnet. Die anhand der BLOSUM 62 Matrix (HENIKOFF und HENIKOFF, 1992) vorgenommene Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung (schwarz ≥ 95 %, dunkelgrau ≥ 85 %, hellgrau ≥ 60 % konservierte AS). Das Alignment wurde mit ClustalX 1.8 erstellt und mit Genedoc 2.6.002 bearbeitet.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der BCO-II umfasst 533 AS und weist ein errechnetes Molekulargewicht von 60,56 kD und einen theoretischen pI = 8,27 auf. Die Halbwertszeit *in vivo* wird aufgrund des n-terminalen Methionins auf 30 h geschätzt (nach BACHMAIER *et al.* 1986). Der *in vitro* Instabilitätsindex wird mit 32,71 beziffert und klassifiziert das Protein als stabil. Über die Zugehörigkeit zur RPE65 Proteinfamilie (*Acc. No.* PF03055; Abb. 10) AS<sub>12-518</sub> hinaus zeigte eine Analyse mit Pfam/SMART Strukturelemente der Cyanat Lyase (AS<sub>65-105</sub>), der LINK-Domäne (AS<sub>259-350</sub>) und der CW-Domäne (AS<sub>271-378</sub>; einer Gruppe hypothetischer Proteine aus *C. elegans*). Mit einer Wahrscheinlichkeit von 89 % (PSORT II) handelt es sich um ein cytoplasmatisches Enzym. Die BCO-II besitzt zwar Homologie (39%/19 % gleichartiger/identischer AS) zur BCO aus *S. domuncula* und durchschnittlich 30%/15% zu den anderen, asymmetrischen BCOs. Höchste Homologie besitzt sie aber zur bakteriellen Lignostilbene-alpha,beta-dioxygenase aus *Nostoc punctiforme* (53%/35 %; E = 5<sup>-67</sup>; *Acc. No.* ZP\_00112423) und der Carotinoid Oxygenase aus *Trichodesmium erythraeum* (53%/33 %; E = 2<sup>-62</sup>; *Acc. No.* ABG52331), beides Cyanobakterien. Die laut KLÖR und SCHULZ (2006) konservierten Histidin- (\*) und Glutamatreste (▼) zur Koordinierung des Fe<sup>2+</sup>-Cofaktors sind in den ausgerichteten Aminosäuresequenzen gekennzeichnet (Abb. 13).

#### **4.3 KOLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON ENZYMEN DER SDR-FAMILIE MIT POTENTIELLER BETEILIGUNG AM VITAMIN A STOFFWECHSEL**

##### **4.3.1 Identifizierung der entsprechenden Gene.**

Zur Überprüfung, ob im Schwamm ein vergleichbarer Vitamin A-Stoffwechselweg wie in höheren Organismen vorzufinden ist (1.2.1; Abb. 2), wurde das Schwammgenom auf eine solche Enzymmaschinerie hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden für die Retinoldehydrogenase (ADH) und die Retinaldehydrogenase (RA-DH) degenerierte Primer (2.7.3) anhand konservierter Bereiche innerhalb von Aminosäurealignments erstellt (Abb. 15(x)) und die cDNA-Bank von *S. domuncula* mittels PCR durchsucht (3.3.4). Die resultierenden PCR-Fragmente wurden kloniert (3.9) und durch Sequenzierung (3.11) auf ihre Zugehörigkeit überprüft. Einige der resultierenden Fragmente (s.u.) ließen sich zu der Proteinfamilie zuordnen und wurden mittels PCR aus der cDNA-Bank vervollständigt. Für die potentielle Retinsäuredehydrogenase (RALDH) wurde auf ein EST-Fragment der Schwammdatenbank zurückgegriffen und mittels einer DIG-markierten, genspezifischen DNA-Sonde im Homologiescreening (3.12) der Komplettklon aus der cDNA-Bank isoliert.



**4.3.1.1 Analyse der potentiellen Retinal-Dehydrogenase (RA-DH)**

Die Gesamtlänge der RA-DH beträgt exklusive des Poly(A)-Schwanzes 1039 bp und enthält ein offenes Leseraster von 852 bp, welches für ein potentielles Protein von 284 AS kodiert. Flankiert wird diese Region vom 5'-untranslatierten Bereich, der nicht die für Eukaryoten typische Kozaksequenz (4.1.4) für eine hohe Translationseffizienz enthält. Der 3'-untranslatierte Bereich ist reich an A und T (26 % bzw. 39 %), und weist das Polyadenylierungssignal AATAAG auf (BEAUDOING *et al.* 2000). Der hohe Gehalt an A/T spricht für ein instabiles mRNA Transkript, obwohl keine typischen Erkennungssequenzen für AU-reiche Elemente (AREs) vorhanden sind (charakteristisch für Typ III AREs; BARREAU 2006).

-41	GGCACGAGCTGAGCTTGTGTTTTGTCACCTATTGTGTTTTCTGA	-1
1	M H V L L E F L L S L G K V G W F C L V	20
1	ATGCATGTGCTGCTAGAAATTTTTGCTGAGTCTGGGAAGGTAGGATGGTCTGTCTGGTG	60
21	A F L K M F N P F K S K K N L D R D I V	40
61	GCATTCTGAAGATGTTCAACCCGTTCAAGTCAAAGAAAAACCTGGATAGGGATATTGTT	120
41	L V T G A G S G I G R L M A I R F A K L	60
121	CTTGTGACTGGAGCTGGCAGTGGTATAGGGAGACTAATGGCTATAAGGTTTGCAAACCTA	180
61	G A K V I L W D I N R E A N E A V A N E	80
181	GGAGCTAAAGTGATCCTATGGGATATAAACAGGGAAGCTAATGAAGCTGTTGCAAACGAA	240
81	I K E M G K T A L P Y G R P A G G R T S	100
241	ATCAAAGAAATGGGCAAACTGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGACTAGT	300
101	D W V I S G K K F F D V A D K M A D L T	120
301	GATTGGGTTCATCAGCGAAAGAAGTTTTTTGATGTTGCAGACAAAATGGCTGATCTCACA	360
121	F Q V N T A A H F W T I K A F V P A M I	140
361	TTCCAAGTCAACACAGCTGCACACTTCTGGACCATCAAGGCGTTTGTCCCTGCAATGATA	420
141	A K N H G H I I T I A S S A G L F G V A	160
421	GCCAAGAACCACGGTTCATATCATCACCATCGCTTCATCTGCCGTTTGTGTTGGAGTAGCT	480
161	G L M D Y C A S K Y G A V G V H E S L A	180
481	GGTCTCATGGATTACTGTGCATCTAAGTATGGTGCAGTAGGGGTTTCATGAATCACTAGCT	540
181	S E L S A L K V D G V T S T L V C P F F	200
541	TCAGAGCTCTCCGCTCTCAAAGTTGATGGAGTGACGTCTACTCTTGTCTGTCCTTTCTTT	600
201	I D T G M F D G V K T R F P F L L P I L	220
601	ATTGACACTGGGATGTTTGATGGAGTCAAGACCAGGTTTCCATTTCTTCTGCCAATTTTG	660
221	K P D Y A V D K I M D A F H S N Q Y M L	240
661	AAACCGACTATGCTGTAGACAAGATAATGGATGCATTTTCATTCGAACCAGTACATGCTG	720
241	L M P R I V Y L F Y C L Q T I L P K E A	260
721	CTCATGCCAAGGATTGTGTATCTTTTCTACTGCCTACAAACAATTTTGCTAAGGAGGCA	780
261	L L E A G R F F G V N Q S M N T F R G R	280
781	TTATTGGAAGCAGGCAGATTCTTTGGAGTAAATCAATCCATGAACACTTTCAGAGGAAGA	840

```

281   V  K  K  D  *
841  GTCAAGAAAGACTAGGTACACACCAGTTAGTGTCTGAGTGATGTGGTTATTTTTACAATG 900
901  TTTTCTCTGGAATAAGTATGAAACATTGCAATTCAGTAATGAGTTGTGTTGTAATAAGT 960
961  GTACATGTTGTGTATGTGTATCATGTGACTTGTAGCG (A) n 998
    
```

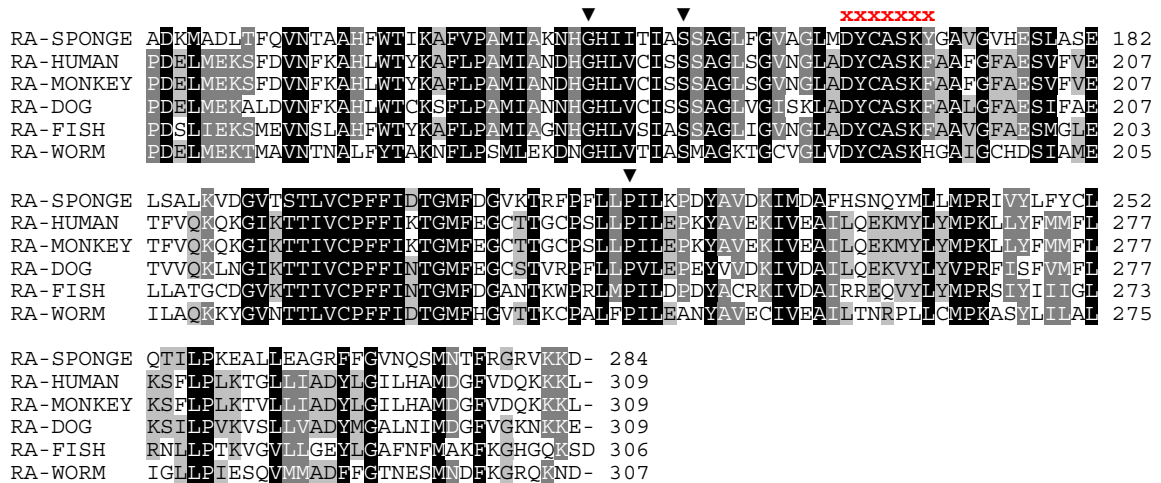
**Abb. 14:** Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der potentiellen Retinsäuredehydrogenase. Untranslatierte Bereiche am 5'-, bzw. 3'-Ende der Sequenz sind in orange, kodierende dagegen schwarz eingefärbt. Das Start- und Stopp-Codon ist in roten, fettgedruckten Lettern dargestellt. Die Nummerierung sowohl der kodierenden Nukleotide als auch der davon abgeleiteten Aminosäuren beginnt mit + 1, wobei die erste nichtkodierende Base am 5'-Ende mit - 1 beziffert ist.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der RA-DH beträgt 284 AS, mit einem errechneten Molekulargewicht von 31,4 kD und einem theoretischen  $pI = 9,34$ . Der N-Terminus des potentiellen Proteins determiniert die *in vivo* Halbwertszeit auf ca. 30 h, wobei der Instabilitätsindex von 25,32 das Protein auch *in vitro* als stabil bezeichnet. Mit 94 %iger Wahrscheinlichkeit handelt es sich um ein cytosolisches Protein, das am C-Terminus in der Membran verankert ist. Eine Analyse der Aminosäuresequenz mit PROSITE (2.10) fand die Signatur der *short-chain Dehydrogenase/Reduktase* Familie (SDR, *Acc. No.* PS00061). Die Sequenz enthält sowohl das konservierte Y-[XXX]-K Motiv (AS<sub>165-169</sub>), das zur aktiven Region des Enzyms gehört, als auch die NADPH-Coenzymbindedomäne G-[XXX]-G-[x]-G (AS<sub>44-50</sub>) (JÖRNVALL *et al.* 1995). Die drei konservierten Aminosäurereste, die zum einheitlichen Faltungsmuster dieser Enzymfamilie beitragen, sind ebenfalls vorhanden (G<sub>144</sub>, S<sub>151</sub> und P<sub>217</sub>). Die zusätzlich gefundenen Motive stehen für Signaturen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in Sequenzen vorzufinden sind. Dazu gehören die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten durch die Proteinkinase C (Konsensus: [ST] - x - [RK]; KISHIMOTO *et al.* 1986), die N-Myristylierung von Glycinresten (Konsensus: G - {EDRKHPFYW} - x(2) - [STAGCN] - {P}, TOWLER *et al.* 1988) und eine mögliche Amidierungsstelle (Konsensus: x - G - [RK] - [RK]; KREIL 1984). Das Enzym weist die höchste Sequenzhomologie (63 % ähnliche AS, davon 43 % identische) zur RA-DH aus *C. elegans* auf und besitzt durchschnittlich 60 % an ähnlichen AS (davon 41 % identische) zu den hier dargestellten Enzymen (Abb. 15).

```

                                     *   *   *
RA-SPONGE  ---MHVLLLEFLLSLGGKVGWFCIVAFIKMFNP--FKSKKNLDRDILVLTGAGSGIGRLMATEFAKLCAKV 64
RA-HUMAN   MSFNLQSSKKLFIPLGKSLFSLLEAMIFALLP---KPRKNVAGETVLTITGAGSGLGRLLALQFARLGSVL 67
RA-MONKEY  MSFNLQSSKKLFIPLGKSLFSLLEAMIFALLP---KPRKNVAGETVLTITGAGSGLGRLLALQFARLGSVL 67
RA-DOG     MASNLKSAKDLVVFLGKSVIAFLESMTFTIIP---KPRKNVAGETVLTITGAGSGLGRLLALQFARLGSVL 67
RA-FISH    MNFLLETLR--VLFLL--SLVVLGLEAFVRLFTIP---PRRKNVSGELVLLTGAGSGIGRLMALQFARLDARL 63
RA-WORM    ---MDRALDFVKMIVGTLFFIILNFFKNFLENGVLEPKSVECKKVLITGSSSGIGRLMALQFAKLCAEV 66

RA-SPONGE  ILWLDINREANEAVANEIKEMG-----KTALPYGRPACGRISDW---VISGKKFFDV 112
RA-HUMAN   VLWLDINKEGNEETCKMAREAGATRVRAYTDCDSQKEGVYRVADQVKKEITGDVSIILINNAGIVTGKKEFLDC 137
RA-MONKEY  VLWLDINKEGNEETCKMAREAGATRVHAYTDCDSQKEGVYRVADQVKKEVGDVSIILINNAGIVTGKKEFLDC 137
RA-DOG     VLWLDINKEGNEETCKMAREAGATRVYAYTDCDSQREDIYRVAEQVKKEVGDVSIILINNAGIVTGKKEFLDC 137
RA-FISH    VLWLDINEDGNKETARLIKKEYGARAHTYTDCDSREEVYRVANQVKREVGDVTLINNAGIVTGKKEFMD 133
RA-WORM    VIWVDVNVKDSAEETKNQVVKAGGK-ASTFVVVDLSQYKDIHKVAKETKEAVGDIIDILINNAGIVTGKKEFLDC 135
    
```



**Abb. 15:** Aminosäuresequenzvergleich der RA-DH verschiedener Organismen: *Suberites domuncula* (RA-sponge; *homo sapiens* (RA-human: Acc. No. BAB91014.1); *Pan troglodytes* (RA-monkey: Acc. No. XP\_528145.1); *Canis familiaris* (RA-dog: Acc. No. XP\_535080.2) *Mus musculus* (RA-mouse: Acc. No. AAI07008.1); *Danio rerio* (RA-fish: Acc. No. AAH54138.1); *Caenorhabditis elegans* (RA-worm: Acc. No. CAA98524.1). Die Position des degenerierten Primers ist in roten (x) dargestellt und liegt innerhalb der aktiven Region (Y - [XXX] - K). Die Coenzymbindedomäne ist mit (\*) und die konservierten Reste G, S und P mit (▼) markiert. Die nach der BLOSUM 62 Matrix (HENIKOFF und HENIKOFF, 1992) vorgenommene Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung (schwarz ≥ 95 %, dunkelgrau ≥ 85 %, hellgrau ≥ 60 % konservierte AS). Das Alignment wurde mit ClustalX 1.8 erstellt und mit Genedoc 2.6.002 bearbeitet.

### 4.3.1.2 Analyse der potentiellen Alkoholdehydrogenase (ADH)

Die Gesamtlänge der ADH beträgt, exklusive des Poly(A)-Schwanzes, 1128 bp, von welchen 1020 bp zum offenen Leserahmen gehören und für ein potentielles Protein von 334 AS kodieren. Dem angrenzenden 5'-untranslatierten Bereich fehlt die Kozaksequenz (KOZAK 1991) für eine hohe Translationsinitiation. Dem 3'-untranslatierten Bereich dagegen fehlt ein typisches Polyadenylierungssignal. Der Gehalt an A und T ist mit 29 % bzw. 40 % hoch und enthält die spezifische Sequenz des Typ I AREs (ATTTA) (BARREAU *et al.* 2005)

```

-53          CGCAGGCACGAGGATCTGCATGGTACTAAATCTTTGAAGGCAAGAGGAAGTGC          -1
   1  M  M  S  V  W  T  L  L  S  W  P  T  V  V  I  A  A  I  L  G          20
   1  ATGATGTCTGTCTGGACTTTACTTTTCATGGCCAACAGTAGTCATCGCAGCAATACTAGGC          60

  21  L  C  L  F  R  R  R  R  S  L  R  R  H  I  C  K  S  K  A  L          40
  61  CTTTGCTTATTTCAGACGCAGAAGATCTCTAAGAAGACACATTTGTAAATCCAAGGCTCTC          120

  41  L  N  G  K  T  V  I  I  T  G  A  N  T  G  I  G  F  E  T  A          60
 121  CTAAATGGAAGACAGTGATAATAACGGGAGCTAACACAGGCATTGGATTTGAGACTGCA          180

   61  L  E  L  A  K  R  Q  A  R  V  I  L  A  C  R  S  V  E  N  G          80
 181  TTGGAGCTGGCAAAGAGACAAGCAAGAGTTATTTTAGCTTGTCTAGTGTAGAAAATGGA          240

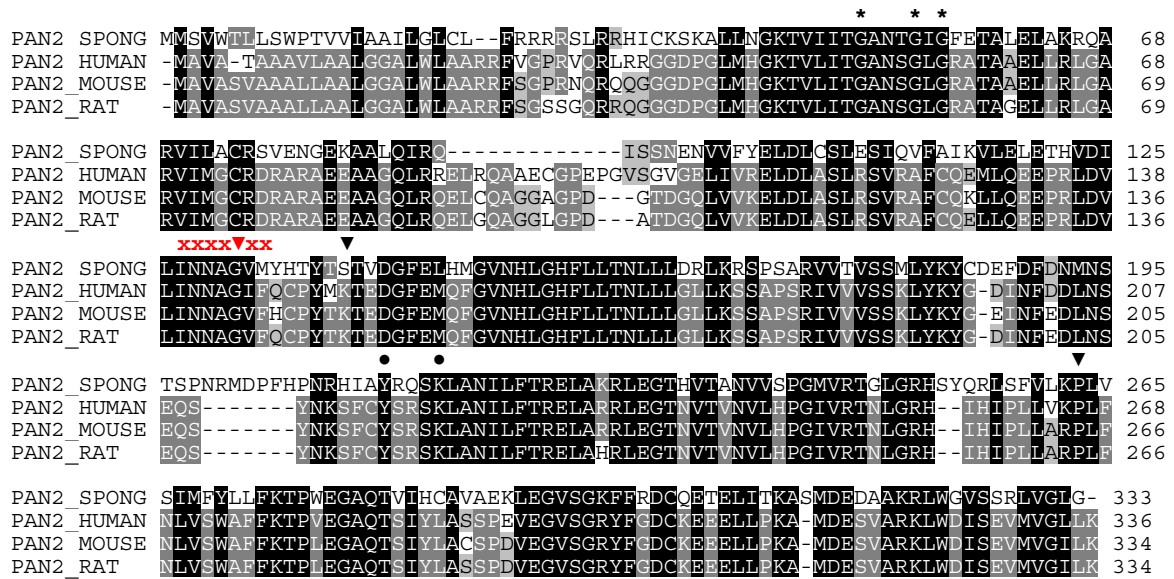
   81  E  K  A  A  L  Q  I  R  Q  I  S  S  N  E  N  V  V  F  Y  E          100
 241  GAAAAGGCTGCTCTCCAAATCCGACAAATAAGTAGCAATGAAAATGTGGTCTTTTATGAA          300

  101  L  D  L  C  S  L  E  S  I  Q  V  F  A  I  K  V  L  E  L  E          120
 301  CTAGATCTTTGTTCGTTGGAATCGATTCAAGTTTTTTGCCATCAAAGTCTTAGAGCTTGAA          360
    
```

121	T H V D I L I N N A G V M Y H T Y T S T	140
361	ACACATGTAGATATTTCTTATAAAACAATGCTGGTGTGATGTATCACACATACACAAGTACT	420
141	V D G F E L H M G V N H L G H F L L T N	160
421	GTAGACGGATTTGAGCTTCACATGGGAGTCAATCACCTCGGACATTTTCTGTTGACAAAT	480
161	L L L D R L K R S P S A R V V T V S S M	180
481	TTATTGCTAGACCGTCTAAAGAGGTCACCTTCTGCCCGTGTGTAAACAGTTTCTTCCATG	540
181	L Y K Y C D E F D F D N M N S T S P N R	200
541	CTATACAAATACTGTGATGAGTTTGATTTTGATAATATGAACAGTACTAGTCCAAATAGA	600
201	M D P F H P N R H I A Y R Q S K L A N I	220
601	ATGGATCCGTTTCATCCGAACCGCCACATAGCATAACCGTCAGAGCAAGCTGGCAAACATT	660
221	L F T R E L A K R L E G T H V T A N V V	240
661	TTATTTACTCGTGAGTTGGCCAAGAGATTGGAAGGTACACATGTGACGGCTAATGTTGTT	720
241	S P G M V R T G L G R H S Y Q R L S F V	260
721	TCTCCTGGAATGGTACGTACTGGTCTGGGAAGACATTCTTATCAACGTCTGTCCTTTGTC	780
261	L K P L V S I M F Y L L F K T P W E G A	280
781	TTGAAGCCATTGGTATCAATCATGTTCTACCTCTTATTCAAGACCCCTGGGAAGGTGCC	840
281	Q T V I H C A V A E K L E G V S G K F F	300
841	CAGACTGTAATCCATTGTGCAGTAGCAGAAAAACTGAAGGTGTGTCTGGAAAGTTCTTT	900
301	R D C Q E T E L I T K A S M D E D A A K	320
901	CGAGATTGTCAAGAACTGAACTTATTACAAAGGCTAGTATGGACGAAGATGCAGCTAAG	960
321	R L W G V S S R L V G L G *	333
961	AGACTGTGGGGTGTAGCAGTAGATTGGTGGGACTGGGT <b>TGACATAGATCTAATTATAACC</b>	1020
1021	<b>ATTTAGACTAGTCTACTATGTAGTAATCTGCATTTTGTAAATTTGCTGCCATGT (A)<sub>n</sub></b>	1075

**Abb. 16:** Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der potentiellen Alkoholdehydrogenase. Untranslatierte Bereiche am 5'-, bzw. 3'-Ende der Sequenz sind in orange, kodierende dagegen schwarz eingefärbt. Das Start- und Stopp-Codon ist in roten, fettgedruckten Lettern dargestellt. Die Nummerierung sowohl der kodierenden Nukleotide als auch der davon abgeleiteten Aminosäuren beginnt mit +1, wobei die erste nichtkodierende Base am 5'-Ende mit -1 beziffert ist.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der ADH umfasst 333 AS, mit einem errechneten Molekulargewicht von 37,5 kD und einem theoretischen pI = 9,2. Die ersten 16 AS kodieren ein Signalpeptid, welches vermutlich abgespalten wird. Resultierend daraus ergibt sich anhand des N-terminus eine *in vivo* Halbwertszeit von ca. 4,4 h. Weiterhin ist der Instabilitätsindex mit 45 recht hoch, wodurch das Protein unter *in vitro* Bedingungen wahrscheinlich ebenfalls instabil ist. Die Untersuchung auf konservierte Domänen ergab eine Zugehörigkeit zur *short-chain* Dehydrogenase/Reduktase Familie (*Acc. No.* PS00061) mit der konservierten Domäne adh\_short (pfam00106; Abb. 19). Potentielle Regulierungsstellen finden sich durch Phosphorylierung von Serin/Threoninresten durch die Proteinkinase C (AS<sub>29-31</sub>; 171-173; 296-298; 326-328), oder der Casein Kinase II (AS<sub>59-61</sub>; 91-94; 121-124; 139-142; 275-278; 313-316; Konsensus: [ST] - x(2) - [DE]; MILETICH und BROZE 1990). An den AS<sub>194-197</sub> könnte eine potentielle Regulation durch N-Glykosylierung eines Asparaginrests (Konsensus: N - {P} - [ST] - {P}; MARSHALL 1972) erfolgen.



**Abb. 17:** Aminosäuresequenzvergleich der ADH-Pan2 verschiedener Organismen: *Suberites domuncula* (PAN2\_SONGE); *Homo sapiens* (PAN2\_HUMAN: Acc. No. AAQ88875.1); *Mus musculus* (PAN2\_MOUSE: Acc. No. AAH92299.1); *Rattus norvegicus* (PAN2\_RAT: Acc. No. XP\_576003.1). Die Position des degenerierten Primers ist in roten (x) dargestellt. Das konservierte YxxxK-Motiv der aktiven Region ist mit (●), die Coenzymbindedomäne mit (\*) und die konservierten Reste G, S und P mit (▼) gekennzeichnet. Die nach der BLOSUM 62 Matrix (HENIKOFF und HENIKOFF, 1992) vorgenommene Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung (schwarz ≥ 95 %, dunkelgrau ≥ 85 %, hellgrau ≥ 60 % konservierte AS). Das Alignment wurde mit ClustalX 1.8 erstellt und mit Genedoc 2.6.002 bearbeitet.

Größte Sequenzhomologie weist die ADH im Vergleich zu den Enzymen der Maus (66 % ähnliche AS, davon 49 % identische) und dem Mensch (64 % ähnliche AS, davon 47 % identische) auf. Durchschnittlich beträgt die Übereinstimmung zu vergleichbaren Enzymen ca. 64 % an ähnlichen und ca. 47 % an identischen Aminosäuren auf.

#### 4.3.1.3 Analyse der potentiellen Retinsäuredehydrogenase (RALDH)

Die Gesamtlänge der potentiellen Retinsäuredehydrogenase beträgt 1743 bp, wovon 1461 bp ein Protein mit 487 AS kodieren. Eine Sequenzanalyse der untranslatierten Bereiche zeigte innerhalb der 3'-UTR auffällige repetitive Sequenzelemente von Purinbasen (Abb. 18). Weiterhin enthält diese ein Motiv der Typ III ARE (BARREAU *et al.* 2005). Diesem [GTTTG]-Pentamer (NT<sub>1539-44</sub>) gehen zwei Adenosinpentamere (Nt<sub>1490-94</sub>; Nt<sub>1501-05</sub>) voran, denen zwei Adenosintetramere (Nt<sub>1511-14</sub>; 1528-31) folgen. *Downstream* des [GTTTG]-Pentamers folgt ein Thymintetramer (Nt<sub>1563-66</sub>) und zwei Thyminpentamere (Nt<sub>1574-78</sub>; Nt<sub>1592-96</sub>). Dem untranslatierten Bereich am 5'-Ende fehlt die Kozak-Erkennungssequenz, während dem 3' untranslatierten Bereich das Polyadenylierungssignal (AATAAA) fehlt. Der prozentuale Anteil der Basen A und T (32 %/33 %) in dieser Region ist relativ hoch.

-140		GTCTACCAGGCATTTCGCTTC	-121
-120	ATGGGGGATAGGGGACCAGGCCCTGGTGACTCGACTGCAGCGCTTTGCTAACTAGCTCGC		-61
-60	TTCTTTTCTGGGAAAAGCCTTCTCTTTGTTTTACCTGTTGCACTCAAACCAAACAACAG		-1
1	<b>M</b> T E P V P K K P R F E S P P E V K Y T		20
1	<b>ATG</b> ACCAGCCAGTACCAAAAAAGCCTCGTTTCGAAAGCCCACCTGAGGTCAAGTACACT		60
21	Q I F I N N E W V N S V S G K T F P T I		40
61	CAAAATCTTCATCAACAACGAATGGGTAAACTCTGTCTCAGTGGAAAGACCTTCCCAACCATC		120
41	N P S T G E K I C D V Q E G D K A D V D		60
121	AACCCAGCACTGGAGAGAAGATCTGTGATGTGCAAGAGGGAGACAAGGCCGACGTGGAT		180
61	K A V D A A R K A F E L G S T W R T M D		80
181	AAGGCTGTGGATGCTGCCGTAAGGCTTTCGAATTGGGTAGCACCTGGCGTACGATGGAT		240
81	A S E R G V L L N K L A D L I E R D R E		100
241	GCATCCGAGCGTGGCGTCCTCCTCAACAAGCTAGCCGATCTCATCGAGCGTGACCCTGAA		300
101	Y L S R L E T L D N G K P Y K D A Y G V		120
301	TACCTTTCACGTCTTGAGACCTTGACAACGGGAAGCCTTACAAAGATGCATACGGTGT		360
121	D L P L T I K C Y R Y Y A G W A D K I H		140
361	GATCTCCCACTCACCATCAAGTGTATCGTTACTATGCTGGCTGGGCTGACAAGATCCAC		420
141	G K T I P T D G N V F T Y T R H E P V G		160
421	GGAAAGACCATTCCCACTGATGGGAATGTCTTCACTTACACTCGCCATGAGCCAGTGGGA		480
161	V C A Q I I P W N F P L L M Q A W K F G		180
481	GTATGTGCTCAGATCATCCCATGGAACCTCCCTCTTCTTATGCAAGCCTGGAAGTTCGGC		540
181	P A L C A G N T V I L K V A E Q T P L T		200
541	CCTGCCCTGTGTGCTGGTAATACCGTCATCTTGAAGGTTGCTGAGCAGACACCTCTTACA		600
201	A L Y I A A L S A E A G F P P G V I N V		220
601	GCTCTTACATTGCTGCATTGTCTGCTGAGGCTGGGTTCCCTCCAGGTGTCATCAATGTT		660
221	I P G Y G P T A G A A L T T H P N V D K		240
661	ATTCCAGGATATGGTCCAACAGCTGGAGCAGCTCTCACTACTCATCCTAACGTTGACAAG		720
241	V A F T G S T E V G R L V K Q A A G A S		260
721	GTGGCCTTCACTGGATCCACTGAAGTTGGACGTCTCGTTAAGCAAGCTGCCGGTGCCAGC		780
261	N L K R V T L E L G G K S P N I V L A D		280
781	AACCTCAAGCGTGTACCCTTGAGCTTGGCGGTAAGAGCCCCAACATTGTCTTGGCAGAT		840
281	A D L D H A V E T S H F A L Y F N Q G Q		300
841	GCTGATCTTGACCATGCTGTGGAAACAAGCCACTTTGCTCTTTACTTTAACCAAGGGCAG		900
301	C C C A G S R T F V H E S I Y D E F V A		320
901	TGTTGCTGTGCTGGGTCACGTACCTTTGTGCACGAGTCTATCTATGACGAATTTGTTGCC		960
321	R S V V R A R K R R V S H P E D H D C E		340
961	AGGAGCGTTGTGAGGGCTCGCAAACGACGTGTCTCTCACCCCTGAGGATCAGACTGCGAG		1020
341	Q G P Q V D Q E Q F D K I M N L I D S G		360
1021	CAAGGACCCCAGGTTGACCAGGAGCAGTTTGACAAGATTATGAATCTCATCGACAGTGGC		1080
361	K K E G A T L E T G G N R I G D K G F F		380
1081	AAGAAAAGAAGGAGCCACTCTTGAGACTGGAGGGAATCGTATCGGAGACAAGGGCTTCTTC		1140
381	I E P T I F S D V K D E M R I A K E E I		400
1141	ATCGAGCCAACCATCTTCAGCGATGTGAAAGATGAGATGAGAATTGCTAAAGAGGAGATC		1200
401	F G P V M Q I L K F K T I D E V I R R A		420
1201	TTTGACCTGTGATGCAGATCCTCAAGTTCAAGACAATCGATGAGGTGATCCGTCGTGCT		1260
421	N N T P Y G L A A S I F T Q N L D N A M		440
1261	AACAACACTCCGTACGGTCTAGCTGCCTCCATTTTCACCCAGAATCTCGACAATGCTATG		1320

441	I L A Q G F E L V P S G S T A T T S S S	460
1321	ATTCTTGCTCAAGGATTCGAGCTGGTACCATCTGGATCAACTGCTACGACGTCCTCGAGT	1380
461	L K L L S E V S K S L E T V V S L V S M	480
1381	CTCAAGCTCCTTTTCGGAGGTTTCAAAGAGTCTGAAACGGTCGTGAGCTTGGTGAGTATG	1440
481	V F S S T Q R *	487
1441	GTCTTCAGCAGTACACAGAGG <b>TGA</b> AGTGTGT <b>CACCATGAAGATCCCACAGAAAACTCTT</b>	1500
1501	<b>AAAAAGGAACAAAAGTGACTGGAACCTTGAAAATTGTATTGTTTGATCCCAACCCCATGTT</b>	1560
1561	<b>GATTTTGTAAATGATTTTTTGTGCTTTGTGAATCAGTTTTTTGATGAG (A)<sub>n</sub></b>	1603

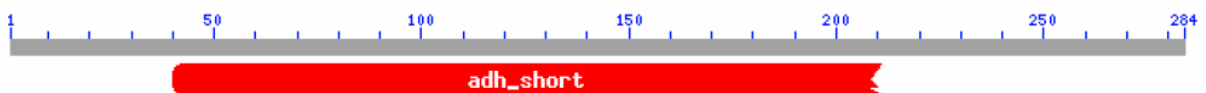
**Abb. 18:** Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der potentiellen Retinsäuredehydrogenase. Untranslatierte Bereiche am 5'-, bzw. 3'-Ende der Sequenz sind in orange, kodierende dagegen schwarz eingefärbt. Das Start- und Stopp-Codon ist in roten, fettgedruckten Lettern dargestellt. Die Nummerierung sowohl der kodierenden Nukleotide als auch der davon abgeleiteten Aminosäuren beginnt mit +1, wobei die erste nichtkodierende Base am 5'-Ende mit -1 beziffert ist.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz der RALDH umfasst 487 AS mit einem errechneten Molekulargewicht von 53,4 kD und einem theoretischen pI = 5,88. Die Halbwertszeit des Proteins *in vivo* wird durch die N-Rule (AS Methionin) auf 30 h geschätzt. Der Instabilitätsindex von 24,94 weist ebenfalls auf ein stabiles *in vitro* Protein hin. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein cytosolisches Protein handelt, beträgt 89 % (PSORT-II).

A: ADH-PAN2



B: RA-DH



C: RALDH



**Abb. 19:** Durch das Programm BLAST dargestellte konservierte Proteindomänen der drei Enzyme aus *S. domuncula* mit potentieller Beteiligung am Vitamin A-Stoffwechsel: A) Konservierte Domäne der Alkoholdehydrogenasefamilie innerhalb der ADH-PAN2 Sequenz (Pfam Acc. No. Pfam00160.12); B) Konservierte Domäne der Alkoholdehydrogenasefamilie innerhalb der RA-DH Sequenz (Pfam Acc. No. Pfam00160.12); C) Konservierte Domäne der Aldehyddehydrogenasefamilie innerhalb der RALDH Sequenz (Pfam Acc. No. Pfam00171.12).

Innerhalb der Aminosäuresequenz befinden sich keine Transmembranregionen und keine Signalsequenzen für den gezielten Transport zu Zellkompartimenten. Obwohl ein Homologievergleich signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen der mitochondrialen Aldehyddehydrogenasefamilie aufweist (Abb. 20), ergaben diesbezügliche Analysen (z.B. PSORT-II, PLOC; 2.10) keinen Hinweis, dass es sich bei der RALDH ebenfalls um ein mitochondriales Enzym handelt. Die Aminosäuresequenz weist die konservierte Domäne der

Aldehyddehydrogenasefamilie auf (Abb. 19), die sowohl Enzyme zur Retinsäuregewinnung als auch für den Energiestoffwechsel besitzen.

