

Klonierung und Charakterisierung der Luziferase und
des Luziferin regenerierenden Enzyms aus dem
marinen Schwamm *Suberites domuncula*

dem Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz eingereichte

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium

vorgelegt von
Diplom-Biologin Mandy Kasueske
geboren am 20.11.1976 in Bützow
Mainz, 2009

JOHANNES
GUTENBERG
UNIVERSITÄT
MAINZ



Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2009

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit bildet den Inhalt der folgenden Publikation:

Luciferase a light source for the silica-based optical waveguides (spicules) in the demosponge *Suberites domuncula*.

Müller, W. E. G.; Kasueske, M.; Wang, X.; Schröder, H. C.; Wang, Y.; Pisignano, D. und Wiens, M. (2009) *Cellular and Molecular Life Sciences*

Für meine Familie

Der Mensch muss bei dem Glauben verharren,
dass das Unbegreifliche begreiflich ist,
sonst würde er nicht forschen.

(Johann Wolfgang von Goethe)

Zusammenfassung	IX
Summary	X
1. EINLEITUNG	1
1.1 Schwämme (<i>Porifera</i>).....	1
1.1.1 Phylogenetische Einordnung.....	1
1.1.2 Systematik.....	2
1.1.3 Morphologie	4
1.1.4 Fortpflanzung	6
1.2 Biolumineszenz	6
1.2.1 Arten der Biolumineszenz	8
1.2.1.1 Primäre Biolumineszenz	8
1.2.1.2 Sekundäre Biolumineszenz.....	9
1.2.2 Biolumineszenzsysteme – die Luziferin/Luziferase Reaktion.....	9
1.2.3 Geschichte der Biolumineszenz	14
1.2.4 Entstehungshypothesen.....	15
1.2.5 Biologische Funktionen der Biolumineszenz.....	17
1.2.6 Biolumineszenz terrestrischer Organismen am Beispiel der Insekten.....	20
1.2.7 Biolumineszenz mariner Organismen	27
1.2.7.1 Biolumineszenz bei marinen Invertebraten	28
1.2.7.2 Biolumineszenz in Schwämmen	30
1.3 Zielsetzung der Arbeit	37
2 ERGEBNISSE	38
2.1 Die Luziferase aus <i>Suberites domuncula</i>	38
2.1.1 Klonierung und Charakterisierung der für die Luziferase (LUC_SUBDO) kodierenden cDNA (<i>SDLUC</i>) aus dem Schwamm <i>Suberites domuncula</i>	38
2.1.2 Analyse und Charakterisierung der Basensequenz und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz	39
2.1.3 Datenbankanalyse von LUC_SUBDO	42
2.1.3.1 Die Einordnung der Luziferase aus <i>Suberites domuncula</i> in die Superfamilie der Acyladenylat-bildenden Enzyme	42
2.1.3.2 Sequenzvergleich von LUC_SUBDO mit Luziferasen der Insekten ..	46
2.1.3.3 Sequenzvergleich von LUC_SUBDO mit verwandten Enzymen aus der Superfamilie	50
2.1.4 Phylogenetische Analyse der <i>S. domuncula</i> -Luziferase	53
2.1.5 Vergleich der As-Sequenz im Bereich zwischen der Box I und BoxII von LUC_SUBDO mit Luziferasen der Insekten	54
2.1.6 Heterologe Expression der <i>SDLUC</i> -cDNA und Western Blot-Analyse....	56
2.1.7 Funktionsanalyse der Luziferase.....	59
2.1.8 Immunhistologische Analyse.....	63
2.2 Das Luziferin regenerierende Enzym aus <i>Suberites domuncula</i>	65
2.2.1 Klonierung und Charakterisierung der für das Luziferin regenerierende Enzym kodierenden cDNA (<i>SDLRE</i>) aus <i>S. domuncula</i>	65
2.2.2 Analyse und Charakterisierung der Basensequenz und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz	66
2.2.3 Datenbankanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz	68

2.2.3.2 Sequenzvergleich von LRE_SUBDO mit Luziferin regenerierenden Enzymen der Insekten.....	69
2.2.3.3 Sequenzvergleich von LRE_SUBDO und verwandten Proteinen	72
2.2.4 Phylogenetische Analyse	74
2.2.5 Heterologe Expression	75
3. Diskussion	78
3.1 <i>Spiculae</i> aus <i>S. domuncula</i> besitzen lichtleitende Eigenschaften	81
3.2 Identifizierung und Klonierung der Luziferase	82
3.2.1 Sequenzanalyse der Luziferase	82
3.2.2 Proteinbiochemische Untersuchung der Luziferase	84
3.2.2.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz	84
3.2.2.2 Phylogenetische Analyse	86
3.2.3 Expression der Luziferase	87
3.2.4 Funktionelle Charakterisierung.....	87
3.2.5 Immunfluoreszenzmikroskopie	90
3.3 Identifizierung des Luziferin regenerierenden Enzyms	91
3.3.1 Nukleotidsequenz von <i>SDLRE</i>	91
3.3.2 Proteinbiochemische Untersuchung der Luziferase	92
3.3.2.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz	92
3.3.2.2 Phylogenetische Analyse	93
3.3.3 Expression des Luziferin regenerierenden Enzyms	93
3.4 Ausblick	94
4. Material.....	96
4.1 Organismen	96
4.1.1 Schwämme	96
4.1.2 Bakterienstämme	96
4.2 cDNA Bank	96
4.3 Plasmide.....	97
4.4 Primer	97
4.4.1 Vektorspezifische Primer.....	97
4.4.2 Genspezifische Primer	98
4.5 Längen- und Molekulargewichtsstandard	99
4.6 Chemikalien.....	100
4.7 Fluorochrome	101
4.8 Antibiotika und Substratanaloga	101
4.9 Bakterienkulturmedien	102
4.10 Lösungen.....	102
4.11 Enzyme und Restriktionsenzyme	104
4.12 Antikörper	104
4.13 Geräte	105
4.14 Verbrauchsmaterialien und weiteres Laborzubehör	106
4.15 Kits und gebrauchsfertige Reagenzien.....	107
4.16 Computerprogramme und Internet-Dienste	108
5. Methoden	111
5.1 Molekularbiologische Methoden	111
5.1.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	111

5.1.1.1 Standard-PCR.....	111
5.1.1.2 Subklonierung mittels PCR	112
5.1.1.3 Touchdown-PCR.....	114
5.1.1.4 Kolonie-PCR	115
5.1.1.5 Primerdesign.....	115
5.1.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente	116
5.1.2.1 Herstellung von Agarose-Gelen	116
5.1.2.2 Färbung von Agarose-Gelen.....	117
5.1.3 DNA-Präparation	117
5.1.3.1 Aufreinigung von PCR-Ansätzen	117
5.1.3.2 Isolierung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen	118
5.1.3.3 Plasmidaufreinigung	118
5.1.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	118
5.1.4 Klonieren von DNA-Fragmenten	119
5.1.4.1 Vorbereitung von Insert und Vektor - Spaltung mit Restriktionsenzymen	119
5.1.4.2 Ligation	120
5.1.4.3 Vorbereitung selektiver Nährmedien.....	122
5.1.4.4 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	123
5.1.4.5 Anzucht und Selektion transformierter <i>E. coli</i> -Zellen	124
5.1.4.6 Kultivierung von transformierten Bakterien in Flüssigmedien.....	125
5.1.4.7 Dauerkonservierung von Bakterien.....	125
5.1.5 Sequenzierung von DNA (Sanger <i>et al.</i> , 1977)	125
5.1.5.1 Polyacrylamid-Gele zur Sequenzierung von DNA.....	126
5.1.5.2 Sequenzier-Reaktion	127
5.1.5.3 Durchführung der Sequenzier-Gelelektrophorese.....	127
5.1.5.4 Analyse der Sequenzrohdaten.....	128
5.2 Proteinanalytische Methoden	128
5.2.1 Rechnergestützte Sequenz- und Datenbankanalyse	128
5.2.1.1 Sequenzanalysen	128
5.2.1.2 Annotierung und Homologiesuche in Datenbanken	129
5.2.1.3 Erstellung von Sequenzalignments.....	130
5.2.1.4 Phylogenetische Analyse	130
5.2.2 Heterologe Expression der rekombinanten Luziferase in <i>E. coli</i>	130
5.2.2.1 Konstruktion des Expressionsklons mittels GATEWAY® Klonierung	131
5.2.2.2 Testexpression und Zellaufschluss	133
5.2.2.3 Überexpression der rekombinanten Luziferase (rLUC_SUBDO) ...	133
5.2.2.4 Zellaufschluss und Reinigung unter denaturierenden Bedingungen	135
5.2.3 Heterologe Expression des rekombinanten LREs in <i>E. coli</i>	136
5.2.3.1 Konstruktion des Expressionsklons	136
5.2.3.2 Testexpression und Zellaufschluss	137
5.2.4 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus <i>Suberites domuncula</i>	138
5.2.5 Renaturierung und Konzentration der rekombinanten Luziferase	138
5.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976).....	139
5.2.7 Herstellung von polyklonalen Antikörpern	140
5.2.8 Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE nach Leammli (1970)....	140
5.2.8.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele	141

5.2.8.2	Probenvorbereitung und Durchführung der SDS-PAGE	141
5.2.8.3	Färbung der SDS-Gele mit Coomassie-Blau	142
5.2.9	Western Blot - Elektrotransfer von Proteinen auf Träger-Membranen ..	142
5.2.9.1	<i>Semi-Dry</i> Blot.....	143
5.2.9.2	<i>Dry</i> Blot	143
5.2.9.3	Anfärben der Träger-Membran mit Ponceau S	144
5.2.10	Biolumineszenztests	144
5.2.10.1	Emission von Biolumineszenzlicht durch Gewebe von <i>S. domuncula</i>	144
5.2.10.2	Messung der Bioaktivität der rekombinanten Luziferase.....	145
5.2.10.3	<i>In vitro</i> Biolumineszenz-Emissionsspektrum der rLUC_SUBDO..	146
5.3	Immunologische Methoden	146
5.3.1	Immunodetektion der immobilisierten Proteine	146
5.3.2	Immunhistologischer Nachweis von Proteinen im Schwammgewebe ...	147
5.3.2.1	Vorbereitung und Präparation der Gewebeschnitte	147
5.3.2.2	Immuncytochemische Färbung der Gewebeschnitte	148
5.3.2.3	Immunofluoreszenzmikroskopie.....	149
6.	Abkürzungsverzeichnis	150
6.1	Abkürzungen	150
6.2	Abkürzungscodes für Aminosäuren und Basen.....	154
7.	Abbildungsverzeichnis	155
8.	Tabellenverzeichnis	157
9.	Literatur.....	158

Zusammenfassung

Bereits 1971 erkannte Reiswig bei einigen Schwämmen in der Kontraktion des Osculums eine Reaktion auf Licht. Nachfolgend konnte für eine Reihe von Schwämmen die Existenz von Lichtreaktionen beobachtet werden (Wapstra & van Soest, 1987).