RALDH2_SPONGE	MTEPVPKK-----S-----PRFESPPEVKYTCIFINNEWVNSVSGKTFPPTINPSTGKTI	48
RALDH2_HUMAN	MTSSKIEMPGEVKADPAALMA----SLHLPLSPTPNLEIKYTKIFINNEWQNSESGRVFPVYNPATGEQV	66
PROT_MONKEY	MLRAAARFGP----RLGRRLLSAAAT-QAVPAPNQOPEVFCNQIFINNEWHDVSRKTFPPTVNPSTGEVI	65
ALDH_DOG	MLRAAALAAAGLRPRLGRRLLSAAAS-QAVPAPNQOPEVFNQIFINNEWHDVSRKTFPPTINPSTGEVI	69
ALDH2_PIG	MLRPAALAAARLVLRQGRRLSAAPT-QAVPAPNQOPEIFYNQIFINNEWHDVSRKTFPPTVNPSTGDI	69
ALDH2_RAT	MLRAALST-ARRGPRLSR-LLSAAAT-SAVPAPNQOPEVFCNQIFINNEWHDVSRKTFPPTVNPSTGEVI	67
ALDH2_FISH	MLRTVLSRASPOVCRISSCOHS---T---IPAPNVQEDVHYNKIFINNEWHDVSRKTFPPTINPATGETI	64
RALDH2_FROG	MTSSKIEMPGEVKTDPAALM----ASLQLPLSPSANLEVKHSKIFINNEWQTSSEGKAFFPVYNPATGEQI	66
RALDH2_SPONGE	CDVQEGDKADVDAARDAKAFELGSLWRTMDASERGVLLNKLADLIERDREYLSRLETLDNGKPKYKDAY	118
RALDH2_HUMAN	CEVQEDAKADIDKAVQAARLAFSLGSPWRRMDASERGRLLDKLADLIERDRAVLATMESLNGKPFLOAF	136
PROT_MONKEY	CVVAEGDKEDVDKAVKAARAAAFOLGSPWRRMDASHRGRLLNRLADLIERDRTYLALETLDNGKPYVTSY	135
ALDH_DOG	CVVAEGDKEDVDKAVKAARAAAFOLGSPWRRMDASDRGRLLNRLADLIERDRTYLALETLDNGKPYVTSY	139
ALDH2_PIG	CHVAEGDKEDVDRAVEAARAAAFOLGSPWRRMDASDRGRLLNRLADLIERDRTYLALETLDNGKPYVTSY	139
ALDH2_RAT	CVVAEGNKEDVDKAVKAAQAAAFOLGSPWRRMDASDRGRLLYRLADLIERDRTYLALETLDNGKPYVTSY	137
ALDH2_FISH	CHVAEGDKADVDAARDAKAFELGSPWRRMDASDRGRLLSRLADCIERDAAYLAVLETLDNGKPYAVSF	134
RALDH2_FROG	CEVQEAEKSDVDKAVQAARLAFALGSPWRRMDASERGRLLDKLADLIERERTALATLESLSNGKPFLOQSY	136
RALDH2_SPONGE	GVDLPLTIKCYRYAGWADKIHGKTIPTDGNVFTYTRHEPVGVCQAQIIPWNFPLLMQAWKLPALCAGNT	188
RALDH2_HUMAN	YVDLQGVIKTFRYAGWADKIHGMTIPVDGDYFTFTRHEPIGVCGQIIPWNFPLLMFAWKLPALCCGNT	206
PROT_MONKEY	LVLDLMLVKCLRYAGWADKYHGKTIPTDGDFFSYTRHEPVGVCQIIPWNFPLLMQAWKLPALATGNV	205
ALDH_DOG	LVLDLMLRCLRYAGWADKYHGKTIPTDGDFFSYTRHEPVGVCQIIPWNFPLLMQAWKLPALATGNV	209
ALDH2_PIG	LVLDLMLVKCLRYAGWADKYHGKTIPTDGDYFSTRHEPVGVCQIIPWNFPLLMQAWKLPALATGNV	209
ALDH2_RAT	LVLDLMLVKCLRYAGWADKYHGKTIPTDGDFFSYTRHEPVGVCQIIPWNFPLLMQAWKLPALATGNV	207
ALDH2_FISH	SVDVPMVVKMRYAGWADKNEGKTIPTDGNVFTYTRHEPIGVCGQIIPWNFPLLMQAWKLPALATGNT	204
RALDH2_FROG	YVDLQGLKTFRYAGWADKIHGLTIPTDGDYFTFTRHEPIGVCGQIIPWNFPLLMFAWKLPALCCGNT	206
RALDH2_SPONGE	VILKVAEQTPLTALYIAALSAEAGFPPGVINIVPGYGPTAGAALITHPNVDKVAFTGSTEVGRILVKQAAG	258
RALDH2_HUMAN	VVIKPAEQTPLSALYMGALIKKAGFPPGVINILPGYGPTAGAAIASHIGIDKIAFTGSTEVGKLIQEAAG	276
PROT_MONKEY	VVMKVAEQTPLTALYVANLIKAGFPPGVVNIIVPGYGPTAGAAIASHEVDKVAFTGSTEVGRVIOVAAG	275
ALDH_DOG	IVMKVAEQTPLTALYVANLIKAGFPPGVVNIIVPGYGPTAGAAIASHEVDKVAFTGSTEVGHILVQVAAG	279
ALDH2_PIG	VVMKVSEQTPLTALYVANLIKAGFPPGVVNIIVPGYGPTAGAAIASHEVDKVAFTGSTEVGHILQVAAG	279
ALDH2_RAT	VVMKVAEQTPLTALYVANLIKAGFPPGVVNIIVPGYGPTAGAAIASHEVDKVAFTGSTEVGHILQVAAG	277
ALDH2_FISH	VVMKVAEQTPLTALYIASLIKAVGFPAGVVNIIVPGYGPTAGAAIASHMDVDKVAFTGSTEVGHILQVASS	274
RALDH2_FROG	VVIKPAEQTPLTALYMGALIKKAGFPPGVVNIIVPGYGPTAGAAIASHIGIDKIAFTGSTEVGMFIQEAAG	276
RALDH2-SPONGE	ASNLKRVTELEGGKSPNIIADADLDYAVEQAHEGQVFFNQGCCAGSRTFVQEDVYDEFVRSVARAKR	328
RALDH2-HUMAN	RSNLKRVTELEGGKSPNIIADADLDYAVEQAHEGQVFFNQGCCAGSRTFVQEDVYDEFVRSVARAKR	346
PROT-MONKEY	SSNLKRVTELEGGKSPNIIADADMDWAVEQAHEGQVFFNQGCCAGSRTFVQEDVYDEFVRSVARAKS	345
ALDH-DOG	NSNLKRVTELEGGKSPNIIADADMDWAVEQAHEGQVFFNQGCCAGSRTFVQEDVYAEFVRSVARAKS	349
ALDH2-PIG	KSNLKRVTELEGGKSPNIIADADMDWAVEQAHEGQVFFNQGCCAGSRTFVQEDVYAEFVRSVARARS	349
ALDH2-RAT	SSNLKRVTELEGGKSPNIIADADMDWAVEQAHEGQVFFNQGCCAGSRTFVQEDVYDEFVRSVARAKS	347
ALDH2-FISH	ASNLKRVTELEGGKSPNIIADANMEBAVEQSHIALFFNQGCCAGSRTFVQEDVYDEFVRSVARAKN	344
RALDH2-FROG	RSNLKRVTELEGGKSPNIIADADLDYAVEQAHEGQVFFNQGCCAGSRTFVQEDVYDEFVRSVARAKR	346
RALDH2_SPONGE	RVVSHPELDHCEQGPOVDQEQFDKIMNLDISGKKEGATLETGGNRIGDKGFFIEPTVFSVVDKDMRIAKE	398
RALDH2_HUMAN	RIVGSPFDPTTEQGPOIDKKOYNKILELISQGVAAEGAKLECGGKGLGRKGFFIEPTVFSNVVDDMRIAKE	416
PROT_MONKEY	RVVGNPFDSKTEQGPOVDETOFKKILGYINTGKQEGAKLLCGGGIAADRGYFIQPTVFGDVODGMTIAKE	415
ALDH_DOG	RVVGNPFDSQTEQGPOVDETOFKKILGYIKSGKEGAKLLCGGGAAADRGYFIQPTVFGDVODMTIAKE	419
ALDH2_PIG	RVVGNPFDSRTEQGPOIDEQTOFKKILGYIKSGKEGAKLLCGGGAAADRGYFIQPTVFGDVODGMTIAKE	419
ALDH2_RAT	RVVGNPFDSRTEQGPOVDETOFKKILGYIKSGQEGAKLLCGGGAAADRGYFIQPTVFGDVODGMTIAKE	417
ALDH2_FISH	RIVGDPFDLNTTEQGPOVNEQDFKVLGYISSGKREGAKLMCGGAPAAERGYFIQPTVFGDVKDDMTIARE	414
RALDH2_FROG	RIVGSPFDPTTEQGPOINKKOYNKILELISQGITTEGAKLECGGKALGRKGFFIEPTVFSNVVDDMRIAARE	416
RALDH2_SPONGE	EIFGPPVQILKFKTIDEVIRRANNTPYGLAASIFTONLDNAMILAQG-----FEIVPSGS---TA	455
RALDH2_HUMAN	EIFGPPVEILRFKTMDEVIRBRANNSDFGLVAAVFTNDINKALTVSSAMQAGTVWVINCYNALNAQSPFGGF	486
PROT_MONKEY	EIFGPPVQILKFKTIEEVVGRANNSYGLAAAVFTKDLDKANYLSQALQAGTVWVWVINCYNVFCQSPFGGY	485
ALDH_DOG	EIFGPPVQILKFKTIEEVIGRANNSKYGLAAAVFTKDLDKANYLSQALQAGTVWVWVINCYNVFCQSPFGGY	489
ALDH2_PIG	EIFGPPVQILKFKTIEEVIGRANNSKYGLAAAVFTKDLDKANYLSQALQAGTVWVWVINCYNVFCQSPFGGY	489
ALDH2_RAT	EIFGPPVQILKFKTIEEVVGRANNSKYGLAAAVFTKDLDKANYLSQALQAGTVWVWVINCYNVFCQSPFGGY	487
ALDH2_FISH	EIFGPPVQILKFKSLEEVIRBRANNSKYGLAGAVFTQNDIKANYISHGLRAGTVWVWVINCYNVFCQSPFGGY	484
RALDH2_FROG	EIFGPPVQILRFKTVEEVIRBRANNSDYGLVAAVFTNDINKALTVSSAMQAGTVWVWVINCYNALNAQSPFGGY	486

- Fortsetzung auf nächster Seite -



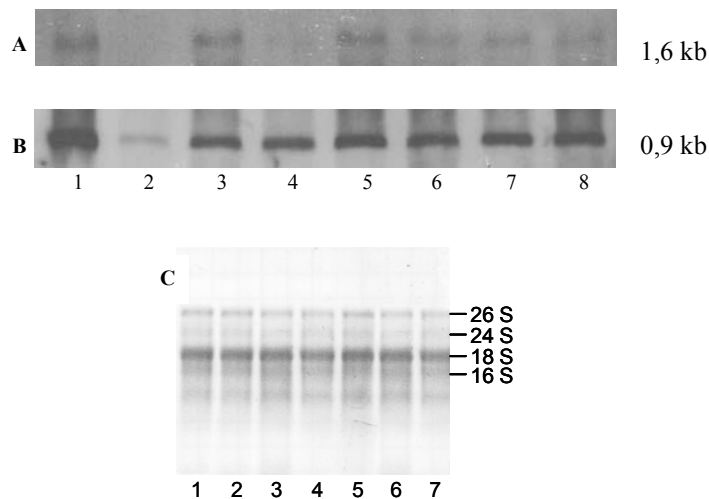
RALDH2_SPONGE	TTSSSLKLLSEVSKSLETVVSLVSMVFSSTQR	487
RALDH2_HUMAN	KMSCNGREMGEFGLREYSEVKTVTVKIPQKNS	518
PROT_MONKEY	KMSCSGRELGEYGLQAYTEVKTVTVKVPQKNS	517
ALDH_DOG	KMSCSGRELGEYGLQAYTEVKTVTIKVPQKNS	521
ALDH2_PIG	KLSCSGRELGEYGLQAYTEVKTVTVKVPQKNS	521
ALDH2_RAT	KMSCSGRELGEYGLQAYTEVKTVTVKVPQKNS	519
ALDH2_FISH	KASCTCREMGEYGLENYTEVKTVTIKVPQKNS	516
RALDH2_FROG	KMSCNGREMGEYGLREYTEAKTVTIKIPQKNS	518

**Abb. 20:** Aminosäuresequenzvergleich der potentiellen RALDH aus *S. domuncula* mit vergleichbaren Enzymen anderer Organismen: *Homo sapiens* (RALDH\_2 Human: Acc. No. BAA34785.1); *Pongo pygmaeus* (PROT\_MONKEY: Acc. No. CAH89657.1); *Canis familiaris* (ALDH\_DOG: Acc. No. XP\_853628.1); *Sus scrofa* (ALDH2\_PIG: Acc. No. ABB70228.1); *Rattus norvegicus* (ALDH2\_RAT: Acc. No. AAH62081.1); *Danio rerio* (ALDH2\_FISH: Acc. No. AAI16560.1); *Xenopus laevis* (RALDH2\_FROG: Acc. No. CAJ83424.1). Die nach der BLOSUM 62 Matrix (HENIKOFF und HENIKOFF, 1992) vorgenommene Farbmarkierung zeigt den Grad der Übereinstimmung (schwarz  $\geq 95\%$ , dunkelgrau  $\geq 85\%$ , hellgrau  $\geq 60\%$  konservierte AS). Das Alignment wurde mit ClustalX 1.8 erstellt und mit Genedoc 2.6.002 bearbeitet.

#### 4.4 PRÜFUNG MÖGLICHER REGULIERUNGSMECHANISMEN DER CAROTINOXYGENASE (BCO)

##### 4.4.1 Inkubationsexperimente mit potentiellen Regulatoren der BCO und Nachweis der mRNA-Transkripte mittels Northern-Transfer

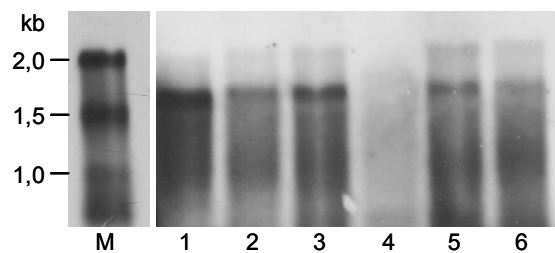
Bislang existieren noch keine gesicherten Daten über eine mögliche Regulierung der BCO-I. Aus diesem Grund wurden Inkubationsexperimente mit dem Substrat ( $\beta$ -Carotin), Endprodukt (Retinsäure) und dessen evtl. Speicherform (Retinylpalmitat) durchgeführt, um eine mögliche Rückkopplungsregulierung auf Transkriptionsebene zu überprüfen.



**Abb. 21:** Analyse der differentiellen Expression des BCO-Gens auf mRNA-Ebene nach Inkubation mit potentiellen Regulatoren. Unter Verwendung des Northern Blot-Verfahrens wurden die Transkripte für (A) die BCO und (B) des *house-keeping* Gens Tubulin mit spezifischen Sonden nachgewiesen. Ein adultes Exemplar von *S. domuncula* wurde hierfür zerteilt und entweder 24 h mit 1  $\mu$ M (3) oder 50  $\mu$ M Beta Carotin (4); 1  $\mu$ M (5) oder 50  $\mu$ M Retinsäure (6) und 1  $\mu$ M (7) oder 50  $\mu$ M Retinylpalmitat (8) inkubiert, und deren RNA extrahiert. Spur (1) enthält ein Kontrollstück aus SW, Spur (2) die eines verendenden Exemplars. Jeweils 5  $\mu$ g der entsprechenden RNA wurden für die Analyse verwendet (C) zeigt die Toluidinblaufärbung des analytischen rRNA Gels der verwendeten Proben zur Integritätsüberprüfung, und um sicherzustellen, dass jeweils die gleiche RNA-Konzentration (5  $\mu$ g) verwendet wurde.

Hierfür wurden Stücke eines Schwammindividuums mit den jeweiligen Substanzen (in zwei Konzentrationen: 1 bzw. 50  $\mu\text{M}$  für 24 h inkubiert (3.24.2), deren RNA isoliert (3.14) und via Northerntransfer mit genspezifischen Sonden auf Röntgenfilm visualisiert (3.15; Abb. 21 A). Um sicherzustellen, dass die eingesetzten Substanzen sich nicht negativ auf den Organismus auswirken, wurden die gleichen Transkripte mit einer Sonde gegen das *house-keeping* Gen  $\beta$ -Tubulin als Vitalitätsmarker untersucht (Abb. 21 B). Abb. 21 C zeigt die Integrität und gleiche Mengenverhältnisse der RNA durch Anfärben der ribosomalen RNA mit Toluidinblau.

In einem weiteren Versuchsansatz (Abb. 22) wurde der Effekt der Haltung der Schwämme in Aquarien auf die Expression der BCO im Vergleich zu frisch aus dem Meer gesammelten Exemplaren verglichen, die zusätzlich mit dem Substrat und dem potentiellen Endprodukt inkubiert wurden. Aufgetragen wurden jeweils 5  $\mu\text{g}$  RNA.



**Abb. 22:** Northern Blot-Analyse zum Vergleich des Einflusses der Haltung von *S. domuncula* in Aquarien auf die Expression der BCO, im Vergleich zu frisch aus dem Meer gesammelten Exemplaren unterschiedlicher Färbung und Inkubation mit potentiellen Regulatoren. (1) isolierte RNA aus einem blauen Exemplar; ca. ein Jahr in Aquarienhaltung, (2) RNA eines Roten; frisch aus dem Meer, (3) RNA eines Blauen; frisch aus dem Meer, (4) 24h Inkubation von (2) mit 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Carotin, (5) 24h Inkubation von (2) mit 10  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Carotin, (6) 24h Inkubation von (2) mit 50  $\mu\text{M}$  Retinsäure. Aufgetragen wurden jeweils 5  $\mu\text{g}$  isolierte RNA; **M** stellt den RNA-Molekulargewichtsstandard mit charakteristischen Banden in kb dar.

Das Experiment zeigt, dass das Expressionsniveau der BCO eines frisch aus dem Meer gesammelten blauen Exemplars (Abb. 22 (3)) von *S. domuncula* im Vergleich zu einem roten (Abb. 22 (2)) wesentlich höher ist. Vergleicht man hierzu das blaue Exemplar nach einjähriger Aquarienhaltung (Abb. 22 (1)), ist die Expression nochmals deutlich gesteigert. Die Inkubationen mit  $\beta$ -Carotin und Retinsäure sind eine Teilreproduktion des Versuchs aus Abb. 21. Bestätigt wird die vollständige Abschaltung der BCO Expression nach 24 h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Carotin (Abb. 22 (4)) und Verringerung durch 24 h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Retinsäure (Abb. 22 (6)), wobei eine 24 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Carotin keinen Einfluss auf das Expressionsniveau offenbarte.

**4.4.2 Real-Time-PCR-Analyse der differentiellen BCO-Expression im Anschluss an Inkubationsexperimente**

Die RTQ-PCR stellt die modernste Methode zur Nukleinsäurequantifizierung dar. Sie ermöglicht genaue Rückschlüsse über das Expressionsniveau einzelner Gene im Vergleich zu einem konstitutiv exprimierten, internen Standard, dem *house-keeping* Gen. Dieses dient als Marker für die Vitalität des untersuchten Organismus und die Expression ist unter physiologischen Bedingungen immer gleich hoch. Weicht das Expressionsniveau infolge einer Inkubation von diesem Wert ab, werden die Ergebnisse für die Zielgene anhand dieser Differenz normalisiert.

Im folgenden Versuch wurde einem roten Exemplar von *S. domuncula* Gewebe entnommen und mit 10 µM bzw. 50 µM β-Carotin für 48 h inkubiert (3.24.2) und anschließend die RNA isoliert (3.14). Nach dem Verdau der genomischen DNA (3.5.1) wurde die RNA in sscDNA umgeschrieben (3.5.1) und deren Konzentration bestimmt (3.14.1). Zur Ermittlung des linearen Bereichs der Amplifizierung wurde eine RTQ-PCR (3.5) mit der erhaltenen Kontroll-sscDNA in einer Verdünnungsreihe durchgeführt (200 ng, 20 ng, 2 ng und 0,2 ng). Die RTQ-PCR verlief bis einschließlich der 2 ng Templates für die BCO und Tubulin linear (nicht gezeigt), was bedeutet, dass die PCR Effizienz in diesen Ansätzen vergleichbar war.

Im Anschluss wurde die RTQ-PCR mit allen Proben (in Duplikaten und zwei Konzentrationen; 20 bzw. 2 ng sscDNA) wiederholt und die C<sub>T</sub>-Werte für das *house-keeping* Gen Tubulin und die BCO ermittelt (Tab. 4). Die Werte belegen die Linearität der RTQ-PCR, indem die Ergebnisse der ΔC<sub>T</sub> für die zwei Konzentrationen nahezu identisch sind. Deutlich wird, dass die Inkubation mit 10 µM β-Carotin die Expression der BCO geringfügig stimuliert, während eine Inkubation mit 50 µM β-Carotin diese stark vermindert. Die PCR Effizienz betrug 96,7 % mit einem linearen Korrelationskoeffizienten R<sup>2</sup> = 0,994.

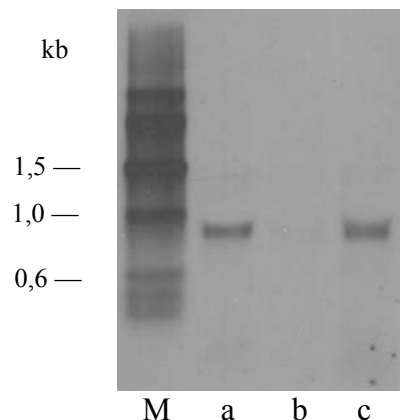
**Tab. 4:** RTQ-PCR für die Carotinoxygenase eines roten Vertreters von *S. domuncula*.

	C <sub>T</sub> -Werte HKG	C <sub>T</sub> -Werte GOI	ΔC <sub>T</sub> (HKG-GOI)	E <sub>r</sub> (Relative Expression)	Änderung von E <sub>r</sub>
<b>20 ng sscDNA</b>					
ohne β-Carotin	33,34 ± 0,04	26,80 ± 0,03	6,54 ± 0,07	1,00 ± 0,10	
10 µM BC	33,62 ± 0,04	27,59 ± 0,02	6,03 ± 0,06	1,42 ± 0,05	+ 42 %
50 µM BC	40,27 ± 0,02	31,02 ± 0,03	9,25 ± 0,05	0,15 ± 3,54	- 85 %
<b>2 ng sscDNA</b>					
ohne β-Carotin	36,93 ± 0,06	30,18 ± 0,02	6,75 ± 0,08	1,00 ± 0,10	
10 µM BC	37,80 ± 0,02	31,56 ± 0,01	6,24 ± 0,03	1,42 ± 0,04	+ 42 %
50 µM BC	41,72 ± 0,02	32,33 ± 0,06	9,39 ± 0,08	0,16 ± 4,37	- 84 %

Dargestellt sind die gemittelten C<sub>T</sub>-Werte für das *house-keeping gene* β-Tubulin (HKG) und die BCO (*gene of interest* = GOI) in zwei Templatekonzentrationen (20 ng und 2 ng) für die Kontrolle ohne Zugabe von β-Carotin, und zwei Proben nach 24 stündiger Inkubation mit 10 µM bzw. 50 µM β-Carotin. Berechnung der relativen Expression erfolgte nach Formel 2 (3.5.2).

#### 4.5 NACHWEIS DER RETINALDEHYDROGENASE (RA-DH) TRANSKRIPTE IN EXEMPLAREN VON *S. DOMUNCULA* VERSCHIEDENER FÄRBUNG

Der alternative Vitamin A Stoffwechselweg setzt voraus, dass neben dem Schlüsselenzym zur Spaltung des  $\beta$ -Carotins auch weitere, modifizierende Enzyme dieses Stoffwechselwegs im Schwamm zu finden sind. Deshalb wurde überprüft, ob die gefundene Sequenz der potentiellen RA-DH im adulten Schwamm exprimiert wird. Gleichzeitig wurde untersucht, ob die Anzahl an Transkripten in Individuen verschiedener Färbung identisch ist. Abb. 23 zeigt das Ergebnis der visualisierten mRNA eines roten (Abb. 23 **a**), eines blauen (Abb. 23 **b**) und eines gelben (Abb. 23 **c**) *S. domuncula* Exemplars. Auffallend ist, dass die Abschrift der RA-DH im blauen Schwamm, im Vergleich zu der nahezu identischen der beiden anderen Individuen, nahezu Null beträgt. Mittels Methylenblaufärbung (3.15) der entwickelten Membran wurde sichergestellt, dass alle Proben den gleichen Gehalt an RNA aufwiesen und diese nicht degradiert vorlag (nicht dargestellt).



**Abb. 23:** Nachweis der RA-DH-Transkripte via Northern Transfer in verschieden gefärbten Schwämmen: Aufgetragen sind jeweils 5  $\mu$ g isolierter Total-RNA aus einem (**a**) roten, (**b**) blauen und (**c**) gelben Exemplar von *S. domuncula*. Die Integrität der RNA wurde mittels Methylenblaufärbung der entwickelten Membran überprüft und gleichzeitig sichergestellt, dass die gleichen Mengen aufgetragen wurden (nicht gezeigt). Wichtige Banden des RNA-Molekulargewichtsmarkers (**M**) sind zum Größenvergleich mit angegeben

##### 4.5.1 Potentielle Regulierungen der Expression der Retinaldehydrogenase (RA-DH) auf mRNA-Ebene

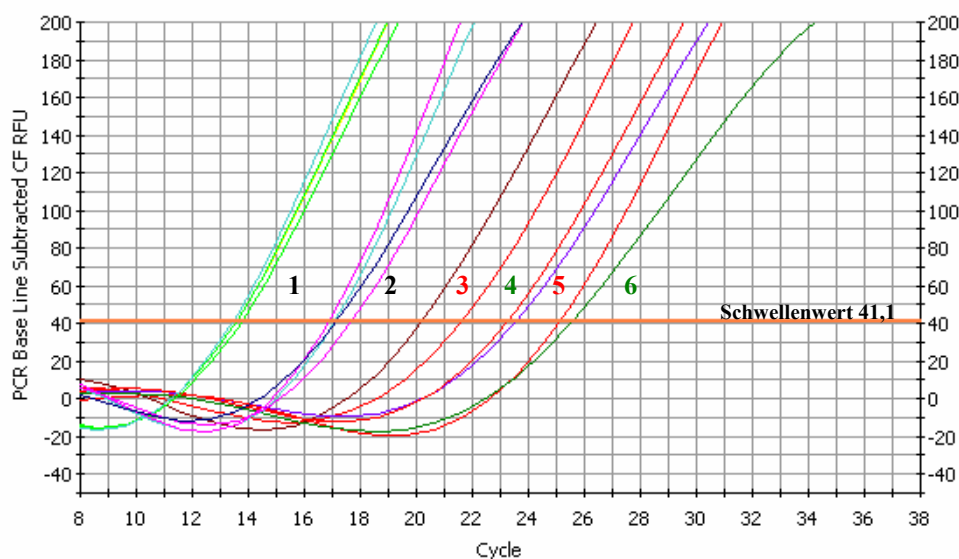
Analog zu den Versuchen mit der BCO (4.4.1) wurden mögliche Einflüsse der Aquarienhaltung auf die Expression der RA-DH und potentielle Rückkopplungsmechanismen in Bezug auf Inkubationsstudien untersucht. Eine Northern-Blot Analyse zeigte (Appendix 6), dass der Zeitpunkt der RNA-Isolierung, d.h. unabhängig davon, ob der Schwamm direkt nach Entnahme aus dem Meer oder erst nach einjähriger Haltung im Aquarium verwendet wurde, keinen Einfluss auf das Transkriptionsniveau der RA-DH besitzt. Lediglich eine Inkubation

mit 50  $\mu\text{M}$  RA führte zu einer Reduzierung der Transkripte. Im Gegensatz zur BCO (Abb. 22) hatte eine Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  BC nahezu keinen Einfluss auf die Anzahl der mRNAs für die RA-DH.

#### 4.5.2 Analyse der differentiellen Genexpression mittels *Real-Time Quantitative PCR*

Mit Hilfe der *Real-Time Quantitative PCR* (RTQ-PCR; 3.5) wurde die Anzahl an mRNA-Transkripten der RA-DH relativ zu der des *house-keeping* Gens  $\beta$ -Tubulin verglichen. Analysiert wurden dieselben RNA-Proben wie in (4.5.1). Die resultierende sscDNA wurde in zwei Verdünnungen (200 ng respektive 20 ng) eingesetzt, um die Linearität der Amplifizierung zu beweisen und mögliche Artefakte auszuschließen. In Abb. 24 ist exemplarisch das Ergebnis der RTQ-PCR für das *house-keeping* Gen  $\beta$ -Tubulin und für die RA-DH (sowohl für die Kontrolle als auch nach 24h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Retinsäure) dargestellt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Allgemein konnten die Ergebnisse aus der Northern-Blot Analyse bestätigt werden (4.5.1). Weiterhin konnte eine ca. 2,5 fache Abnahme der Expression der RA-DH nach 24 h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Retinsäure (Abb. 24) festgestellt werden.



**Abb. 24:** RTQ-PCR zur Ermittlung der relativen Expression der RA-DH. Exemplarisch sind hier die Fluoreszenzkurven des *house-keeping* Gens  $\beta$ -Tubulin im Vergleich zur RA-DH gezeigt; jeweils in Duplikaten. Jede Kurve entspricht einem RTQ-PCR-Ansatz. 1= Tubulin Kontrolle und Tubulin nach 24h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Retinsäure; 2 = 1 in Verdünnung 1:10; 3 = RA-DH Kontrolle; 4 = RA-DH nach 24h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Retinsäure; 5 = 3 in 1:10 Verdünnung; 6 = 4 in 1:10 Verdünnung. Verwendete Templatemenge war 200 ng, respektive 20 ng in der 1:10 Verdünnung. Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) der jeweiligen PCR-Zyklen. Der Schwellenwert der Fluoreszenz zur Berechnung des  $C_T$ -Wertes wurde auf 41,1 RFU festgesetzt.

Auffällig ist die ca. 2,3 fache Abnahme der relativen Anzahl an RA-DH Transkripten nach 24 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  BC im Vergleich zur ca. 1  $\frac{1}{2}$  fachen Steigerung infolge einer 24 h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  BC (Tab. 5). Einen Einfluss der Inkubationen auf die Vitalität des Schwammes konnte durch das konstante Expressionsniveau des *house-keeping* Gens  $\beta$ -Tubulin widerlegt werden (Abb. 24). Die PCR-Effizienz für diesen Lauf betrug 107 % mit einem Korrelationskoeffizienten  $R^2 = 0,999$ . Zuvor wurde sichergestellt, dass die PCR-Effizienzen beider Gene gleich waren sowie die eingesetzten Templatemenen sich innerhalb des linearen Amplifikationsbereichs (3.5.1.1) befanden.

**Tab. 5:** Auszug einzelner, gemittelter  $C_T$ -Werte aus der RTQ-PCR für die differenzielle Expression der RA-DH.

	$C_T$ -Werte HKG	$C_T$ -Werte GOI	$\Delta C_T$ (HKG-GOI)	$E_r$ (Relative Expression)	Änderung von $E_r$
Kontrolle	13,56 $\pm$ 0,02	20,82 $\pm$ 0,04	7,26 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,09	
24h BC 10 $\mu\text{M}$	13,52 $\pm$ 0,03	19,96 $\pm$ 0,02	6,44 $\pm$ 0,05	1,76 $\pm$ 0,03	+ 76 %
24h BC 50 $\mu\text{M}$	20,84 $\pm$ 0,03	29,30 $\pm$ 0,02	8,46 $\pm$ 0,05	0,44 $\pm$ 0,40	- 56 %
24h RA 50 $\mu\text{M}$	13,60 $\pm$ 0,05	22,14 $\pm$ 0,03	8,54 $\pm$ 0,08	0,41 $\pm$ 0,60	- 59 %
SD blau*	17,64 $\pm$ 0,06	22,14 $\pm$ 0,03	4,50 $\pm$ 0,09	6,78 $\pm$ 0,00	+ 578 %

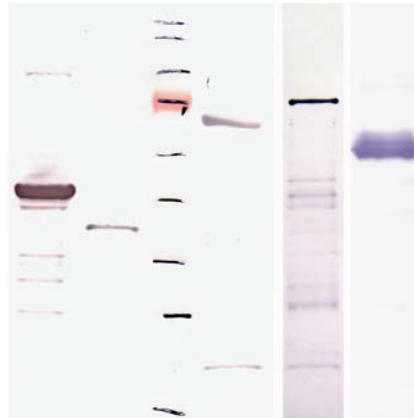
Dargestellt ist das *house-keeping* Gen  $\beta$ -Tubulin (HKG) und die RA-DH (GOI) für die Kontrolle, 24 h Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Carotin, 24 h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Carotin; 24 h Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Retinsäure und als Vergleich das Expressionsniveau eines blauen *S. domuncula* Individuums. Die Werte beziehen sich jeweils auf die  $C_T$ -Werte der 200 ng-Templates.  $S\Delta C_T - K\Delta C_T$  ist die Differenz zwischen Sample  $\Delta C_T$  und Kontroll  $\Delta C_T$ . Die relative Expression wurde mit Formel 2 (3.5.2) berechnet.\* diese Werte stammen aus einem blauen Exemplar und sind nur mit der Grundexpression des roten Schwamms vergleichbar (Kontrolle).

Um einen Vergleich des Expressionsniveaus beider Gene in einem blauen Exemplar von *S. domuncula* zu erhalten, wurde diese RNA mit untersucht. Normalisiert auf die Expression eines roten Exemplars wäre die RA-DH im blauen Schwamm über 6 Mal so hoch exprimiert.

#### 4.6 EXPRESSION DER REKOMBINANTEN PROTEINE

Mit spezifischen Primern (2.7.3) wurden die kodierenden Bereiche der Gene BCO, BCO-II, ADH, RA-DH und RALDH spezifisch von der cDNA eines roten *S. domuncula* amplifiziert (3.3.1) und in einen Expressionsvektor kloniert (3.9). Die resultierenden Plasmide wurden in einen Bakterienhost transformiert (3.10.2) und schließlich exprimiert (3.16.2). Mittels Westernblot (3.21) wurde die erfolgreiche Expression der rekombinanten Proteine überprüft (Abb. 25). Für die BCO wurden verschiedene Expressionsvektoren (2.6) und Bakterienhosts (2.8) hinsichtlich produzierter Proteinmenge und -Lokalisierung beurteilt. Dabei ließ sich die größte Proteinmenge aus Top10-Zellen in Kombination mit dem TOPO-Vektor pTrcHis2 (2.6) extrahieren, wobei das Protein fast ausschließlich in unlöslicher Form als „inclusion-bodies“ gespeichert wurde. Diese wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt

(3.16.3.2) und das Protein z.B. als Antigen zur Antikörperproduktion eingesetzt (3.22). Für Aktivitätsuntersuchungen ist nur der native Proteinanteil entscheidend. Die BCO ist ein wasserlösliches Enzym und so wurde nur die lösliche Fraktion der Bakterienextrakte verwendet (3.16.3.1). Die Kombination des TOPO-Vektors pBAD (2.6) mit XL1-blue Bakterien (2.8) erwies sich für eine hohe Ausbeute an nativem Enzym am geeignetsten.



**Abb. 25:** Western-Blot zur Verifizierung der rekombinant hergestellten Proteine im Vitamin A Stoffwechsel von *S. domuncula*. Dargestellt sind die aus *E. coli* Expressionskulturen aufgereinigter Proteine; von links nach rechts: ADH, RA-DH, Marker, BCO-II, BCO und RALDH (sichtbare Markerbanden in kD: 15, 25, 35, 45, 55, **70** orange, 100, 130, 170). Detektion mit Primärantikörper Anti-His, Sekundärantikörper Anti-Mouse mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase (2.4).

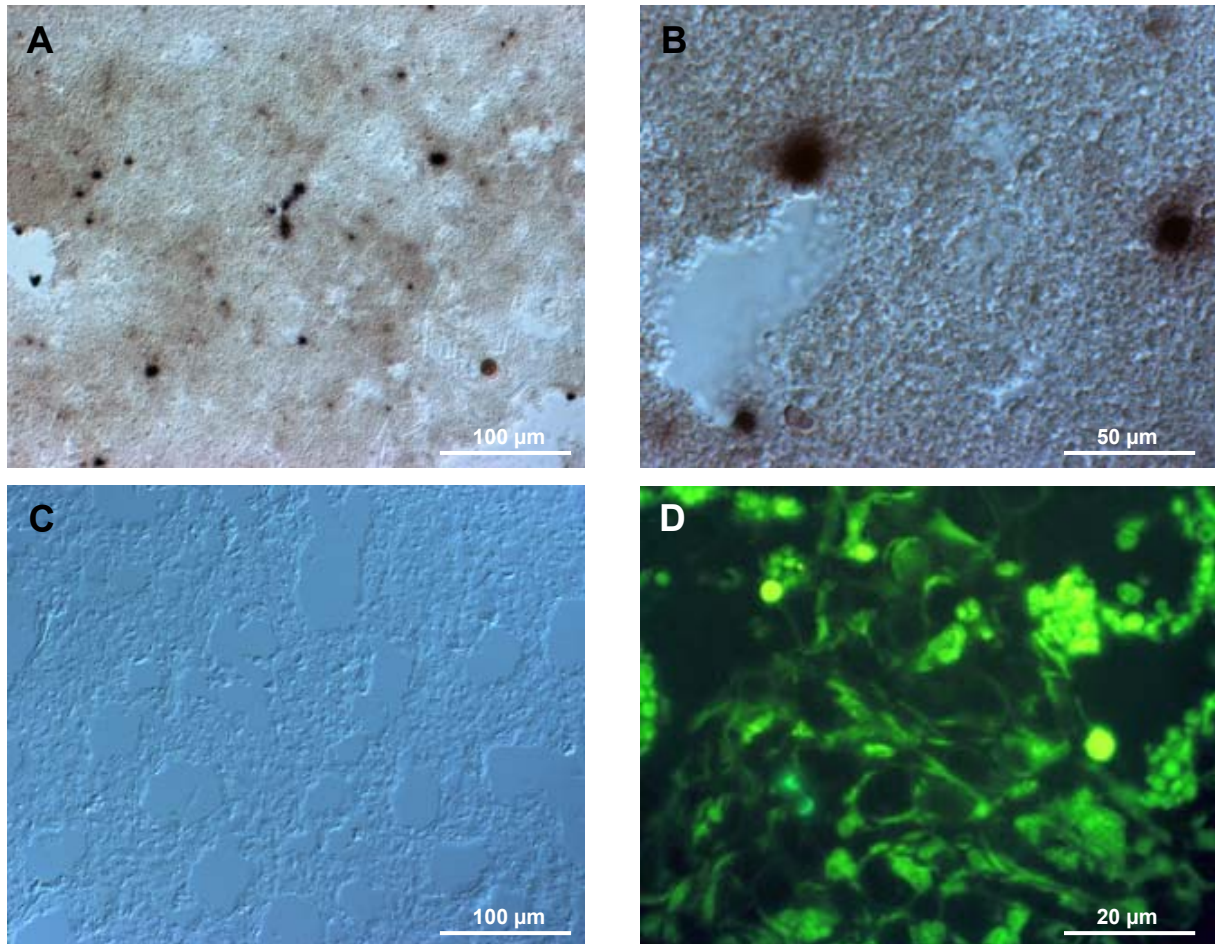
#### 4.7 *IN-SITU* NACHWEIS DER DIFFERENZIELLEN GENEXPRESSION

##### 4.7.1 *In-situ* Hybridisierung mit der BCO

In den Northern-Blot und RTQ-PCR Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Expression der BCO evtl. über Rückkopplungsmechanismen gesteuert wird. Aus diesem Grund wurde das Verhalten der BCO Expression in Gewebeschnitte aus adulten und primmorphen Schwämmen, mit gleicher Behandlung wie in (3.24.2) beschrieben, mittels *in-situ* Hybridisierung innerhalb der Zellen untersucht. Das Färbungsmuster der Zellen gibt dabei Aufschluss über die Lokalisierung und relative Menge des exprimierten Gens.

Mit Hilfe der *in-situ* Hybridisierung (3.23) konnten keine BCO-Transkripte innerhalb adulter Schwämme (Abb. 26\_C) und in älteren Primmorphen nachgewiesen werden, während junge Primmorphe über das Gewebe verteilt einzelne, spezifische Färbungen enthielten (Abb. 27\_A1). In älteren Primmorphen ließ sich die Expression der BCO durch Zugabe von Stressoren (hier Zöller-Medium) auf ein vergleichbares Niveau von jungen (Kontroll-) Primmorphen bringen (Abb. 26\_A). Abb. 26\_B zeigt eine Ausschnittsvergrößerung von Abb. 26\_A mit klar abgegrenzten, gefärbten Zellehaufen. Innerhalb adulter Schwämme wurden mehrere Regionen (inklusive Oskulum) hinsichtlich der BCO Expression untersucht

mit negativem Ergebnis (Abb. 26\_C). Abb. 26\_D zeigt die Lokalisierung der BCO Expression durch immunocytochemische Färbung (auf Proteinebene) innerhalb der Zellen. Die Expression ist räumlich nicht beschränkt und kann die komplette Zelle (Cytosol) umfassen.

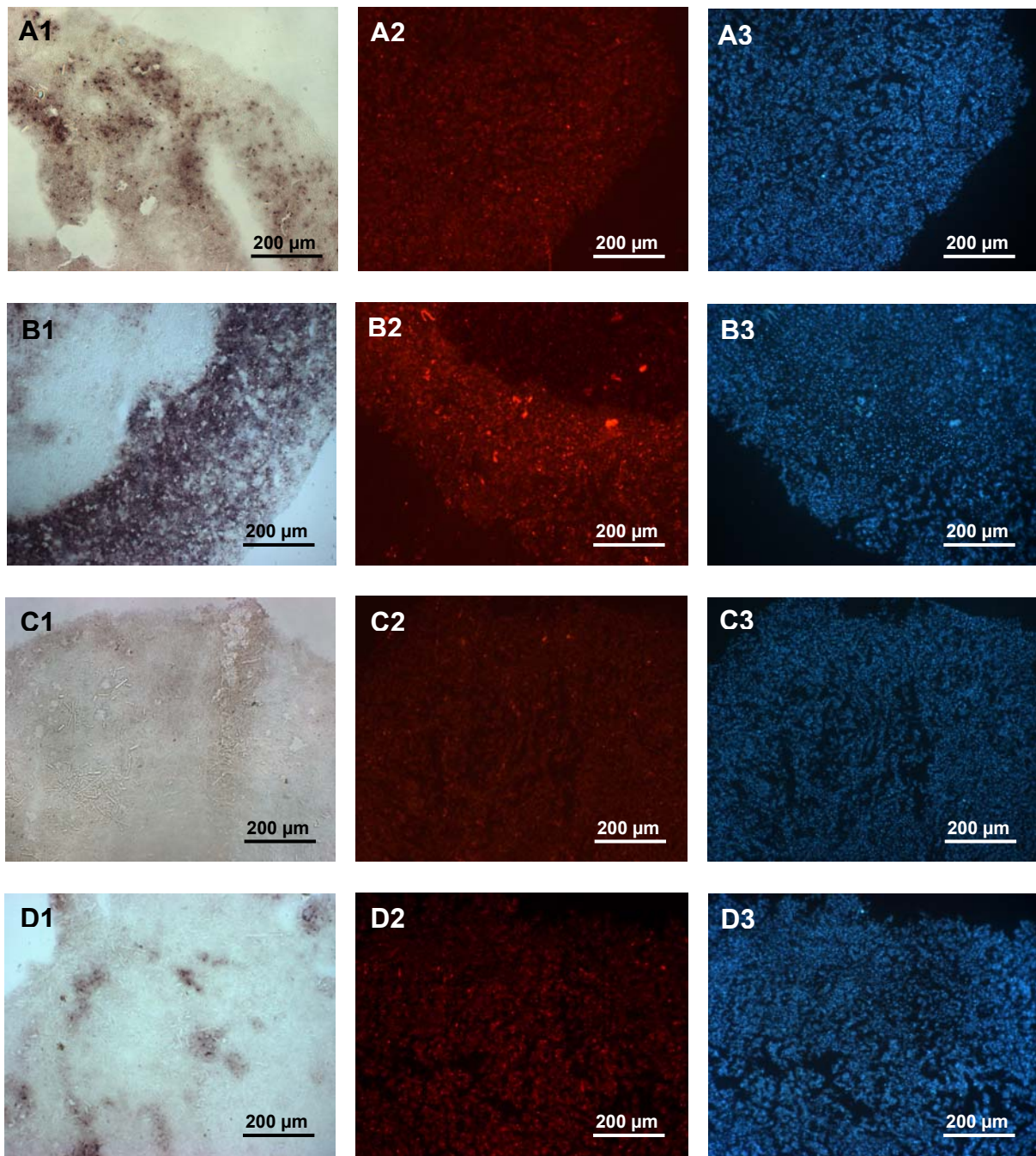


**Abb. 26:** *In-situ* Hybridisierung von Gewebeschnitten mit spezifischer BCO Sonde: (A) Primmorph behandelt mit Zöller-Medium 20 x Vergrößerung, (B) gleicher Schnitt wie (A) mit 400 x Vergrößerung, (C) adulter Schwamm mit 40 x Vergrößerung, (D) immunocytochemische Färbung zur Lokalisierung der BCO Proteine innerhalb der Zellen mit 1000 x Vergrößerung.

#### 4.7.2 Nachweis der differentiellen BCO Expression auf mRNA- und Proteinebene

Durch *in-situ* Hybridisierung lassen sich die mRNA-Transkripte der BCO in jungen Primmorphen (unbehandelt) vor allem in den Randregionen nachweisen (Abb. 27\_A1). Durch die Zugabe von Retinsäure zum Kulturmedium lassen sich keine Transkripte identifizieren (Abb. 27\_C1), wohingegen eine Verabreichung von Citral zu einer starken Überexpression der BCO vor allem im Randbereich führt (Abb. 27\_B1). Nach Inkubation mit Vitamin A ist die Anzahl an Transkripten deutlich reduziert und sie sind nur noch vereinzelt, räumlich eng begrenzt nachweisbar (Abb. 27\_D1).





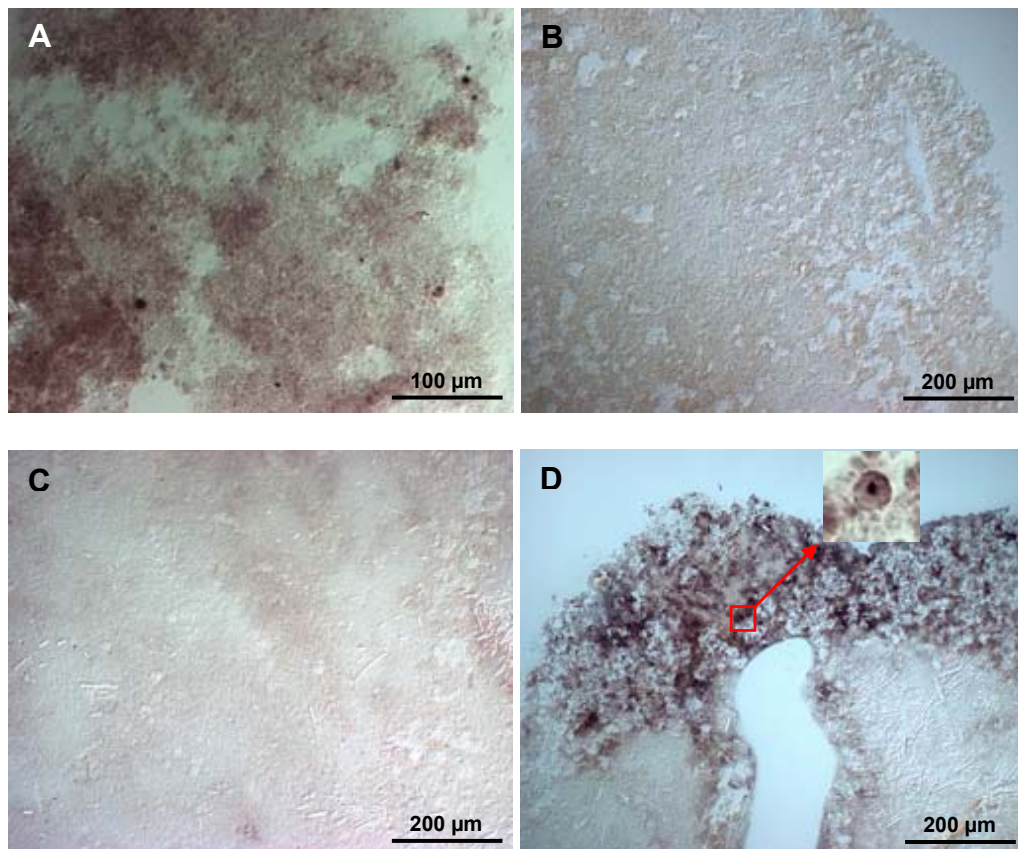
**Abb. 27:** Nachweis der differentiellen BCO Expression in Primmorphen mittels *in-situ* Hybridisierung (Spalte 1) und immuncytochemischer Färbung (Spalte 2). Spalte 3 zeigt die DAPI-Doppelfärbung der Zellkerne durch die immuncytochemische Färbung der Schnitte aus Spalte 2. **A** Kontrolle; **B** Inkubation mit 1  $\mu$ M Citral; **C** Inkubation mit 1  $\mu$ M Retinsäure und **D** Inkubation mit 1  $\mu$ M Vitamin A. Auffällig ist die scharf abgegrenzte Expression der BCO im Randbereich der mit Citral behandelten Schnitte (B1;B2), während durch die Behandlung mit Retinsäure nahezu keine Transkripte (C1) bzw. Protein (C2) nachzuweisen war. In unbehandelten Primmorphen ist eine diffuse Expression (A) zu erkennen, während mit Vitamin A nur lokal begrenzte Bereiche positiv reagierten (D). Alle Aufnahmen sind in 100 x Vergrößerung dargestellt.

Die Ergebnisse der *in-situ* Hybridisierung wurden durch die immuncytochemische Färbung mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen die BCO (3.24.3) bestätigt, wobei der Unterschied zwischen den Inkubationsansätzen (Abb. 27\_A2-D2) im Vergleich geringer ausfällt. In den Retinsäure behandelten Primmorphen (Abb. 27\_C2) lässt sich kein BCO

Protein nachweisen, während dieses durch Zugabe von Citral deutlich in den Randregionen akkumuliert (Abb. 27\_B2). Der Unterschied zwischen Kontrolle (Abb. 27\_A2) und Vitamin A (Abb. 27\_D2) lässt sich bildlich nicht eindeutig darstellen, reflektiert aber das Ergebnis aus der *in-situ* Hybridisierung. Die DAPI-Doppelfärbung (Abb. 27\_A3-D3) visualisiert die Zellkerne und bestätigt die spezifische Färbung durch den Antikörper innerhalb einer Zelle.

#### 4.7.3 Nachweis der differentiellen RA-DH Expression auf mRNA-Ebene

Innerhalb derselben Primmorphen wie in 4.7.2 ist die Anzahl an nachweisbaren RA-DH mRNA Transkripten (Abb. 28) im Vergleich zur BCO (Abb. 27 A1-D1) deutlich geringer.



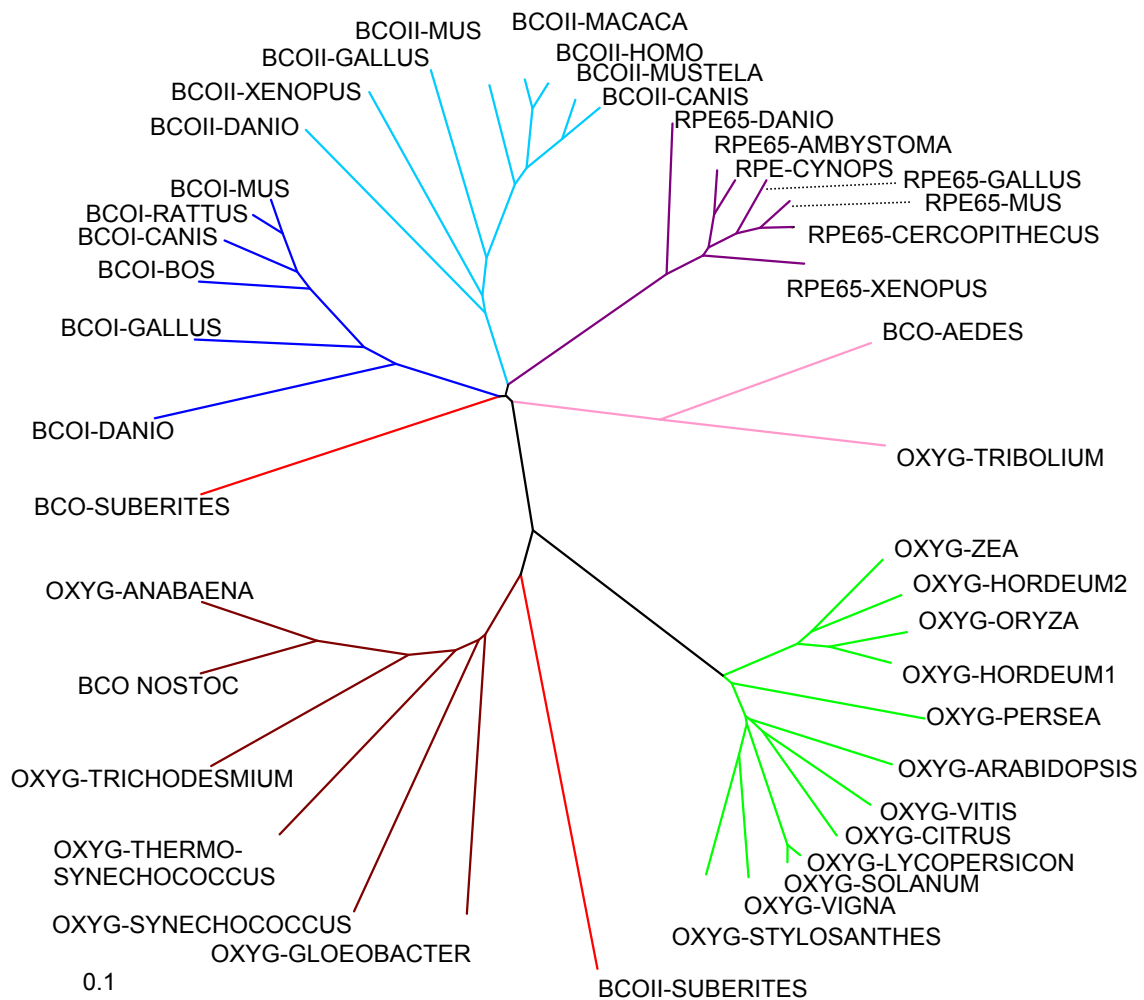
**Abb. 28:** Nachweis der differentiellen RA-DH Expression in Primmorphen mittels *in-situ* Hybridisierung: (A) Kontrolle bei 200 x facher Vergrößerung; (B) Inkubation mit 10  $\mu$ M Retinsäure bei 100 x Vergrößerung; (C) Inkubation mit 10  $\mu$ M Vitamin A bei 100 x facher Vergrößerung; (D) Inkubation mit 10  $\mu$ M Citral bei 100 x facher Vergrößerung mit Ausschnittsvergrößerung bei 1000 x facher Vergrößerung zur Visualisierung der räumlich abgegrenzten mRNA-Transkripte.

Bei den unbehandelten Kontrollprimmorphen (Abb. 28\_A) sind nur vereinzelt Transkripte nachzuweisen, während in Retinsäure (Abb. 28\_B) und Vitamin A (Abb. 28\_C) behandelten Primmorphen kein Nachweis möglich war. Für Citral (Abb. 28\_D) ist eine deutliche Steigerung an Transkripten in der Randregion zu erkennen, jedoch wesentlich geringer im

Vergleich zur BCO (Abb. 27\_B1). Die Ausschnittsvergrößerung in Abb. 28\_D zeigt eine einzelne Zelle bei 1000 facher Vergrößerung.

#### 4.8 PHYLOGENETISCHE ANALYSE DER ENZYME MIT KONSERVIERTER RPE65-DOMÄNE

Die Namensgebung dieser Proteinfamilie resultiert, wie einleitend erwähnt, (1.2.1) von einem Protein (65 kD), welches erstmals aus dem Pigmentepithel der Retina isoliert wurde. Zum Erstellen eines Phylogramms (Abb. 29) wurden die Aminosäuresequenzen verschiedener Carotinoxygenasen aus Pflanzen, Insekten, Tieren, Cyanobakterien und verschiedener RPE-Proteine aneinander ausgerichtet und daraus ein Baumdiagramm berechnet (ClustalX; 2.10). Mit TreeView (2.10) wurde dieses visualisiert.



**Abb. 29:** Phylogramm zur Entwicklung der verschiedenen carotinoidmodifizierenden Enzyme. Die Oxygenasen aus Cyanobakterien sind in dunkelbraun, die der Pflanzen in grün, die tierische symmetrisch spaltende Variante (BCOI) in blau, deren asymmetrische Variante (BCOII) in türkis, Proteine des Retinapigmentepithels (RPE) in violett und die Oxygenasen der Insekten in rosa dargestellt. Die Äste zu den beiden Schwammenzymen sind rot eingefärbt. Die zum Baum gehörenden exakten Artnamen und *Accession Numbers* sind in APPENDIX 5 dargestellt.

Die Enzyme gruppieren darin anhand ihrer Herkunft und Funktion, nämlich in bakterielle (Abb. 29, braun), tierische (unterteilt in die symmetrisch (Abb. 29, blau) und asymmetrisch (Abb. 29, türkis) spaltenden Varianten), pflanzliche (Abb. 29, grün), Oxygenasen aus Insekten (Abb. 29, rosa), aber auch verwandte Proteine des RPE (Abb. 29, violett). Weiterhin lässt sich das Phylogramm zweiteilen; während in der einen Hälfte die bakteriellen und pflanzlichen Oxygenasen gruppieren, sind in der anderen die tierischen Carotinoxxygenasen, die Retinaproteine, sowie die Carotinoxxygenasen der Insekten zu finden. Ein näherer Verwandtschaftsgrad zwischen Enzymen gleicher Herkunft (z.B. der tierischen oder pflanzlichen Oxygenasen) und Funktion ist offensichtlich, während der Abstand zwischen den einzelnen Proteingruppen relativ groß ist. Die BCO aus *S. domuncula* geht auf den gleichen Ursprung der symmetrisch spaltenden, tierischen Carotinoxxygenasen (BCOI) zurück, zweigt aber früh in der gemeinsamen Entwicklung ab. Ähnlich verhält es sich mit der BCO-II aus *S. domuncula*, die einen gemeinsamen Ursprung mit den bakteriellen Oxygenasen findet und sich früh in einen eigenen Ast verzweigt.

#### **4.9 ANALYSE DER FARBGEBENDEN KOMPONENTEN AUS *S. DOMUNCULA***

Im Anschluss an den Nachweis der Carotinoid modifizierenden Enzyme auf Nukleinsäure- und Proteinebene, wurden die farbgebenden Substanzen der Schwämme untersucht. Aufgrund der intensiv roten Färbung lag die Vermutung nahe, dass es sich entweder um Eisenverbindungen oder organische Farbstoffe (z.B. Carotinoide) handelt. Als Substrat der BCO kommen nur wenige Carotinoide in Frage, welche sich mit organischen Lösungsmitteln extrahieren lassen. Unter diesem Aspekt wurden Schwammstücke mit Aceton behandelt, die sich daraufhin entfärbten.

##### **4.9.1 Identifizierung von Carotinoiden mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC**

Um ein Substrat der BCO (z.B.  $\beta$ -Carotin) im Schwamm nachzuweisen, wurde ein Farbextrakt aus frischem Gewebe mit Aceton hergestellt (3.25.1). Die intensiv gefärbten Schwammstücke konnten damit (unabhängig von der Ursprungsfärbung) vollständig entfärbt werden. Der resultierende Acetonextrakt eines blauen, gelben und roten *S. domuncula* wurde zunächst einer Dünnschichtchromatographie (DC) mit den folgenden Referenzsubstanzen unterzogen: Echinenon, Lutein,  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin, Violaxanthin, Cryptoxanthin, Iso-Cryptoxanthin, Zeaxanthin und Canthaxanthin (Laufmittel: Dichlormethan und Ethylacetat

(7:3 v/v)). In (Tab. 6) sind die Substanzen aufgelistet, die während der DC die gleiche Laufweite wie in den untersuchten Schwämmen erzielten. Echinenon migrierte mit der Laufmittelfront. Nicht alle Farbkomponenten in den Schwammextrakten konnten durch die DC aufgetrennt werden. So enthielten die Lauffronten der einzelnen Extrakte mehrere Farbkomponenten und Echinenon war deswegen nicht eindeutig identifizierbar.

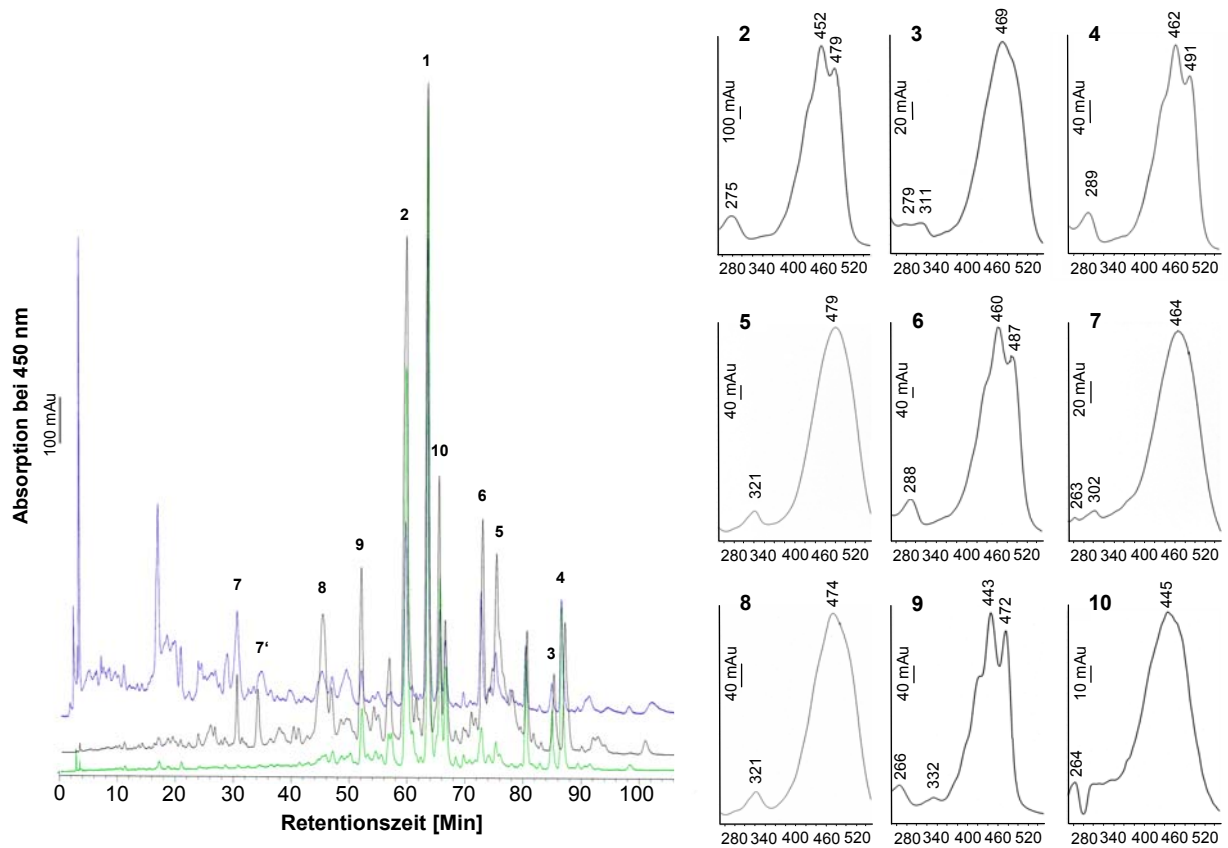
**Tab. 6:** Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie nachgewiesene Carotinoide in den verschieden gefärbten Schwämmen. Verwendetes Laufmittel Dichlormethan und Ethylacetat (7:3 v/v) auf Silica 60 Matrix (2.12).

	Astaxanthin	$\beta$ -Carotin	Echinenon	Lutein	Violaxanthin
Roter Schwamm	X	X	X?		
Gelber Schwamm	X	X	X?		
Blauer Schwamm	X	X	X?	X	X

Beim blauen Schwamm waren zusätzlich zu den in Tab. 6 angegebenen Banden vier weitere unterhalb der Luteinlauffront, und eine kurz oberhalb von Astaxanthin zu erkennen. Bei Betrachtung unter UV fluoreszierte zusätzlich eine Bande auf Höhe des Astaxanthins rosa-bläulich. Die verbleibenden Schwämme wiesen keine fluoreszierenden Banden auf.

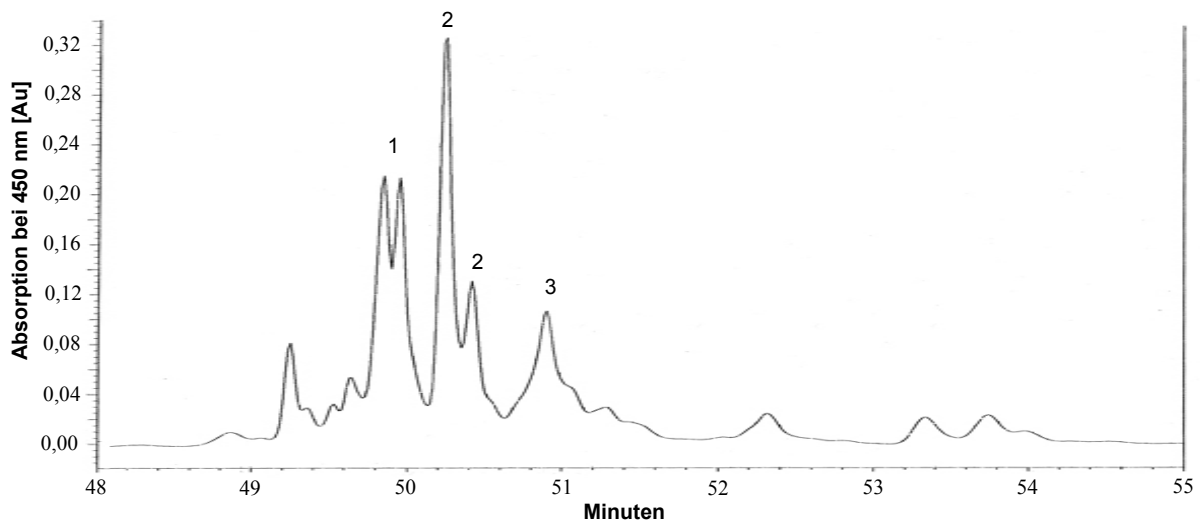
#### 4.9.2 Identifizierung von Carotinoiden mittels HPLC

Im Anschluss an die DC wurde eine *reversed-phase* HPLC (3.26) mit denselben Acetonextrakten wie in 4.9.1 durchgeführt. Die Vielfalt an Carotinoiden im Chromatogramm (Spektrum des Gesamtexttraktes), gemessen bei 450 nm, ist in Abb. 30 wiedergegeben. Der blaue Schwamm enthält die größte Anzahl an unterschiedlichen Carotinoiden sowohl im polaren (kurze Retentionszeit in Abb. 30) als auch im apolaren Bereich (längere Retentionszeit). Die geringste Anzahl weist der gelb-weiße Schwamm auf. Auffällig ist, dass die  $\beta$ -Carotin Konzentration in allen drei Individuen am höchsten war. Die Spektren aus Abb. 30 zeigen Carotinoide, die in allen drei Schwammfarben in größeren Mengen nachzuweisen waren (bis auf Abb. 30\_7). Bedingt durch die hohe Anzahl ließen sich diese nicht ausreichend auftrennen, um sie z.B. durch Massenspektroskopie genau zu charakterisieren. Das Spektrum Nr. 4 in Abb. 30 ähnelt der Substanz Isorenieratin aus dem Meeresschwamm *Suberites sericeus* (Absorptionsmaxima: 438, 460, 495 nm in Chloroform; MATSUNO *et al.* 1984). Ebenfalls in diesem Schwamm wurde der Carotinoidester von Trikenriorhodin entdeckt Absorptionsmaximum 473 nm in Hexan; MATSUNO 1995). Das Spektrum Nr. 8 (Abb. 30) könnte diese Substanz repräsentieren.



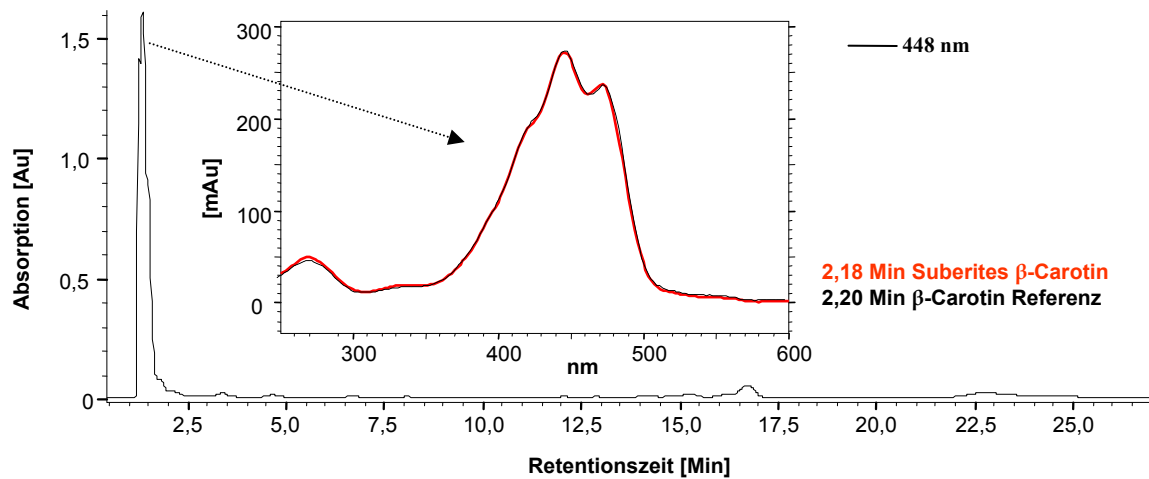
**Abb. 30:** Auftrennung der Farbextrakte aus verschiedenen gefärbten Schwämmen mittels *reversed-phase* HPLC. Zur Veranschaulichung sind die Chromatogramme übereinander versetzt dargestellt: **Links:** Absorptions-Laufzeitdiagramm bei 450 nm; grün = Extrakt eines gelb-weißen *S. domuncula*, schwarz = Extrakt eines roten *S. domuncula* und blau = Extrakt eines blauen *S. domuncula*. **Rechts:** Spektren von Carotinoiden, die in allen drei Schwammfarben vorzufinden sind. Nähere Klassifizierung war aufgrund mangelnder Referenzsubstanzen nicht möglich (x-Achse = Wellenlänge in nm). Peak 1 entspricht  $\beta$ -Carotin (Spektrum siehe **Abb. 32**). Laufmittel Chloroform, lineare *reversed-phase* HPLC (3.26).

Zur Separierung des  $\beta$ -Carotins von den restlichen Carotinoiden wurde der Acetonrohextrakt eines roten *S. domuncula* gemäß (3.25.2.1) gereinigt, eingengt, in Chloroform aufgenommen und anschließend einer Gradienten-*reversed-phase*-HPLC unterzogen. Im Chromatogramm dieses Laufs (Abb. 31) ließen sich eindeutig die beiden Isomere (Syn und Anti) von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin identifizieren (verifiziert durch den Lauf der entsprechenden Referenzsubstanz und der dazugehörigen Spektren; nicht gezeigt). Weiterhin ließ sich ein Ketocarotinoid in der 51. Minute (Abb. 31\_3) identifizieren. Die Spektren der verbleibenden Peaks weisen u. a. auf 4-hydroxy-Carotinoide hin (mündliche Bestätigung durch Professor Bayer, Universität Freiburg).



**Abb. 31:** *Reversed-phase* HPLC eines Acetonextrakts aus einem roten *S. domuncula*. Chromatogramm bei 450 nm. 1 = die beiden Stereoisomere von  $\alpha$ -Carotin (syn und anti); 2 = die beiden Stereoisomere von  $\beta$ -Carotin (syn und anti); 3 = ein Ketocarotinoid (nicht charakterisiert).

Zur Verifizierung des  $\beta$ -Carotins im Pigmentextrakt aus *S. domuncula* wurde dieser mit der Reinsubstanz in einer *normal-phase* HPLC verglichen. Das Spektrum des Peaks bei 2,18 Min ist mit dem der Reinsubstanz (2,20 Min) identisch (Abb. 32). Anhand der Laufzeit und des charakteristischen Spektrums konnte die Substanz aus *S. domuncula* eindeutig als  $\beta$ -Carotin identifiziert werden.



**Abb. 32:** HPLC-Chromatogramm des Acetonextrakts aus *S. domuncula*: Analysiert wurde ein gereinigter Acetonextrakt eines roten *S. domuncula*. Verwendetes Laufmittel ist ein n-Hexan/Ethanolgemisch (99,5:0,5 v/v). Das Spektrum des Schwammpigment-Peaks bei 2,18 Min (rote Linie) ist identisch mit dem der  $\beta$ -Carotin Reinsubstanz (schwarz gepunktete Linie).

### 4.9.3 Quantifizierung des $\beta$ -Carotingehaltes in *S. domuncula*

Verschieden gefärbte Exemplare von *S. domuncula* wurden auf ihren  $\beta$ -Carotingehalt hin untersucht. Es wurden pro Individuum jeweils vier Gewebestücke entnommen und deren Gewicht bestimmt. Nach Zerkleinerung wurden sie in Aceton überführt und mittels Ultraschallstößen vollständig entfärbt (3.25.1). Die gesammelten Aceton-Farbextrakte wurden von störenden Substanzen gereinigt (3.25.2.1) und bis zur Trockene eingengt. Zur Fehlerminimierung wurden die vier Gewebeextrakte einer Farbe nach Aufnahme in Laufmittel möglichst verlustfrei vereint. Nach erneutem Einengen wurden diese in genau definiertem Volumen an Laufmittel aufgenommen und 10  $\mu$ L davon einer HPLC unterzogen. Der  $\beta$ -Carotingehalt wurde durch Integration der resultierenden Peaks im Chromatogramm berechnet (Tab. 7). Mit 135 nMol pro Gramm Frischgewicht (FG) war der  $\beta$ -Carotin Gehalt im roten Schwamm am höchsten, gefolgt vom blauen mit 30 nMol/g FG und dem gelbweißen mit 21 nMol/g FG.

**Tab. 7:** Quantifizierung des  $\beta$ -Carotingehalts in *S. domuncula* verschiedener Färbung:

	rot	blau	gelb-weiß
nMol/g Frischgewicht	135,44	30	21
mg/g Frischgewicht	72,2	16,1	11,3

## 4.10 DAS CAROTINOID-BINDEPROTEIN VON *S. DOMUNCULA*

Das in dieser Arbeit untersuchte Carotinoidbindeprotein aus *S. domuncula* wurde von Professor Jaenicke (Molekulare Biophysik, Universität Mainz) isoliert und für die nachfolgenden Versuche zur Verfügung gestellt. Der Protein-Carotinoid-Komplex ist intensiv dunkelblau gefärbt und dessen Absorptionsverhalten wurde photometrisch bestimmt (Abb. 33). Neben der Proteinabsorption bei 280 nm erscheint ein Absorptionsmaximum bei 590 nm mit einer Schulter bei 533 nm.