In dieser Arbeit sollten Gene eines Luziferin/Luziferase Systems im marinen Schwamm *Suberites domuncula* identifiziert werden, die eine Rolle bei der Biolumineszenz spielen. Mit Hilfe der PCR-Technik konnten die in der cDNA-Bank identifizierten Fragmente einer Luziferase und eines Luziferin regenerierenden Enzyms erfolgreich vervollständigt, kloniert und analysiert werden. Datenbankanalysen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergeben sowohl für die Luziferase als auch für das Luziferin regenerierende Enzym Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Proteinen aus Leuchtkäfern, wie z. B. *Photinus pyralis*. Ausgehend von der cDNA wurden zunächst beide Enzyme in *E. coli* rekombinant exprimiert und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Für die Luziferase gelang es, spezifische Antikörper herzustellen, die im Anschluss an den im Western Blot durchgeführten Nachweis eine Identifizierung in histologischen Schwamm-schnitten ermöglichte. Weitere Analysen konnten für *Suberites domuncula* sowohl im Schwammgewebe, im Proteinextrakt als auch für das rekombinante Protein die Licht-generierende Fähigkeit nachweisen. Das ermittelte *in vitro* Biolumineszenz-Emissionsspektrum der rekombinanten Luziferase weist eine Lichtemission im gelb-grünen Bereich des Spektrums mit einem Maximum bei 548 nm und einer Schulter bei 590 nm auf. Ausserdem bestätigte die Funktionsanalyse des rekombinanten Enzyms die für Luziferasen bekannte ATP- und Temperatur-abhängigkeit sowie den stimulierenden Effekt von Coenzym A.

Die Existenz einer bioaktiven Luziferase in einem der ältesten, rezent vertretenen Metazoa deutet darauf hin, dass sich die Oxygenasefunktion der Luziferasen bereits früher entwickelte, als bisher von Viviani* vermutet. Die bisherigen Daten über die optischen Eigenschaften der *Spiculae* liefern gemeinsam mit den Ergebnissen dieser Arbeit – einer Licht-emittierenden Luziferase in *S. domuncula* – die Voraussetzungen für die mögliche Existenz eines Photorezeptionssystems in Schwämmen.

Summary

As long ago as 1971 Reiswig recognized that in some sponges the contraction of the osculum was a reaction to light. Subsequently the existence of light reactions was observed in other sponges (Wrapsta and van Soest, 1987).

In this study, genes of a luciferin/luciferase system, which play an important role in bioluminescence, should be identified in the marine sponge *Suberites domuncula*. It succeeded to identify cDNA-fragments of a luciferase and a luciferin regenerating enzyme by PCR technique. In addition these fragments were completed, cloned and analyzed. The deduced protein sequences were analyzed with different databases and both luciferase as well as luciferin regenerating enzyme showing high homologies with proteins from fireflies, like *Photinus pyralis*. First, originated from the cDNA, both luciferase and luciferin regenerating enzyme were expressed recombinant in *E. coli* and purified by affinity chromatography. The purified, recombinant luciferase was used for the production of polyclonal antibodies. Those enabled both the protein detection following Western blot analysis and the identification of the protein in sponge tissue. Further analyses on extracts and sponge tissue from *Suberites domuncula* showed light generating features. Same results were obtained as using the recombinant protein. The determined *in vitro* bioluminescence emission spectrum for the recombinant luciferase showed a yellow-green light emission with a maximum peak at 548 nm and a shoulder at 590 nm. In addition functional analysis of the recombinant luciferase confirmed the known ATP- and temperature-dependence plus the stimulating effect of Coenzyme A.

The existence of a bioactive luciferase in one of the oldest, recent occurring Metazoa indicates that the luciferase function as an oxygenase was developed earlier than assumed by Viviani*. Previous data about the optical features of the spicules and the results of this study – a light-emitting luciferase from *S. domuncula* – are laying the foundations for the possibly existence of a photo-reception system in sponges.

1. EINLEITUNG

1.1 Schwämme (*Porifera*)

Schwämme (*Porifera*) gehören zu den ältesten, noch heute existierenden *Metazoen*. Die *Porifera* (Porenträger; lat. *porus* = Pore; Öffnung; *ferre* = tragen) werden aufgrund paläontologischer, morphologischer und embryonaler Studien auf ein Alter von ca. 500 - 600 Mio. Jahren geschätzt (Westheide & Rieger, 1996; Müller, 2001a). Molekularbiologische Untersuchungen, die zur phylogenetischen Einordnung beitrugen, weisen auf ein Alter von über 800 Mio. Jahren hin (Willmer, 1994; Müller, 1995). Schwämme sind, mit Ausnahme von ca. 200 Süßwasserarten, vorwiegend marine, sessile Organismen (ca. 9000 rezente Arten). Die große Vielfalt der *Porifera*, die sich trotz ihres einfachen und dennoch seit dem Präkambrium (*Ediacarium*) wenig veränderten Bauplan auszeichnen, verdeutlicht ihren evolutionären Erfolg (Müller *et al.*, 2007a).

1.1.1 Phylogenetische Einordnung

Die phylogenetische Einordnung der *Porifera*, die aufgrund ihres einfachen Aufbaus lange Zeit ein Problem darstellte, wurde erst durch die zunehmende Anwendung molekularbiologischer Techniken ermöglicht (Müller *et al.*, 2004). Anhand von verschiedenen in Schwämmen identifizierten Molekülen konnten diese, bis dahin als „lebende Fossilien“ (Müller, 2001a) bezeichneten „*Parazoa*“, phylogenetisch den *Metazoa* zugeordnet werden. Ermöglicht wurde dies z. B. durch die Forschung an den Schwämmen *Suberites domuncula* und *Geodia cydonium* (Reitner & Mehl, 1995; Cavalier-Smith *et al.*, 1996), bei denen neben dem Kollagen weitere Bestandteile der *Porifera* identifiziert wurden. Zu diesen Erfolgen gehörte u. a. die Entdeckung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen, wie Fibronectin (Pahler *et al.*, 1998), Galectin (Wagner-Hülsmann *et al.*, 1996) und Lectin (Gundacker *et al.*, 2001). Sie weisen eine hohe Ähnlichkeit in der DNA-Sequenz und in der Proteinfunktion mit entsprechenden Molekülen anderer *Metazoa* auf. Schwämme haben mit einigen *Metazoen* Transkriptionsfaktoren und Morphogene gemeinsam, die charakteristisch für Muster- und Achsenbildung sind. Isolierte Stammzell-Markergene verdeutlichen, dass Schwämme in der Lage sind, sich zu differenzieren (Müller *et al.*, 2004).

Der Nachweis der V-Domäne der Immunglobuline (Schäcke *et al.*, 1994; Blumbach *et al.*, 1999), der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Schäcke *et al.*, 1994), des AIF-1 (Allograft inflammatory factor), der Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen (Müller, 2001) und der GPX (Glutathion Peroxidase) zeigte, dass Schwämme ebenfalls über ein Immunsystem (Kruse *et al.*, 1999) verfügen und die Fähigkeit zur Apoptose besitzen (Wiens *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse bestätigen den monophyletischen Ursprung aller *Metazoa* (Müller, 1995; Cavalier-Smith *et al.*, 1996) und die Abstammung von einem gemeinsamen Vorfahren, dem *Urmetazoa* (Müller, 2001a).

1.1.2 Systematik

Schwämme besiedeln als sessile, aquatische Organismen große Gebiete des marinen Benthos, der neben der Tiefsee und lichtarmen Zonen auch lichtdurchflutete Flachwasserbereiche einschließt (Storch & Welsch, 1991; Göthel, 1997). Anhand ihrer Skelettelemente (Skleren) aus Calcit, Kieselsäure oder Spongin werden die lebenden *Porifera* in drei Klassen eingeteilt: die *Calcarea* (Kalkschwämme), die *Demospongiae* (Hornschwämme) und die *Hexactinellida* (Glasschwämme). Die *Calcarea* besitzen Skelettnadeln (*Spiculae*) aus Kalk (Calciumcarbonat) und sind fast ausschließlich in Bereichen von bis zu 100 m Tiefe anzutreffen. Ein typischer Vertreter der *Calcarea* ist *Clathrina coriacea* (s. Abb. 1).



Abbildung 1: Die marine Spezies *Clathrina coriacea* als Vertreter der *Calcarea*.

Der in Rovinj, Kroatien aufgenommene Schwamm zeigt eine koordinierte Kontraktion als Reaktion auf eine Berührung (Simpson, 1984). Am oberen Bildrand ist ein Teil eines nicht stimulierten Organismus zu erkennen. © W. E. G. Müller, Universität Mainz

Dagegen findet man die *Hexactinellida* oder Glasschwämme in der Tiefsee. Ihr Skelett aus Kiesel-*Spiculae* (Siliziumdioxid) ist aus drei- bis sechsstrahligen Anordnungen aufgebaut (Kästner, 1993; Bergquist, 1978). Der wohl bekannteste

Hexactinellid ist *Euplectella aspergillum*, dessen Skelett aus Silicat in der folgenden Abbildung 2 zu sehen ist.



Abbildung 2: Das Skelett des Tiefseeschwammes *Euplectella aspergillum*.

Neben den Glasschwämmen *Monorhaphis chuni* und *Hyalonema sieboldi* gehört *Euplectella aspergillum*, gerade wegen der Gestalt seines Skeletts, zu den bekanntesten Vertretern der *Hexactinellidae*. Weitere Bezeichnungen für diesen Schwamm sind "Venusblumenkorbchen" oder „Gießkannenschwamm“. © Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung.

Mit über 90 % der rezenten Arten stellen die *Demospongiae* die größte der Schwammklassen dar und enthalten neben marinen Spezies auch einige wenige Süßwasserformen. Sie besiedeln sowohl flache Gewässerregionen als auch Tiefen bis zu 8600 m (Gruner *et al.*, 1993). Ihr Skelettnetzwerk besteht aus Spongin; bei einigen Arten finden sich auch *Spiculae* aus Silicat. Neueren Studien zufolge werden ihnen auch die *Sclerospongia* zugeordnet, welche früher die vierte Klasse der *Porifera* darstellten (Westheide & Rieger, 1996). Sie weisen eine Kombination aus einem dünnen Kieselsäure- und Sponginskelett auf, das ein massigeres, zentrales Kalkskelett umgibt. Während die *Demospongiae* und die *Calcarea* innerhalb der *Porifera* in dem Unterreich der *Cellularia* zusammengefasst werden, bilden die *Hexactinellidae* den einzigen Vertreter des *Symplasma* (Lafay *et al.*, 1992).