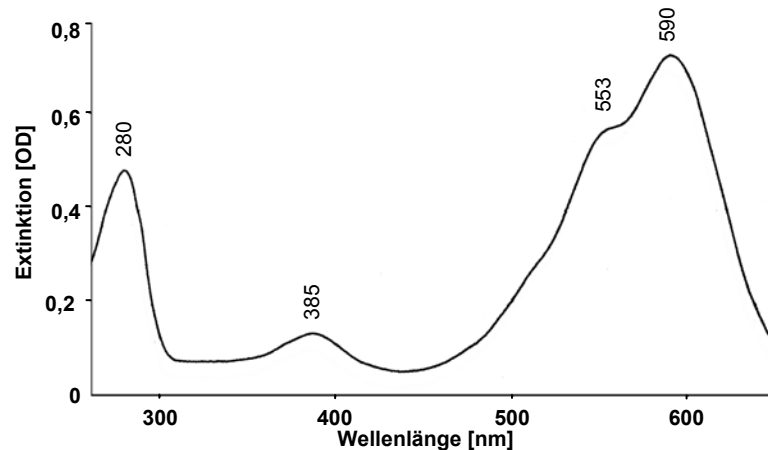
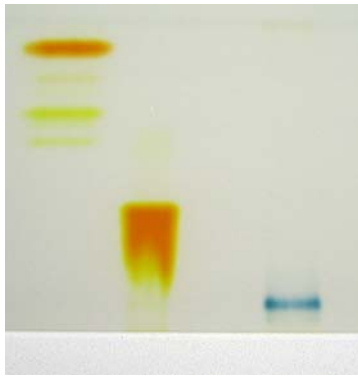
### 4.10.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für eine erste Charakterisierung des gebundenen Carotinoids wurden 50  $\mu$ L der Carotin-Protein-Lösung in einem Reaktionsgefäß mit 350  $\mu$ L PBS versetzt und mit 400  $\mu$ L Chloroform/Methanol (2:1 v/v) ausgeschüttelt. Die Chloroformphase (untere Phase) wurde für die DC verwendet (Abb. 33).

Durch das Ausschütteln verlor der Carotin-Protein-Komplex seine charakteristische blaue Farbe und die Chloroformphase erschien hellgelb. Nach Applizierung auf die Sammelschicht



der DC-Platten blieb diese Färbung zunächst erhalten. Wurde als Laufmittel Chloroform verwendet, immobilisierte sich das Carotinoid kurz oberhalb der Sammelschicht als intensiv türkis-blaue Bande (Abb. 33). Das an die Kieselgelmatrix gebundene Carotinoid ließ sich durch Auskratzen wieder in Chloroform lösen und erhielt dadurch seine hellgelbe Färbung zurück.

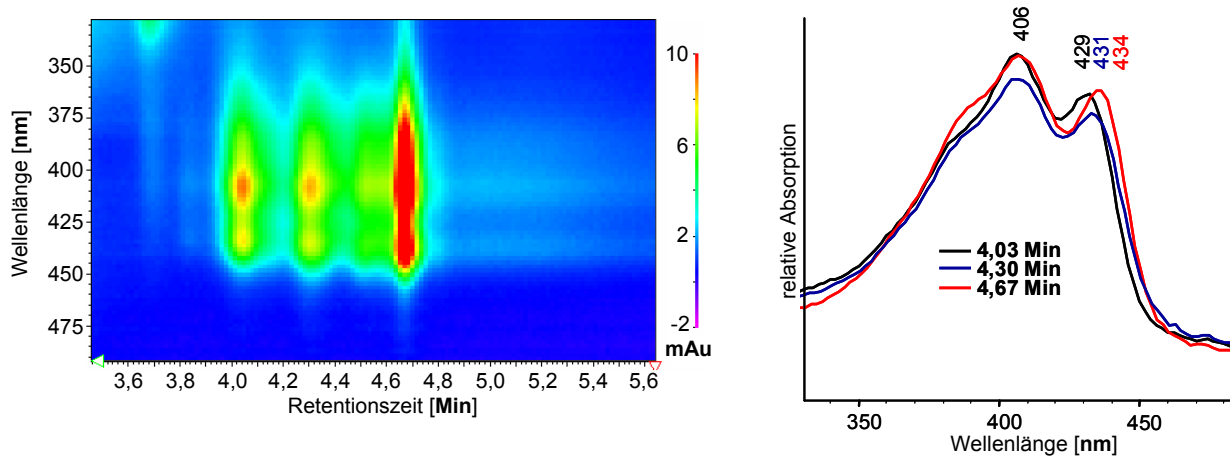


**Abb. 33:** Analyse des Carotin-Proteinkomplexes aus *S. domuncula*. **Links:** DC des extrahierten Carotinoids aus dem Bindeprotein von *S. domuncula*. Spur 1 =  $\beta$ -Carotin; Spur 2 = Astaxanthin; Spur 3 = Carotinoid aus *S. domuncula*. Verwendetes Laufmittel: Chloroform; Platten: Kieselgel 60. **Rechts:** Absorptionsspektrum des Carotinoid-Bindeprotein-Komplexes aus *S. domuncula* unter nativen Bedingungen.

Wurde als Laufmittel Petrolether/Diethylether/Aceton (Verhältnis 20:5:5) verwendet, immobilisierte das Carotinoid aus *S. domuncula* nicht. Die Bande lief der Stoffklasse der Carotinoide spezifisch innerhalb der Trennschicht und es war kein Farbumschlag zu erkennen. Mit der Entnahme der Platte aus der Laufkammer und der damit einhergehenden Trocknung entfärbte sich die Carotinoidbande vollständig (nicht gezeigt).

#### 4.10.2 Spektrometrische Untersuchung des Carotin-Proteinkomplexes und des Carotinoids

Im Spektrum des Carotin-Protein-Komplexes aus *S. domuncula* (Abb. 33) ist ein Absorptionsmaximum bei 590 nm zu erkennen. Extrahiert man das Carotinoid, ergibt sich ein Absorptionsmaximum bei 406 nm mit einer Schulter bei 434 nm. Eine zusätzlich durchgeführte HPLC-Analyse zeigte, dass sich drei Substanzen mit nahezu identischen Absorptionsspektren und Retentionszeiten im photometrisch bestimmten Absorptionsspektrum überlagern (Abb. 34). Das Carotinoid aus dem Bindeprotein erscheint nach ca. 4,7 Min und zeigt im Spektrum ein Maximum bei 406 nm und ein weiteres bei 434 nm. Bei den zwei verbleibenden Substanzen handelt es sich um Derivate desselben Carotinoids.



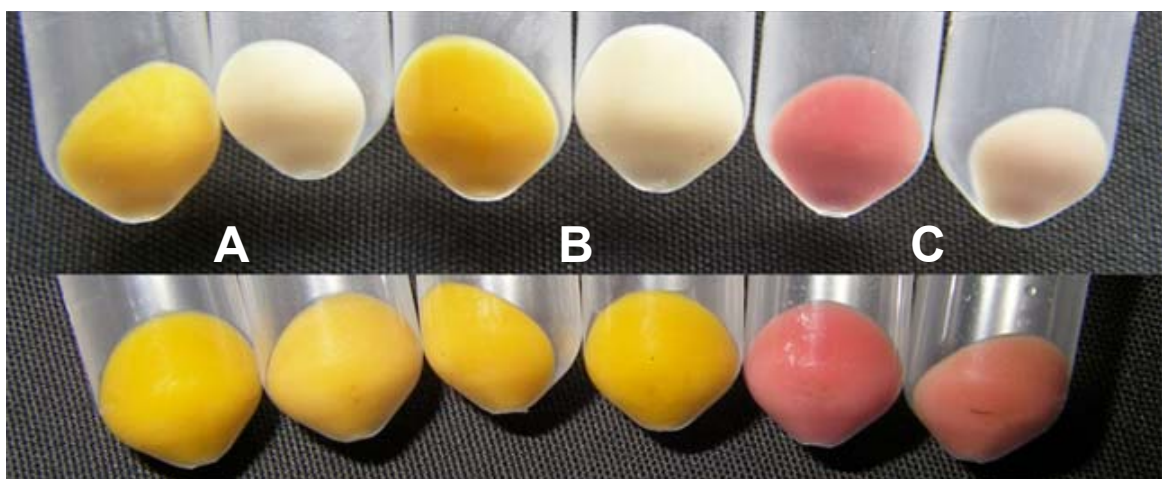
**Abb. 34:** HPLC-Analyse des vom Bindeprotein extrahierten Carotinoids aus *S. domuncula*: **A)** Absorptionsmaxima der Substanz im Totalspektrum (300-500 nm) in Abhängigkeit von der Laufzeit. Der Hauptanteil der Substanz erscheint nach ca. 4,7 Min in n-Hexan/Ethanol (99,5:0,5). **B)** Skalierte Spektren der in (A) aufgetrennten Substanzen.

#### 4.11 ÜBERPRÜFUNG DER ENZYMFUNKTION DER BEIDEN CAROTINOXYGENASEN

##### 4.11.1 Überprüfung im Bakterientestsystem

Zur funktionalen Überprüfung der Enzyme BCO und BCO-II wurde ein Coexpressionsversuch der jeweiligen Enzyme in Bakterien durchgeführt, welche entweder Lykopen, Zeaxanthin oder  $\beta$ -Carotin synthetisieren.

In Abhängigkeit von der Inkubationsdauer ist für die BCO eine graduelle Abnahme der Farbintensität mit fortschreitender Zeit zu erkennen. Die Bakterien entfärben sich bei Expression über Nacht fast vollständig (Abb. 35 B).

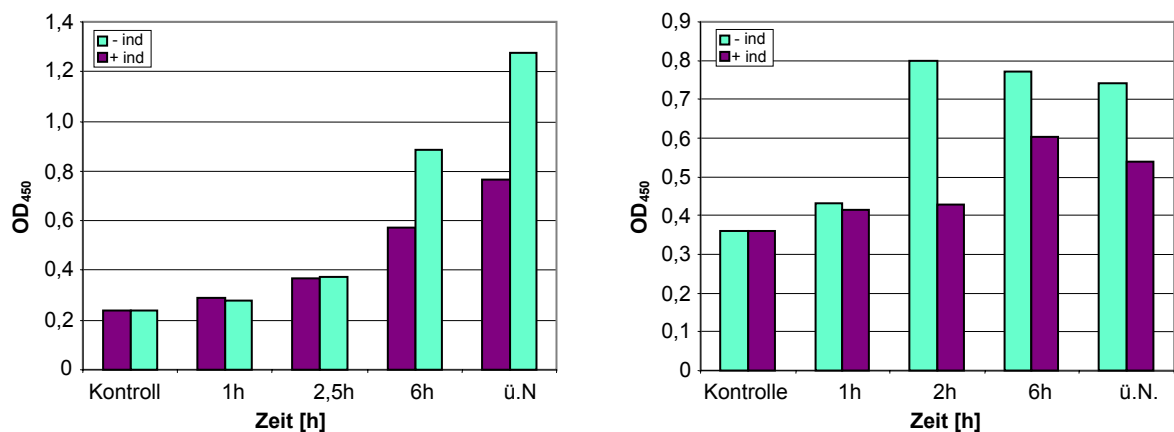


**Abb. 35:** Färbungen von  $\beta$ -Carotin- (A), Zeaxanthin- (B) und Lycopin- (C) synthetisierenden und akkumulierenden *E. coli* Zellen nach Expression der BCO (oben) oder der BCO-II (unten). Dargestellt sind die jeweiligen carotinoid akkumulierenden Kontrollstämme versus solche, die die jeweilige Carotinoxygenase co-exprimieren.

Im Gegensatz hierzu zeigt sich, bei Expression ü.N., für die BCO-II nur eine geringfügige Entfärbung; am stärksten bei Lykopin (Abb. 35 A).

Die graduelle Abnahme der Lycopinkonzentration ließ sich am besten in *E. coli*s darstellen, welche die BCO im Expressionsvektor pBAD-TOPO exprimierten (Abb. 36\_links). Bereits nach 2,5 h ist photometrisch eine geringfügige Abnahme im Vergleich zur nichtinduzierten Vergleichskultur zu erkennen. Nach 6 h unterscheiden sich die Konzentrationen der induzierten und nichtinduzierten Kulturen bereits deutlich voneinander. Nach Inkubation ü.N. ist in induzierten Zellen nur etwa die Hälfte an Lycopin im Vergleich zu nichtinduzierten nachzuweisen.

In den  $\beta$ -Carotin synthetisierenden Zellen war ein größerer Unterschied durch die Expression der BCO in pTrcHis2-TOPO zu erkennen (Abb. 36\_rechts.) Während sich die  $\beta$ -Carotinkonzentration in den co-transformierten, uninduzierten Zellen bereits nach 2 h verdoppelt hatte, blieb sie in den induzierten Kulturen nahezu unverändert. Die absolute  $\beta$ -Carotinmenge nahm in den uninduzierten Kulturen mit fortschreitender Inkubationsdauer geringfügig ab, während in induzierten Zellen nach 6 h eine Zunahme festzustellen war.



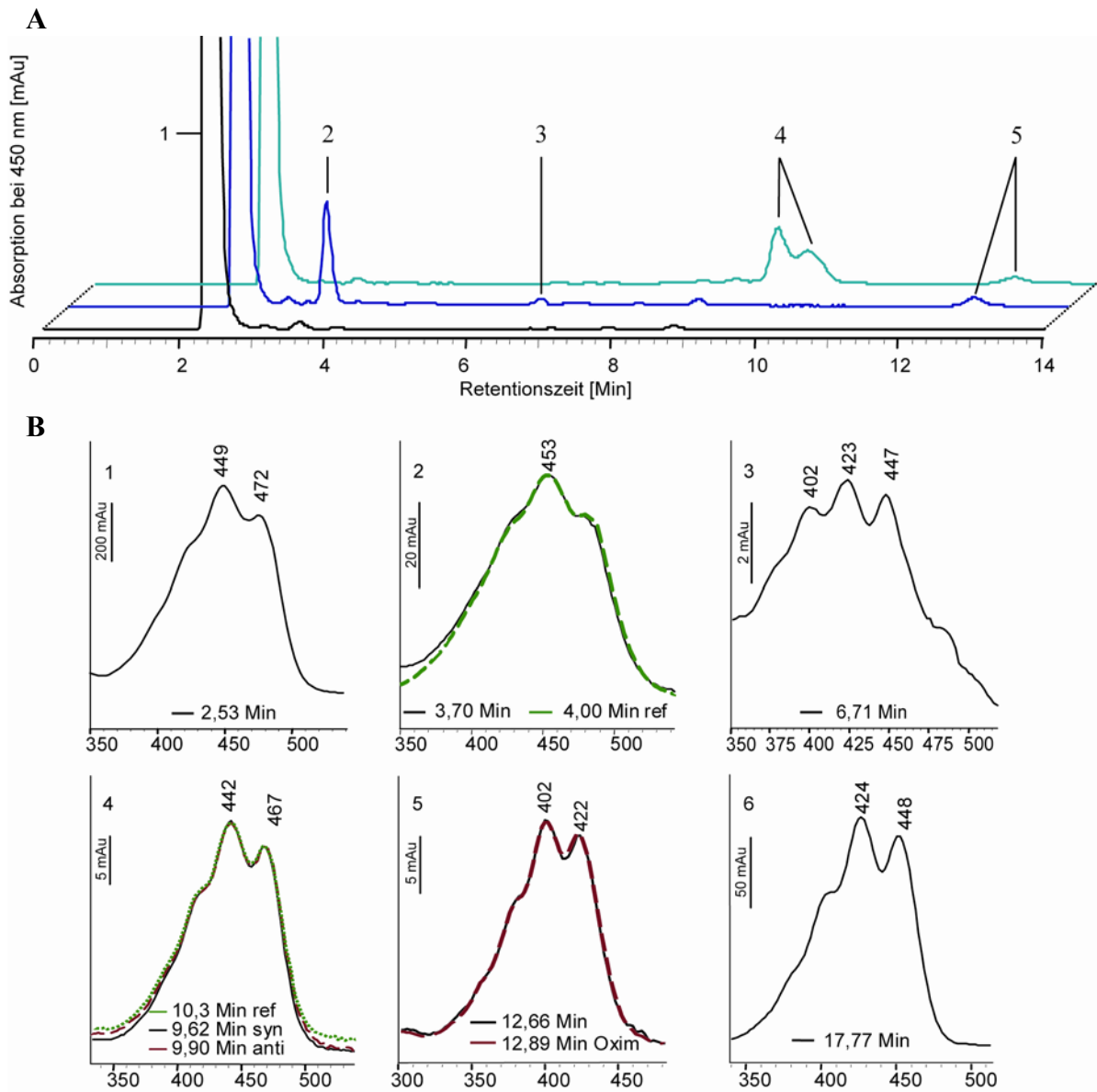
**Abb. 36:** Co-Expression der BCO in carotinsynthetisierenden und akkumulierenden *E. coli* Zellen mit spektrometrischer Bestimmung des Carotingehalts. (**links**) Expression im Vektor pBAD-TOPO und Lykopin synthetisierenden *E. coli*s; (**rechts**) Expression im Vektor pTrcHis2 und  $\beta$ -Carotin synthetisierenden *E. coli*s. Dargestellt sind jeweils nichtinduzierte (-ind) vs. induzierte Zellen (+ind)

Um sicherzustellen, dass die Differenz des Carotingehaltes zwischen den induzierten und nichtinduzierten Kulturen auf die Spaltung der Substanzen zurückgeht und nicht eine verringerte Synthese aufgrund der BCO Expression darstellt, wurde ein *E. coli* Rohextrakt, welcher alleine die BCO exprimiert, mit  $\beta$ -Carotin inkubiert. Auch hier zeigte sich eine deutliche Abnahme der Absorption bei 450 nm im Vergleich zu einem Bakterienrohextrakt ohne BCO Expression (nicht gezeigt).

#### 4.11.2 Nachweis der $\beta$ -Carotin-Spaltprodukte der BCO mittels HPLC

Zum Nachweis der Spaltprodukte wurden Bakterienpellets von  $\beta$ -Carotin synthetisierende und BCO exprimierenden Bakterien entweder als Oxim (3.25.2.1.1) oder ohne Oxim (3.25.2.1) extrahiert, und die Farbkomponenten durch HPLC (*normal-phase*) aufgetrennt. Abb. 37 zeigt deren Chromatogramme – gemessen bei 450 nm – und die dazugehörigen Spektren (Abb. 37\_1-6). Als Referenz wurde ein  $\beta$ -Carotin synthetisierender *E. coli* Stamm ohne BCO verwendet.

Die Substanz mit der höchsten Konzentration und kürzesten Retentionszeit entspricht in allen Extrakten dem  $\beta$ -Carotin (Abb. 37\_1). Bei den unbehandelten Bakterienpellets (Abb. 37, blaue Kurve) lässt sich eine Substanz nach 3,7 Min nachweisen, die ein identisches Spektrum und Laufzeit mit der Referenzsubstanz  $\beta$ -8'-Apocarotinal aufweist (Abb. 37\_2). In den zum Oxim umgesetzten Bakterienpellets ist diese nicht nachweisbar. Diese zeigen zwei Stereoisomere (*syn* und *anti*) mit Absorptionsmaxima nach ca. 10 Min. Die Spektren (Abb. 37\_4) und die Laufzeiten entsprechen der Referenzsubstanz  $\beta$ -8'-Apocarotinal-Oxim (Abb. 37\_4). Nach knapp 7 min ist in den unbehandelten Bakterienpellets eine Substanz nachzuweisen (Abb. 37\_3), die sich anhand des Spektrums als Crocetin erklären ließe, jedoch fehlte eine Referenzsubstanz. Sowohl unbehandelte als auch ins Oxim umgewandelte Bakterien zeigen eine Absorption in der 13. Minute (Abb. 37\_5). Es handelt sich nicht um das vermutete 8'-Apocarotinal, wie die Referenzsubstanz zeigt (Abb. 37\_6).

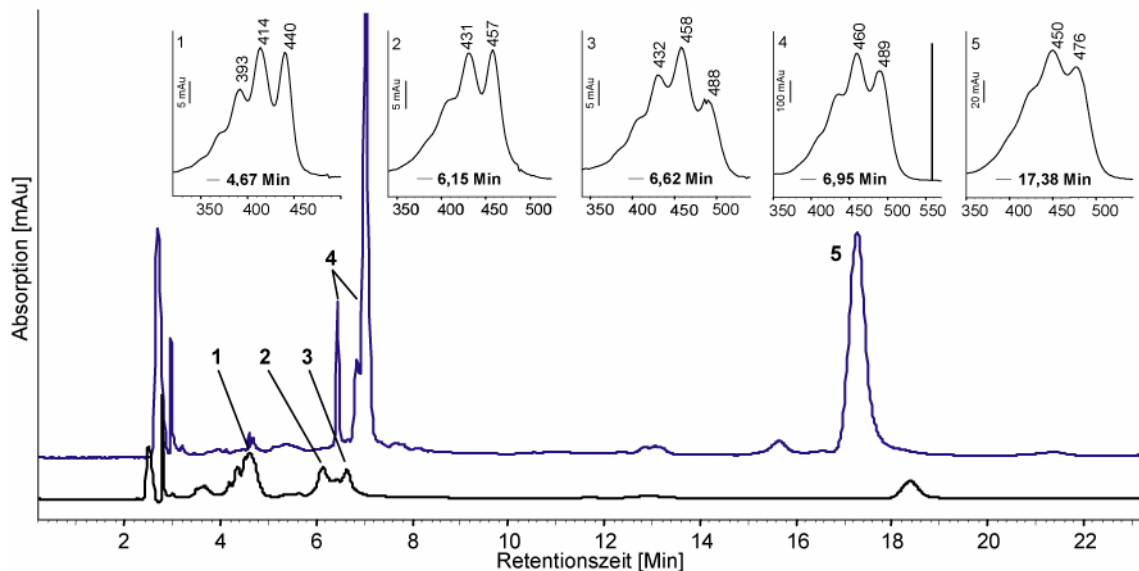


**Abb. 37:** Auftrennung der  $\beta$ -Carotin Spaltprodukte der BCO mittels HPLC: **(A)** Chromatogramm der Carotinoid-Extrakte aus *E. coli* Bakterienpellets. Zur Veranschaulichung sind die Kurven versetzt dargestellt; schwarz = Kontrollbakterien ohne BCO, blau = BCO co-exprimierte Bakterien ohne Oximumsetzung, grün = BCO co-exprimierte Bakterien mit Umsetzung der Aldehyde ins Oxim. **(B)** Spektren der einzelnen Peaks: 1 =  $\beta$ -Carotin, 2 = 8'-Apocarotinal (Referenzsubstanz grün), 3 = potentielles Crocetin, 4 = die zwei Stereoisomere des 8'-Apocarotinal-Oxim (Referenzsubstanz grün), 5 = ein Apocarotinal, 6 = Referenz für 8'-Apocarotinal. X-Achse der Spektren ist Wellenlänge in [nm]. Laufmittel n-Hexan/Ethanol (99,5:0,5) *normal-phase*.

### 4.11.3 Nachweis der Zeaxanthin-Spaltprodukte der BCO mittels HPLC

Analog zur Spaltung des  $\beta$ -Carotins wurde die Enzymaktivität der BCO mit anderen Carotinoiden untersucht. Im Bakterientestsystem mit Zeaxanthin synthetisierenden *E. coli* zeigte sich das breite Wirkspektrum dieses Enzyms. In Abb. 38 sind die Carotinoide der Extrakte aus co-exprimierten (schwarze Kurve) und von Kontrollbakterien (blaue Kurve) durch HPLC (*normal-phase*) aufgetrennt.

Zeaxanthin ist das komplexeste der hier untersuchten Carotinoide und wird schrittweise von Lykopen über  $\beta$ -Carotin,  $\beta$ -Cryptoxanthin zu Zeaxanthin erst zyklisiert und dann schrittweise hydroxyliert. Das Spektrum des  $\beta$ -Carotins (ca. 2,5 Min) ist hier nicht berücksichtigt. Das Absorptionsmaximum bei 450 nm bildet bei den Kontrollbakterien das Cryptoxanthin (Abb. 38\_4; es ist nur das Stereoisomer in anti-Konformation dargestellt). Das Absorptionsmaximum in der 18. Minute repräsentiert das Zeaxanthin (Abb. 38\_5). In den BCO co-exprimierten Bakterien sind nur noch Spuren davon nachweisbar. Bei der Substanz mit der kürzesten Retentionszeit (Abb. 38\_1) handelt es sich wahrscheinlich um Crocetindiol, das innere Kettenstück des Carotinoids. Das Absorptionsmaximum bei 6,15 Min (Abb. 38\_2) zeigt  $\beta$ -8'-Apocarotinal-3-ol. Das Produkt in der 7. Min (Abb. 38\_3) wäre erklärbar, wenn Lykopen einseitig zyklisiert vorliegt und dann durch das Enzym gespalten wird.



**Abb. 38:** Auftrennung der Zeaxanthinspaltprodukte der BCO mittels HPLC: Dargestellt sind die Bakterienextrakte Zeaxanthin synthetisierender *E. coli*s mit BCO Coexpression (schwarze Kurve) und ohne (blaue Kurve). 1 = potentielles Crocetindiol, 2 =  $\beta$ -8'-Apocarotinal-3-ol, 3 = möglicherweise einseitig zyklisiertes Lykopen mit nachfolgender Spaltung, 4 = Cryptoxanthin, 5 = Zeaxanthin. X-Achse der Spektren Wellenlänge [nm], Laufmittel n-Hexan/Ethanol (99,5:0,5) *normal-phase*

## 5 DISKUSSION

Carotinoide und deren Derivate (z.B. Retinoide) erfüllen die unterschiedlichsten Aufgaben in der Tier- und Pflanzenwelt und sind die einzige Quelle für natürlich erzeugtes Vitamin A (zusammengefasst in: UNDERWOOD 2004; VON LINTIG *et al.* 2005). Dieses dient in seiner aktiven Form als Aldehyd (Retinal) zahlreichen visuellen Systemen als Chromophor oder beeinflusst als Säure (Retinsäure) Entwicklungsprozesse in Chordaten (zusammengefasst in BASTIEN und ROCHETTE-EGLY 2004). Man spricht deswegen auch von der dualen Funktion des Vitamin A (CANESTRO *et al.* 2006). Bereits im Jahr 1919 (PALMER 1919) wurde ein Zusammenhang zwischen  $\beta$ -Carotin und Vitamin A vermutet, aber kurz darauf als unwahrscheinlich erklärt (PALMER und KENNEDY 1920). Erst 10 Jahre später erbrachte Moore (1930) den Beweis, dass in Rattenleberextrakten aus „Carotin“ Vitamin A hergestellt wird. Trotz dieser Erkenntnis dauerte es 70 Jahre, bis es zwei unabhängigen Gruppen gelang, das verantwortliche Enzym auf molekularer Ebene nachzuweisen und rekombinant herzustellen (VON LINTIG und VOGT 2000; WYSS *et al.* 2000). In den folgenden Jahren wurden Carotinoxygenasen in Pflanzen, Insekten, Vertebraten und kürzlich auch in Cyanobakterien nachgewiesen (VON LINTIG *et al.* 2005; RUCH *et al.* 2005; AULDRIDGE *et al.* 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals Proteine eines vergleichbaren Stoffwechselwegs in *S. domuncula* als Modell für die Porifera, und damit für eine entwicklungsgeschichtlich sehr alte Gruppe, identifiziert. Die Ergebnisse legen nahe, dass Retinsäure (oder ein analoges Spaltprodukt) auch in „niederen“ Tieren maßgeblich an Entwicklungsprozessen beteiligt ist. Die zugrunde liegenden Enzyme in einem der ältesten, rezent vertretenen Metazoen unterscheiden sich von den bisher identifizierten tierischen Analoga und könnten eine Kombination aus bakteriellem und pflanzlichem Stoffwechselweg darstellen. Über die molekularbiologische Identifizierung der potentiell involvierten Enzyme hinaus erfolgte, speziell für die neuentdeckte  $\beta$ -Carotin-Oxygenase (BCO), eine funktionelle Untersuchung, die über den Spaltungsmechanismus und eine potentielle Regulierung dieses Enzyms Aufschluss gibt.

### 5.1 IDENTIFIZIERUNG DER BEIDEN CAROTINOXYGENASEN BCO UND BCO-II

Mit Hilfe eines degenerierten Primers (2.7.3.1) konnte die Teilsequenz einer potentiellen Carotinoxygenase auf cDNA-Ebene in *S. domuncula* nachgewiesen werden. Anhand dieser Sequenz wurde eine DIG-markierte Sonde (3.3.5) erstellt und damit mehrere positive

Phagenklone im Homologiescreening (3.12) detektiert. Nach Excision (3.13) und Sequenzierung (3.11) stellte sich heraus, dass in *S. domuncula* zwei unterschiedliche Gene mit hoher Sequenzhomologie zur Familie der Carotinoxygenasen, eine Untergruppe der RPE65 Proteinfamilie, existieren. Die Namensgebung letzterer resultiert von einem häufig vorkommenden Protein mit 65 kD Molekulargewicht im **Retinapigmentepithel**, mit erst kürzlich gekläarter Funktion (JIN *et al.* 2005; 1.2.1)

Aufgrund der hohen Homologie des einen Enzyms aus *S. domuncula* zur symmetrisch spaltenden BCO-I anderer Organismen, wurde es anfangs für ein orthologes Enzym gehalten und BCO genannt. Der alternative Klon wurde mit BCO-II bezeichnet. Spätere funktionelle Analysen (4.11) zeigten, dass es sich bei beiden gefundenen Enzymen aus *S. domuncula* um bisher unbekannte Varianten von Carotinoxygenasen in den Metazoa handelt.

### 5.1.1 Sequenzanalyse der $\beta$ -Carotin-Oxygenase (BCO)

Inklusive der untranslatierten Bereiche umfasst das Gen der BCO 1789 bp, wovon 1620 bp zum offenen Leserahmen gehören (Abb. 9). Das Startcodon der BCO ist nicht von der aus Vertebraten bekannten Konsensussequenz GCC A/G CC**ATGG**) für eine optimale Translationsinitiation umgeben (KOZAK, 1991). Die Sequenz der BCO weicht im ersten Triplet davon ab (CTA GCC**ATGG**), beinhaltet aber sowohl die minderwichtige Pyrimidinbase C an Position -1, als auch die überaus wichtige Purinbase G an Position -3 und +4 (Kozak 1991). Diese Basen alleine dürften für eine gesteigerte Translationseffizienz ausreichen, wie für *Drosophila* und einige Pflanzen gezeigt wurde (KOZAK 1987; KOZAK 1991). Da sich die angegebene Konsensussequenz auf Säugerzelllinien beziehen, ist die optimale Konsensussequenz wahrscheinlich speziesabhängig verschieden. Die Konservierung der Basen C und G in der BCO-Sequenz lässt auf eine gesteigerte Translation dieses Gens schließen.

Der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der BCO (Abb. 9) fehlt ein typisches Polyadenylierungssignal (z.B. AATAAA; ZARKOWER *et al.* 1986), ein in Schwämmen häufig beobachtetes Phänomen (PFEIFER *et al.* 1993). Der hohe Anteil der Basen A und T innerhalb der 3'-UTR mit insgesamt 67 %, weist auf ein kurzlebigen mRNA-Transkript hin. Die Halbwertszeit eines mRNA-Transkripts wird durch die Basenzusammensetzung der 3'-UTR bestimmt. In kurzlebigen Transkripten dominieren die Basen A/T, meist in repetitiven Einheiten. BARREAU *et al.* (2005) fassen die Erkenntnisse der letzten 10 Jahre über diese regulativen **AU**-reichen **E**lemente (ARE) der 3'-UTR zusammen und ordnen sie anhand bekannter Erkennungsmerkmale (unabhängig von der Funktion) in drei Gruppen (Tab. 8). Die



Autoren weisen bei ihrer Einteilung ausdrücklich darauf hin, dass die destabilisierenden Eigenschaften nicht alleine auf die bisher bekannten AU-Motive und deren Interaktion mit ARE-Bindeproteinen zurückzuführen sind, sondern noch unbekannte Faktoren eine Rolle spielen. Weiterhin existiert für keine der drei Gruppen eine einheitliche Konsensussequenz.

**Tab. 8** AU-reiche Elemente (ARE) der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) bestimmen die Halbwertszeit von mRNA-Transkripten. Klassifizierung nach Barreau *et al.* (2005).

Klassifizierung	Spezifische Merkmale
<b>Typ I ARE</b>	Kennzeichen dieser Gruppe ist das Sequenzelement [AUUUA], welches meist in mehreren Kopien innerhalb der AU-reichen 3'-UTR vorliegt. Sie sind Hauptelemente der mRNA von Transkriptionsfaktoren und Proteinen, die an zellregulatorischen Prozessen beteiligt sind.
<b>Typ II ARE</b>	Besitzen mindestens zwei überlappende [UUAUUUA(U/A)(U/A)] Nonamere innerhalb der 3'-UTR. Viele Cytokine enthalten diese Erkennungssequenz.
<b>Typ III ARE</b>	Eine Zuordnung ist schwierig, da sie keine einheitliche Konsensussequenz aufweisen. Die 3'-UTR ist reich an AU, besitzt aber kein [AUUUA]-Motiv. Oft enthalten sie repetitive AU-Pentamere. Einige Transkriptionsfaktoren und zellregulatorische Proteine gehören zu dieser Klasse.

Anhand der von Barreau *et al.* (2005) vorgenommenen Typisierung lässt sich die BCO am ehesten den Typ III ARE zuordnen. Die Sequenz enthält drei Kopien eines Thyminpentamers (Abb. 9) aber keine bekannte Konsensussequenz die charakteristisch für eine der anderen Gruppen ist. Weiterhin folgen dem ersten Thyminpentamer zwei [GT]-Hexamere, die durch ein einzelnes Thymin voneinander getrennt sind. Einerseits könnte es sich um zwei Elemente handeln, die evtl. mit den ARE-Bindeproteinen interagieren und so über das Schicksal der mRNA entscheiden. Andererseits könnte es sich um einen Sequenzabschnitt handeln, der durch Inversion an besagtem Thymin entstanden ist. Die tatsächliche Funktion dieser Oligonukleotidstruktur und der gefundenen ARE lässt sich nur durch die Identifizierung der entsprechenden Bindeproteine aus *S. domuncula* be- oder widerlegen. Eine zufällige Anordnung kann ausgeschlossen werden.

### 5.1.2 Sequenzanalyse der alternativen Carotinoxigenase (BCO-II)

Die Sequenzanalyse der BCO-II lässt weniger Rückschlüsse auf mögliche posttranskriptionale Prozesse zu. Die Gesamtlänge des Gens beträgt 1766 bp, wovon 1599 bp eine kodierende Funktion übernehmen. Das Startcodon ist nicht von Basen flankiert, die eine gesteigerte Translationseffizienz ermöglichen (Abb. 12). Eine Regulierung erfolgt wahrscheinlich auf transkriptionaler Ebene oder als posttranslationale Modifikation des resultierenden Proteins.

Die 3'-UTR besitzt einen außergewöhnlich hohen Gehalt der Basen A und T (insgesamt 70 %). Dies spricht für ein kurzlebigen Transkript mit Typ III AREs (Tab. 8), da keine Motive der anderen Gruppen zu erkennen sind. Im Gegensatz zur BCO lassen sich keine eindeutigen

Muster repetitiver Sequenzabschnitte in diesem Bereich erkennen. Zwar findet man Triplettwiederholungen, diese geben aber in dieser Form keinen Aufschluss über die Halbwertszeit der mRNA. Ob allein ein hoher A/T-Gehalt einen schnellen Abbau des mRNA-Transkripts ermöglicht, könnte in einem Substitutionsversuch der 3'-UTR eines bekannten kurzlebigen Transkripts (mit klassischen ARE) durch die der BCO-II untersucht werden. Ist die Halbwertszeit des Akzeptortranskripts signifikant kürzer als ohne ARE, wäre der Beweis für solche Elemente für die BCO-II ebenfalls erbracht. Wünschenswert wäre eine solche Charakterisierung zur Überprüfung, in wieweit die Kategorien der ARE auf Porifera zutreffen.