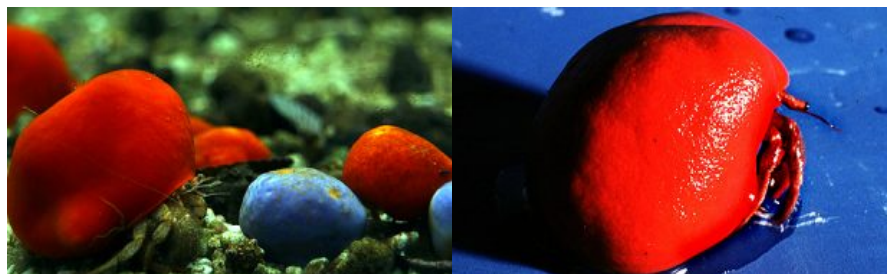


Abbildung 3: Modelorganismus *Suberites domuncula*.

Als Vertreter der *Demospongiae* sind einige *Suberites domuncula* in verschiedenen Farbvarianten zu sehen. © W. E. G. Müller, Universität Mainz

Die Schwämme *Geodia cydonium* und *Suberites domuncula* (*S. domuncula*) verkörpern bedeutende Modellorganismen und molekularbiologische Forschungsobjekte. *S. domuncula* ist als Vertreter der *Demospongiae* für die mutualistische Besiedlung von Schneckenhäusern bekannt, welche von Einsiedlerkrebsen, wie z. B. *Paguristes eretima* bewohnt werden (s. Abb. 3).

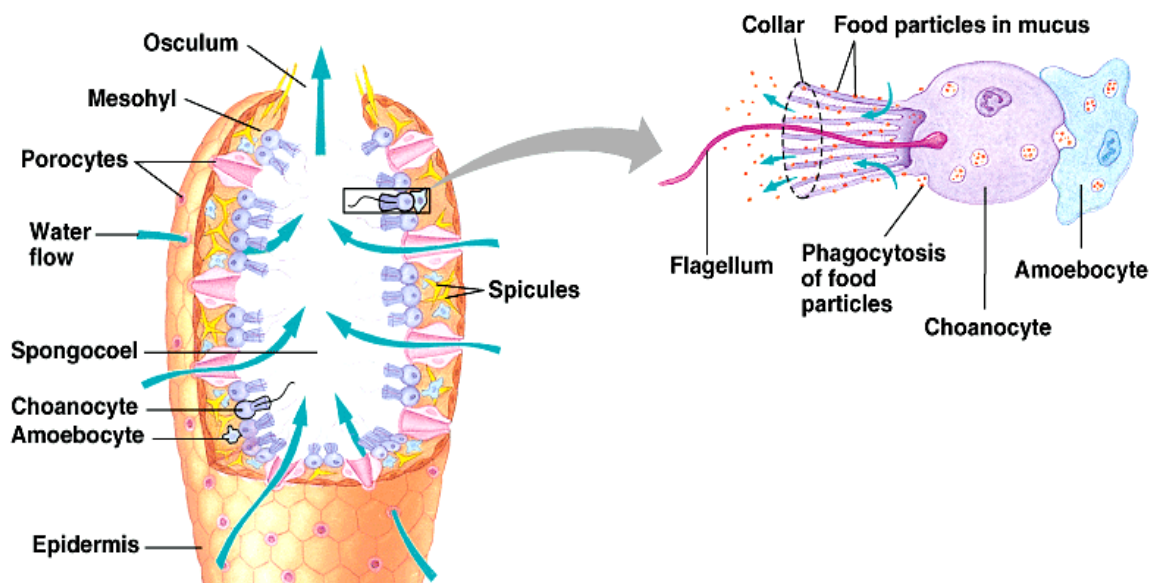
1.1.3 Morphologie

Schwämme werden aufgrund ihres, von zahlreichen Poren durchsetzten Körpers als Porenträger (*Porifera*) bezeichnet (s. Abb. 4). Diese bilden die Grundlage eines komplexen Systems aus Kanälen und Kammern, durch welches Wasser gepumpt wird. Die Aufnahme des Wassers kann sowohl passiv durch die vorherrschende Strömung erfolgen als auch aktiv durch spezielle Zellen, wie den Kragengeißelzellen (*Choanocyten*). Je nach Größe der Schwämme, die zwischen wenigen Millimetern und mehreren Metern variiert, kann die Kapazität des Wasserdurchflusses mehrere tausend Liter pro Tag betragen (Vogel, 1977). Als sessil lebende Strudler nehmen Schwämme ihre Nahrung (Pico- und Nanoplankton, aber auch Algen und Bakterien) zusammen mit dem Sauerstoff über zahlreiche kleine Öffnungen, den so genannten Ostien auf. Bei der Ernährung können häufig auch mit den Schwämmen assoziierte Mikroorganismen, wie Grünalgen, Bakterien und Cyanobakterien beteiligt sein (Wilkinson *et al.*, 1984). Je nach Komplexität des Bauplans der entsprechenden *Porifera* unterscheidet man verschiedene Organisationsstufen, wie *Ascon*-, *Sycon*- und *Leucontyp*.

Den einfachsten Aufbau zeigen asconoide Schwämme mit der röhrenförmigen Grundform. Das Wasser gelangt über den einheitlichen, von Poren durchbrochenen und mit *Choanocyten* besetzten Schlauch in den Gastralraum, der auch als *Spongocoel* bezeichnet wird und tritt durch eine größere Öffnung, dem *Osculum* wieder aus. Der Gastralraum wird vom *Mesohyl* ausgekleidet und dadurch getrennt. Dabei bilden die *Pinacocyten* die äußere Schicht (*Pinacoderm*) der Körperwand und die *Choanocyten* (Kragengeißelzellen) das innere *Choanoderm*. Zu den zum Teil beweglichen Zelltypen, die das *Mesohyl* darstellen, zählen die unspezialisierten *Archaeocyten*, aus denen sich alle weiteren Zelltypen entwickeln können. Die Verarbeitung von Nahrungspartikeln erfolgt durch phagocytotische *Amoebocyten*. Zur Stabilisierung der Körperform enthalten Schwämme kontraktile *Collencyten* und *Sklerocyten*, welche durch das Sezernieren von

Skleriten ein Skelett nach innen aufbauen. Diese bestehen aus Kalk oder Kieselsäure und bieten dem Schwammkörper die benötigte Festigkeit und den Schutz gegenüber der biotischen Umwelt.

Schwämme mit der Organisationsstufe vom syconoiden Typ weisen eine größere Grundform auf, deren Körperwand verdickt und mit Kragengeißelzellen besetzt ist. Aufgrund von radiären Ausbuchtungen kann eine vergrößerte Oberfläche des Körpers erreicht werden. Im Gegensatz zum *Ascontyp* ist der syconoide Schwammkörper von längeren Poren durchsetzt und bildet dementsprechend ein System von einfachen Kanälen aus. Die Ausbildung zahlreicher Geißelkammern, deren Kanäle in zentrale, innere Hohlräume münden, kennzeichnet Schwämme von der Körperorganisation des *Leucontyps*. Es ermöglicht diesen *Poriferen* ein schnelles und ausgedehntes Wachstum. Während die *Demospongiae* nur die leuconoide Organisationsform zeigen, können die meist kleinwüchsigen Formen der *Calcarea* die Bauweisen der drei Typen aufweisen.



Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Abbildung 4: Morphologie der *Porifera*.

Im dargestellten Querschnitt wird die Anatomie der Schwämme verdeutlicht und eine *Choanocyte* vergrößert abgebildet.

(<http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/16cm05/1116/33-03-SpongeAnatomy-L.gif>)

Trotz des Auftretens epithelartiger Schichten und einiger Zellen mit unterschiedlicher Morphologie und Funktion, besitzen Schwämme keine „echten“ Gewebe, Organe, Gonaden, Nervensysteme oder Blutgefäße (Müller, 1998).

1.1.4 Fortpflanzung

Die Fortpflanzung der *Porifera* kann sowohl asexuell als auch sexuell erfolgen. Bei der asexuellen Fortpflanzung werden *Gemmulae* durch Abschnürung von Zellverbänden gebildet, die als sog. Überdauerungsform, besonders bei Süßwasser bewohnenden Schwämmen dazu dienen, schlechte Lebensbedingungen zu überstehen. Die sexuelle Fortpflanzung durchleben die *Porifera* als zwittrige oder als getrennt geschlechtliche Organismen. Dabei entstehen die *Oocyten* aus den *Archaeocyten*, die Spermien aus den *Choanocyten* (Harrison & Cowden, 1976). Nach außen abgegebene Spermien werden mit dem Wasserstrom aufgenommen, herausfiltriert und gelangen über die *Choanocyten* zu den *Oocyten*. Aus der im Inneren des Schwammes befruchteten Eizelle entsteht eine *Blastula*, die ins Wasser abgegeben wird. Eine sich daraus entwickelnde Larve lässt sich auf passendem Substrat nieder und wächst zu einem Schwamm heran.

1.2 Biolumineszenz

Das Phänomen der Biolumineszenz fasziniert die Menschheit, insbesondere die Wissenschaftler schon seit Jahrtausenden. Bereits 500 v. Chr. wurde in einer chinesischen Enzyklopädie namens „Erh-ya“ durch Pu Shang, einem Schüler des Konfuzius, über die „leuchtenden Käfer“ berichtet (Tyler, 2002).

Unter Biolumineszenz versteht man die Fähigkeit von lebenden Organismen, sichtbares Licht zu emittieren. Diese Fähigkeit zur chemisch-induzierten Lichtproduktion ist dabei im Verlauf der Evolution mehrfach unabhängig voneinander, in verschiedenen Organismen entstanden (Wilson & Hastings, 1998). Primär ist die Biolumineszenz ein marines Phänomen (Greer & Szalay, 2002). Im größten Lebensraum der Welt, der Tiefsee, ist sie die vorherrschende Lichtquelle. Zu den dort lebenden Organismen gehören sowohl marine Vertebraten als auch Invertebraten und Bakterien. Neben biolumineszenten Mikroorganismen und Pilzen, ist die terrestrische Biolumineszenz dagegen weitgehend auf einige Familien von leuchtenden Insekten und auf bestimmte Würmer limitiert (Strehler, 1955). Eingesetzt wird dieses bedeutende Naturphänomen vor allem zum Zweck der Abwehr, der Paarung, der Tarnung und zur Nahrungssuche. Die Biolumineszenz ist eine besondere Form der Chemilumineszenz, bei der biolumineszente Organismen in der Lage sind, chemische Energie aus

biochemischen Reaktionen in Lichtenergie umzuwandeln. Da diese aktive Umwandlung unter hoher Quantenausbeute erfolgt und dabei kaum Wärme entsteht, wird das biologische Leuchten auch als „kaltes Licht“ bezeichnet.

Der Begriff der Biolumineszenz setzt sich zusammen aus dem griechischen Wort für Leben „*bios*“ und der lateinischen Bezeichnung für Licht „*lumen*“. Das Licht, welches bei der Biolumineszenz erzeugt wird, variiert je nach Organismus und Biolumineszenzsystem.

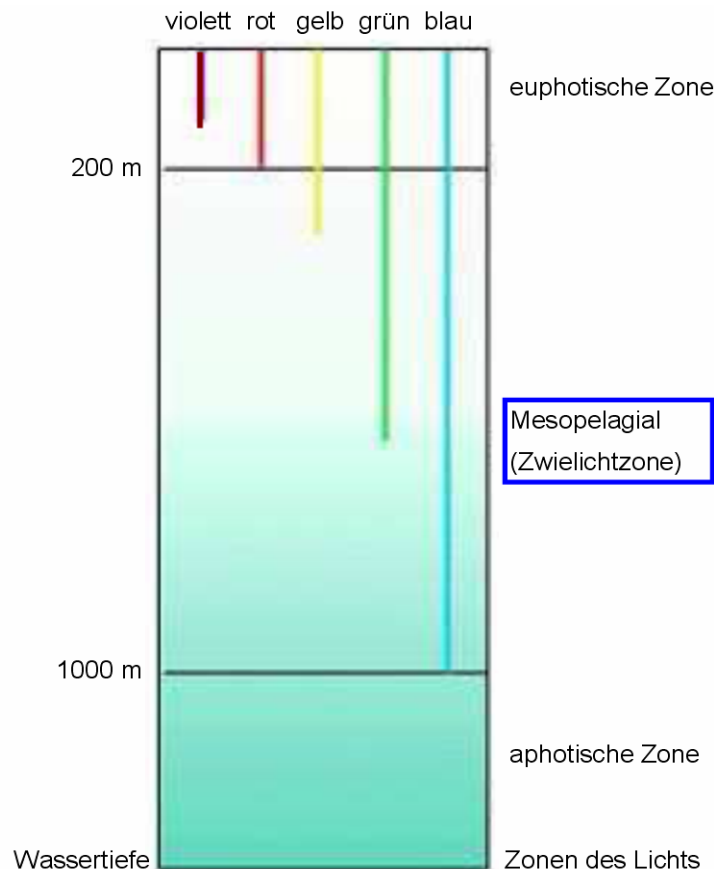


Abbildung 5: Transmission des Sonnenlichtes in verschiedenen Wassertiefen.

In Anlehnung an eine Abbildung von Alexander Westermann aus „Was sieht ein Fisch in der Tiefsee?“ (Seminar: Sinnesorgane, Sinneszellen, Sinnesleistungen). Aufgrund der Eigenschaft von Wasser, die verschiedenen Wellenlängen des Lichtes unterschiedlich stark zu absorbieren, gelangen nur schwächer absorbierte Farben wie grün und besonders blau in tiefere Wasserschichten.

Es liegt mit den Farben rot, grün, blau, gelb und orange im sichtbaren Wellenbereich für den Menschen. Dabei ist blau die vorherrschende Biolumineszenzfarbe in der marinen Umwelt. Sie ist, wie auch die scheinbar blaue Färbung des Wassers, auf die Eigenschaft von Wasser zurückzuführen, bestimmte Farben des Sonnenlichtes schneller zu absorbieren, als andere. Während rotes Licht am stärksten, und in geringerem Ausmaß auch gelbes und grünes Licht absorbiert

wird, gelangt blaues Licht in weitaus tiefere Wasserschichten (s. Abb. 5; Smith & Baker, 1981). An die Lichtverhältnisse der terrestrischen Umwelt angepasst, stellt hier grün bzw. grün-gelb die häufigste Biolumineszenzfarbe da.

Exotischere Farben wie blau, orange und rot sind dagegen auf einige Spezies beschränkt (Viviani*). Man kann die verschiedenen Farbvariationen des Leuchtens bei unterschiedlichen Arten differenzieren. Dabei erfolgt die Einteilung je nach Art in bakterielle oder intra- und extrazelluläre Biolumineszenz. Eine der auffälligsten Charakteristika der Biolumineszenz ist die sehr große Vielfalt von Mechanismen, Strukturen und Funktionen, die sich in biolumineszenten Organismen entwickelt haben (Wilson & Hastings, 1998; Rees *et al.*, 1998). Im Allgemeinen umfassen alle bekannten Biolumineszenzsysteme die Oxidation von Licht-emittierenden Substanzen, Luziferine genannt, durch molekularen Sauerstoff oder reaktive Sauerstoffspezies. Katalysiert werden diese Reaktionen von Enzymen, die als Luziferasen bezeichnet werden und verschiedene Cofaktoren wie z. B. ATP, Calcium und Magnesium benötigen (Viviani, 2002).

1.2.1 Arten der Biolumineszenz

Unter biolumineszenten Lebewesen fasst man die intra- und extrazelluläre Biolumineszenz als primäres Leuchten zusammen, da in diesen Fällen das Licht vom Organismus selbst erzeugt wird. Dagegen wird die Biolumineszenz von Bakterien als sekundäre Biolumineszenz bezeichnet, weil das emittierte Licht von Lebewesen genutzt wird, die mit den Mikroorganismen in Symbiose leben.

1.2.1.1 Primäre Biolumineszenz

Bei der intrazellulären Biolumineszenz wird das Licht in lumineszierenden Zellen, den Photophoren oder Photocyten erzeugt. Sie bilden in den jeweiligen Organismen die Leuchtorgane, welche durch Reflektor-, Linsen- und Pigmentschichten verstärkt werden können. Zu den Organismen mit intrazellulärer Biolumineszenz gehören Dinoflagellaten, Hohltiere, einige Vertreter der Ringelwürmer, Krebstiere, Insekten, Fische, Kopffüßer und andere Weichtiere. Werden die Leuchtsubstanzen von den Organismen über separate Drüsenzellen aus dem Körper abgegeben, spricht man von extrazellulärer Biolumineszenz. Diese Form der Biolumineszenz tritt bei Krebstieren, Kopffüßern und weiteren Weichtieren auf.

Dabei stellt die Napfschnecke *Latia neritoides* die einzige bekannte lumineszente Spezies aus dem Süßwasser da (Shimomura *et al.*, 1972).

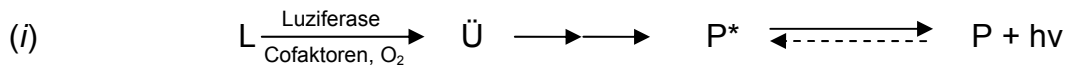
1.2.1.2 Sekundäre Biolumineszenz

Die sekundäre oder bakterielle Biolumineszenz ist durch die Symbiose von Bakterien, z. B. der Gattung *Vibrio* mit verschiedenen Tiefsee-Organismen, wie z. B. Kopffüßer und Fische gekennzeichnet. Für die Lebewesen der Tiefsee bzw. nachtaktive Fische ist die Eigenschaft der Bakterien, das Licht konstant über längere Perioden zu erzeugen, von Vorteil (Meyer-Rochow, 2003). Da die Biolumineszenz der Bakterien kaum über hormonelle oder neuronale Wege gesteuert werden kann, entwickelten die marinen Lebewesen spezielle Leuchtorgane oder Hautausbildungen, um die Biolumineszenz regulieren zu können.

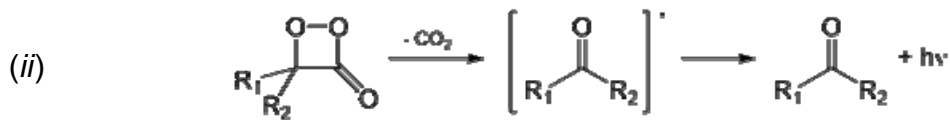
1.2.2 Biolumineszenzsysteme – die Luziferin/Luziferase Reaktion

Die Biolumineszenz zeichnet sich durch ihre Ausbeute an Lichtquanten von fast 100 % aus, während die Lichtausbeute durch das Glühen einer Glühlampe maximal 5 - 10 % beträgt (Seliger & McElroy, 1960). Mit der Entwicklung der enzymatischen Umwandlung von chemischer Energie in Licht, entstanden die bis heute sehr effizienten Systeme der Biolumineszenz in verschiedenen Organismen, wie in Bakterien, Pilzen, Krebstieren, Weichtieren, Fischen und Insekten (Strehler, 1955; Branchini *et al.*, 2001). Obwohl der oxidative Mechanismus von biolumineszenten Systemen für die meisten Luziferasen ähnlich ist, sind die Enzyme in der marinen und in der terrestrischen Biolumineszenz sowie die entsprechenden Substrate chemisch verschieden und evolutionär nicht verwandt (Hastings, 1983; Viviani, 2002). Phylogenetische Untersuchungen weisen darauf hin, dass Luziferin/Luziferase Systeme im Verlauf der Evolution mehr als 30 unabhängige Ursprünge besitzen (Hastings, 1983). Dennoch werden die Enzyme, welche in 17 unterschiedlichen Tierstämmen und mindestens 700 Gattungen auftreten, generell als Luziferasen und die entsprechenden Substrate als Luziferine bezeichnet (Hastings & Wood, 2001). Innerhalb jeder Tiergruppe sind sowohl die Luziferasen als auch die Luziferine art- oder gruppenspezifisch. Bei der von der Luziferase katalysierten biochemischen Reaktion werden das Licht-emittierende Substrat (das Luziferin), molekularer Sauerstoff und verschiedene Cofaktoren wie ATP und

lonen benötigt (i). Die Luziferine (L) werden durch die Luziferasen unter Verbrauch von Sauerstoff umgesetzt, wobei sich das entstandene oxidierte Luziferin zunächst in einem Übergangszustand (Ü) befindet. Das Oxyluziferin gelangt anschließend, meist nach einer Decarboxylierung und weiteren Zwischenschritten, in einen elektronisch angeregten Zustand (P*). Nach einer kurzen Lebenszeit wird ein Photon emittiert und der Grundzustand (P) erreicht.



Dabei ist allen Biolumineszenzsystemen die Bildung und der Zerfall eines cyclischen Peroxids (Vierring), dem 1,2-Dioxetan bzw. dem α -Keto-Derivat Dioxetanon, oder eines linearen Hydroperoxids gemein (Branchini, 2008). Das sich im Übergangszustand (Ü) befindliche Dioxetanon ist instabil, so dass es unter Abspaltung von CO_2 (Decarboxylierung) zerfällt. Dies erzeugt ein Keton im elektronisch angeregten Zustand und emittiert das Licht beim Übergang in den Grundzustand (ii).



Die Luziferin/Luziferase Systeme der verschiedenen Organismen werden in fünf Klassen unterteilt: dem Firefly-Luziferin, einem Benzothiazol (s. Abb. 6); dem Luziferin aus Dinoflagellaten, einem Tetrapyrrol (s. Abb. 7); dem bakteriellen Luziferin, einem Flavin (s. Abb. 8); dem Bestandteil von Luziferinen verschiedener mariner Organismen, einem Imidazolpyrazin (hier: das Coelenterazin; s. Abb. 9) und dem *Latia*-Luziferin, einem Aldehyd aus der Süßwasserschnecke Neuseelands *Latia neritoides* (s. Abb. 10).