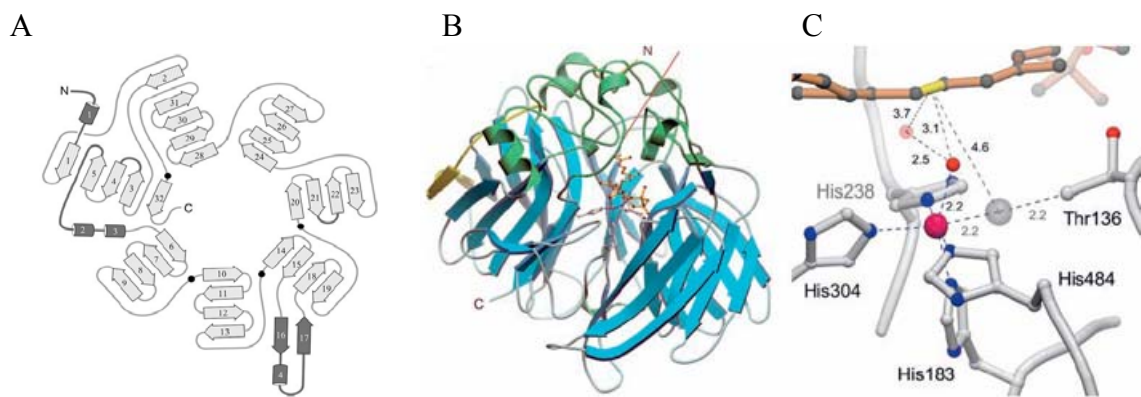
Das typische Polyadenylierungssignal der Vertebraten lautet [AATAAA] und im Mensch enthalten 90 % aller mRNAs diese Erkennungssequenz (ZHAO *et al.* 1999; BEAUDOING *et al.* 2000; GILMARTIN 2005). Zusätzlich existieren einige wenige alternative Nukleotidhexamere (z.B. AATAAG), die ebenfalls eine Adenylierung der mRNA veranlassen (BEAUDOING *et al.* 2000). Ein solches Hexamer ist in der 3'-UTR der BCO-II (Nt<sub>1700-06</sub>) enthalten. Inwiefern sich die bekannten Motive auf die Porifera projizieren lassen ist unklar, da sie sich stark zwischen den einzelnen Reichen unterscheiden (ZHAO *et al.* 1999). Während in höheren Eukaryoten das Polyadenylierungssignal weitestgehend konserviert vorliegt, ist es in Hefen komplex aufgebaut und schwach konserviert. In Pflanzen ist bislang nur wenig über solche Motive bekannt. ZHAO *et al.* (1999) beschreiben detailliert die unterschiedlichen Vorgänge der prä-mRNA Prozessierung, inklusive der dazugehörigen Enzymmaschinerie (kurz zusammengestellt in GILMARTIN 2005). Da vielen Schwammsequenzen ein typisches, eukaryotisches Polyadenylierungssignal fehlt (PFEIFER *et al.* 1993), bieten sich prä-mRNA-Studien zur Untersuchung der 3'-mRNA-Modifizierung in diesem Phylum an.

### **5.1.3 Proteinbiochemische Untersuchung der $\beta$ -Carotinoxigenase (BCO)**

#### **5.1.3.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz**

Aufgrund der abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde die BCO aus *S. domuncula* zu Beginn der Arbeit, aufgrund der höchsten Übereinstimmung der Aminosäurezusammensetzung zur Maus BCO-I, ebenfalls für eine symmetrisch spaltende Carotinoxigenase gehalten. Erst spätere biochemische Analysen zeigten, dass es sich um eine asymmetrisch spaltende Variante handelt (4.11.2). Die Primärstruktur reflektiert die hochkonservierten Aminosäurebereiche, wie sie allen Carotinoxigenasen zueigen ist (Abb. 11). Bislang existiert keine Kristallstruktur von Carotinoxigenasen. Eine genaue strukturelle Einschätzung

der Funktionsweise ist daher nicht möglich. Dennoch; die sechs konservierten Histidinreste, denen von vielen Autoren eine Beteiligung an der Koordinierung des Eisenkofaktors zugesprochen wird (z.B. KIEFER *et al.* 2001), sind mit Sternchen innerhalb der ausgerichteten Aminosäuresequenz gekennzeichnet (Abb. 11). Seit kurzem liegt jedoch die Röntgenstruktur einer Apocarotinoidoxxygenase (ACO) aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 vor, die C<sub>25</sub>- bis C<sub>35</sub>-Apocarotinoide spaltet (KLÖR und SCHULZ 2006; Abb. 39). Nach dieser sind an der Fe<sup>2+</sup>-Koordinierung lediglich vier Histidinreste beteiligt (Abb. 13), wohingegen die fünfte Koordinierungsstelle durch ein Wassermolekül fixiert wird und die sechste unbesetzt bleibt. Wären bereits alle sechs Koordinierungsstellen von Histidinresten blockiert, könnte das einzelne Fe<sup>2+</sup> im Reaktionszentrum nicht ohne Konformationsänderung des Proteins an einer Reaktion teilnehmen. Die vier Histidinreste werden ihrerseits in der Tertiärstruktur des Proteins durch drei konservierte Glutamatreste innerhalb der Aminosäuresequenz fixiert (Abb. 13) und verleihen dem Molekül eine Steifheit, wodurch es seine Form auch ohne Cofaktor (Fe<sup>2+</sup>) beibehält (KLÖR und SCHULZ 2006). Obwohl es sich beim untersuchten Protein von KLÖR und SCHULZ um eine Apocarotinoideoxygenase handelt, postulieren sie diesen Grundaufbau für alle bekannten Carotinoxygenasen. Deren Kennzeichnung der Histidin- und Glutamatreste ist im Alignment der BCO-II wiedergegeben (Abb. 13).



**Abb. 39:** Struktur der Apocarotinoideoxygenase aus *Synechocystis sp.* PCC 6803. (A) Schematische Darstellung der 7 blättrigen Propellerstruktur die als Grundmotiv aller Carotinoideoxygenasen postuliert wird. Die Positionen der vier konservierten Histidinreste zur Eisenkoordinierung sind mit Punkten markiert, die vier Bereiche und der N-Terminus die zur Ausbildung der domartigen Struktur der Substratbindestelle beitragen, sind dunkelgrau schattiert. (B) Fadenmodell des Enzyms mit den blau eingefärbten  $\beta$ -Faltblättern des Propellers, die grün dargestellten Reste der Domstruktur oberhalb des aktiven Zentrums und die N-terminale Erweiterung in gelb. Die vier koordinierenden Histidinreste und die zwei Wassermoleküle sind im Kugel-Stäbchen-Modell und der Tunnelausgang als rote Linie dargestellt. (C) Aktives Zentrum mit Substratbindegeometrie. Das Apocarotinooidssubstrat ist orange eingefärbt mit seiner schneidbaren 15,15'-Doppelbindung (gelb). Die grau eingefärbte Sphäre steht für die unbesetzte Eisenkoordinierungsstelle und die transparent rote für das zweite Wassermolekül. Einige Distanzen sind in Angström [ $\text{\AA}$ ] angegeben. **Nach KLÖR und SCHULZ (2006).**

Aufgrund der hohen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen innerhalb dieser Proteinfamilie erklären sich die einheitlich physikochemischen Eigenschaften, wie sie auch

für die BCO beobachtet wurden (5.1.3.2). Es handelt sich um lösliche Enzyme mit leicht alkalinem pH-Optimum, deren Aktivität auf molekularem Sauerstoff beruht (zusammengefasst in LINTIG *et al.* 2005). Die Beteiligung des Eisen-Cofaktors konnte durch chelatierende Agenzien und sulfhydrylbindende Komponenten bewiesen werden (LEUENBERGER *et al.* 2001). Ob die Spaltung einer Mono- oder Dioxygenasereaktion entspricht (Abb. 41), ist nach wie vor ungeklärt und wird in 5.1.3.3 näher diskutiert.

### 5.1.3.2 Untersuchung der Enzymaktivität

Der Nachweis der Enzymaktivität der BCO erwies sich als Herausforderung. Obwohl sich das Enzym unter nativen Bedingungen aufreinigen ließ, verlor es dadurch weitgehend seine Aktivität. Trotz Bereitstellung von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen und schützendem Antioxidationsmittel im verwendeten Puffersystem (3.25.3), gelang es nicht, in einem Inkubationsansatz mit dem Substrat  $\beta$ -Carotin reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Zwar war photometrisch eine geringfügige Abnahme der Carotinkonzentration zu erkennen (nicht gezeigt), diese ließ sich aber nicht eindeutig auf die Enzymaktivität zurückführen, da ein oxidativer Zerfall des  $\beta$ -Carotins während der Inkubation nicht ausgeschlossen werden konnte. Eine weitere Schwierigkeit stellte die Unlöslichkeit des Substrates in Wasser dar. Trotz Applizierung des  $\beta$ -Carotins in wasserlöslichen Micellen (3.25.3.2) und Umwälzen des Mediums, konzentrierten sich diese innerhalb weniger Minuten an der Oberfläche.

Um diese Problematik zu umgehen, wurde auf das von der Arbeitsgruppe von Lintig (Universität Freiburg) entwickelte *E. coli* Bakterientestsystem zurückgegriffen. Diese Bakterien sind in der Lage, Carotinoide *de novo* zu synthetisieren und zu akkumulieren (VON LINTIG und VOGT 2000). Durch Co-Expression der BCO in diesen Zellen werden die Carotinoide am Ort ihrer Entstehung direkt gespalten. Mit Hilfe dieses Testsystems konnte die Spaltung der Carotinoide  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin und Lycopin bestätigt werden (Abb. 35). Damit stellt die Carotinoxigenase aus dem Schwamm eine Besonderheit dar, da sie sowohl acyclische- (Lycopin), cyclische- ( $\beta$ -Carotin) als auch hydroxylierte- (Zeaxanthin) Carotinoide (Xanthophylle genannt) spaltet. Die vollständige Entfärbung der Bakterienpellets bei längerer Induktionsdauer (Abb. 35) unterstützte dabei die anfängliche Vermutung, dass es sich um ein orthologes Enzym einer symmetrisch spaltenden Carotinoxigenase (BCO-I) handelt. Durch die zentrale Spaltung (an C15,15') entstehen zwei Moleküle Retinal (Abb. 1), welches nahezu farblos ist. Wie sich in einer späteren Untersuchung der Spaltprodukte zeigte (Abb. 37), ist das Enzym aus *S. domuncula* in der Lage, das bei der Primärsplaltung entstehende Apocarotinoid, erneut zu spalten, wodurch sich die Bakterien ebenfalls entfärben.

Demzufolge unterscheidet es sich von den tierischen, asymmetrisch spaltenden Carotinoxygenasen (CCD, carotenoid cleavage dioxygenases), die eine höhere Substratspezifität aufweisen und nicht in der Lage sind, Apocarotinoide erneut zu spalten (z.B. KIEFER *et al.* 2001). Für einige pflanzlichen CCDs wurde dies aber berichtet (zusammengefasst in AULDRIDGE *et al.* 2006).

Die Substratspezifität wird durch die domartige Struktur oberhalb des aktiven Zentrums des Enzyms definiert (Abb. 39). Durch Varianz der Länge und Aminosäurezusammensetzung der die Porpellerblätter verbindenden Schleifen kann diese verändert werden (KLÖR und SCHULZ 2006). Das BCO-Protein ist deutlich kürzer als verwandte Enzyme und weist mehrere Fehlstellen im Alignment auf (Abb. 11). Vermutlich ermöglicht dies einem breiteren Substratspektrum den Zugang zum aktiven Zentrum.

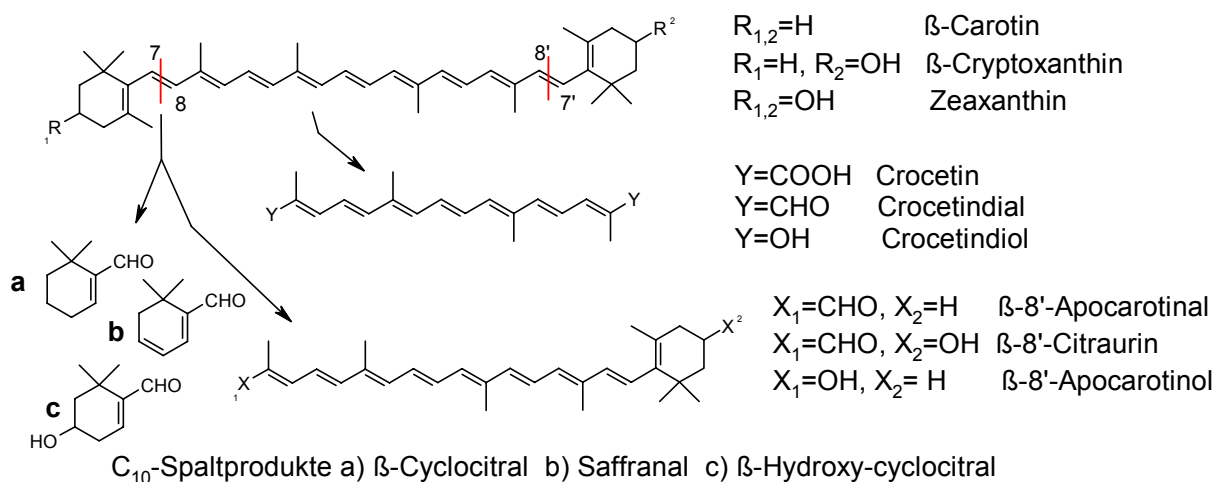
### 5.1.3.3 Das Enzym BCO aus *S. domuncula* ist eine 7,8(7',8')-Carotinoxygenase

Nachdem eine Entfärbung der carotinoid-akkumulierenden Bakterien visuell (Abb. 35) bzw. photometrisch (Abb. 36) zu erkennen war, wurde sichergestellt, dass dies auf einer enzymatischen Spaltung der Carotinoide beruht und nicht auf eine Reprimierung der Carotinoidsynthese durch die Co-Expression der BCO in den Testbakterien zurückgeht. Mit Hilfe der HPLC wurden die entstehenden Carotinoid-Spaltprodukte identifiziert (4.11; Abb. 37). Sie charakterisieren die BCO aus *S. domuncula* eindeutig als 7,8(7',8')-Carotinoxygenase. Damit ist es das einzige in Tieren identifizierte Enzym dieser Art und findet sich nur in einem einzigen pflanzlichen Ortholog wieder, der Zeaxanthin spaltenden Oxygenase aus *Crocus sativus* (BOUVIER *et al.* 2003).

Das Spaltprodukt Crocetin (C<sub>20</sub>; Abb. 40) ließ sich in allen Ansätzen, unabhängig vom Carotinoidsubstrat, nachweisen. Es ist das innere, identische Kettenstück der untersuchten C<sub>40</sub>-Carotinoide und entsteht durch Spaltung der Substrate an Position 7,8 und 7',8' (Abb. 40.). Dabei spaltet die Schwamm-BCO die entsprechenden Carotinoide sukzessiv, was durch den Nachweis der jeweiligen 8'-Apocarotinalen (bedeutet einseitige Spaltung an C7',8') in den Bakterienextrakten (z.B. β-8'-Apocarotinal für β-Carotin; Abb. 37) demonstriert wurde.

Es ist unwahrscheinlich, dass unter physiologischen Bedingungen im Schwamm die primären Spaltprodukte akkumulieren. Daher wird das Vorkommen von Crocetin in *S. domuncula*. in frage gestellt. Im Pigmentextrakt (Abb. 30) mehrerer adulter Individuen war diese Substanz (bzw. Crocetindial, -diol) nicht nachweisbar. Ähnliches gilt bei kurzer Expressionsdauer der BCO in einem streng regulierten Vektor. Im Vergleich zu den 8'-Apocarotinalen ließ sich nur

eine geringe Menge an Crocetin nachweisen (Abb. 37). Dies spricht für eine eindeutige Substratpräferenz des Enzyms für Carotinoide. Die Bakterien entfärbten sich dabei nicht. Erst mit zunehmender Apocarotinoidkonzentration werden diese ein zweites Mal von der BCO gespalten. Entscheidend für eine evtl. Doppelspaltung ist die Verfügbarkeit der Carotinoide/Apocarotinoide für das Enzym. Da es sich bei der BCO um ein wasserlösliches, cytosolisches Enzym handelt, stehen bislang noch keine Erkenntnisse über die Enzym-Substrat-Interaktion zur Verfügung. Hinsichtlich der BCO-II werden einige Möglichkeiten hierfür diskutiert (5.1.4).



**Abb. 40:** Einige Edukte und Produkte der 7,8(7',8')-Carotinoxygenase aus *S. domuncula*. Stellvertretend für  $C_{40}$ -Carotinoide wurden die Spaltprodukte von  $\beta$ -Carotin,  $\beta$ -Cryptoxanthin und Zeaxanthin ausgewählt. Bei einseitiger Spaltung entsteht jeweils ein Molekül des 8'-Apocarotinoids und des komplettierenden  $C_{10}$ -Spaltprodukts. Bei doppelter Spaltung erhält man das innere Kettenstück, das für viele  $C_{40}$ -Carotinoide identisch ist. Es kann als Di-Carbonsäure, Di-al oder Di-ol vorliegen.

Die Identität der resultierenden Apocarotinale wurde durch die entsprechenden Referenzsubstanzen im HPLC-Lauf bestätigt (Abb. 37) und zusätzlich durch deren Umsetzbarkeit in die entsprechenden Oxime abgesichert (Abb. 37; Spektrum 4). Das zusätzlich auftretende Produkt bei der  $\beta$ -Carotinspaltung (Spektrum 5; Abb. 37) konnte nicht eindeutig zugeordnet werden. Da es sich nicht ins Oxim umsetzen ließ, wurde vermutet, dass es sich um den Alkohol  $\beta$ -8'-Apocarotinol handelt. Der Lauf der Referenzsubstanz (Spektrum 6, Abb. 37) widerlegte dies. Aufgrund der Spaltung im eingesetzten Bakterien-Testsystem haben die Bakterien evtl. das entstehende 8'-Apocarotinol modifiziert und eine Doppelbindung aufgebrochen. Dies wurde schon mehrfach in diesen Bakterien beobachtet (mündliche Mitteilung von PD. Johannes von Lintig, Universität Freiburg). Durch Wegfall einer der konjugierten Doppelbindungen innerhalb der Polyenkette ließe sich das Spektrum 5 in Abb. 37 erklären. Eine massenspektroskopische Untersuchung (optional NMR) bietet sich

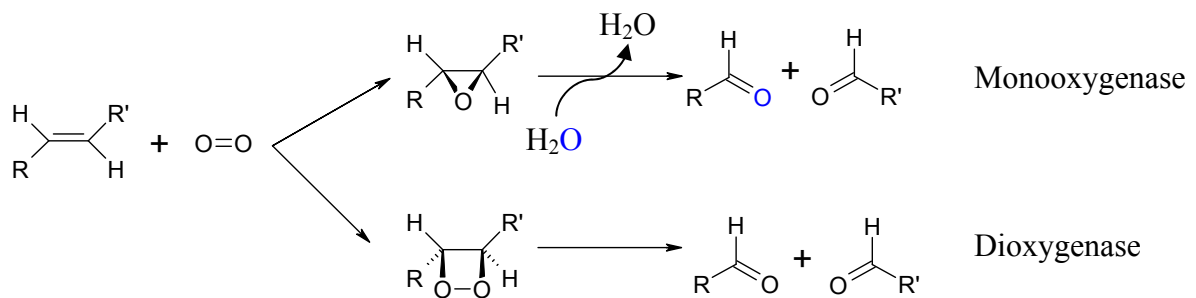
für die genauere Charakterisierung an. Modifikationen durch Stoffwechselfvorgänge im Bakterientestsystem können im *in vitro*-Testsystem (3.25.3; VON LINTIG und VOGT 2000) ausgeschlossen werden. Dafür wurden BCO-überexprimierende *E. coli* Bakterien aufgeschlossenen und mit der Reinsubstanz  $\beta$ -Carotin inkubiert (3.25.3). Im Gegensatz zu den mit diesem System erfolgreich getesteten CCDs (VON LINTIG und VOGT 2000) waren mit der BCO aus *S. domuncula* keine enzymbedingten Spaltprodukte zu erkennen (Appendix 4). Die zusätzlichen Peaks im Vergleich zum Kontrollchromatogramm resultieren nicht aus der Enzymaktivität und sind wahrscheinlich Folge oxidativer Prozesse während der Inkubation.

Am eindrucksvollsten ließ sich die Substratvielfalt der BCO anhand der Zeaxanthin-akkumulierenden Bakterien demonstrieren. Die Synthese des Zeaxanthins erfolgt über mehrere Zwischenstufen, die ebenfalls von der BCO gespalten werden können. So ist in Abb. 38 in den Kontrollbakterien eine hohe Konzentration an  $\beta$ -Cryptoxanthin (einseitig hydroxyliertes  $\beta$ -Carotin) zu erkennen, welches durch die Expression der Carotinoxygenase in diesen Zellen verschwindet. In Appendix 1 sind die Spaltprodukte der BCO-I aus dem Menschen, der BCO aus *S. domuncula* gegenübergestellt. Die Spezialisierung des Enzyms auf ein Substrat im Lauf der Evolution lässt sich so klar erkennen. Auch phylogenetisch betrachtet sind die Enzyme sehr unterschiedlich (Abb. 29). So ist zwar eine nähere Verwandtschaft der *S. domuncula* BCO zu den symmetrischen BCO-I anderer Organismen zu erkennen, doch unterscheidet sie sich in der Funktion die einzigartig in der Tierwelt ist. Die anderen Enzyme sind dagegen anhand ihrer Funktion und Herkunft abseits zu gruppieren (symmetrisch vs. asymmetrisch in Pflanzen, Tieren, Insekten und Bakterien; Abb. 29).

Zusätzlich zu den 8'-Apocarotalen entstehen bei der Spaltung der verschiedenen Carotinoide die kurzketigen  $C_{10}$ -Spaltprodukte (Abb. 40). Diese flüchtigen Substanzen akkumulierten nicht in den Bakterien und waren mit dem verwendeten HPLC-System nicht nachweisbar.  $\beta$ -Cyclocitral (Abb. 40) entsteht bei der Spaltung von  $\beta$ -Carotin und findet sich z.B. als Duft- und Aromastoff in Zitrusfrüchten (z.B. AULDRIDGE *et al.* 2006). Es trug zum fruchtigen Geruch der Bakterienkultur bei. In Lycopin akkumulierenden und BCO-exprimierenden *E. colis* war das Aroma am intensivsten (hier entsteht das acyclische Citral), während es in Zeaxanthin akkumulierenden Zellen am schwächsten ausgeprägt war (es bildet sich  $\beta$ -Hydroxy-Cyclocitral).

Der zugrunde liegende Spaltmechanismus der BCO dürfte, wie ursprünglich für alle Carotinoxygenasen vermutet, einer Dioxygenasereaktion entsprechen (Abb. 41). LEUENBERGER *et al.* (2001) und WOGGON (2002) widerlegten zwar diesen Reaktionsmechanismus, indem sie durch Isotopenmarkierung ( $H_2^{18}O$  und  $^{17}O_2$ ) bewiesen,

dass sowohl ein molekulares-, als auch ein aus dem Wasser stammendes Sauerstoffatom in den Spaltprodukten nachweisbar war. Neuste Studien hingegen beweisen anhand der Carotinoxygenase aus *Arabidopsis thaliana*, die Dioxygenasereaktion (SCHMIDT *et al.* 2006). Sie nutzt als einzige Quelle molekularen Sauerstoff. Sie zeigen weiterhin, dass es mit fortschreitender Versuchsdauer zu einem Austausch von Sauerstoffatomen zwischen den Spaltprodukten und dem wässrigen Medium kommt; eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Beobachtungen von LEUENBERGER *et al.* (2001) und WOGGON (2002). Beide Reaktionsmechanismen sind in Abb. 41 gegenübergestellt.



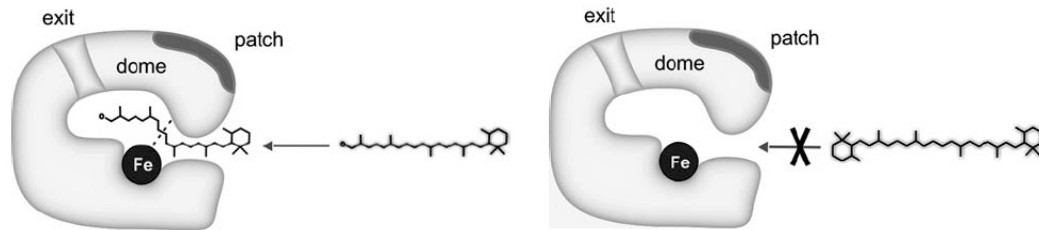
**Abb. 41:** Kontrovers diskutiert Spaltmechanismen der Carotinoxygenasen. Die Beteiligung des Fe<sup>2+</sup>-Cofaktors ist hier nicht berücksichtigt. In der Monooxygenasereaktion erfolgt die Spaltung über eine Epoxid-Zwischenform, wobei das Eisen das zweite Sauerstoffatom übernimmt und anschließend auf das Wassermolekül überträgt. In der Dioxygenasereaktion werden beide Sauerstoffatome verwendet und die Spaltung erfolgt über eine Dioxethan-Zwischenstufe.

#### 5.1.4 Untersuchung der alternativen Carotinoxygenase (BCO-II)

Die hier vorgestellte Carotinoxygenase BCO-II aus *S. domuncula* besitzt nur eine verhältnismäßig geringe Homologie zu den bekannten Carotinoxygenasen (30 % ähnlicher AS, davon 15 % identische; 4.2.2). Deutlich höher ist die durchschnittliche Übereinstimmung der Aminosäurezusammensetzung mit den bakteriellen Lignostilben-dioxygenasen (48 % ähnlicher AS, davon 29 % identische; Abb. 13). Da Lignin kein Bestandteil von *S. domuncula* ist, wurde dem Enzym, aufgrund der Homologie zu den Carotinoxygenasen, eine Beteiligung am Carotinoidstoffwechsel zugesprochen. Neuste Studien (RUCH *et al.* 2005 und KLÖR und SCHULZ 2006) belegen, dass dies auch für einige homologe bakterielle Enzyme gilt, die fälschlicherweise in den Genomdatenbanken als Lignostilben-α,β-dioxygenasen (LSD) geführt werden. Der LSD aus *Synechocystis sp.* PCC 6803 z.B. fehlt die Fähigkeit Lignin in Vanillin zu spalten, doch ist dieses Enzym in der Lage Retinal aus verschiedenen Apocarotinoiden (C<sub>35</sub>-C<sub>27</sub>), durch Spaltung an der C15,15'-Doppelbindung, herzustellen (RUCH *et al.* 2005). KLÖR und SCHULZ (2006) gelang zusätzlich die Aufklärung der 3D-Struktur dieses Proteins, welche die Substratspezifität erklärt (Abb. 39). Im Gegensatz zu den



Carotinoxygenasen führt bei den Apocarotinoxygenasen (ACO) ein „Tunnel“ zum Reaktionszentrum, der nicht von den Ringstrukturen der Carotinoide durchdrungen werden kann (Abb. 42)



**Abb. 42:** Schematische Darstellung der Apocarotinoxygenase (ACO). Gezeigt sind der Tunneleingang, der Knick zum aktiven Zentrum und der Ausgang (*exit*). Die domartige Struktur (*dome*) oberhalb des aktiven Zentrums mit dem unpolaren Fleck (*patch*; s. u.) sind markiert. **Links:** Apocarotinoide mit nur einer Ringstruktur können in den Tunnel eindringen, wobei der Abstand zwischen dem katalytischen Eisen (Fe) und dem Eingang die Spaltposition bestimmt. **Rechts:** Substrate mit Ringstrukturen an beiden Enden können nicht in den Tunnel eindringen und werden deswegen nicht gespalten. **Aus KLÖR und SCHULZ (2006).**

Diese neuen Erkenntnisse liefern eine mögliche Erklärung, warum für die BCO-II aus *S. domuncula* keine Spaltung von Carotinoiden beobachtet wurde. Weder zeigte sich eine Entfärbung der Bakterienpellets (Abb. 35), noch waren in den Extrakten aus dem Bakterien-Testsystem mittels HPLC Spaltprodukte erkennbar. In der Überzeugung, dass es sich um eine Carotinoxygenase handelt, wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Inkubationsversuche mit Apocarotinoiden oder Co-expressionsstudien mit beiden Enzymen (BCO und BCO-II) im Bakterien-Testsystem unternommen. Stellen diese Enzyme, wie hiermit postuliert, eine Kaskade dar, in welcher erst die BCO das Carotinoid und dann die BCO-II das resultierende Apocarotinoid spaltet, wird eine Akkumulierung verhindert und es kommt zu keiner erneuten Spaltung durch die BCO. Das setzt natürlich voraus, dass die Umsatzrate der BCO-II größer als die der BCO ist.

Gäbe es in *S. domuncula* nur die asymmetrische Carotinoxygenase (BCO), müsste das resultierende C<sub>30</sub>-Apocarotinoid zunächst verkürzt werden, um seine aktive Form (z.B. C<sub>15</sub>-Retinoide) zu erreichen. Der zugrunde liegende Mechanismus ähnelt der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und ist bereits mehrfach – nach Spaltung von Carotinoiden durch verwandte asymmetrische Carotinoxygenasen – beschrieben worden (z.B. KIEFER *et al.* 2000). Die Polyenkeette wird dabei schrittweise um zwei Kohlenstoffatome verkürzt. Auf diesem Weg entsteht das aktive Retinoid (als Säure) direkt und bedarf keiner weiteren Modifikation. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das aktive Retinoid im Schwamm auf diese Weise (erst Spaltung, dann sukzessive Kürzung) synthetisiert wird. Hinsichtlich der Homologie der BCO-II Sequenz zu den Apocarotinoxygenasen wird jedoch eine erneute Spaltung durch

dieses Enzym vermutet und momentan untersucht. Weiterhin würde diese erneute Spaltung die Anzahl der Kohlenstoffatome ( $C_{15-20}$ ) des potentiellen Signalmoleküls, oder dessen Precursor, von *S. domuncula* enthüllen. In *Arabidopsis thaliana* z.B. wurde eine ähnliche Enzymkaskade entdeckt, die ein neues, unbekanntes Apocarotinoidhormon ( $C_{18}$ ) produziert (AULDRIDGE *et al.* 2006). Dabei wird ein Carotinoid zunächst von einer Carotinoxygenase (*carotene cleaving dioxygenase*; CCD7) in ein  $C_{27}$ -Apocarotinoid gespalten, welches von einer weiteren (CCD8) zu einem  $C_{18}$ -Apocarotinoid umgesetzt wird (SCHWARTZ *et al.* 2004). Allerdings handelt es sich bei CCD8 nicht ausschließlich um eine Apocarotinoidoxygenase, denn es wurde gezeigt, dass sie auch Carotinoide direkt spalten kann (AULDRIDGE *et al.* 2006a).

Somit wäre die BCO-II aus *S. domuncula* die dritte bisher bekannte Apocarotinoidoxygenase. Die Spaltung von Apocarotinoiden durch dieses Enzym wird derzeit in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Lintig (Universität Freiburg) untersucht. Obwohl bislang keine experimentellen Daten mit Apocarotinoiden für die BCO-II vorliegen, ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesem Enzym um eine ACO handelt. Die Aminosäuresequenz (Abb. 13) enthält sowohl die konservierten Histidin- als auch Glutamatreste, die zu den Grundelementen dieser Enzymfamilie gehören (KLÖR und SCHULZ 2006). Lykopen, als acyclisches Carotinoid, könnte von der Struktur her gesehen ins aktive Zentrum der ACOs eindringen, doch waren keine Spaltprodukte durch die BCO-II nachweisbar. RUCH *et al.* (2005) analysierten die Spaltaktivität der ACO aus *Synechocystis specialis* PCC 6803 u.a. im selben Bakterientestsystem. Auch diesem Enzym mangelte es an der Fähigkeit Lykopen zu spalten. KLÖR und SCHULZ (2006) bestätigen zudem, dass nur Apocarotinoide (inklusive der acyclischen) bis zu einer Länge von 35 Kohlenstoffatomen von diesem Enzym gespalten werden.

Da für alle (Apo-)Carotinoxygenasen eine einheitliche Grundstruktur angenommen wird (Abb. 39), entscheidet die domartige Struktur oberhalb des aktiven Zentrums über die Substratspezifität und trennt die ACOs (formt einen Tunnel) von den CCDs (bildet eine Kluft). Gemeinsam ist ihnen aber ein unpolarer Fleck (*patch*; Abb. 42), der maßgeblich über die Enzym-Substrat-Interaktion entscheiden soll (KLÖR und SCHULZ 2006). Genaues darüber ist bislang unbekannt, doch wird vermutet, dass die Carotinoxygenasen (als lösliche Proteine ohne Membrananker) ihr Substrat durch Andocken an die Membran (mit dem unpolaren Fleck) empfangen (KLÖR und SCHULZ 2006). Nach dessen Spaltung entlassen sie das kurzkettige, polare Apocarotinoid durch den Ausgang (*exit*; Abb. 42) ins Cytosol und geben das längerkettige, apolarere Apocarotinoid evtl. durch den Eingang zurück an die Membran (Abb. 42). Dieser Mechanismus bestimmt über die Verfügbarkeit des Substrats und

entscheidet letztendlich darüber, ob im Schwamm eine einfache oder doppelte Spaltung durch die BCO erfolgt. Jedenfalls dürfte das C<sub>10</sub>-Spaltprodukt über den Ausgang ins Cytosol der Zelle abgegeben werden.

### 5.1.5 Identifikation der Schwammcarotinoide als mögliche Enzysubstrate

Die Färbung von *S. domuncula* von nahezu weiß über intensiv rot bis hin zu blau legte die Vermutung nahe, dass es sich bei den Pigmenten um Carotinoide handelt. Ein erster Hinweis darauf war die vollständige Entfärbung der Individuen nach Zugabe von Aceton. Die resultierenden Farbextrakte wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) näher untersucht. Alle Extrakte trennten sich in multiplen Banden auf den DC-Platten auf, die zum Teil identische Laufweiten mit den aufgetragenen Referenzsubstanzen zeigten (Tab. 6). In der HPLC konnten bis auf  $\beta$ - und  $\alpha$ -Carotin (Abb. 31, Abb. 32) keine Pigmente eindeutig identifiziert werden. Überraschend dagegen war die hohe Anzahl verschiedener Carotinoide in den Acetonextrakten, deren Zusammensetzung sich zwischen den untersuchten Schwammfarben unterschied. Mangels Referenzsubstanzen konnten diese nicht identifiziert werden. Der Lauf der linearen *reversed-phase* HPLC zeigt diese Vielfalt eindrucksvoll (Abb. 30). Darin war ebenfalls zu erkennen, dass der blaue Schwamm unter anderem polare Carotinoide besitzt, die den anderen Schwammfarben fehlen. Durch die Verseifung der Acetonextrakte konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Carotinoide verestert vorliegt (Appendix 3), einer möglichen Speicherform dieser Substanzen wie sie in vielen Organismen zu finden ist. Ein Großteil der polaren Carotinoide aus dem blauen Exemplar ist nach Verseifung mittels HPLC nicht mehr nachweisbar. Es wird vermutet, dass diese alkali-instabil sind und nicht als Ester vorliegen, da keine entsprechende Absorptionsverschiebung im Chromatogramm zu erkennen waren (Appendix 2).

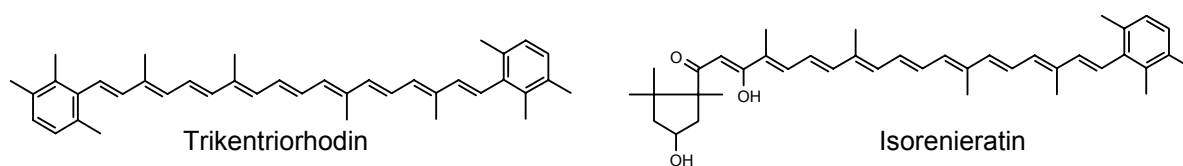
Unabhängig von der Färbung zählen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carotin zu den Hauptbestandteilen der Schwammcarotinoide. Um den Carotinoidgehalt der Schwämme mit anderen natürlichen Quellen vergleichen zu können, wurde der  $\beta$ -Carotingehalt quantifiziert (Tab. 9). Für das rote Exemplar offenbarte sich ein fast 400 fach höherer  $\beta$ -Carotingehalt wie er in Karotten zu finden ist (vgl. KRINSKY und JOHNSON 2005).

**Tab. 9:** Vergleich des  $\beta$ -Carotingehalts zwischen verschiedenen gefärbten *S. domuncula* und ausgewählten pflanzlichen Nahrungsprodukten (aus KRINSKY und JOHNSON 2005).

Nahrungsmittel	Gehalt mg/g Frischgewicht*	Schwamm	Gehalt mg/g Frischgewicht
Karotten (roh)	0,183	Rot	72,2
Mango, (gekocht)	0,131	Blau	16,1
Süßkartoffel (roh)	0,095	Gelb-weiß	11,3
Spinat (roh)	0,056		

\*essbarer Anteil

Die Spektren der Acetonextrakte weisen unter anderem auf Ketocarotinoide und 4-Hydroxy-Carotinoide hin (mündlich bestätigt durch Professor Beyer, Universität Freiburg). Bei zwei Spektren (Abb. 30) könnte es sich um die Arylcarotinoide Isorenieratin (Abb. 30\_4; Abb. 43) und Trikentriorhodin (Abb. 30\_8; Abb. 43) handeln, die auch im Meeresschwamm *Suberites sericeus* identifiziert wurden (MATSUNO 2001). Das Vorkommen solcher aromatischer Carotinoide ist einzigartig für Schwämme und manche Bakterien (LIAAEN-JENSEN 1991). Der Ursprung der Carotinoidvielfalt in *S. domuncula* ist bislang unergründet. Als Nahrungsfiltrierer könnte er diese z.B. in Form von Phytoplankton bzw. sedimentierenden phototrophen Bakterien bzw. Algen aufnehmen. MATSUNO (2001) postuliert die Herkunft der Arylcarotinoide zum Teil aus symbiotischen Bakterien (photosynthetische und nichtphotosynthetische). Es wird aber nicht ausgeschlossen, dass der Schwamm selbst in der Lage ist, die Carotinoide zu modifizieren (LIAAEN-JENSEN 1967). So fand EIMHJELLEN (1967) z.B. in *Halichondria panicea* keine Carotinoide, die auf einen mikrobiellen Ursprung zurückgehen. Es bleibt abzuwarten ob zukünftige Sequenzierprojekte in Schwämmen Hinweise auf Carotinoid modifizierende Enzyme liefern.