Unter den biolumineszenten Landlebewesen bilden die Insekten die größte und facettenreichste Gruppe (Harvey, 1952). Von den ca. 3000 Arten leuchtender Insekten ist die Familie der *Lampyridae* (Leuchtkäfer) am besten untersucht, insbesondere das Luziferin/Luziferase System des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (Strehler & McElroy, 1949). Katalysiert wird die Reaktion von der Luziferase (EC 1.13.12.7), einem ca. 60 kDa großen Enzym, in den für Acyladenylat-bildende Enzyme charakteristischen zwei Schritten. Während des ersten Schrittes katalysiert die Luziferase die Aktivierung des D-Luziferins

(s. Abb. 6) durch die Adenylierung der Carboxylgruppe unter Verwendung von MgATP, ähnlich der Aktivierung von Aminosäuren (As) durch tRNA-Synthetasen und von Fettsäuren durch Acyl:CoA Ligasen.

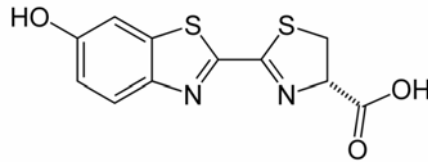


Abbildung 6: Chemische Struktur des D-Luziferins aus Insekten.

Das D-Luziferin der Insekten-Luziferasen ist ein Benzothiazol [2-(6-hydroxybenzothiazol-2-yl)-2-thiazoline-4-Carbonsäure].

Im zweiten Schritt, der eigentlichen Lumineszenzreaktion, agiert die Luziferase als Oxygenase, welche die Oxygenierung des Luziferyl-Adenylats und die Bildung des energiereichen Dioxetan-Zwischenproduktes, dem Luziferinperoxid katalysiert. Der spontane Zerfall des Dioxetanringes führt zur Abspaltung von CO_2 und Bildung des angeregten Oxyluziferins. Beim Übergang des Oxyluziferins vom angeregten Zustand in den Grundzustand wird mit hoher Effizienz ein Photon im grün-roten Bereich des Lichtspektrums emittiert (Viviani, 2002).

Das Phänomen der marinen Biolumineszenz an der Oberfläche von Ozeanen wird allgemein als „Meeresleuchten“ bezeichnet. Zu den auslösenden Organismen gehören unter anderem Dinoflagellaten, wie etwa *Noctiluca scintillans* und *Pyrocystis noctiluca*, die auch an den so genannten „Red Tide“ beteiligt sind.

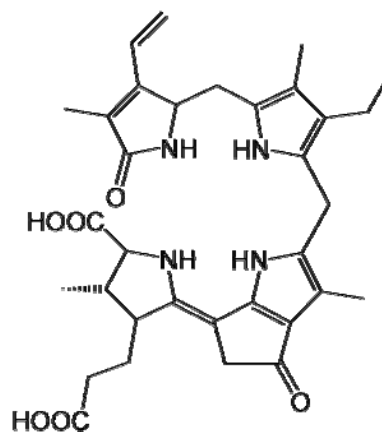


Abbildung 7: Chemische Struktur des Luziferins aus Dinoflagellaten.

Das Luziferin aus Dinoflagellaten, wie *Noctiluca scintillans* und *Pyrocystis noctiluca* ist ein Tetrapyrrol.

Für die Lichtemission sind neben dem Luziferin (= reduziertes Tetrapyrrol, ähnlich dem Chlorophyll; s. Abb. 7), der ca. 137 kDa großen Luziferase auch ein sog.

Luziferinbindeprotein notwendig (Morse *et al.*, 1989; Morse & Mittag, 2000). Das Luziferinbindeprotein ist ein Dimer mit identischen Untereinheiten (75 kDa). Bei einem pH-Wert von 8,0 bindet es an das Tetrapyrrol-Luziferin, welches beim niedrigeren pH-Wert von 6,3 instabil ist (Fogel & Hastings, 1971; Nakamura *et al.*, 1989). Erst durch ein Absinken des pH-Wertes löst sich das Luziferin und ist für die Luziferase zugänglich. Dieses, beim pH von 8,0 inaktive Enzym, wird erst bei einem pH-Wert von 6,3 aktiv (Schultz *et al.*, 2005). Die Biolumineszenzreaktion selbst findet in speziellen Organellen, den sog. Scintillone statt (Fogel & Hastings, 1972). Nach der Oxidation des reduzierten, freien Tetrapyrrols wird blau-grünes Licht emittiert ($\lambda_{\max} = 470 \text{ nm}$).

Zu den biolumineszenten Organismen zählen außerdem eine Reihe Licht-emittierender Bakterien, die sowohl marine, terrestrische als auch Süßwasser-Lebensräume besiedeln (Meighen, 1994). Die bakteriellen Luziferasen sind gemischt funktionierende Oxidasen, die aus zwei nicht identischen Untereinheiten α (40 kDa, aktives Zentrum) und β (35 kDa, strukturelle Vollständigkeit) aufgebaut sind (Westerlund-Karlsson *et al.*, 2002).

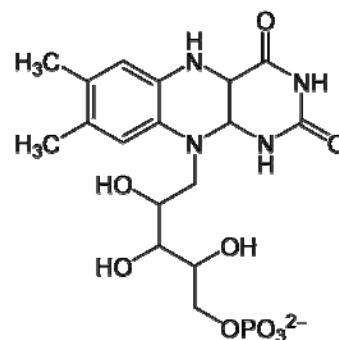


Abbildung 8: Chemische Struktur des bakteriellen Luziferins.

Ein reduziertes Flavinmononukleotid stellt das bakterielle Luziferin dar.

Sie katalysieren die Oxidation des bakteriellen Luziferins, des reduzierten Flavinadeninmononukleotids (s. Abb. 8), in Verbindung mit langkettigen Aldehyden und Sauerstoff zu den entsprechenden langkettigen Carboxylsäuren und angeregtem FMN mit der anschließenden Emission von blau-grünem Licht ($\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$; Viviani, 2002).

Das am besten untersuchte Beispiel für biolumineszente *Coelenterata* ist das Luziferin/Luziferase System von *Aequorea victoria*, bei der sich die Luziferase Aequorin, ein kleines monomeres Protein von ca. 35 kDa, im Rand des Schirmes befindet (Shimomura *et al.*, 1962; Shimomura *et al.*, 1974). Es handelt sich bei

dieser Biolumineszenzreaktion um ein Calcium-abhängiges System, in dem die Luziferase drei Ca^{2+} -Bindestellen besitzt. Das funktionale Protein ist bereits an das Substrat, dem Coelenterazin (s. Abb. 9) und molekularem Sauerstoff gebunden.

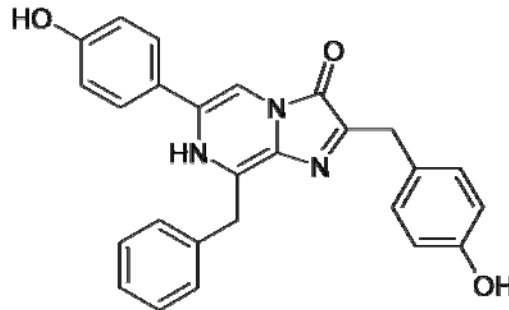


Abbildung 9: Chemische Struktur des Coelenterazins.

Das Coelenterazin [2-Amino-3-benzyl-5-(4-methoxyphenyl)-pyrazin] stellt das Luziferin einiger *Cnidaria* dar.

Nach der Bindung von Calciumionen katalysiert das Aequorin eine intramolekulare Reaktion, in der das Coelenterazin durch den Sauerstoff zu Coelenteramid und CO_2 oxidiert wird. Dabei macht das Enzym eine Konformationsänderung durch. Nach Relaxation des Coelenteramids in den Grundzustand wird ein Lichtquant mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$ emittiert.

Latia neritoides ist der momentan einzige bekannte biolumineszente Süßwasserorganismus. Das Luziferin/Luziferase System besitzt dabei Ähnlichkeiten zur bakteriellen Biolumineszenz (Viviani*).

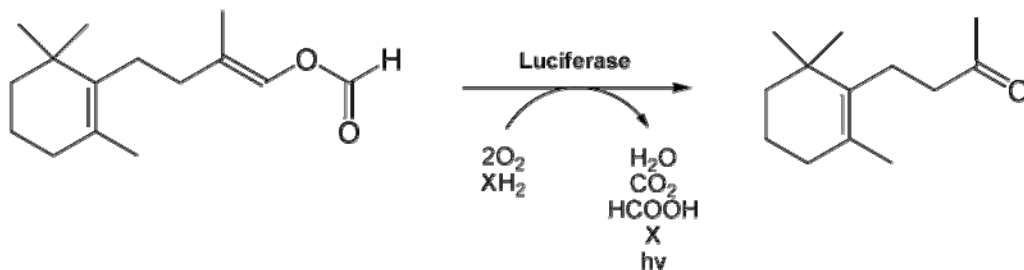


Abbildung 10: Chemische Struktur des D-Luziferins aus *Latia neritoides*

Darstellung der Strukturformel des *Latia*-Luziferins – einem Aldehyd aus *Latia neritoides* und die von der Luziferase katalysierten Reaktion.

Die zugrunde liegende chemische Reaktion basiert darauf, dass die Luziferase, ein Flavoprotein (EC-Nummer 1.14.99.21), eine Licht-emittierende Flavin-Gruppe enthält (Shimomura *et al.*, 1972; Ohmiya *et al.*, 2005). Das spezifische *Latia*-Luziferin (s. Abb. 10), ein terpenoides Aldehyd, wird von der Oxidoreduktase unter Verwendung von zwei Sauerstoffmolekülen und FADH_2 (XH_2 ; s. Abb. 10) oxidiert.

Bei der Reaktion entsteht neben CO₂ und H₂O auch Ameisensäure. Das emittierte Licht liegt im Wellenbereich von $\lambda_{\max} = 536 \text{ nm}$ und lässt den Schleim, welchen *Latia neritoides* z. B. nach mechanischen Reizen absondert, grün lumineszieren (Nakamura *et al.*, 2004). Das entstehende Oxyluziferin ist im Gegensatz zum Oxyluziferin des Leuchtkäfers kein Fluorophor, da die bei dieser Reaktion freiwerdende Energie auf ein proteingebundenes Flavin übertragen wird. Im Vergleich zu den anderen Biolumineszenzsystemen wird nur eine geringe Quantenausbeute erreicht, so dass hier von einem nicht klassischen Luziferin/Luziferase System gesprochen wird (Ohmiya *et al.*, 2005; Viviani*).