**Abb. 43:** Strukturformeln der beiden potentiellen aromatischen Carotinoiden in *S. domuncula*. Trikentriorhodin ist der rote Farbstoff der erstmals aus *Trikentron helium* isoliert wurde. Isorenieratin zählt zu den Carotinoiden aus *S. sericeus*.

Das Carotinbindeprotein aus *S. domuncula* wurde erstmals von CARIELLO und ZANETTI (1981) beschrieben und von Prof. Jaenicke (Molekulare Biophysik, Universität Mainz) näher charakterisiert. Die intensive Suche nach dem zugrunde liegenden Gen führte in dieser Arbeit nicht zum Erfolg. Das proteingebundene Carotinoid wurde mittels DC und HPLC untersucht, konnte aber nicht näher charakterisiert werden. Aufgrund der Wechselwirkung (Immobilisierung und Farbumschlag) mit den Proteinen der verwendeten Kieselgelmatrix in Zusammenhang mit dem polaren Laufmittel Chloroform (Abb. 33), wurde eine protonierbare

Epoxygruppe innerhalb des Carotinoids vermutet. CARIELLO und ZANETTI (1981) untersuchten das Carotinoid ebenfalls mittels DC und verglichen es mit einem Monoepoxycarotinoid und erbringen – wie auch hier gezeigt – den Beweis, dass es sich nicht um Astaxanthin handelt. Mit einem apolareren Laufmittelgemisch migrierte das Carotinoid seiner Stoffklasse entsprechend, zeigte aber durch Bedampfung mit konzentrierter Salzsäure keinen Farbumschlag (nicht gezeigt). Einerseits könnte das bedeuten, dass das Carotinoid keine Epoxygruppe in seiner Struktur aufweist, oder sich diese nicht protonieren lässt. Die blaue Färbung des Protein-Carotin-Komplexes (Abb. 33) beruht wahrscheinlich auf anderen Wechselwirkungen (z.B. Konformationsänderung, Beeinflussung des mesomeren Systems etc.). Das gelöste Carotinoid ist sowohl lichtinstabil als auch sauerstoffempfindlich und zerfällt unter solchen Konditionen binnen weniger Sekunden, wodurch es seine Färbung verliert. Im Verbund mit dem Bindeprotein bleibt es über mehrere Jahre stabil.

### 5.1.6 Funktion der Spaltprodukte

Apocarotinoide bzw. Retinoide (z.B. Retinol und Retinsäure) sind Carotinoidspaltprodukte die essentielle biologische Funktionen in Tieren (z.B. ROHWEDEL *et al.* 1999; LAMPERT *et al.* 2003), Pflanzen (z.B. QIN und ZEEVAART 1999; BOUVIER *et al.* 2005), Grünalgen und Archaeobakterien (z.B. SPUDICH 1998; RUCH *et al.* 2005) erfüllen. Durch den Nachweis von Rhodopsinen wird Retinal zudem eine Bedeutung in Eubakterien und Pilzen zugesprochen (SPUDICH *et al.* 2000; JUNG *et al.* 2003). Abgesehen von der Pigmentierung erfüllen die Apocarotinoide ihre Hauptaufgabe als Chromophor in photosensorischen Systemen (z.B. ist 11-cis-Retinal das universelle Chromophor aller Vertebraten; MCBEE *et al.* 2001) und als Liganden für Kernrezeptoren (zusammengefasst in: MANGELSDORF und EVANS 1995; BASTIEN und ROCHETTE-EGLY 2005). Dadurch kontrollieren sie, über den regulatorischen Einfluss auf Zelldifferentiation, -Proliferation und Apoptose, als nicht-Steroidhormone zahlreiche Prozesse während der Entwicklung und Homöostase des Organismus (ROSS *et al.* 2000; ALTUCCI und GRONEMEYER 2001). Nach wie vor wird davon ausgegangen, dass Retinsäure mediatisierte Vorgänge auf Chordaten beschränkt sind (siehe auch 5.3), doch häufen sich die Hinweise, dass vergleichbare Signaltransduktionswege auch in Pflanzen (über Abscisinsäure und Retinsäureanaloge; AULDRIDGE *et al.* 2006) existieren.

Betrachtet man sich die Carotinoidzusammensetzung des Schwammes im Zusammenhang mit den beiden identifizierten Carotinoxygenasen, ergibt sich eine Vielzahl an möglichen Spaltprodukten, die eine physiologische Rolle übernehmen können. Anhand von Inkubationsstudien (3.24.2) wurden mögliche Einflüsse auf die Regulation der  $\beta$ -Carotinoxygenase

(BCO) und der potentiellen Retinaldehydrogenase (RA-DH) untersucht. Die Ergebnisse lassen auf einen Stoffwechselweg mit ähnlicher Funktion wie aus Vertebraten bekannt schließen und werden im folgenden Kapitel (5.2) erläutert.

Im Gegensatz zur symmetrischen Spaltung entstehen bei der asymmetrischen – zusätzlich zu den Apocarotinoiden – noch kurzkettige Spaltprodukte (C<sub>10-13</sub>). Pflanzen nutzen diese hauptsächlich als Duft- und Aromastoffe oder als Lockmittel für Insekten zur Bestäubung oder deren Erlegung. Am bekanntesten sind wohl der charakteristische Duft von Zitrusfrüchten (C<sub>10</sub>-Spaltprodukte wie Citral; FRIEDMAN *et al.* 2004) und der typische Rosenduft ( $\beta$ -Ionon und C<sub>13</sub>-Derivate) verschiedener Pflanzen (EUGSTER und MÖRKI-FISCHER 1991; MACTAVISH *et al.* 2000; AZUMA *et al.* 2002). Letztere werden auch als potente Lockstoffe in Insektenfallen eingesetzt (DONALDSON *et al.* 1990; FLATH *et al.* 1994). Weiterhin besitzen diese Substanzen bakterizide und fungizide Wirkungen und bieten dem erzeugenden Organismus so einen Schutz vor Befall (PARANAGAMAL *et al.* 2003; FRIEDMANN *et al.* 2004). Zitronen erhalten durch Citral einen wirksamen Fraßschutz, indem es z.B. die Fruchtfliege *Ceratitis Capitata* tötet (SALVATORE *et al.* 2004).

Projiziert man die Funktion der pflanzlichen Aroma-/Lockstoffe auf das marine Milieu der Schwämme, ist eine Verwendung der Spaltprodukte als Botenstoffe sowohl innerhalb des Schwamms als auch zwischen Artgenossen (als Pheromon) vorstellbar. Wie bei Korallen beobachtet, könnten solche Substanzen eine Rolle während der Koloniebildung oder Koordination der sexuellen Fortpflanzung spielen.

Bezüglich der vielseitigen Eigenschaften der flüchtigen C<sub>10</sub>-Spaltprodukte ist es unwahrscheinlich, dass sie lediglich unerwünschte Nebenprodukte während der Apocarotinoïdsynthese darstellen. Die BCO liefert dem sessilen Schwamm eher die Möglichkeit, sich gegen parasitären Befall oder Ähnliches zur Wehr zu setzen. In Inkubationsexperimenten mit Citral >1  $\mu$ M zeigte sich, dass dissoziierte Schwammzellen die Fähigkeit verloren, Primmorphe zu bilden (nicht gezeigt). Ob dies auf das Absterben der schwammassoziierten Bakterien zurückgeht, die evtl. nur eine bedingte Citraltoleranz aufweisen, oder auf chemotaktische Prozesse (im Sinne von Koloniebildung), ist bisher nicht untersucht. Eine weitere Erklärung wäre die Hemmung der Retinaldehydrogenase (RALDH) durch Citral (HYATT *et al.* 1996), wodurch die Umsetzung von Retinal in Retinsäure verhindert, und so die Morphogenese der Schwammprimorphe unterbunden wird. Andererseits könnte die begleitende Citralsynthese dem Schwamm eine zusätzliche Möglichkeit gewähren diesen Stoffwechselweg zu kontrollieren (siehe auch 5.2.2).

## 5.2 BEDEUTUNG DER CAROTINOXYGENASE (BCO) FÜR *S. DOMUNCULA*

Die Funktion der BCO als 7,8(7',8')-Carotinoxygenase konnte im Rahmen dieser Arbeit bewiesen werden. Sie stellt den ersten Schritt in einem Carotinoidstoffwechsel dar, der final zur Erzeugung eines hormonellen Botenstoffs, möglicherweise Retinsäure, führt (Abb. 1) und die Morphogenese und andere Entwicklungsprozesse steuert. Unter diesem Aspekt wurden differentiell inkubierte Gewebestücke adulter, wie auch sich neu organisierender Schwämme (Primmorphe), auf das Expressionsmuster der BCO hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Enzym in Primmorphen einer streng räumlich-/zeitlichen Kontrolle unterliegt (5.2.2).

### 5.2.1 Regulation der mRNA-Transkripte der Carotinoxygenase (BCO)

Mittels Northern-Transfer wurde die Anzahl an mRNA-Transkripten der BCO aus inkubierten Gewebestücken adulter Schwämme miteinander verglichen (Abb. 21). Im Gegensatz zum konstitutiv exprimierten Tubulin (Abb. 21\_B) waren Transkripte der BCO (Abb. 21\_A) in adulten Schwämmen nur nahe der Detektionsgrenze nachzuweisen. Deswegen wurde auf eine quantitative Auswertung der Bandenstärke verzichtet. Wichtiger als die absoluten Unterschiede war unter anderem die Erkenntnis, dass die BCO in „sterbenden“ Tieren nicht exprimiert wird (Abb. 21\_A Spur 2). Dies kann als Hinweis dafür angesehen werden, dass sie nicht an der Bereitstellung eines Botenstoffs (RA oder ein Analogon) für apoptotische Signaltransduktionswege beteiligt ist.

Das Abschalten der BCO durch Inkubation mit hohen Dosen an  $\beta$ -Carotin (Abb. 21\_A Spur 4) bestätigt bisherige Funde in dieser Enzymfamilie (z.B. BRUBACHER und WEISER 1985; BACHMAN *et al.* 2002) und deutet auf eine negative *feed-back*-Regulation dieses Enzyms hin. Dies postuliert gleichzeitig einen direkten Zusammenhang der eingesetzten, externen Carotinkonzentration mit der Abschrift des BCO-Gens. In Anbetracht der Tatsache, dass  $\beta$ -Carotin auf vielfältige Weise in das Zellgeschehen eingreift (Redox-Status, Immunsystem, Membranfluidität etc.; 1.1), ist die Regulierung wahrscheinlich eine Synergie aus verschiedenen Prozessen. Eine verlässlichere Größe wäre die intrazelluläre Carotinkonzentration, die nicht zwangsläufig mit der extrazellulären in Zusammenhang steht. Da  $\beta$ -Carotin praktisch unlöslich in Wasser ist, hängt die intrazelluläre Konzentration einerseits von der tatsächlich gelösten Menge im Inkubationsmedium und andererseits vom zugrunde liegenden Aufnahmemechanismus in die Zelle ab. Beides ist wiederum von zahlreichen Faktoren abhängig. ELLIOT (2005) gibt einen detaillierten Überblick über die bisherig erworbenen Erkenntnisse und erklärt damit die sich zum Teil widersprechenden

Ergebnisse von Studien, die gleiche Konzentrationen einsetzen. So ist die Aufnahme von Carotinoiden in Zellen nicht nur von der Art des eingesetzten Lösungsmittels (Verfügbarkeit) abhängig, sondern unterscheidet sich auch aufgrund unterschiedlicher Aufnahme-mechanismen zwischen den einzelnen Spezies. Auch innerhalb desselben Organismus variiert die Aufnahme gewebsspezifisch in Abhängigkeit der Dosis und der Zeit. Ein negativer Rückkopplungsmechanismus ist zwar, wie auch hier gezeigt, bestätigt, es wird nur darauf hingewiesen, dass die meisten Organismen Carotinoide unterschiedlich absorbieren und metabolisieren. Dadurch ist eine effiziente und repräsentative Bereitstellung der lipophilen Carotinoide für unterschiedliche Zellen/Organismen schwer zu beurteilen. Das erklärt warum geringere  $\beta$ -Carotindosen zum Teil keinen Einfluss auf das Transkriptionsniveau der Enzyme zeigten (Abb. 21\_A Spur 3).

Die Ergebnisse aus Retinsäure inkubierten Gewebestücken gleichen denen die mit  $\beta$ -Carotin behandelt wurden. Die niedrigere Dosis hat keinen Einfluss auf das Transkriptionsniveau (Abb. 21\_A Spur 5), während die höhere Konzentration einen Rückgang an Transkripten hervorruft (Abb. 21\_A Spur 6). Innerhalb der Retinsäure inkubierten Zellen gilt demnach auch für die BCO das Prinzip der negativen Rückkopplungshemmung (Endprodukt-hemmung), wie von BACHMANN *et al.* (2002) für das Ratten- bzw. Hühnerenzym gezeigt werden konnte. Dies ist ein weiteres Indiz für retinsäureabhängige Entwicklungsprozesse in Schwämmen. Die Löslichkeit von Retinsäure in Wasser ist mit der von  $\beta$ -Carotin vergleichbar. Die Verfügbarkeit und Aufnahme in die Zelle obliegt somit den gleichen, restriktiven Kriterien und erklärt eventuell, warum bei niedriger Konzentration keine Veränderung der Transkription in adulten Schwämmen feststellbar war. Der Rückgang der BCO-Transkripte durch Inkubation mit Retinylpalmitat lässt die Vermutung zu, dass auch die Speicherform von Retinoiden sich negativ auf die Transkription der BCO auswirkt. Ob die Spaltprodukte im Schwamm gespeichert werden, ist unklar. Zwar wurden im Schwammextrakt Carotinoidester mittels HPLC gefunden (Appendix 3), aber wiesen die resultierenden Spektren nicht auf bekannte Apocarotinoide (bzw. Retinoide) hin. Eventuell ist der Rückgang an BCO-Transkripten auf die Bildung oxidativer Spaltprodukte der Retinylester zurückzuführen, die während der 24 stündigen Inkubation, mit permanenter Belüftung der Schwammstücke durch Sprudelsteine, entstehen können.

Der Inkubationsversuch wurde mit Gewebestücken eines weiteren roten Individuums wiederholt. In einem Northern Transfer wurde zusätzlich zu dieser RNA solche von blauen Schwämmen (einer frisch aus dem Meer, der andere nach einjähriger Aquarienhaltung) aufgetragen, um die Anzahl der BCO-Transkripte in den unterschiedlich gefärbten



Exemplaren zu vergleichen (Abb. 22). Der mRNA-Gehalt in blauen Schwämmen ist demnach höher im Vergleich zu roten Exemplaren. Zudem zeigt das blaue Exemplar nach einjähriger Aquarienhaltung ein nochmals gesteigertes Niveau. Da es sich bei den blauen Schwämmen nicht um dasselbe Exemplar handelt, ist die gesteigerte Abschrift der BCO eventuell auch auf individuelle Unterschiede zurückzuführen. Da blaue *S. domuncula* sehr selten sind, konnte dies nicht verifiziert werden. Das höhere Transkriptionsniveau in blauen Schwämmen liegt eventuell in einem niedrigeren Carotinoidgehalt (Tab. 7) begründet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass sich die beiden untersuchten Schwämme in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befanden und sich die Expression deshalb unterscheidet.

Quantitativ wurde der Unterschied der BCO-Transkripte eines roten *S. domuncula* mittels quantitativer *Real-Time* PCR (RTQ-PCR) ermittelt (Tab. 4). Er bestätigt die Ergebnisse des Northern-Transfers und zeigt eine mehr als 6 fache Reduktion der BCO-Transkripte im Anschluss an eine Inkubation mit 50  $\mu$ M  $\beta$ -Carotin, während die Inkubation mit 1  $\mu$ M nahezu keine Veränderung bewirkte.

### 5.2.2 *In-situ* Nachweis der differentiellen $\beta$ -Carotinoxygenase (BCO)-Expression

Die Northern-Blot- und RTQ-PCR Versuche waren ein erster Hinweis darauf, dass die Expression der BCO über Rückkopplungsmechanismen gesteuert wird. Der Nachweis der mRNA-Transkripte mittels *in-situ* Hybridisierung, bzw. des Enzyms mittels immunocytochemischer Färbung gaben zusätzlich Aufschluss über die Lokalisierung und relativen Mengen des exprimierten Gens.

Der Mangel an nachweisbaren mRNA-Transkripten in Geweben adulter Schwämme (Abb. 26\_C Erg) war nicht gänzlich überraschend. Die BCO stellt das Schlüsselenzym des Carotinoidstoffwechsels dar, dessen Endprodukt an der Steuerung von Entwicklungsprozessen beteiligt ist. Demnach erwartet man nur eine geringe Kopienzahl in bereits ausdifferenzierten Zellen. Eine Grundexpression dieses Gens, wenn auch in äußerst geringem Umfang, wurde in den Northern-Blot und RTQ-PCR-Versuchen für adulte Schwämme gezeigt (Abb. 21). Die Anzahl an Transkripten innerhalb des Gewebes lag vermutlich unterhalb der durch *in-situ* Hybridisierung nachweisbaren Mindestmenge. Dasselbe wurde in älteren Primmorphen beobachtet, die erst nach Zugabe eines Stressors die Expression der BCO bedingt hochregulierten (Abb. 26A/B).

In jungen Primmorphen ließen sich mRNA-Transkripte vor allem in den Randregionen nachweisen (Abb. 27\_A1). Dort finden sich noch eine Vielzahl an undifferenzierten Zellen bzw. die Wachstumszone der Primmorphe. Das bestätigt, dass die BCO an der Morphogenese

der Schwämme beteiligt ist und adulte Tiere dieses Gen nur zur Aufrechterhaltung der Homöostase bedingt exprimieren. Da  $\beta$ -Carotin das prominente Carotinoid in *S. domuncula* ist (Abb. 30) und dieses unter den ca. 50 Provitamin A-Carotinoiden die höchste Aktivität besitzt (KRINSKY und JOHNSON 2005), wurden Inkubationen der Primmorphen mit resultierenden Produkten des  $\beta$ -Carotinstoffwechsels durchgeführt (Abb. 27). Die Ergebnisse zeigen, dass die BCO sowohl durch Zwischenprodukte (Retinol) als auch dem Endprodukt (Retinsäure) dieses Stoffwechselwegs gehemmt wird. Zur Absicherung wurden in einem Gegenversuch Schwammprimmorphie mit Citral inkubiert, welches die Umsetzung von Retinal zu Retinsäure durch die Retinaldehyddehydrogenase blockiert (Abb. 44; HYAT *et al.* 1996; DIDIERJEAN *et al.* 1999). Solche Primmorphie zeigten eine extrem gesteigerte Abschrift des BCO-Gens im Randbereich (Abb. 27\_B1). Eine Inkubation mit Retinsäure erzielte genau den gegenteiligen Effekt und schaltete das Gen vollständig ab (Abb. 27\_C1). Auch die Behandlung mit Vitamin A (Retinol) führte zu einer deutlichen Reduzierung der BCO-Aktivität und es waren nur noch vereinzelt Transkripte nachweisbar (Abb. 27\_D1). In der immunocytochemischen Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen die BCO ergab sich das gleiche Bild wie in der *in-situ* Hybridisierung (Abb. 27\_A2-D3). Die Proteinmenge wurde durch Citral hochreguliert und bei Inkubation mit Retinsäure abgeschaltet.

Zusammengefasst übernimmt die BCO in *S. domuncula* als 7,8(7',8')-Carotinoxygenase vergleichbare Funktionen wie vergleichbare Enzyme in Vertebraten (Bereitstellung von Retinoiden) und Pflanzen (Produktion von Apocarotinoidhormonen). Sie ist der erste Schritt in der Synthese eines Botenstoffs, der maßgeblich Entwicklungsprozesse steuert. Dabei unterliegt dieses Gen einer strengen räumlichen und zeitlichen Kontrolle, was charakteristisch für diese Morphogene ist. LAMPERT *et al.* (2003) zeigen dies eindrucksvoll durch *whole-mount in-situ* Hybridisierung von Zebrafischembryonen. Aufgrund der langen Generationszeit von *S. domuncula* lassen sich in diesem Organismus keine vergleichbaren Studien durchführen.

### 5.3 IDENTIFIZIERUNG DER ENZYME MIT POTENTIELLER BETEILIGUNG AM RETINSÄURESTOFFWECHSEL

Das Vorhandensein Carotinoid spaltender Enzyme in *S. domuncula* deutet auf einen retinsäureabhängigen Stoffwechselweg in Schwämmen hin. Bislang ist solch ein Stoffwechselweg ausschließlich in Chordaten nachgewiesen, während es keine Hinweise auf Retinsäurerezeptoren außerhalb dieser Gruppe gibt (DUESTER 2000). Zwar wurde in *S. domuncula* bereits erfolgreich ein Retinoid X Receptor (RXR) identifiziert (WIENS *et al.*

2003), doch gelang es bisher nicht, einen ***Retinoic Acid Receptor*** (RAR) nachzuweisen. In Chordaten wirkt Retinsäure über das Heterodimer RAR/RXR oder das Homodimer RAR/RAR, welche bisher für einen retinsäureabhängigen Entwicklungsprozess zwingend vorausgesetzt wurden (HUANG und ICHIKAWA 1997; CLAGETT-DAME und DELUCA 2002; LAMPERT *et al.* 2003; MOLTOKOV und DUESTER 2003; BASTIEN und ROCHETTE-EGLY 2004 etc.). Neuere Studien liefern dagegen erste Hinweise auf alternative, RAR-unabhängige Signaltransduktionswege und postulieren die Evolvierung des aus Chordaten bekannten Systems, noch vor die Entstehung der Deuterostomia (CANESTRO *et al.* 2006).

RAR bzw. RXR, als Hormonrezeptoren des Zellkerns, gehören zur Superfamilie der Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren, welche die Expression spezifischer Zielgene während der frühen Embryonalentwicklung und in der adulten Physiologie kontrollieren (MANGELSDORF *et al.* 1995; MOHAN und HEYMAN 2003). Der Einfluss von Metaboliten des Carotinoidstoffwechsels auf die Entwicklung von *S. domuncula* (5.2) zeigt, dass solche Signaltransduktionswege evolutiv sehr alt sind. Unabhängig von der Natur der bereitgestellten Retinoide (Spaltung von Carotinoiden oder durch Nahrungsaufnahme) ist eine Enzymmaschinerie vonnöten, die eine Hypervitaminose im Organismus vermeidet oder die aktive Form des Botenstoffs (Retinsäure) generiert. Im Folgenden werden Enzyme beschrieben, die theoretisch in der Lage sind diese Aufgaben in *S. domuncula* zu übernehmen.

### 5.3.1 Die potentielle Retinaldehydrogenase (RA-DH)

Die Retinaldehydrogenase gehört zur Familie der *short chain dehydrogenases/reductases* (SDR) (1.2.2.2). Sie katalysiert entweder die Umwandlung des entsprechenden Alkohols (hier Retinol) ins Aldehyd (Retinal) oder umgekehrt. Dabei entscheidet das beteiligte Coenzym über die Funktion als Dehydrogenase (NADH) oder Reduktase (NADPH; DUESTER 2000; Abb. 44).

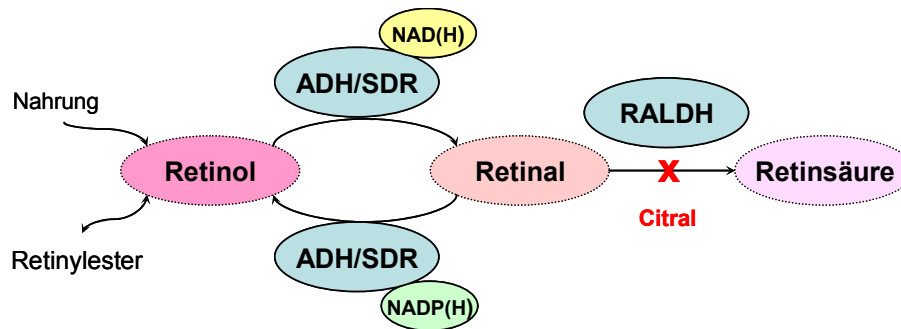
#### 5.3.1.1 Charakterisierung der Retinaldehydrogenase

Insgesamt weist die cDNA des Gens 1039 bp auf (Abb. 14), von denen 852 bp für das potentielle Enzym kodieren. Die Sequenzanalyse der 5'-untranslatierten Region der RA-DH, (Abb. 14) ergab keinen Hinweis auf bekannte regulative Signaturen. So ist z.B. das Starttriplekt nicht von Basen flankiert, welche nachweislich die Translation beeinflussen (KOZAK, 1991, siehe auch 5.1.1). In der 3'-UTR findet sich dagegen die Basenabfolge [AATAAG]<sub>Nt910-16</sub>. Vermutlich handelt es sich hierbei, wie für die BCO-II beschrieben (5.1.2), um ein alternatives Polyadenylierungssignal. Der Gesamtgehalt der Basen A/T

innerhalb der 3'-UTR, ist mit 65 % relativ hoch und könnte ein Indiz auf ein kurzlebige mRNA-Transkript sein. Die Verteilung dieser Basen mit zwei Thyminpentameren (Nt<sub>889-94</sub>; Nt<sub>901-04</sub>) ließe auf eine Markierung von Typ III AREs (Tab. 8) schließen. Da jedoch keine weiteren repetitiven AU-reichen Segmente zu erkennen sind, bestimmt die 3'-UTR wahrscheinlich nicht über die Halbwertszeit dieser mRNA. Auffällig ist die Wiederholung des Triplets [GTT], das insgesamt sechs Mal vorzufinden ist. Über die Bedeutung der Triplettwiederholung kann bisher keine Aussage getroffen werden.

Über die molekulare Identifizierung des Gens hinaus erfolgte eine erfolgreiche Expression des rekombinanten Proteins in *E. coli* (ca. 40 kD; Abb. 25). Ein Vergleich von dessen Primärstruktur mit Internetdatenbanken (z.B. Pfam; 2.10) offenbarte die Domäne der ADH-*short chain dehydrogenase* Familie, wenn auch c-terminal unvollständig (Abb. 19). Da sowohl die katalytische Domäne, die Coenzymbindestelle, als auch die für die Faltung wichtigen, konservierten Aminosäurereste vorhanden sind (Abb. 15), wird hier angenommen, dass es sich um eine funktionstüchtige Alkoholdehydrogenase handelt. Dabei ist aufgrund der hohen Homologie zu verwandten Enzymen anderer Organismen (Abb. 15) als wahrscheinlichstes Substrat das Retinoid Retinol (Funktion als Dehydrogenase), oder das daraus abgeleitete Aldehyd Retinal (Funktion als Reduktase) vorzuschlagen. Eine Einschätzung, welche Aufgabe das Enzym bei dieser Interkonversion übernimmt, ist allein aufgrund der gefundenen Homologie nicht zu treffen. Größte Übereinstimmung anhand der Primärstruktur bieten die Enzyme aus *Caenorhabditis elegans* (63 % ähnliche AS, davon 43 % identische;  $E=7^{-63}$ ) und aus *Canis familiaris* (61 % ähnliche AS, davon 42 % identische;  $E=2^{-59}$ ). Beide wirken, wie auch die verbleibenden Enzyme im Sequenzvergleich (Abb. 15), als Reduktase in der Rückreaktion des Retinsäurestoffwechsels (Speicherung der Retinoide; Abb. 44), da sie als Coenzym NADPH präferieren (z.B. DUESTER 2000; MATSUZAKA *et al.* 2002). Ob und inwiefern dies auf die RA-DH zutrifft, ist zum jetzigen Zeitpunkt rein spekulativ. Die konservierten Aminosäurereste Gly15 und Asp38 definieren das Enzym eher als Dehydrogenase, da sie eine zentrale Rolle bei der Bindung des Coenzym NADH spielen (CHEN *et al.* 1991). Die negativ geladene Aminosäure Asp38 steht im Konflikt mit der ebenfalls negativ geladenen Phosphatgruppe des NADPHs, während sie an die Adenosin-Ribose des NADHs bindet und so die Konformation der Coenzymbindedomäne stabilisiert (Chen *et al.* 1991). Anhand dieser Sequenzdaten ist eine Funktion als Dehydrogenase in der Hinreaktion (Retinsäureweg; Abb. 44) glaubhafter. Letztendlich kann nur eine *in vivo* bzw. *in-situ* Analyse diese Kontroverse klären, wobei die physiologischen Konzentrationen

(Verfügbarkeit) beider Coenzyme am Ort der Verwendung die einfachste Antwort auf diese Frage geben.



**Abb. 44:** Vereinfachtes Schema des Retinsäurestoffwechsels: Retinol aus der Nahrung oder gespeicherten Retinylestern wird durch Dehydrogenasen der ADH bzw. SDR Familie zu Retinal oxidiert, wobei NAD(H) als Coenzym verwendet wird. Retinal wiederum kann in einer Rückreaktion durch Reduktasen der ADH bzw. SDR Familie in Retinol umgewandelt werden (Coenzym NADPH). Alternativ kann es irreversibel durch Enzyme der RALDH Familie zu Retinsäure oxidiert werden. Citral inhibiert die RALDH und verhindert die Synthese der Retinsäure.

### 5.3.1.2 Interpretation des Expressionsmusters der Retinaldehydrogenase

Die Grundexpression der Retinaldehydrogenase in verschiedenen gefärbten, adulten Exemplaren von *S. domuncula* wurde mittels Northern Transfer untersucht (Abb. 23). Die nahezu identische Bandenstärke in roten und gelben Exemplaren und das Fehlen der Transkripte in blauen ist mit Vorsicht zu interpretieren. Irreführend wäre die Annahme, dass die RA-DH in blauen Exemplaren nicht exprimiert wird. Da für die RA-DH eine Beteiligung am Retinsäurestoffwechsel angenommen wird, unterliegt sie – wie alle diese Entwicklungsgene – einer strengen zeitlichen und räumlichen Kontrolle (NAPOLI *et al.* 1991; ONG 1994; LAMPERT *et al.* 2003; ISKEN *et al.* 2007). Da keine Einschätzung der Schwämme bezüglich Alter, Entwicklungsstadium und Vitalität getroffen werden kann, sind die Unterschiede möglicherweise eher auf individuelle als farbspezifische Faktoren zurückzuführen.

Inkubationsexperimente mit  $\beta$ -Carotin und Retinsäure zeigten in einem weiteren Northern Transfer einen Rückgang an RA-DH Transkripten in retinsäurebehandeltem Gewebe (Appendix 6). Dies ist ein Hinweis auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch das Endprodukt dieses Stoffwechselwegs. Mittels quantitativer Echtzeit PCR (RTQ-PCR) wurde eine Halbierung der RA-DH Transkripte infolge dieser Retinsäurebehandlung festgestellt (Tab. 5) und bestätigt damit diesen Regulationsmechanismus.

Anhand der differentiell inkubierten Primmorphen, wie sie auch für den Nachweis der BCO-Transkripte verwendet wurden, sollte ein Zusammenhang zwischen beiden Enzymen und dem Retinsäurestoffwechsel überprüft werden. Ähnlich den Ergebnissen der BCO (Abb. 27) sind

RA-DH Transkripte in unbehandelten Primmorphen nur vereinzelt und räumlich stark begrenzt nachweisbar (Abb. 28). Durch Inkubation mit Retinol (Vitamin A) bzw. Retinsäure waren keine Transkripte in den Gewebeschnitten zu erkennen, wobei Citral eine gesteigerte Transkription vor allem in Zellen des Randbereichs (Abb. 28\_D) veranlasste.

Das Abschalten der Transkription in Primmorphen infolge einer Retinsäureinkubation bestätigt sowohl die Ergebnisse aus adulten Tieren als auch eine strenge Regulierung dieses Enzyms durch das Endprodukt. Weiterhin ist ein histologischer Unterschied in diesen Primmorphen zu erkennen (Abb. 28\_B), wie bereits früher in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (WIENS *et al.* 2003). Das Gewebe erscheint wesentlich „poröser“ und ähnelt dadurch Schnitten durch adultes Schwammgewebe (Abb. 26\_C); ein weiteres Indiz für retinsäuregesteuerte Differentiationsprozesse in Schwämmen.

In retinolinkubierten Primmorphen waren ebenfalls keine RA-DH Transkripte nachweisbar, was einerseits auf eine dosisabhängige Regulierung des Enzyms hindeuten könnte (die eingesetzte Konzentration ist für physiologische Bedingungen sehr hoch). Andererseits ist es möglich, dass die RA-DH ihr Substrat zu Retinal umsetzt und eine Akkumulierung dessen das Enzym hemmt. Eine Analyse der Retinoide in solch inkubierten Primmorphen könnte Aufschluss darüber geben.

Citral verhindert die Produktion von Retinsäure durch die Hemmung der Retinaldehyd-Dehydrogenase (HYAT *et al.* 1996; DIDIERJEAN *et al.* 1999, Abb. 44). Primmorphe, die dieser Substanz ausgesetzt sind, fehlt demnach das wichtige Morphogen zur Zelldifferentiation. Vermutlich versucht der Schwamm dieses Defizit durch eine Überexpression der RA-DH auszugleichen, um genügend Substrat der RALDH zur Verfügung zu stellen. Dies bietet gleichzeitig eine Erklärung, warum eine Überexpression im Vergleich zur BCO (Abb. 27) nur beschränkt stattfindet. Die BCO ist das erste Glied im Retinsäurestoffwechsel und die sich anschließende BCO-II generiert direkt Retinal, das als Substrat für Retinalreduktasen oder die RALDH dient (Abb. 44). Wie in Abb. 27 gezeigt, wird die Transkription der BCO infolge einer Citralinkubation extrem gesteigert und dadurch entsprechende Mengen an Retinal hergestellt. Die RA-DH ist als mittleres Glied dieses Stoffwechselwegs an der Interkonversion des RALDH-Substrats beteiligt (Abb. 44). Herrscht ein Mangel, setzt das Enzym Retinol (entweder aus dem Retinoidspeicher oder frei verfügbares) in Retinal um. Es ist bislang nicht untersucht, ob im Schwamm die Carotinoide spaltung dort erfolgt, wo auch die Retinsäure benötigt wird, oder ob das Spaltprodukt über Carrier (z.B. Bindeproteine) in die Zielzelle transportiert wird. So könnte trotz Überexpression der BCO lokal ein Retinalmangel entstehen, der durch die Überexpression der RA-DH ausgeglichen wird.

### 5.3.2 Identifizierung einer weiteren Alkoholdehydrogenase (ADH)

Innerhalb der *short chain dehydrogenase/reductase*-Familie existieren zahlreiche Proteine, die physiologisch betrachtet die gleichen Aufgaben erfüllen, sich aber sowohl innerhalb derselben Spezies (gewebsspezifisch) als auch zwischen den Spezies unterscheiden (zusammengefasst in DUESTER 2000). Aus diesem Grund wurde nach alternativen Enzymen zur RA-DH gesucht und ein Gen entdeckt, das Homologien zu ADH-Pan2-Retinaldehydrogenasen anderer Organismen aufweist. Die Namensweiterung Pan2 geht dabei auf die Lokalisierung des Enzyms im Pankreas zurück, weswegen für *S. domuncula* auf diesen Zusatz verzichtet wurde.

Die cDNA der ADH (Abb. 16) umfasst insgesamt 1128 bp und 1020 bp davon kodieren für das entsprechende Protein. Eine Analyse der untranslatierten Regionen ergab für das 5'-Ende keine Besonderheiten. In der 3'-UTR findet sich ein Erkennungsmerkmal der Typ I ARE (Tab. 8), das auf ein kurzlebiges mRNA-Transkript hinweist. Allerdings ist das Pentamer [ATTTA]<sub>1021-25</sub> nicht in mehreren Kopien vorhanden, was nach PENG *et al.* (1996) gegen ein kurzlebiges Transkript sprechen könnte. Gleichzeitig berichten sie aber von einem destabilisierenden Effekt eines einzelnen Typ I ARE, falls es in einem uracilreichen (entspricht Thymin auf cDNA-Ebene) Kontext zu finden ist. Solche Sequenzelemente finden sich in der 3'-UTR der ADH. Der Gesamtgehalt der Basen A/T ist mit 69 % außergewöhnlich hoch und die 3'-UTR mit insgesamt 72 bp recht kurz. Da bisher noch keine einheitliche Konsensussequenzen für die einzelnen ARE-Typen gefunden wurden (BARREAU *et al.* 2005), kann davon ausgegangen werden, dass die 3'-UTR der ADH die mRNA für einen schnellen Abbau markiert.

Im Anschluss an die Identifizierung des ADH-Gens, wurde das rekombinante Protein erfolgreich in *E. coli* exprimiert (mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 45 kD, was der zu erwartenden Größe entspricht, Abb. 25). Als Mitglied der SDR-Familie ist es mit 332 AS relativ groß, doch entspricht die konservierte Domäne der durchschnittlichen Größe dieser Enzymklasse von ca. 250 AS (Abb. 19; JÖRNVALL *et al.* 1995). Eine Analyse auf posttranslationale Modifikationen identifizierte ein mögliches Signalpeptid (Abb. 16), dessen Existenz jedoch in Frage gestellt wird, da eine computergestützte Zuordnung zu Zellkompartimenten fehlschlug. Dies ist in Übereinstimmung mit der bioinformatischen Analyse nach KLEIN *et al.* (1985), die das Enzym mit 94 %iger Wahrscheinlichkeit dem Cytosol zuordnet. Der Nachweis des Proteins in der löslichen Fraktion der *E. coli*-Aufschlüsse bekräftigt diese Zuordnung.

Die charakteristischen Elemente der SDR-Enzymklasse (Coenzymbindestelle, katalytische Region, und für die Faltung konservierte Aminosäurereste) sind in der ADH-Sequenz

enthalten (Abb. 17). Die durchschnittliche Übereinstimmung zu anderen Retinoldehydrogenasen beträgt 64 % an ähnlichen (davon 47,6 % identischen) Aminosäuren (Abb. 17) und deutet auf ein Enzym mit gleicher Funktion hin. Im Gegensatz zur RA-DH ist die konservierte, aliphatische Aminosäure Glycin an Position 15 durch Isoleucin (ebenfalls aliphatisch) ersetzt. Asparaginsäure an Position 38 bleibt aber konserviert (Abb. 17). Besonders diese negativ geladene Aminosäure steht im Konflikt mit der ebenfalls negativ geladenen Phosphatgruppe des NADPHs und entscheidet die Präferenz zugunsten des NADHs (CHEN *et al.* 1991). Deshalb ist vermutlich auch die ADH ein Enzym der Hinreaktion des Retinsäurestoffwechsels (Abb. 44). *In-situ* Untersuchungen der Expression, wie sie für die RA-DH durchgeführt wurden, und eine Analyse der generierten Produkte könnten sowohl die Funktion des Enzyms als auch die hier angenommene Rolle in der Enzymkaskade der Retinsäuresynthese klären.

### 5.3.3 Identifizierung einer potentiellen Retinaldehyd-Dehydrogenase (RALDH)

Die Retinaldehyd-Dehydrogenase (RALDH) stellt das letzte Enzym des Retinsäurestoffwechsels dar und reduziert den Aldehyd Retinal zur korrespondierenden Retinsäure (Abb. 44). Bisher wurden mehrere Isoformen dieses Enzyms entdeckt und das Enzym aus *S. domuncula* weist höchste Homologie zu den RALDH2 anderer Organismen auf (durchschnittlich 82,3 % an ähnlichen AS, davon 69,8 % an identischen; Abb. 20). Das zugrunde liegende Gen der potentiellen RALDH enthält 1743 bp, wovon 1461 bp das offene Leseraster darstellen. Eine Sequenzanalyse der untranslatierten Bereiche (Abb. 18) zeigte innerhalb der 5'-UTR keine Signaturen, die über regulative Prozesse Aufschluss geben könnten. Die 3'UTR dagegen weist auffällige repetitive Sequenzelemente (Abb. 18) auf. Das Pentamer [GTTTG]<sub>1539-44</sub> entspricht dem Typ III ARE (Tab. 8), wie es im Proto-Onkogen „c-jun“ (PENG *et al.* 1996) zu finden ist. Zusammen mit dem hohen Anteil der Basen A und T (insgesamt 65 %) ist dies ein Indiz auf ein kurzlebiges mRNA-Transkript (BARREAU *et al.* 2005). Um eine mRNA für einen raschen Abbau zu markieren, bedarf es im Normalfall mehrere Kopien desselben Pentamers, da ein einzelnes ARE die Halbwertszeit einer mRNA nur geringfügig zu beeinflussen vermag (PENG *et al.* 1996). Dieselbe Studie belegt jedoch auch einen raschen Abbau der mRNA, wenn das ARE in einem AU-reichen Kontext steht, wie es bei der RALDH der Fall ist.

Die Retinaldehyd-Dehydrogenase generiert, als letztes Enzym in der Stoffwechselkette (Abb. 44), Retinsäure und nimmt Einfluss auf zahlreiche Prozesse wie Entwicklung, Zelldifferentiation und, als Steroidhormon, auf die Transkription von Genen (KIEFER *et al.*



2001). Deshalb unterliegt ihre Expression einer präzisen räumlichen und zeitlichen Kontrolle. Durch die ARE in der 3'-UTR erfährt die RALDH, zusätzlich zur transkriptionellen Regulation, eine Markierung für die ARE-abhängige Eliminierung. So wird in „ruhenden“ Zellen gewährleistet, dass evtl. entstehende Transkripte rasch beseitigt werden. CONNE *et al.* (2000) und AUDIC und HARLEY (2004) fassen die Wichtigkeit dieser Repression zusammen.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Schwammproteins ist der RALDH2 aus *Xenopus tropicalis* am ähnlichsten (84 % an ähnlichen AS, davon 71 % identische; E=0). Die Konservierung dieses Enzyms im Laufe der Evolution ist beachtlich und stützt die Vermutung, dass es sich bei dem Schwammenzym um eine funktionstüchtige RALDH handelt. Einen endgültigen Beweis hierfür kann nur eine funktionale Analyse des Enzyms *in vitro* oder *in vivo* erbringen. Nichtsdestotrotz gibt es weitere Indizien, die diese Hypothese unterstützen. Die Enzyme der RALDH-Familie sind cytosolische Proteine und besitzen eine hohe Affinität zu Retinal, wohingegen die Affinität gegenüber anderen Aldehyden (z.B. Acetaldehyd) eher gering ist (MOORE *et al.* 1998; TRYGGVASON *et al.* 2001; GRAHAM *et al.* 2006 und andere). Eine bioinformatische Untersuchung der Aminosäuresequenz der Schwamm-RALDH (4.3.1.3) lokalisiert das Protein ebenfalls im Cytoplasma (Wahrscheinlichkeit 89 % nach REINHARDT und HUBBARD 1998; 65,2 % nach KLEIN *et al.* 1985), wohingegen sich die ebenfalls homologen ALDH2-Proteine (Abb. 20) in Mitochondrien befinden. Letztere sind dort an der Umwandlung des Acetaldehyds aus dem Ethanolstoffwechsel beteiligt und zeigen nur eine geringe Affinität zu Retinal (GRAHAM *et al.* 2006). Das Schwammenzym weist im Gegensatz zu diesen ALDH2, keine Signalsequenz auf, die einen Transport in die Mitochondrien veranlässt. Schlussfolgernd kann man mit einiger Sicherheit davon ausgehen, dass es sich bei der RALDH aus *S. domuncula* um eines der ersten retinsäuregenerierenden Enzyme der Metazoa handelt. Zusammen mit der Identifizierung eines retinsäureabhängigen Rezeptors (RXR, WIENS *et al.* 2003) rechtfertigen die hier präsentierten Ergebnisse die Zweifel von CANESTRO *et al.* 2006, welche die Entstehung retinsäuremediatisierter Entwicklungsprozesse nicht als Neuheit den Chordaten zuschreiben. Ihrer Meinung nach ist diese noch vor die Abgrenzung der Deuterostomia zu datieren. Der Schwamm stellt einen geeigneten Kandidaten für eine solche Annahme dar.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Carotinoiden und Vitamin A (Retinol) vermutet. Heute ist eine Vielzahl an Enzymen bekannt, welche Carotinoide zu wichtigen Retinoiden (Retinol, Retinal und Retinsäure) metabolisieren, die während der Entwicklung bzw. des Wachstums und in visuellen Systemen benötigt werden. Das Carotinoidspaltprodukt Retinal ist z.B. nicht nur Chromophor unterschiedlichster Sehsysteme, sondern auch die Basis zur Herstellung von Retinsäure. In Chordaten steuert sie die Expression bestimmter Gene, indem sie als Ligand an Kernrezeptoren bindet. Carotinoidspaltprodukte sind damit wichtige Vorstufen von physiologisch wichtigen Substanzen.

Die vorliegende Arbeit präsentiert erstmalig eine Carotinoxigenase aus Schwämmen (*S. domuncula*), die einzigartig im Tierreich ist und nur einen orthologen Vertreter in Pflanzen (nachgewiesen für *Crocus sativus*) wiederfindet. Das Enzym aus *S. domuncula* ist eine 7,8(7',8')-Carotinoxigenase (BCO), die C<sub>40</sub>-Carotinoide zwischen den C-Atomen 7,8 spaltet. Primär entsteht daraus ein kurzkettiges C<sub>10</sub>-Spaltprodukt und 8'-Apocarotinal. Letzteres kann erneut durch die BCO zwischen den C-Atomen 7',8' gespalten werden. Mittels HPLC und entsprechenden Referenzsubstanzen wurden sowohl die Primärspaltprodukte von  $\beta$ -Carotin, Zeaxanthin und Lycopin als auch das für alle identische innere Kettenstück (Crocetin) bei Doppelspaltung nachgewiesen. Die Carotinoidzusammensetzung des Schwamms wurde untersucht, um mögliche Substrate für dieses Enzym zu identifizieren. Zu den prominenten Carotinoiden zählen  $\alpha/\beta$ -Carotin und ein weiteres, unbekanntes Carotinoid. Als Besonderheit finden sich in *S. domuncula* aromatische Carotinoide, wahrscheinlich Isorenieratin und Trikentriorhodin. Die Quantifizierung des  $\beta$ -Carotingehalts ergab mit 72,2 mg/g Frischgewicht einen ca. 400-fach höheren Gehalt von Karotten.

Ein Nachweis der BCO-Transkripte in adulten Schwämmen sowie Primmorphen (spezielle dreidimensionale Zellaggregate proliferierender Zellen) belegen eine Beteiligung des Enzyms während Entwicklungsprozessen. Inkubationen mit Metaboliten des Carotinoidstoffwechsels zeigen zudem *in-situ* sowohl eine strenge räumlich-zeitliche Regulierung als auch eine Steuerung dieses Enzyms über Rückkopplungsmechanismen. Eine Blockierung des Retinsäure generierenden Enzyms RALDH bewirkt eine Überexpression der BCO und postuliert einen direkten Zusammenhang zwischen Carotinoidmetabolismus und diesem wichtigen Morphogen.

Ein weiteres hier identifiziertes Gen aus *S. domuncula* (BCO-II) weist hohe Übereinstimmungen mit einer kürzlich entdeckten, bakteriellen Apocarotinoxigenase

(ACO) auf. Sie übernimmt das resultierende Apocarotinoid der BCO und spaltet dieses zu Retinal. Aufgrund der konservierten Elemente in der Primärstruktur der BCO-II und der Homologie zur bakteriellen ACO wird für die BCO-II von einer gleichen Funktion ausgegangen. Dies setzt allerdings voraus, dass auch im Schwamm Enzyme des Retinoidstoffwechsels (Generierung von Retinsäure aus Retinal/Retinol) vorhanden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Alkoholdehydrogenasen (RA-DH und ADH) der *short chain dehydrogenase/reductase* (SDR) Familie entdeckt, die potentiell in der Lage sind Retinol zu Retinal zu oxidieren. Die Vermutung, dass beide Enzyme als Dehydrogenase fungieren, stützt sich auf Strukturelemente der Aminosäuresequenz, die eine Präferenz für das beteiligte Coenzym NADH nahe legen. Expressionsstudien der RA-DH, unter anderem *in-situ*, weisen auf ähnliche Regulierungsmechanismen hin, wie sie für die BCO gefunden wurden.

Das entscheidende Enzym des Retinoidstoffwechsels ist eine Aldehyddehydrogenase, die Retinal irreversibel zur Retinsäure oxidiert. In dieser Arbeit konnte mit RALDH2 ein entsprechendes Gen identifiziert werden, das auf Aminosäureebene eine Übereinstimmung von über 82 % zu solchen Enzymen aufweist.

Bereits früher wurden in unserer Arbeitsgruppe retinsäurebedingte Veränderungen in *S. domuncula* festgestellt und ein Retinoid-Rezeptor (RXR) identifiziert. Zusammen mit den hier vorgestellten Ergebnissen kann mit einiger Sicherheit behauptet werden, dass in einem der ältesten, rezent vertretenen Metazoa Entwicklungsprozesse durch Retinsäure mediatisiert werden. Dies bekräftigt die Hypothese, dass eine Steuerung von Entwicklungsprozessen durch Retinsäure keine Innovation der Chordaten ist, sondern evolutiv viel früher anzusiedeln ist. Der Nachweis einer solchen Enzymmaschinerie in *S. domuncula* ist ein Hinweis, dass sich dieser Signaltransduktionsweg bereits vor mehreren Hundertmillionen Jahren entwickelt haben könnte. Weitere funktionelle Untersuchungen der hier vorgestellten Enzyme besitzen das Potential, Entwicklungsprozesse in niederen Tieren besser zu verstehen, und helfen die Spezialisierung zu dem komplexeren System der Chordaten nachzuvollziehen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Altucci L. und Gronemeyer H. (2001).** Nuclear receptors in cell life and death. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**:460-468
- Alwine J., Kemp D. und Stark G. (1977).** Methods for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA-probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5350-5354
- Audic Y. und Hartley R. (2004).** Post-transcriptional regulation in cancer. *Biol. Cell.* **96**:479-498.
- Auldridge M., McCarty D. und Klee H. (2006).** Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **9**:315-321.
- Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J. und Struhl K. (1994).** Current protocols in molecular biology. *John Wiley and Sons Inc.*, NY, USA
- Bachmann H., Desbarats A., Pattison P., Sedgewick M., Riss G., Wyss A., Cardinault N., Duszka C., Goralczyk R. und Grolier P. (2002).** Feedback Regulation of  $\beta,\beta$ -Carotene 15,15'-Monooxygenase by Retinoic Acid in Rats and Chickens. *J. Nutr.* **132**:3616-3622
- Baker M. (1996).** Unusual evolution of 11 $\beta$ - and 17 $\beta$ -hydroxysteroid and retinol dehydrogenases. *Bioessays* **18**:63-70
- Bastien J. und Rochette-Egly C. (2004).** Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-traget genes. *Gene* **328**:1-16
- Beaudoing E., Freier S., Wyatt J., Claverie J-M. und Gautheret D. (2000).** Patterns of Variant Polyadenylation Signal Usage in Human Genes. *Genome Res.* **10**:1001-1010
- Beck S. und Koester H. (1990).** Application of dioxethane chemiluminescent probes to molecular biology. *Analyt. Chem.* **62**:2258-2270
- Béjà O., Spudich E., Spudich J., Leclerc M. und DeLong E. (2001).** Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *NATURE* **411**:786-789
- Biesalski H. und Obermueller-Jevic U. (2001).** UV Light, Beta-carotene and Human Skin – Beneficial and Potentially Harmful Effects. *Arch. Biochem. Biophys.* **389**:1-6
- Blaner W. (1989).** Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr. Rev.* **10**:308-316
- Blumbach B., Diehl-Seifert B., Seack J., Steffen R., Müller I. und Müller W. (1999).** Cloning and expression of new receptors belonging to the immunoglobulin superfamily from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* **49**:751-763
- Böhm M., Schröder H., Müller I., Müller W. und Gamulin V. (2000).** The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is conserved in metazoans: Cloning and activation of p38 of the SAPK2 subfamily from the sponge *Suberites domuncula*. *Biology of the Cell.* **92**:95-104
- Bouvier F., Isner J-C., Dogbo O. und Camara B. (2005).** Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *TRENDS* **10**:187-194
- Bouvier F., Suire C., Mutterer J. und Camara B. (2003).** Oxidative remodelling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* **15**:47-62
- Bradford M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitaion of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bindin. *Anal. Biochem.* **72**:248-254
- Brown T. (1993).** Gentechnologie für Einsteiger: Grundlagen, Methoden, Anwendungen. *Spektrum, Akademischer Verlag*, Heidelberg
- Brubacher G. und Weiser H. (1985).** The vitamin A activity of beta-carotene. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **55**:5-15
- Canestro C., Postlethwait J., González-Duarte R. und Albalat R. (2006).** Is retinoic acid machinery a chordate innovation? *Evo. Devol.* **8**:394-406
- Cariello L. und Zanetti L. (1981).** A Blue Carotenoprotein form the Marine Sponge *Suberites domuncula*: Purification and Properties. *Marine Biol.* **62**:151-155
- Cariello L. und Zanetti L. (1981).** A Blue Carotenoprotein from the Marine Sponge *Suberites domuncula*: Purification and Properties. *Marine Biol.* **62**:151-155
- Cavalier-Smith T., Allsopp M., Chao E., Boury-Esnault N. und Vacelet, J. (1996).** Sponge phylogeny, animal monophyly, and the origin of the nervous system: 18S rRNA evidence. *Can. J. Zool.* **74**:2031-2045

- Chai X., Zhai Y. und Napoli J. (1997).** cDNA cloning and characterization of a cis-retinol/3 $\alpha$ -hydroxysterol short-chain dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**:33125-33131
- Chelly J., Concordet J., Kaplan J. und Kahn A. (1989).** Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:2617-2621
- Chen Z., Lee W. und Chang S. (1991).** Role of aspartic acid 38 in the cofactor specificity of Drosophila alcohol dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **202**:263-267
- Chew B. und Park J. (2004).** Carotenoid Action on the Immune Response. *J. Nutr.* **134**:257-261
- Clagett-Dame M. und DeLuca H. (2002).** The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development *Annu. Rev. Nutr.* **22**:347-381
- Clark J. (1988).** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl. Acids Res.* **16**:9677-9686
- Clarke L. und Carbon J. (1976).** A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* **9**:91-99
- Cline J., Braman J. und Hogrefe H. (1996).** PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**:3546-3551
- Conne B., Stutz A. und Vassalli J. (2000).** The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nature Med.* **6**:637-641.
- Cypionka H. (1999).** Grundlagen der Mikrobiologie, *Springer-Verlag* Berlin und Heidelberg
- Demmig-Adams B. und Adams W. III (2002).** Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. *Science* **298**:2149-2153
- Didierjean L., Tran C., Sorg O. und Saurat J-H. (1999).** Biological Activities of Topical Retinaldehyde. *Dermat.* **1**:19-24
- Donaldson J., McGovern T. und Laddy T. (1990).** Floral attractants for the Cetoniinae and Rutelinae (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Econ. Entomol.* **83**:1470-1476
- Duester G. (2000).** Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function Production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267**:4315-4324
- Duester G., Farrés J., Felder M., Holmes R., Höög J-O., Parés X., Plapp B., Yin S-J. und Jörnvall H. (1999).** Recommended nomenclature for the vertebrate alcohol dehydrogenase family. *Biochem. Pharmacol.* **58**:389-395
- Duester G., Mic F. und Molotkov A. (2003).** Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem. Biol. Interact.* **143-144**:201-210
- During A. und Harrison E. (2004).** Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. *Arch. Biochem. Biophys.* **430**:77-88
- Eimjhellen K. (1967).** Photosynthetic bacteria and carotenoids from a sea sponge *Halichondrium panicea* *Acta Chem. Scand.* **21**:2280-2281
- Elliot R. (2005).** Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. *Biochim. Biophys. Acta* **1740**:147-154
- Evans P. und Halliwell B. (2001).** Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr.* **85**:67-74
- Fidge N., Smith F., Goodman D. (1969).** Vitamin A and carotenoids. The enzymatic conversion of beta-carotene into retinal in hog intestinal mucosa. *Biochem. J.* **114**:689-694
- Flath R., Cunningham R., Liquido N. und McGovern T. (1994).** Alpha-ionol as attractant for trapping *Batrocera latifrons* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* **87**:1470-1476
- Friedman M., Henika P., Levin C. und Mandrell R. (2004).** Antibacterial Activities of Plant Essential Oils and Their Components against *Escherichia coli* 0175:H7 and *Salmonella enterica* in Apple Juice. *J. Agric. Food Chem.* **52**:6042-6048
- Gilmartin G. (2005).** Eukaryotic mRNA 3' processing: a common means to different ends. *Genes Dev.* **19**:2517-1521
- Giuliano G., Al-Babili S. und von Lintig J. (2003).** Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *TRENDS* **8**:145-149
- Glass D. B. und Smith S. B. (1989).** Phosphorylation by cyclic GMP-dependent protein kinase of a synthetic peptide corresponding to the autophosphorylation site in the enzyme. *J. Biol. Chem.* **258**:14797-14803
- Glover J. und Redfearn E. (1954).** The mechanism of the transformation of  $\beta$ -carotene into vitamin A *in vivo*. *Biochem. J.* **58**:15-16
- Goodman D., Huang H. (1965).** Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzyme. *Science* **149**:879-880

- Graham C., Brocklehurst K., Pichersgill R. und Warren M. (2006).** Characterization of retinaldehyde dehydrogenase 3. *J. Biochem.* **394**:67-75
- Gundacker D., Leys S. P., Schröder H. C., Müller I. M. und Müller W. E. G. (2001).** Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. *Glycobiol.* **11**:21-29
- Halliwell B. (1996).** Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic. Res.* **25**:57-74
- Hanahan D. (1983).** Studies of the transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580
- Hansen L., Sigman C., Andreola F., Ross S., Kelloff G. und De Luca L. (2000).** Retinoids in chemoprevention and differentiation therapy. *Carcinogenesis* **21**:1271-1279
- Helling R., Goodman H. und Boyer H. (1974).** Analysis of R. EcoRI fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose gelelectrophoresis. *J. Virol.* **14**:1235-1244
- Hochuli E., Dobeli H. und Schacher A. (1987).** New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* **18**:177-184
- Holland L. (2005).** Non-neural ectoderm is really neural: evolution of developmental patterning mechanisms in the non-neural ectoderm of chordates and the problem of sensory cell homologies. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **304**:304-323
- Huang D-Y. und Ichikawa Y. (1997).** Purification and characterization of a novel cytosolic NADP(H)-dependent retinol oxidoreductase from rabbit liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1338**:47-59
- Hyatt G., Schmitt E., Fadool J. und Dowling J. (1996).** Retinoic acid alters photoreceptor development *in vivo*. *PNAS* **93**:13298-13303
- Isken A., Holzschuh J., Lampert J., Fischer L., Oberhauser V., Palczewski K. und von Lintig J. (2007).** Sequestration of Retinyl Esters Is Essential for Retinoid Signaling in the Zebrafish Embryo. *J. Biol. Chem.* **282**:1144-1151
- Jin M., Li S., Moghrabi W., Sun H. und Travis G. (2005).** Rpe65 Is the Retinoid Isomerase in Bovine Retinal Pigment Epithelium. *Cell* **122**:449-459
- Johnston G., Eisen H. und Fry D. (1991).** An evaluation of several adjuvant emulsion regimens for the production of polyclonal antisera in rabbits. *Lab. Anim. Sci.* **41**:15-21
- Jörnvall H. und Höög J-O. (1995).** Nomenclature of alcohol dehydrogenases. *Alcohol Alcohol.* **30**:153-61
- Jörnvall H., Persson B., Krook M., Atrian S., González-Duarte R., Jeffery J. und Ghosh D. (1995).** Short-Chain Dehydrogenases/Reductases (SDR). *Biochem.* **34**:6003-6013
- Jung K., Trivedi V. und Spudich J. (2003).** Demonstration of a sensory rhodopsin in Eubacteria. *Mol. Microbiol.* **47**:1513-1522
- Karrer P., Helfenstein A., Wehrli H., Wettstein A. (1930).** Über die Konstitution des Lycopins und Carotins. *Helv. Chim. Acta.* **13**:1084-1099
- Kedishvili N., Bosron W., Stone C., Hurley T., Peggs C., Thomasson H., Popov K., Carr L., Edenberg H. und Li T. (1995).** Expression and kinetic characterization of recombinant human stomach alcohol dehydrogenase. Active-site amino acid sequence explains substrate specificity compared with liver isozymes. *J. Biol. Chem.* **270**:3625-3630
- Kiefer C., Hessel S., Lampert J., Vogt K., Lederer M., Breithaupt S. und von Lintig J. (2001).** Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J. Biol. Chem.* **276**:14110-14116
- Klein P., Kanehisa M. und DeLisi C. (1985).** Prediction of protein function from sequence properties. Discriminant analysis of a data base. *Biochim. Biophys. Acta* **787**:221-226
- Klör S. und Schulz G. (2006).** Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**:2291-2303
- Kozak M. (1991).** Structural features in eucaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* **266**:19867-19870
- Kozak M. (1997).** Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol. Cell. Biol.* **7**:3428-3445
- Koziol C., Borojevic R., Steffen R. und Müller W. (1998).** Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal- to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech. Ageing Dev.* **100**:107-120
- Kraay G., Zapata M. und Veldhuis M. (1992).** Separation of chlorophylls c1, c2, and c3 of marine phytoplankton by reversed-phase-C18-high-performance liquid chromatography. *J. Phycol.* **28**:708-712

- Kreil G. (1984).** Occurrence, detection, and biosynthesis of carboxy-terminal amides *Methods Enzymol.* **106**:218-223
- Krinsky N. und Johnson E. (2005).** Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Asp. Med.* **26**:459-516
- Kruse M., Gamulin H., Cetkovic H., Pancer Z., Müller I. und Müller W. (1996).** Molecular evolution of the metazoan protein kinase C multigene family. *J. Mol. Evol.* **43**:374-383
- Kruse M., Steffen R., Batel R., Müller I. und Müller W. (1999).** Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponges. *J. Cell Sci.* **112**:4305-4313
- Laemmli U. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
- Lafay B., Boury-Esnault N., Vacelet J. und Chrsiten R. (1992).** An analysis of partial 28S ribosomal RNA sequences suggests early radiation of sponges. *Biosystems* **28**:139-151
- Lampert J., Holzschuh J., Hessel S., Driever W., Vogt K. und von Lintig J. (2003).** Provitamin A conversion to retinal via the  $\beta,\beta$ -carotene-15,15'-oxygenase (bcx) is essential for pattern formation and differentiation during zebrafish embryogenesis. *Dev.* **130**:2173-2186
- Lee C., Boileau A., Boileau T., Williams A., Swanson K., Heitz K. und Erdman, Jr. J. (1999).** Review of Animal Models in Carotenoid Research. *J. Nutr.* **129**:2271-2777
- Lee N. (1980).** Molecular Aspects of ara Regulation. In: The Operon. Miller J. und Reznikoff W. (eds) *Cold Spring Harbor, N.Y* pp. 389-410
- Lee N., Francklyn C. und Hamilton E. (1987).** Arabinose-Induced Binding of AraC Protein to araI2 Activates the araBAD Operon Promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:8814-8818
- Leuenberger M., Engeloch-Jarret C. und Woggon W. (2001).** The reaction mechanism of the enzyme-catalyzed central cleavage of beta-carotene to retinal. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**:2613-2617.
- Li J., Parker B. und Kowalik T. (1987).** Rapid alkaline blot-transfer of viral dsRNAs. *Anal. Biochem.* **163**:210-218
- Liaaen-Jensen S. (1967).** Recent advances in the chemistry of natural carotenoids *Pure Appl. Chem.* **14**:227-244
- Liaaen-Jensen S. (1991).** Marine carotenoids: recent progress. *Pure Appl. Chem.* **63**:1-12
- Lidén M. und Eriksson U. (2006).** Understanding Retinol Metabolism: Structure and Function of Retinol Dehydrogenases
- Lindahl R. (1992).** Aldehyde dehydrogenases and their role in corcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**:283-335
- Lindqvist A. und Andersson S. (2002).** Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *J. Biol. Chem.* **277**:23942-2348
- Lohr M. (2001).** Beziehungen zwischen den Xanthophyllzyklen und der Biosynthese von Lichtsammelxanthophyllen in Chlorophyll a/c-haltigen Algen. *Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*
- Lotan R. (1996).** Retinoids in cancer chemoprevention. *FASEB J.* **10**:1031-1039
- MacTavish H., Davies N. und Menary R. (2000).** Emission of Volatiles From Brown Boronia Flowers: Some Comparative Observations. *Ann. Bot.* **86**:347-354
- Mangelsdorf D. und Evans R. (1995).** The RXR Heterodimers and Orphan Receptors. *Cell* **83**:841-850
- Mangelsdorf D., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schuetz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. und Evans R. (1995).** The Nuclear Receptor Super-Family: The Second Decade. *Cell* **83**:835-839
- Manzanares M., Wada H., Itasaki N., Trainor P., Krumlauf R. und Holland P. (2000).** Conservation and elaboration of Hox gene regulation during evolution of the vertebrate head. *Nature* **408**:854-857
- Marshall H., Studer M., Popperl H., Aparicio S., Kuroiwa A., Brenner S. und Krumlauf R. (1994).** A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene Hoxb-1. *Nature*:**370**:567-571
- Matsuno T. (1995).** Aryl carotenoids from the marine sponge *Suberites sericeus*. In: Britton G., Liaaen-Jensen S. und Pfander H. (eds) Carotenoids. Example 4: Invertebrate Animals. *Birkhäuser Verlag Berlin.* pp. 239-242
- Matsuno T. (2001).** Aquatic animal carotenoids. *Fish. Science* **67**:771-783

- Matsuno T., Maoka T., Katagiri K. und Komori T. (1984).** A new carotenoid, isorenieradicistene from the sea sponge *Suberites sericeus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **50**:1071-1075
- Matsuzaka Y., Okamoto K., Tsuji H., Mabuchi T., Ozawa A., Tamiya G. und Inoko H. (2002).** Identification of the hRDH-E2 gene, a novel member of the SDR family, and its increased expression in psoriatic lesion. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **297**:1171-1180
- McBee J., van Hooser J., Jang G-F. und Palczewski K. (2001).** Isomerization of 11-cis-Retinoids to All-trans-retinoids *in Vitro* and *in Vivo*. *J. Biol. Chem.* **276**:48483-48493
- McDonell M. und Studier M. (1977).** Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* **110**:119-146
- Mehta K. (2003).** Retinoids as regulators of gene transcription. *J. Biol. Regul. Homeost Agents.* **17**:1-12
- Mohan R. und Heyman R. (2003).** Orphan Nuclear Receptor Modulators. *Curr. Topics Med. Chem.* **3**:1637-1647
- Molotkov A. und Duester G. (2003).** Genetic Evidence that Retinaldehyde Dehydrogenase Raldh1 (Aldh1a1) Functions Downstream of Alcohol Dehydrogenase Adh1 in Metabolism of Retinol to Retinoic Acid. *J. Biol. Chem.* **278**:36085-16090
- Moore S., Baker H., Blythe T., Kitson K., Kitson T. und Baker E. (1998).** Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* **6**:1541-1551
- Moore T. (1930).** Vitamin A and carotene. VI The conversion of carotene to vitamin A *in vivo*.
- Morris-Kay G. und Ward S. (1999).** Retinoids and Mammalian development. *Int. Rev. Cytol.* **188**:73-131
- Mülhardt C. (2003).** Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Kapitel 4: Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg
- Müller C., Blumbach B., Krasko A. und Schröder H. (2001).** Receptor protein-tyrosine phosphatases: origin of domains (catalytic domain, Ig-related domain, fibronectin type III module) based on the sequence of the sponge *Geodia cydonium*. *Gene.* **262**:221-230
- Müller W. (1995).** Molecular phylogeny of Metazoa (animals): monophyletic origin. *Naturwissenschaften* **82**:321-329
- Müller W. (2001).** How was metazoan threshold crossed? The Hypothetical Urmetazoa. *Comp. Biochem. Phys. Part A.* **129**:433-460
- Müller W., Diehl-Seifert B., Sobel C., Bechtold A., Kljajic Z und Dorn A. (1986).** Sponge secondary metabolites: biochemical and ultrastructural localization of the antimetabolic agent avarol in *Dysidea avara*. *J. Histochem. Cytochem.* **34**:1687-90
- Müller W., Krasko A., Skorokhod A., Bünz C., Grebenjuk V., Steffen R., Batel R., Müller I. und Schröder H. (2002).** Histocompatibility reaction in the sponge *Suberites domuncula* on tissue and cellular level: central role of the allograft inflammatory factor 1. *Immunogenetics* **54**:48-58
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. und Ehrlich H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**:263-273
- Nagao N. und Olson J. (1994).** Enzymatic formation of 9-cis, 13-cis, and all-trans retinals from isomers of beta-carotene. *FASEB J.* **12**:968-973
- Napoli J. und Race K. (1988).** Biogenesis of retinoic acid from beta-carotene. Differences between the metabolism of beta-carotene and retinal. *J. Biol. Chem.* **263**:17372-17377.
- Napoli J., Posch K., Fiorella P. und Boerman M. (1991).** Physiological occurrence, biosynthesis and metabolism of retinoic acid: evidence for roles of CRBP and CRABP in the pathway of retinoic acid homeostasis. *Biomed. Pharmacother.* **45**:131-143
- Niederreither K., Abu-Abed S., Schuhbauer B., Petkovich M., Chambon P. und Dolle P. (2002).** Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat. Genet.* **31**:84-88
- Olson J. und Krisnky N. (1995).** Introduction: the colourful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *FASEB J.* **9**:1547-1550
- Olson J., Hayaishi O. (1965).** The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **54**:1364-1370
- Ong D. (1994).** Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr. Rev.* **52**:24-31
- Pahler S., Blumbach B., Müller I. und Müller W. (1998).** A putative multiadhesive basal lamina protein from the marine sponge *Geodia cydonium*: cloning of the cDNA encoding a fibronectin-, an SRCR- as well as a complement control protein module. *J. Exp. Zool.* **282**:332-343



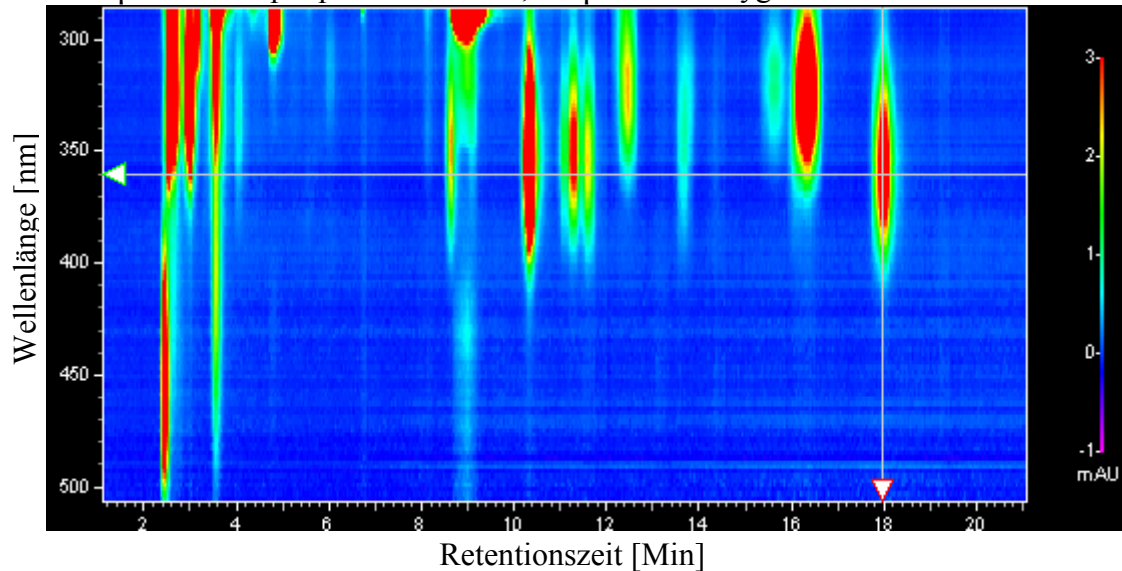
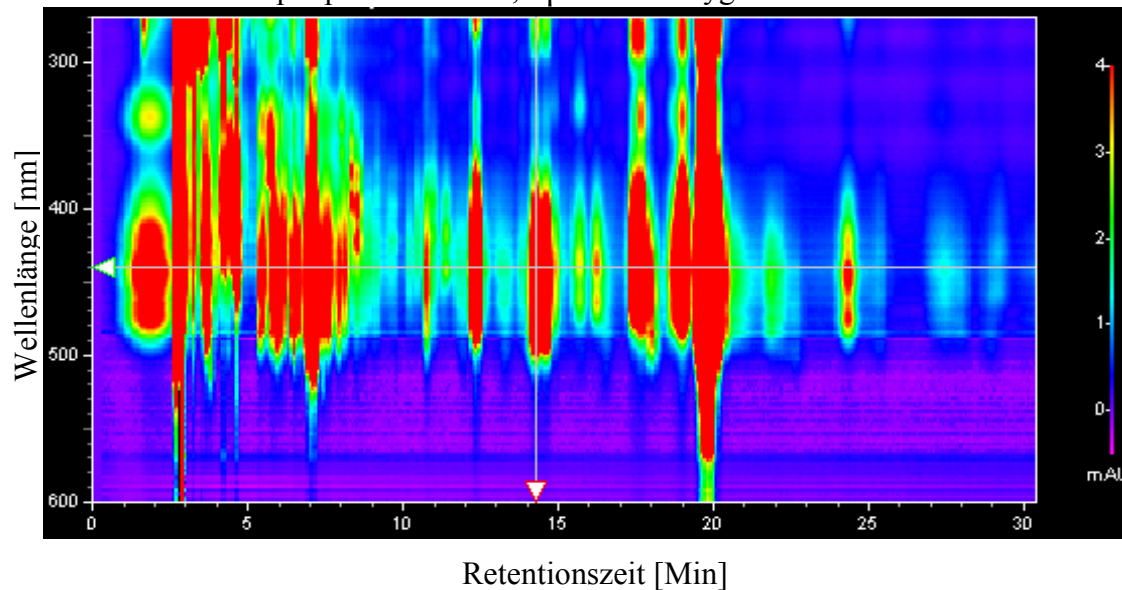
- Palmer L. (1919).** Carotenoids as Fat-Soluble Vitamin. *Science* **50**:501-502
- Palmer L. und Kennedy C. (1921)** The relation of plant carotinoids to growth and reproduction of albino rats. *J. Biol. Chem.* **46**:559-577
- Pancer Z., Kruse M., Müller I. und Müller W. (1997).** On the origin of the adhesion receptors of metazoa: cloning of the integrin  $\alpha$  subunit cDNA from the sponge *Geodia cydonium*. *Mol. Bio. Evol.* **14**:391-398
- Paranagamal P., Abeysekeral K., Abeywickrama K. und Nugaliyadde L. (2003).** Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters Appl. Microbiol.* **37**:86-90
- Parker R. (1996).** Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J.* **10**:542-551
- Peng S., Chen C-Y. und Shyu A-B. (1996).** Functional Characterization of a Non-AUUUA AU-Rich Element from the c-jun Proto-Oncogene mRNA: Evidence for a Novel Class of AU-Rich Elements. *Mol. Cell. Biol.* **16**:1490-1499.
- Perozich J., Nicholas H., Wang B., Lindahl R. und Hempel J. (1999).** Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci.* **8**:137-146
- Persson B., Zigler J. Jr. und Jörnvall H. (1994).** A super-family of medium-chain dehydrogenases/reductases (MDR) – Sub-lines including zeta-crystallin, alcohol and polyol dehydrogenases, quinone oxidoreductases, enoyl reductases, VAT-1 and other proteins. *Eur. J. Biochem.* **226**:15-22
- Pfeifer K., Haasemann M., Gamulin V., Bretting H., Fahrenholz F. und Müller W. (1993).** S-type lectins occur also in invertebrates: unusual subunit composition and high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiol.* **3**:179-184.
- Qin X. und Zeevaart J. (1999).** The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory Step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *PNAS.* **96**:15354-15361
- Reijntjes S., Blentic A., Gale E. und Maden M. (2005).** The control of morphogen signalling: regulation of the synthesis and catabolism of retinoic acid in the developing embryo. *Dev. Biol.* **285**:224-237
- Reinhardt A. und Hubbard T. (1998).** Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res.* **26**:2230-2236
- Reitner J. und Mehl D. (1995).** Early Paleozoic diversification of sponges: new data and evidences. *Geol. Paläontol. Mitt.* **20**:335-347
- Rohwedel J., Guan K. und Wobus A. (1999).** Induction of Cellular Differentiation by Retinoic Acid *in vitro*. *CTO* **165**:190-202
- Rohwedel J., Guan K. und Wobus A (1999).** Induction of Cellular Differentiation by Retinoic Acid *in vitro*. *Cells Tissues Organs* **165**:190–202
- Ross S., McCaffery P., Drager U. und De Luca L. (2000).** Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* **80**:1021-1054
- Ruch S., Beyer P., Ernst H. und Al-Babili S. (2005).** Retinal biosynthesis in Eubacteria: *in vitro* characterization of a novel carotenoid oxygenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* **55**:1015-1024.
- Rychilk W. (1995).** Priming efficiency in PCR. *Biotechniques.* **18**:84-86 ; 88-90
- Rychilk W. und Rhodes R. (1989).** A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**:8543-51
- Saari J. (2000).** The sights along route 65. *Nature* **29**:8-9
- Saiki R. K. (1989).** PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Erlich, H. A., ed.) S. 17, *Stockton Press*, New York
- Saiki R. K., Scharf S. J., Falloona F. Mullis K. B., Horn G. T. Erlich H. A. und Arnheim N. (1985).** Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**:1305-1354
- Salvatore A., Borkosky S., Willink E. und Bardón A. (2004).** Toxic effects of lemon peel constituents on *Ceratitidis Capitata*. *J. Chem. Ecol.* **30**:323-333
- Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**:5463-5467
- Schäcke H., Rinkevich B., Gamulin V., Müller I. und Müller W. (1994).** Immunoglobulin-like domain is present in the extracellular part of the receptor tyrosine kinase from the marine sponge *Geodia cydonium*. *J. Mol. Recognition.* **7**:27-276