1.2.3 Geschichte der Biolumineszenz

Die ersten Beobachtungen von Biolumineszenz liegen weit zurück. Um 500 v. Chr. existierten nicht nur Berichte aus Indien und China, sondern auch aus Griechenland kamen Belege für marine Biolumineszenz. Aristoteles (384 - 322 v. Chr.) schrieb: „Einige Dinge, welche weder Feuer noch Formen von Feuer sind, scheinen von Natur aus Licht hervorzubringen“. Er beschrieb bereits 180 marine Spezies und erkannte die Biolumineszenz als „kaltes Licht“ (Harvey, 1957). In vielen Kulturen wurden diese Phänomene im Aberglauben (Klein, 1965), in der Folklore, wie z. B. bei den Polynesiern, Sibiriern und den Skandinaviern, oder in den Mythen von Seefahrern verankert (Alberte, 1993). So berichtete z. B. Christopher Kolumbus von mysteriösen Lichtern im Wasser, bevor er im Jahr 1492 San Salvador erreichte. William Shakespeare baute im 16. Jh. seine Beobachtung von Biolumineszenz mit den Worten „ausreichendes Feuer des Glühwürmchens“ in sein Stück „Hamlet“ ein (Jacobs, 1974). 1555 erschien das erste Buch über Bio- und Chemilumineszenz von Conrad Gesner (Carter & Kricka, 1982). Thomas Muffet zeigte 1634 erstmals Abbildungen des Leuchtkäfers (*Pyrophorus*). 200 Jahre später erstellte C. G. Ehrenberg einen Stich mit der Bezeichnung „Das Leuchten der Meeres“, auf dem er marine Organismen (Dinoflagellaten) darstellte und ihnen das Phänomen der Biolumineszenz zusprach (Harvey, 1957). Robert Boyle läutete mit seinen Untersuchungen 1672 eine neue Ära in der Erforschung der Biolumineszenz ein, in dem er die Bedeutung der Luft erkannte, ohne dass der Sauerstoff entdeckt worden war. Im Jahr 1887 extrahierte Raphael Dubois die zwei Schlüsselkomponenten der Biolumineszenzreaktion und konnte so erstmals

experimentell Licht produzieren. Von ihm stammen die Bezeichnungen Luziferin und Luziferase (lat.: für lichtbringend „lucifer“; Pieribone & Gruber, 2005).

Zu den bedeutendsten Wissenschaftlern des 20. Jh. gehörte Prof. E. Newton Harvey (1887 - 1959). Er untersuchte 1952 das Luziferin/Luziferase System in jedem leuchtenden Organismus, den er finden konnte. Durch die Feststellung, dass die Enzyme und deren Substrate von verschiedenen Organismen nicht miteinander ausgetauscht werden konnten, wird eine polyphyletische Entstehung der Luziferasen und Luziferine vermutet (Cormier, 1978; Cody, 1999). Das erste Luziferin wurde im Jahr 1957 von Osamu Shimomura durch seine Arbeit an *Aequorea victoria* isoliert. Kurze Zeit später konnte er mit seinen Kollegen sowohl das Photoprotein als auch das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) isolieren. Er nannte es Aequorin und erkannte die Abhängigkeit von Calcium (Zimmer*). Das Luziferin/Luziferase System der Leuchtkäfer, insbesondere das von *Photinus pyralis* wurde in den letzten 50 Jahren u. a. von H. H. Seliger, W. D. McElroy, M. DeLuca, B. R. Branchini & V. R. Viviani intensiv erforscht.

1.2.4 Entstehungshypothesen

Trotz der Erkenntnis, dass Biolumineszenzvorgänge im Verlauf der Evolution mindestens 30-mal unabhängig voneinander entstanden (Hastings, 1983), wird die Frage nach dem eigentlichen evolutionären Ursprung weiterhin untersucht. Es existieren einige Hypothesen zur Entstehung sowohl mariner als auch terrestrischer Biolumineszenz. Man vermutet, dass der Ursprung, wie die Entstehung des Lebens selbst, in den Ozeanen liegt, da bekannt ist, dass 97 % der Tiefseeorganismen (z. B. in der Umgebung von Bermuda) in einer Tiefe von 500 bis 1000 m biolumineszent sind (Beebe, 1937).

Ursprünglich nahm man an, dass sich die Biolumineszenz als zufälliges Nebenprodukt der Detoxifizierung von Sauerstoff in frühen anaeroben Lebensformen entwickelt hat, als sich photosynthetischer Sauerstoff in der Atmosphäre ansammelte (Seliger & McElroy, 1965). Eine alternative Theorie stellte H. H. Seliger bereits im Jahr 1975 vor, in der die Luziferasen möglicherweise aus gemischtfunktionierenden Oxygenasen hervorgehen. Die Enzyme könnten sich folglich entwickelt haben, um den molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwenden und die metabolische Kapazität der Organismen gegenüber Konkurrenten erhöhen zu können. Eine mögliche Beteiligung des Enzyms an der

Oxidation von zunehmenden Mengen an ungesättigten und aromatischen Verbindungen und ein daraus resultierender, lumineszenter Phenotyp hätten den Organismen einen selektiven Vorteil gewährleistet. Drei Jahre später wurde von H. H. Seliger die Idee entwickelt, dass sich bakterielle Luziferasen aus einer Flavinprotein-Oxygenase ableiten, die gesättigte Fettsäuren unter geringem Sauerstoffdruck katabolisieren konnte. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass viele der biolumineszenten Arten erst entstanden, nachdem der Sauerstoffdruck in der Atmosphäre den heutigen Stand erreichte. Außerdem zeigten viele dieser Luziferasen keine signifikanten Sequenzhomologien mit traditionellen Oxygenasen (Rees *et al.*, 1998). Demzufolge scheint der Ursprung der Luziferasen aus frühen Oxygenasen nur für die bakteriellen Luziferasen gültig zu sein. Aus heutiger Sicht geht man davon aus, dass die meisten Luziferasen erst mit der Entwicklung des Sehens entstanden (Hastings, 1983), als ihr lumineszenter Phenotyp zu neuen Oxygenasefunktionen führte und einen Vorteil gegenüber anderen Organismen darstellte (Wood, 1995; Hastings & Wood, 2001).

Für das Photoprotein der *Coelenterata* konnten z. B. Sequenzvergleiche gewisse Ähnlichkeiten zu Calmodulin aufzeigen. Diese deuten an, dass der Ursprung für dieses Enzym bei frühen Calcium-Bindeproteinen zu suchen ist (Inouye *et al.*, 1985; Tsuji *et al.*, 1995). Das entsprechende Luziferin, das Coelenterazin, zeigt Untersuchungen zufolge starke antioxidative Eigenschaften, mit einer hohen Reaktivität gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies wie Peroxiden und Superoxid-Anionen. Es untermauert die Theorie der primären Bedeutung des Coelenterazins in der Detoxifizierung von Sauerstoffderivaten. Der Sprung von der antioxidativen Funktion zur Fähigkeit, Licht zu emittieren, könnte auf den selektiven Druck von antioxidativen Abwehrmechanismen beruhen. Ein weiterer Grund für die Entwicklung mariner Biolumineszenzprozesse könnte die Besiedlung von tieferen Bereichen der Ozeane sein, in denen der oxidative Stress, aufgrund weniger Lichtstrahlen und geringerem Sauerstoffgehalt, reduziert ist. Viele der marinen biolumineszenten Organismen bewohnen jedoch den mesopelagischen Bereich zwischen 200 und 1000 m, in dem die Lichtstrahlen noch begrenzt vordringen können. Dennoch können antioxidative Mechanismen, trotz des benötigten Sauerstoffs für die Biolumineszenzreaktion, gute Grundlagen für deren Entstehung darstellen (Rees *et al.*, 1998).

Dagegen wird für die Luziferasen der Käfer die Entstehung durch Genduplikation vermutet, da gezeigt werden konnte, dass sie eindeutig von einer Acyl:CoA Ligase mit anderen Funktionen abstammen (Wood, 1995). Seit längerem ist die Ähnlichkeit in der Adenylierungsreaktion der Luziferase zur Aktivierung von Aminosäuren durch tRNA-Synthetasen und von Fettsäuren durch Acyl:CoA Ligasen (McElroy *et al.*, 1967) bekannt. Spätere Untersuchungen zeigten u. a. Homologien zu vielen Ligasen, welche die Adenylierung verschiedener Carboxylverbindungen und die anschließende Thioesterbildung katalysieren (Viviani, 2002). Die höchste Verwandtschaft dieser Luziferasen besteht zu einer Gruppe von Ligasen, zu denen Langkettige Fettsäure:CoA Ligasen, Acetyl:CoA Synthetasen, Synthetasen für aromatische Säuren und 4-Cumarat:CoA Ligasen zählen. Letztere, die eine bedeutende Rolle im Phenylpropanoidstoffwechsel höherer Pflanzen spielt, ist den Luziferasen der Käfer am ähnlichsten (Cukovic *et al.*, 2001). Die Fähigkeit der frühen Ligase zur Synthese des Luziferyl-Adenylats scheint der entscheidende Schritt zur Entwicklung der Biolumineszenz gewesen zu sein, da diese Verbindung selbst in wässrig-basischem Medium eine schwache Chemilumineszenz zeigt (Seliger & McElroy, 1962). Viviani und Bechara fanden 1996 Ligasen im Fettkörper von nicht biolumineszenten Käfern, die eine ähnliche Aktivität wie die Luziferase aufwiesen. Sie emittieren schwaches rotes Licht in der Anwesenheit von D-Luziferin und ATP. Ein nicht identifiziertes Genprodukt aus *Drosophila melanogaster* wies ebenfalls eine hohe Homologie zur Sequenz der Luziferase aus Käfern auf. Aufgrund dieser Erkenntnisse geht man davon aus, dass sich die Oxygenasefunktion der Luziferase möglicherweise später entwickelt hat, um die Leuchtkraft der Biolumineszenz zu erhöhen (Viviani*).

Der Ursprung der Luziferine wird vor der Entwicklung der Luziferasen vermutet, so dass die potenziellen chemilumineszenten Verbindungen zur Bildung eines biolumineszenten Phenotyps der Enzyme beitragen. Da eine Ähnlichkeit des D-Luziferins der Käfer zu einigen Pigmenten besteht, könnte es strukturell als Antioxidant funktionieren, wie es schon beim Coelenterazin mariner Organismen vermutet wird (Viviani*).

1.2.5 Biologische Funktionen der Biolumineszenz

Ebenso lang, wie die Entstehung und die Mechanismen der Biolumineszenz erforscht werden, finden auch Überlegungen zu den möglichen biologischen

Funktionen statt. Man geht davon aus, dass die Biolumineszenz zur Nahrungssuche, zur Partnersuche, zur Kommunikation und zum Zweck der Abwehr bzw. der Tarnung genutzt wird.