- Schmidt H., Kurtzer R., Eisenreich W. und Schwab W. (2006).** The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. *J. Biol. Chem. Papers in press*: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M511668200>
- Schröder H., Krasko A., Batel R., Skorokhod A., Pahler S., Kruse M., Müller I. und Müller W. (2002).** Stimulation of protein (collagen) synthesis in sponge cells by a cardiac myotrophin-related molecule from *Suberites domuncula*. *FASEB J.* **14**:2022-2031
- Schütze J., Reis-Custodio M., Efremova S., Müller I. und Müller W. (1999).** Evolutionary relationship of Metazoa within the eukaryotes based on molecular data from Porifera. *Proc. Royal Soc. London. B* **266**: 63-73
- Schwartz S., Tan B., Gage D., Zeevaart J. und McCarty D. (1997).** Specific Oxidative Cleavage of Carotenoids by VP14 of Maize. *Science* **276**:1872-1874
- Schwartz S., Qin X. und Leowen M. (2004).** The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J. Biol. Chem.* **279**:46940-46945
- Seack J., Kruse M. und Müller W. (1998).** Evolutionary analysis of G-proteins in early metazoans: Cloning of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits from the sponge *Geodia cydonium*. *Biochim. Biophys. Acta* **1401**:93-103
- Seack J., Pancer Z., Müller I., Müller W. (1997).** Molecular cloning and primary structure of an Rh (Rhesus) antigen-like protein from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* **46**:493-498
- Sharma R., Mathur S. und Dmitrovskii A. (1977).** Studies on the metabolism of  $\beta$ -carotene and Apo- $\beta$ -carotenoids in rats and chickens. *Biochim. Biophys. Acta* **486**:183-194
- Shilling T. und Knight R. (2001).** Origins of anteroposterior patterning and Hox gene regulation during chordate evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**:1599-1613
- Shimeld S. (1996).** Retinoic acid, hox genes and the anterior-posterior axis in chordates. *BioEssays* **18**:613-616
- Short J., Fernandez J., Sorge J. und Huse W. (1988).** Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids. Res.* **16**:7583-7600
- Simkin A., Underwood B., Aldridge M., Loucas H., Shibuya K., Schmelz E., Clark D. und Klee H. (2004).** Circadian Regulation of the PhCCD1 Carotenoid Cleavage Dioxygenase Controls Emission of Ionone, a Fragrance Volatile of Petunia Flowers. *Plant Physiol.* **136**:3504-3514
- Spudich J. (1998).** Variations on a molecular switch: transport and sensory signalling by archaeal rhodopsins. *Mol. Microbiol.* **28**:1051-1058
- Spudich J., Yang C., Jung K. und Spudich E. (2000).** Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**:365-392
- Takatsuka J., Takahashi N. und De Luca L. (1996).** Retinoic acid metabolism and inhibition of cell proliferation: an unexpected liaison. *Cancer Res.* **56**:675-678
- Thein S., Lynch J., Weatherall D. und Wallace R. (1986).** Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides. *Lancet* **1**:93
- Towbin H., Staehelin T. und Gordon J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**:4350-4354
- Tryggvason K., Romert A. und Eriksson U. (2001).** Biosynthesis of 9-*cis*-Retinoic Acid *in Vivo*: The roles of different retinol dehydrogenases and a structure activity analysis of microsomal retinol dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **276**:19253-19258
- Underwood B. (2004).** Vitamin A deficiency disorders: international efforts to control a preventable "pox". *J. Nutr.* **134**:231-236
- Uriz M., Turon X. und Becerro M. (2000).** Silica deposition in demosponges: spiculogenesis in *Crambe crambe*. *Cell Tissue Res.* **301**:299-309
- von Lintig J. und Vogt K. (2000).** Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J. Biol. Chem.* **275**:11915-11920.
- von Lintig J. und Wyss A. (2001).** Molecular analysis of vitamin A formation: cloning and characterization of beta-15,15'-dioxygenases. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**:47-52
- von Lintig J., Hessel S., Isken A., Kiefer C., Lampert J., Voolstra O. und Vogt K. (2005).** Towards a better understanding of carotenoid metabolism in animals. *Biochim. Biophys. Acta* **1740**:122-131
- Wada H. (2001).** Origin and evolution of the neural crest: a hypothetical reconstruction of its evolutionary history. *Dev. Growth Differ.* **43**:509-520

- Wagner-Hülsmann C., Bachinski N., Diehl-Seifert B., Blumbach B., Steffen R., Pancer Z. und Müller W. (1996).** A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge [*Geodia cydonium*] system. *Glycobiol.* **6**:785-793
- Wang J., Chai X., Eriksson U. und Napoli J. (1999).** Activity of human 11-cis-retinol dehydrogenase (Rdh5) with steroids and retinoids and expression of its mRNA in extra-ocular human tissue. *Biochem. J.* **338**:23-27
- Wang X., Russel R., Liu C., Stickel F., Smith D. und Krinsky D. (1996).** Beta-oxidation in rabbit liver *in vitro* and in the perfused ferret liver contributes to retinoic acid biosynthesis from beta-apocarotenoids. *J. Biol. Chem.* **271**:26490-26598
- Ward G. (1984).** Multiple functions of Vitamin A. *Physiol. Rev.* **64**:873-937
- Weber K. und Osborn M. (1969).** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**:4406-4412
- Wehner R. und Gehring W. (1995).** Zoologie, 23. Auflage. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York.* 626-632
- Westermeier R., Gronau S. und Schickle H. (1989).** Semidry-Blotting von Proteinen aus SDS- und IEF-Polyacrylamidgelen. *Pharmacia*, Freiburg, Sonderdruck SD 072
- Westheide W. und Rieger R. (1996).** Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere. *Gustav Fischer Verlag, Jena & Stuttgart & New York.* 75-119
- Wiens M., Batel R., Korzhev M. und Müller W. (2003).** Retinoid X receptor and retinoic acid response in the marine sponge *Suberites domuncula*. *J. Exp. Biol.* **206**:3261-3271
- Wiens M., Mangoni A., D'Esposito M., Fattorusso E., Korchagina N., Schröder H., Grebenjuk V., Krasko A., Batel R., Müller I. und Müller W. (2003).** The molecular basis for the evolution of the metazoan bodyplan: extracellular matrix-mediated morphogenesis in marine demosponges. *J. Mol. Evol.* **57**:60-75
- Wiens M., Seack J., Koziol C., Hassanein H., Steffen R., Korzhev M., Schröder H. und Müller (1999).** 17[beta]-Estradiol-dependent regulation of chaperone expression and telomerase activity in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Mar. Biol.* **133**:1-10
- Willmer P. (1994).** Invertebrate relationships. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Woggon W. (2002).** Oxidative cleavage of carotenoids catalyzed by enzyme models and beta-carotene 15,15'-monooxygenase. *Pure Appl. Chem.* **74**:1397-1408.
- Wyss A. (2004).** Carotene Oxygenases: A New Family of Double Bond Cleavage Enzymes. *J. Nutr.* **134**:246-250
- Wyss A., Wirtz G., Woggon W., Brugger R., Wyss M., Friedlein A., Bachmann H. und Hunziker W. (2000).** Cloning and expression of beta,beta-carotene 15,15'-dioxygenase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **271**:334-336
- Yan W., Jang G-F., Haeseleer F., Esumi N., Chang J., Kerrigan M., Campochiaro M., Campochiaro P., Palczewski K. und Zack D. (2001).** Cloning and characterization of a human  $\beta,\beta$ -carotene-15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium. *Genomics* **72**:193-202
- Yang Z., Davis G., Hurley T., Stone C., Li T. und Bosron W. (1994).** Catalytic efficiency of human alcohol dehydrogenases for retinol oxidation and retinal reduction. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **18**:587-591
- Zarkower D., Stephenson P., Sheets M. (1986).** The AAUAAA sequence is required both for cleavage and for polyadenylation of simian virus pre-mRNA *in vitro*. *Mol. Cell. Bio.* **6**:2317-2323
- Zhang L-X., Cooney R. und Bertram J. (1991).** Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogen.* **12**:2109-2114
- Zhao J., Hyman L. und Moore C. (1999).** Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:405-445

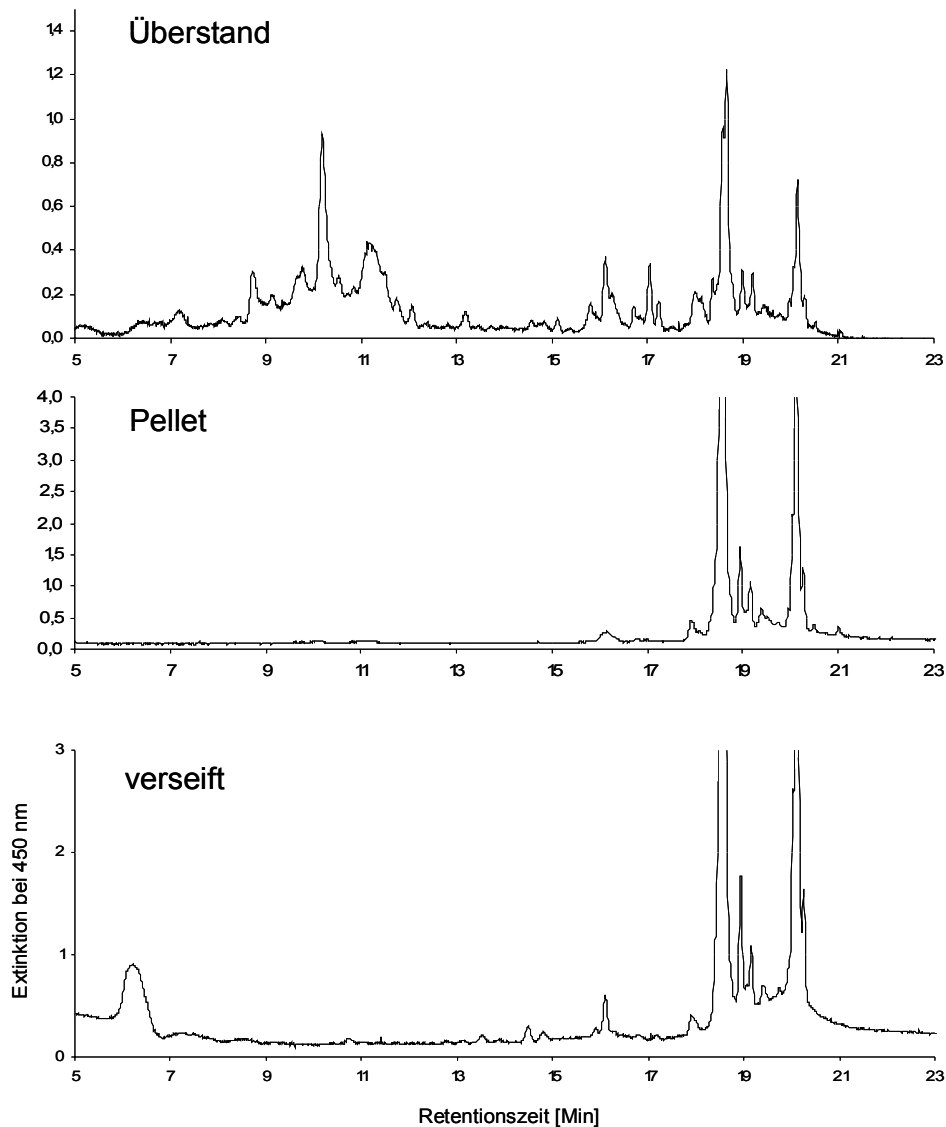
## 8 APPENDIX

## APPENDIX 1

 $\beta$ -Carotin-Spaltprodukte der 15,15'- $\beta$ -Carotinoxygenase aus dem MenschZeaxanthinspaltprodukte der 7,8- $\beta$ -Carotinoxygenase aus dem Schwamm

**Appendix 1:** Vergleich der Spaltprodukte einer 15,15'- $\beta$ -Carotinoxygenase aus dem Mensch und der 7,8- $\beta$ -Carotinoxygenase aus dem Schwamm. **Oben:** Spaltprodukte von  $\beta$ -Carotin durch die Oxygenase aus dem Mensch. **Unten:** Spaltprodukte von Zeaxanthin durch die Oxygenase aus dem Schwamm. Die Extinktionen in beiden Chromatogrammen (Mensch bzw. Schwamm) zwischen der 2. und 3. Minute entsprechen dem  $\beta$ -Carotin. Im Chromatogramm des Schwamms ist das Zwischenprodukt der Zeaxanthinsynthese in der 6-7. Minute (Cryptoxanthin) und Zeaxanthin in der 20. Minute zu erkennen. Verbleibende Substanzen sind sowohl Spaltprodukte des Zeaxanthins, als auch von Carotinoidzwischenprodukten dieses Synthesewegs (z.B. evtl. einseitig zyklisiertes und dann gespaltenes Lykopen).

## APPENDIX 3

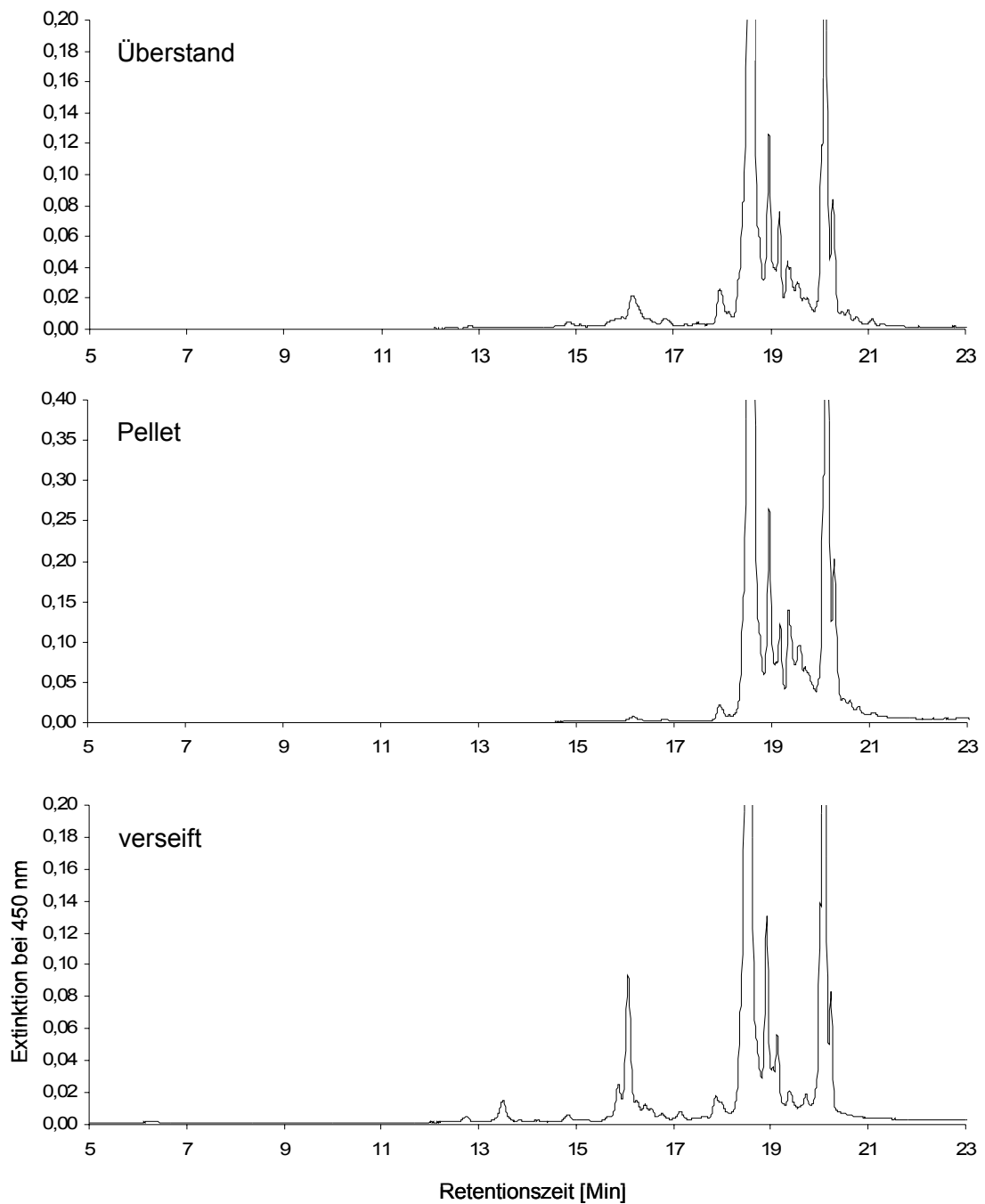


**Appendix 2 :** Ergebnis der HPLC-Pigmentextraktanalyse eines blauen *S. domuncula*: Gegenüberstellung der Gesamtcarotinoide im Schwamm vor bzw. nach Verseifung, um mögliche Carotinoidester zu identifizieren. Im hier verwendeten polareren Laufmittel fiel ein Teil der extrahierten Pigmente aus (Pellet) und wurde getrennt untersucht. Die Chromatogramme Überstand und Pellet entsprechen also den Pigmenten einer Probe. Im Chromatogramm „verseift“ wurde der Pigmentextrakt vor der Aufnahme in Laufmittel verseift

**MATERIAL: HPLC:** WATERS mit Pumpeneinheit und Niederdruckmischkammer (WATERS 600-MS), Autosampler (WATERS 717), Photodiodenarray (PDA-)Detektor (WATERS 996). Steuerung und Prozessierung erfolgte computergestützt (NEC Power-Mate 486/66i) unter Verwendung der Software Millennium 2.0 (WATERS). **Säule:** reversed phase Typ ET 250/4 Nucleosil 300-5 C18 (MACHERY-NAGEL, Düren). **Laufmittel:** verwendet wurde ein tenärer Gradient aus 3 Gemischen; Eluent (A) 85 % MetOH / 15 % H<sub>2</sub>O / 0,5 M Ammoniumacetat, Eluent (B) 90 % Acetonitril / 10 % H<sub>2</sub>O, Eluent (C) Ethylacetat 100 %.

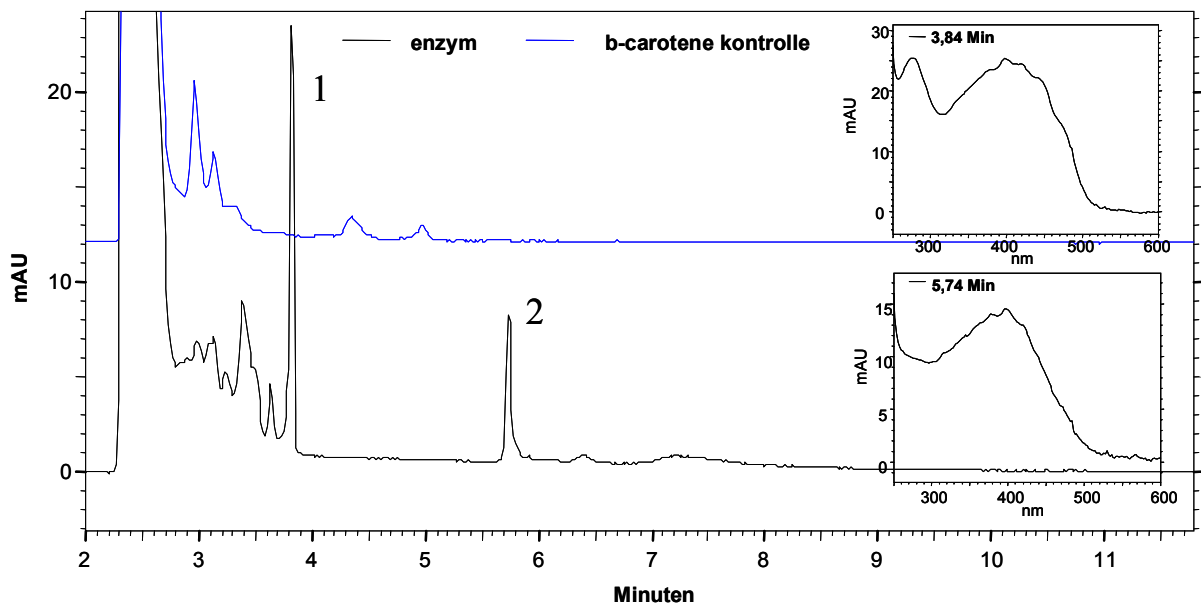
**METHODIK:** Die Schwammpigmente wurden wie in 3.27.1 extrahiert und bis zur Trockene eingengt. Anschließend in 20 µL Chloroform aufgenommen, mit 400 µL **Extraktionslösung** (Methanol/H<sub>2</sub>O/Ethylacetat im Verhältnis 90:10:11, gepuffert mit 0,18 M Ammoniumacetat; LOHR 2001) versetzt, gemischt, 40 µL H<sub>2</sub>O zugegeben und mit 120000 x g abzentrifugiert. 200 µl des Überstands wurden in die HPLC injiziert. Das resultierende Pellet wurde in 20 µL Ethylacetat aufgenommen, mit 100 µl Extraktionslösung versetzt, abzentrifugiert und 100 µL injiziert. **Verseifung:** 20 µL des in Chloroform aufgenommenen Pigmentextrakts wurden mit 0,5 mL Ethanol versetzt, 2 mL methanolische 10 %ige KOH zugegeben, gemischt und im Dunkeln bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend 20 µL Ethylacetat, 400 µL Extraktionslösung und 20 µL H<sub>2</sub>O zugegeben, zentrifugiert und 100 µL injiziert. **HPLC:** Es wurde ein tenärer Laufmittelgradient mit konstanter Flussrate verwendet (KRAAY *et al.* 1992)

## APPENDIX 3



**Appendix 3** : Ergebnis der HPLC-Pigmentextraktanalyse eines roten *S. domuncula*: Gegenüberstellung der Gesamtcarotinoide im Schwamm vor bzw. nach Verseifung, um mögliche Carotinoidester zu identifizieren. Im hier verwendeten polareren Laufmittel fiel ein Teil der extrahierten Pigmente aus (Pellet) und wurde getrennt untersucht. Die Chromatogramme „Überstand“ und „Pellet“ entsprechen also den Pigmenten einer Probe. Im Chromatogramm „verseift“ wurde der Pigmentextrakt vor der Aufnahme in Laufmittel verseift  
Material und Methodik siehe Appendix 2

## APPENDIX 4

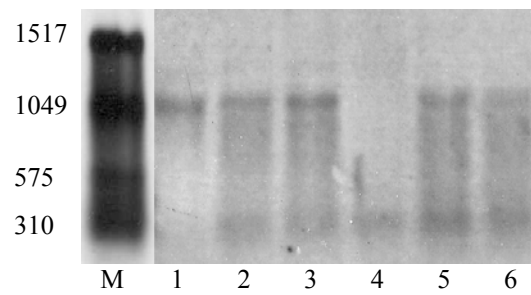


**Appendix 4:** *In vitro* Spaltversuch mit dem Reinsubstrat  $\beta$ -Carotin und der rekombinanten BCO aus *S. domuncula*: Dargestellt sind die Normalphasen-Chromatogramme der Reinsubstanz  $\beta$ -Carotin (blau) und des Enzymtestansatzes mit der BCO (schwarz). Methodik siehe 3.25.3. Durch die Enzymeinwirkung sind zwar zwei Substanzen nachweisbar, die sich anhand ihrer Spektren aber nicht zuordnen lassen. Es handelt sich wahrscheinlich um Oxidationsprodukte des  $\beta$ -Carotins, die durch die Inkubation bei 37 °C entstanden sind.

## APPENDIX 5

**Appendix 5:** Vollständige Artnamen und Accession Numbers des in Abb. 29 dargestellten Phylogramms. OXYG-TRICHODESMIUM = Acc. No. ABG52331.1 [*Trichodesmium erythraeum IMS101*]; OXYG-SYNECHOCOCCUS = Acc. No. NP\_896322.1 [*Synechococcus sp. WH 8102*]; OXYG-GLOEOBACTER = Acc. No. gll3689 [*Gloeobacter violaceus PCC 7421*]; OXYG-THERMOSYNECHOCOCCUS = Acc. No. NP\_680806.1 [*Thermosynechococcus elongatus BP-1*]; OXYG-ANABAENA = Acc. No. YP\_321755.1 [*Anabaena variabilis ATCC 29413*]; BCO\_NOSTOC = Acc. No. ZP\_00112423.1 [*Nostoc punctiforme PCC 73102*]; OXYG-ARABIDOPSIS = Acc. No. AAL07104.1 [*Arabidopsis thaliana*]; OXYG-CITRUS = Acc. No. AAY89370.1 [*Citrus sinensis*]; OXYG-STYLOSANTHES = Acc. No. AAY98512.2 [*Stylosanthes guianensis*]; OXYG-VIGNA = Acc. No. BAB11932.1 [*Vigna unguiculata*]; OXYG-SOLANUM = Acc. No. AAT75151.1 [*Solanum tuberosum*]; OXYG-LYCOPERSICON = Acc. No. CAD30202.1 [*Lycopersicon esculentum*]; OXYG-VITIS = Acc. No. AAR11193.1 [*Vitis vinifera*]; OXYG-PERSEA = Acc. No. AAK00623.1 [*Persea americana*]; OXYG-HORDEUM1 = Acc. No. ABB71583.1 [*Hordeum vulgare subsp. vulgare*]; OXYG-ORYZA = Acc. No. AAW21321.1 [*Oryza sativa (japonica cultivar-group)*]; OXYG-HORDEUM2 = Acc. No. ABB71584.1 [*Hordeum vulgare subsp. vulgare*]; OXYG-ZEA = Acc. No. AAB62181.1 [*Zea mays*]; OXYG-TRIBOLIUM = Acc. No. XP\_967460.1 [*Tribolium castaneum*]; RPE65-CERCOPITHECUS = Acc. No. AF093455\_1 [*Cercopithecus aethiops*]; RPE65-CYNOPS = Acc. No. BAC41351.1 [*Cynops pyrrhogaster*]; RPE65-MACACA = Acc. No. XP\_001095946.1 [*Macaca mulatta*]; RPE65-MUS = Acc. No. NP\_084263.1 [*Mus musculus*]; BCO-AEDES = Acc. No. EAT45491.1 [*Aedes aegypti*]; RPE65-DANIO = Acc. No. NP\_001025146.1 [*Danio rerio*]; BCOI-DANIO = Acc. No. AAH49331.1 [*Danio rerio*]; BCOII-DANIO = Acc. No. XP\_684630.1 [*Danio rerio*]; RPE65-AMBYSTOMA = Acc. No. AAD12758.1 [*Ambystoma tigrinum*]; RPE65-GALLUS = Acc. No. BAA75667.1 [*Gallus gallus*]; RPE65-XENOPUS = Acc. No. AAH43751.1 [*Xenopus laevis*]; BCOI-BOS = Acc. No. NP\_001019730.1 [*Bos taurus*]; BCOI-CANIS = Acc. No. XP\_546815.1 [*Canis familiaris*]; BCOII-CANIS = Acc. No. XP\_536572.2 [*Canis familiaris*]; BCOII-MUSTELA = Acc. No. AAS20392.1 [*Mustela putorius furo*]; BCOI-MUS = AAM76677.1 [*Mus musculus*]; BCOII-XENOPUS = Acc. No. NP\_001006739.1 [*Xenopus tropicalis*]; BCOI-RATTUS = Acc. No. BAB60807.1 [*Rattus norvegicus*]; BCOII-HOMO = Acc. No. Q9BYV7 [*Homo Sapiens*]; BCOII-GALLUS = Acc. No. XP\_417929.1 [*Gallus gallus*]; BCOII-MACACA = Acc.

## APPENDIX 6



**Appendix 6:** Northern Blot-Analyse zum Vergleich des Einflusses der Haltung von *S. domuncula* in Aquarien auf die Expression der BCO, im Vergleich zu frisch aus dem Meer gesammelten Exemplaren unterschiedlicher Färbung und Inkubation mit potentiellen Regulatoren. **(1)** isolierte RNA aus einem blauen Exemplar; ca. ein Jahr in Aquarienhaltung, **(2)** RNA eines Roten; frisch aus dem Meer, **(3)** RNA eines Blauen; frisch aus dem Meer, **(4)** 24h Inkubation von **(2)** mit 50  $\mu\text{M}$  Retinsäure, **(5)** 24h Inkubation von **(2)** mit 10  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Carotin, **(6)** 24h Inkubation von **(2)** mit 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Carotin. Aufgetragen wurden jeweils 5  $\mu\text{g}$  isolierte RNA; **M** stellt den RNA-Molekulargewichtsstandard mit charakteristischen Banden in kb dar



## 9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Prof. M. für die interessante Themenstellung sowie für seine freundliche Betreuung und fachliche Unterstützung. Auch für das in mich gesetzte Vertrauen, ihn z.B. auf Verwaltungsratssitzungen eines internationalen Netzwerks vertreten zu dürfen oder andere administrative Aufgaben für ihn zu erfüllen, möchte ich mich bedanken.

Herrn Prof. S. danke ich für seine kreative Mitbetreuung und Beratung in wissenschaftlichen Fragen.

Herrn PD. Dr. v.L. (Biologie I, Universität Freiburg) möchte ich für die außergewöhnlich gute Kooperation und die Einführung in die HPLC-Analytik meinen besonderen Dank aussprechen. Die selbstlose Aufnahme in sein Expertenteam und der vertrauensvolle und fundierte Austausch von Fachwissen waren für mich eine einzigartige Erfahrung. Seinen Mitarbeitern Frau Dr. H., Frau I., Herrn Dr. V. und Frau Z. möchte ich für die Unterstützung und das familiäre Klima während meiner Aufenthalte in Freiburg danken. Insbesondere Herrn Dr. V. für die 4 Wochen Unterkunft in seiner Wohnung, als ich kein anderes Quartier zur Verfügung hatte.

Herrn Prof. J., Herrn Prof. S. und Herrn Dr. Habil. W. (Zweitgutachter) möchte ich für die freundliche Bereitschaft, sich als Prüfer zur Verfügung zu stellen, danken.

Der Arbeitsgruppe Prof. M. sei für die freundliche Arbeitsatmosphäre gedankt. Besonders gilt dies für Frau S., die mir geduldig die Antikörperfärbungen beibrachte und meine Primmorphie mitversorgte, falls ich abwesend war. Frau Dr. P. möchte ich für die kompetente Anleitung zur *in-situ*-Hybridisierung und das freundschaftliche Arbeitsverhältnis danken. Unsere phänomenale Teamarbeit im Labor 02-123 möchte ich erwähnen und danke Herrn K., Dr. K. und Herrn K. für die gegenseitige Unterstützung, Hilfe und Freundschaft bei der Arbeit und im Privatleben. Frau Z., der guten Seele unseres Labors, danke ich für die Freundschaft, das Fairständnis und die tröstenden Worte, wenn die Welt mal kurzfristig aus den Fugen zu geraten schien. Frau E. danke ich für die hilfreichen subjektiven wie objektiven Ratschläge über das Arbeitsleben hinaus und die Versorgung mit Karten unserer '05er.

Dr. L. (Allgemeine Botanik, Universität Mainz) möchte ich für die freundliche Unterstützung, seine mir gewidmete Arbeitszeit und die Nutzung seiner HPLC-Anlage, im Versuch noch mehr Schwammcarotinoide zu identifizieren, danken.

Meine Freunde sollen nicht vergessen werden, insbesondere Herr und Frau P., Frau S., Frau R. und Herr M., ohne die ich nicht zu dem geworden wäre, was ich heute bin. Danke für all die Jahre in Freundschaft, das Vertrauen, das Stützen in weniger erfreulichen Lebenslagen und einfach für das Miteinander.

Bei Herrn M. und Herrn P. möchte ich mich für die Bereitschaft und die Mühen der Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Zum Schluss danke ich meiner Familie. Es gibt wenige Dinge im Leben, auf die es lohnt stolz zu sein. Zu Euch zu gehören zählt für mich dazu. Danke für bisher 31 wundervolle Jahre.

**10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
ADH	Alkoholdehydrogenase
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	Zweifach destilliertes Wasser ( <i>Aqua bidestillata</i> )
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser ( <i>Aqua destillata</i> )
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BCO	β-Carotinoxygenase
BCO-II	β-Carotinoxygenase II
bp	Basenpaar
cm	Zentimeter
CMFSW	Calcium und Magnesium freies Seewasser
CMFSW+E	Calcium und Magnesium freies Seewasser plus EDTA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DIG-UTP	Digoxigenin markiertes Desoxyuridintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
L	Liter
M	molar (mol/l)
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Molekulargewicht
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
Nt, nt	Nukeotid(e)
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pfu	<i>Plaque forming units</i>
RA	<i>retinoic acid</i> (Retinsäure)
RA-DH	Retinaldehydrogenase
RALDH	Retinaldehyddehydrogenase
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RTQ-PCR	<i>Realtime quantitative PCR</i> (quantitative Echtzeit PCR)
SDR	<i>Short chain dehydrogenase/reductase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde(n)
SM	suspension medium
SSC	<i>Saline-Sodium Citrate</i>
SW	Seewasser (Sigma)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TdT	Terminale-deoxynukleotidyl-Transferase
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ü.N.	über Nacht
V	Volt
(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per Volume
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

Die vorliegende Dissertation entstand am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie, der Johannes Gutenberg-Universität Mainz in der Zeit von September 2002 bis April 2007 unter der Leitung von **Prof. Dr. M.**

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

Mainz, April 2007

Michael Binder