Ein möglicher Vorteil von biolumineszenten Arten gegenüber anderen nicht leuchtenden Organismen besteht u. a. bei der Anziehung von Partnern. In der marinen Umwelt können z. B. dünnbesiedelte Arten ihre Wahrnehmungsdistanz erhöhen (Baird *et al.*, 1995). Zur Übertragung von Signalen, wie bei der Partnersuche, wird z. B. der lumineszierende Köder des Anglerfisches *Chaenophryne draco* genutzt. Es hat sich hier ein sexueller Dimorphismus von Photophoren entwickelt, d. h. nur die Weibchen besitzen dieses Organ (Herring, 2000). Ebenso wurde beobachtet, dass bei den Kopffüßern *Japetella diaphana* and *Eledonella pygmaea*, die Weibchen in der Lage sind, Licht einer spezifischen Wellenlänge zur Partnersuche einzusetzen, ohne dabei selbst zur Beute von Fressfeinden zu werden (Robison & Young, 1981). Bei den lumineszierenden Käfern liegt die biologische Funktion in den meisten Fällen in der sexuellen Anziehung (Viviani*). Es existieren zwei Kommunikationssysteme in Leuchtkäfern. Zum einen emittieren ortsgebundene Weibchen mit ausgebildeten Leuchtorganen gleichbleibende Lichtimpulse an die Männchen, die im Allgemeinen weniger gut entwickelte Leuchtorgane besitzen. Im zweiten System sind die Leuchtorgane und Augen der Männchen deutlich besser ausgebildet und senden den Weibchen die Lichtsignale, auf die sie wiederum antworten (Viviani*).

Mit der Entstehung der Biolumineszenz entwickelten die Organismen je nach Lebensraum unterschiedliche Anpassungen. Einige Fische der Tiefsee besitzen z. B. große und/oder stark reflektierende Augen, viele verschiedene Lichtorgane entlang des Körpers oder zu Ködern umgewandelte Organe. Die hier begründete Funktion der Biolumineszenz liegt u. a. in der Nahrungssuche und dem speziellen Anlocken von, auf Phototaxis reagierenden Beutetieren. Ein besonderes Beispiel ist der Anglerfisch *Oneirodes sp.*, der einen raffiniert geformten Köder, „Esca“ bzw. „Illicium“ genannt, besitzt. Die Biolumineszenz verdankt der Fisch der Symbiose mit Bakterien (Widder, 2001). Wie im Abschnitt 1.2.1.2 beschrieben, haben einige marine Organismen Hautausbildungen entwickelt, um die von den Bakterien erzeugte Biolumineszenz regulieren zu können. Beispielsweise kann der Barten-Drachenfisch *Photostomias guernei* zur Nahrungssuche seine Umgebung mit seinen Leuchtorganen posterior den Augen erhellen. Um sich selbst vor

Angreifern zu schützen, ist es dem Fisch möglich, das Leuchtorgan mit der Hautausbildung zu verdecken (Widder, 2001).

Neben der blauen Biolumineszenz, die in der Tiefsee vorherrschend ist, entwickelten einige Organismen, besonders Vertreter aus der Familie der Drachenfische, spezielle Leuchtorgane, mit denen sie zusätzlich Licht einer anderen Wellenlänge emittieren können. Sie besitzen zwei verschiedene Leuchtorgane an ihren Köpfen. Mit einem Paar von Photophoren hinter dem Auge emittieren sie blau-grünes Licht, wie viele biolumineszente marine Organismen auch. Ein zweites Leuchtorgan unter dem Auge ermöglicht den Drachenfischen *Aristostomias*, *Pachystomias* und *Malacosteus* die Emission von rotem Licht von 700 nm. Dieses Licht aus dem langwelligen Bereich des Spektrums ist dem infraroten Licht sehr ähnlich und mit dem menschlichen Auge kaum sichtbar (Herring, 1978). Trotz der kurzen Reichweite des roten Lichtes im Wasser ist es für den Fisch, in Bezug auf die Jagd nach Beute, ein deutlicher Vorteil gegenüber der Konkurrenz (Douglas & Partridge, 1997). Denn im Gegensatz zu den meisten Fischen sind Drachenfische durch ein adaptiertes visuelles System sensitiv für rotes Licht (Widder *et al.*, 1984). Unter den biolumineszenten Insekten bieten die Larven der Pilzmücke (*Arachnocampa luminosa*) den Besuchern der „Waitomo Glowworm“ Höhle in Neuseeland ein besonderes Schauspiel. Um mit Hilfe der Biolumineszenz Beutetiere anzulocken, emittiert dieser Vertreter der *Mycetophilidae* grün-blaues Licht aus Exkretionsorganen, mit denen er zahlreiche bis zu 20 cm lange, vertikale und perlenartige Klebefäden spinnen kann (Meyer-Rochow, 1990).

Nicht weniger bedeutend ist die Biolumineszenz für das Überleben vieler Tiefseebewohner. Besonders beeindruckend wird diese zur Täuschung von Fressfeinden eingesetzt. In der Dämmerzone lebende Fische sind leichte Beute, wenn sie sich gegen die helleren Wasserschichten über ihnen abzeichnen. Zum eigenen Schutz imitieren sie mit ihrer Biolumineszenz das Sonnenlicht in erstaunlicher Übereinstimmung von Farbe und Intensität, d. h. sie passen sich den gegebenen Lichtverhältnissen an. Man spricht in diesem Fall von Schalter-Illumination (Widder, 2001). Einigen Organismen erleichtert das Ausstoßen von biolumineszente Material die Flucht vor Angreifern, wie beispielsweise bei der Tiefseegarnele *Acanthephyra purpurea*. Fressfeinde können ebenfalls durch das Emittieren heller Lichtblitze abgelenkt werden, welches sie für einen Moment

blindet, wie z. B. beim Ruderfußkrebs *Metridia gerlachei* (Meyer-Rochow, 1990). Die Pilzart *Mycena* nutzt die Biolumineszenz ebenfalls zum Schutz vor Fressfeinden, wie Insekten, in dem konstant gelb-grünes Licht ($\lambda_{\max} = 520 - 530 \text{ nm}$) emittiert wird, welches unter anderem die Feinde der eigenen Schädlinge anlockt. Andererseits verschafft die Biolumineszenz dem Pilz einen Vorteil bei der Sporenverbreitung, da sie in erster Linie sporentragende Insekten anzieht (Sivinski, 1981).

1.2.6 Biolumineszenz terrestrischer Organismen am Beispiel der Insekten

Basierend auf morphologischen und biochemischen Daten, entwickelten sich unter den terrestrischen Lebewesen mindestens acht der ca. 30 unabhängig voneinander entstandenen Biolumineszenzsysteme (Viviani*). Innerhalb der Insekten existieren über 3000 lumineszierende Arten, welche in den *Collembola* (Springschwänze), in den *Diptera* (Zweiflügler, Echte Fliegen) und vorwiegend in den *Coleoptera* (Käfer) beschrieben sind. Am Amazonas wurden leuchtende Arten der *Orthoptera* (Geradflügler) entdeckt (Viviani*). Bei den *Diptera* sind biolumineszente Spezies in der Familie der *Mycetophilidae* (Pilzmücken) zu finden. Dazu gehören z. B. die Pilzmücken *Arachnocampa luminosa* (s. Abs. 1.2.5) aus Neuseeland und *Orfelia fultoni* aus Nordamerika. Wie in Abb. 11 zu sehen ist, gehören neben den *Mycetophilidae* (*Diptera*) mit blauer Biolumineszenz, die *Phengodidae* (*Coleoptera*) mit emittiertem Licht des roten Wellenlängenbereichs zu den Produzenten exotischer Biolumineszenzfarben (Viviani*). Dabei emittiert die nordamerikanische Pilzmücke *Orfelia fultoni*, mit einer Wellenlänge von 460 nm, das blaueste Licht innerhalb der biolumineszenten Insekten. Ein bisher noch unbekanntes Luziferin wird im Biolumineszenzsystem von *Orfelia* erst nach dem Lösen von einem Luziferinbindeprotein durch die möglicherweise als Dimer vorliegende Luziferase (140 kDa) umgesetzt. Im Gegensatz dazu ähnelt das Biolumineszenzsystem von *Arachnocampa* dem ATP-aktivierten System der Leuchtkäfer, welches sich nur im Gebrauch verschiedener Luziferine unterscheidet (Viviani*). Die größte Zahl und Vielfalt an biolumineszenten Arten ist bei den *Coleoptera* (Käfer) zu finden. Sie wurden hauptsächlich in der Superfamilie der *Elateroidea* (ehemals *Cantharoidea* und *Elateroidea*) gefunden, welche die *Lampyridae* (Leuchtkäfer), die *Phengodidae* (Federleuchtkäfer), die *Elateridae* (Schnellkäfer) und weitere verwandte Arten einschließen.

Leuchtkäfer, wie z. B. *Photinus pyralis*, emittieren gelb-grüne Lichtblitze durch ventrale Laternen zur sexuellen Anziehung von Partnern, gekennzeichnet durch Dauer, Intervall und Frequenz (Viviani, 2002). Schnellkäfer, wie z. B. *Pyrphorus plagiophthalmus*, besitzen zwei dorsale Prothorax-Laternen, welche konstant grünes Licht emittieren und ein ventrales Lichtorgan am Abdomen, das gelb-oranges Licht während des Fluges emittiert. Die Funktion der Biolumineszenz liegt vermutlich im Werben um Partner und in der Abwehr, genauere Studien darüber fehlen.

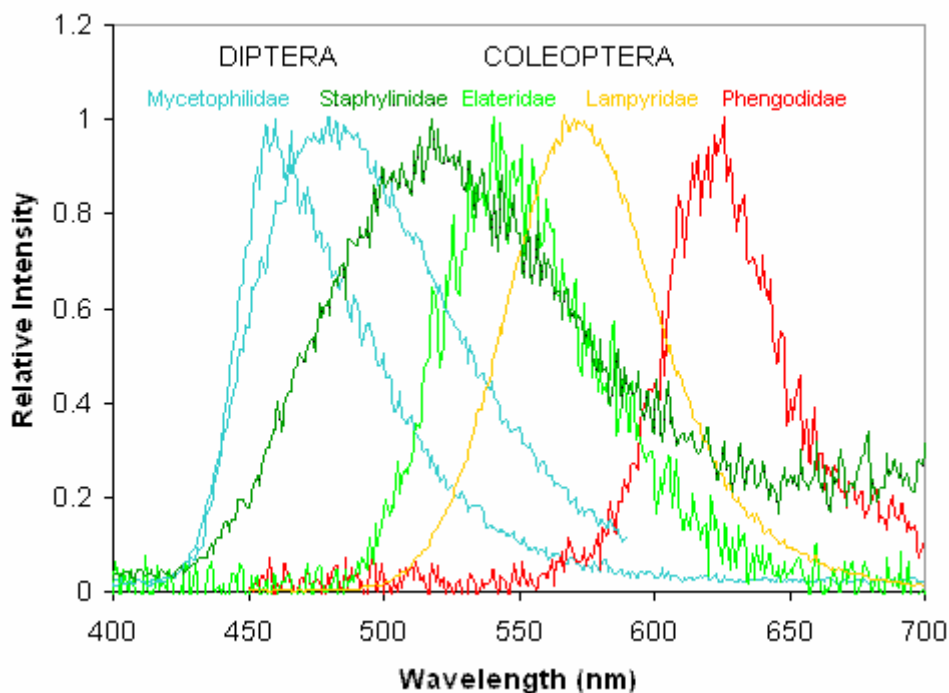


Abbildung 11: Biolumineszenzspektrum der Insekten.

Die Biolumineszenz der Insekten umfasst Licht vom blauen zum roten Bereich des Spektrums (Viviani*).

Federleuchtkäfer emittieren unter den lumineszierenden Käfern den größten Bereich an Farben. Zu ihnen zählen einige der bekanntesten Beispiele mit Larven und Weibchen, die Reihen von lateralen Laternen entlang des Körpers besitzen. Diese emittieren grün-oranges Licht, während die Laternen am Kopf bei süd-amerikanischen Arten, wie die brasilianischen *Phrixothrix viviani* und *Phrixothrix hirtus*, abhängig von der Art, Licht von gelb-grün ($\lambda_{\max} = 546 - 570 \text{ nm}$) bis rot ($\lambda_{\max} = 620 - 638 \text{ nm}$) emittieren. Die spezialisierten Lichtorgane der Käfer, welche für die Biolumineszenz verantwortlich sind, ähneln histologisch dem Fettkörper (Buck, 1948). Im einfachsten Fall (wie bei der konstant leuchtenden *Phengodes* Larve) besteht das photogene Organ aus einer einzelnen großen, Oenocyten-

ähnlichen Photocyte. In den komplexen Fällen (wie z. B. bei *Photinus* und *Photuris*) bestehen die Lichtorgane aus Rosetten von tausenden Photocyten, durchdrungen von Tracheolen und Nerven. Der Sauerstoff wird von den Tracheolen bereitgestellt und die Biolumineszenz wird neural kontrolliert, möglicherweise durch die Sauerstoffaufnahme von Zellen an den Tracheolenenden (Buck, 1948; Timmins *et al.*, 2000). Das Substrat der Luziferase, das Luziferin, wurde in den Photocyten sowohl in gelöster Form als auch in Granula konzentriert gefunden, wohingegen die Luziferase mit den Peroxisomen assoziiert ist (Viviani, 2002).

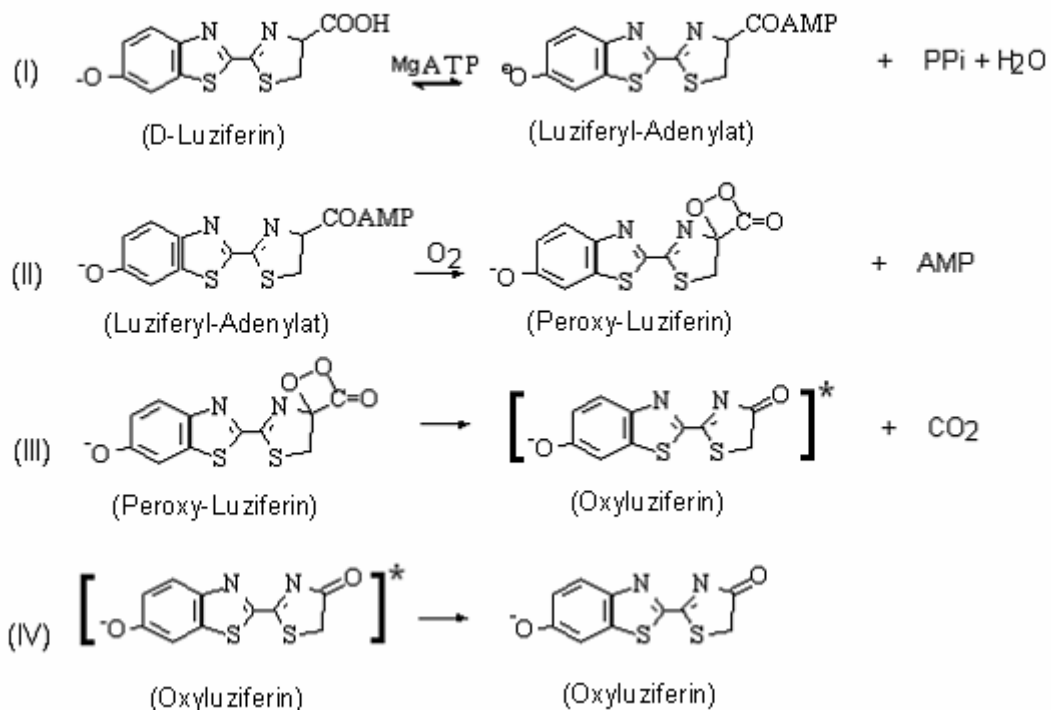


Abbildung 12: Mechanismus der von der Leuchtkäfer-Luziferase katalysierten Biolumineszenzreaktion.

Die von der Luziferase katalysierten enzymatischen Schritte beinhalten die Ligase-Reaktion (I) und die Oxygenase-Reaktion (II). Im Anschluss daran führen die spontanen Schritte (III und IV) zur Biolumineszenz.

Unter den biolumineszenten Insekten ist insbesondere die Biochemie des Luziferin/Luziferase Systems der Leuchtkäfer untersucht worden (Strehler & McElroy, 1949). In zwei enzymatischen Schritten katalysiert die Luziferase die Biolumineszenzreaktion der Leuchtkäfer, bei der ein Benzothiazol-Luziferin durch ATP aktiviert wird (s. Abb. 12). Während des ersten Schrittes (I) katalysiert die Luziferase die Aktivierung des D-Luziferins durch die Adenylierung der Carboxylgruppe unter Verwendung von MgATP und Freisetzung von Pyro-

phosphat. Im zweiten Schritt (II) agiert die Luziferase als eine Oxygenase, welche die Oxygenierung des Luziferyl-Adenylats durch molekularen Sauerstoff und die Bildung eines energiereichen Dioxetan-Zwischenproduktes, dem Luziferinperoxid katalysiert. Der spontane Zerfall des Dioxetanringes (III) führt zur Abspaltung von CO₂ und Bildung des angeregten Oxyluziferins. Beim Übergang des Oxyluziferins vom angeregten Zustand in den Grundzustand (IV) wird ein Photon im grün-roten Bereich des Lichtspektrums emittiert (Viviani, 2002). Während der intensiven Studien an der Luziferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* gelang es, die für das Enzym kodierende cDNA zu klonieren und zu sequenzieren (McElroy & DeLuca, 1978; DeWet *et al.*, 1985). Die Luziferase von *Photinus pyralis* (EC 1.13.12.7) besteht aus einem einzelnen Polypeptid mit 550 Aminosäuren (As) und einem Molekulargewicht von 60 kDa. Sie wird auch als Photinus-Luziferin 4-Monooxygenase (ATP-hydrolysing) bezeichnet.

Sämtliche Luziferasen von Leuchtkäfern, welche nach der Charakterisierung der *Photinus pyralis*-Luziferase kloniert und sequenziert wurden, sind ebenfalls einfache Polypeptide, die in der Länge variieren (542 - 550 As) und ein durchschnittliches Molekulargewicht von ca. 60 kDa besitzen. Mit Ausnahme der Acetylierung des ersten Methionins, werden vermutlich keine weiteren post-translationalen Modifikationen in den Enzymen beobachtet (Viviani, 2002). Alle Luziferasen enthalten, ausgenommen die der *Luciola*, ein C-terminales Signal, das Tripeptid „SKL“, welches für den Transport der Enzyme zu den Peroxisomen verantwortlich ist. Basierend auf Sequenzvergleichen sind die Luziferasen der Leuchtkäfer zueinander zwischen 66 - 99 % identisch. Die Luziferasen der Schnellkäfer, welche Biolumineszenzfarben emittieren, die sich vom grünen zum orangen Bereich des Spektrums ($\lambda_{\max} = 532 - 593 \text{ nm}$) erstrecken, besitzen die kürzesten Polypeptide (542 - 543 As) und sind in ihrer Sequenz mit den Luziferasen der Leuchtkäfer zu ca. 45 % identisch (Viviani, 2002).

Wie im Abschnitt 1.2.2 erwähnt, ist die von der Luziferase der Käfer katalysierte Reaktion charakteristisch für die Acyladenylat-bildende Enzymfamilie. Untersuchungen von Fraga *et al.* (2004) und Nakamura *et al.* (2005) zeigten u. a., dass die Luziferasen der Käfer in der Lage sind, im Anschluss an die Aktivierung von D-Luziferin durch MgATP und in Anwesenheit von Coenzym A, die Bildung eines Luziferyl-Coenzym A zu katalysieren. Die Klonierung und Sequenzierung der *Photinus pyralis*-Luziferase und ähnlicher Enzyme anderer Käfer ergaben eine

enge Verwandtschaft zu Acyl:CoA Synthetasen (Suzuki *et al.*, 1990; Babbitt *et al.*, 1992), welche Reaktionen von ATP mit carboxylierten Substraten katalysieren und Acyladenylate bilden (Branchini *et al.*, 2001). Viele Enzyme aus der Acyladenylat-bildenden Enzymfamilie (Chang *et al.*, 1997) erzeugen Thioester-Intermediate (z. B. von Coenzym A) oder Produkte aus den anfangs gebildeten Acyladenylaten. Genutzt wird dieser Reaktionsmechanismus von einer Reihe prokaryotischer und eukaryotischer Enzyme mit unterschiedlichen Funktionen, die u. a. Langkettige Fettsäure:CoA Ligasen, 4-Cumarat:CoA Ligasen, Peptid-Synthetasen, Acetyl:CoA Synthetasen und andere eng verwandte Synthetasen einschließt (McElroy *et al.*, 1967; Fulda *et al.*, 1994; Wood, 1995). Das in höheren Pflanzen vorkommende Enzym 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL) katalysiert im Phenylpropanstoffwechsel in einer zweistufigen Reaktion die Aktivierung von Zimtsäurederivaten zu CoA-Thioestern. Es ist den Luziferasen der Käfer am ähnlichsten (Schröder, 1989; Cukovic *et al.*, 2001). Acyl:CoA Synthetasen besitzen Sequenzähnlichkeiten in der Primärstruktur (Oba *et al.*, 2005).

In der Aminosäuresequenz besitzen diese Enzyme das hoch konservierte AMP-Bindemotiv (As₂₃₄ - As₂₄₅; ExpASY Accession: PS00455), welches an der ATP-abhängigen kovalenten Bindung von AMP an die jeweiligen Substrate beteiligt ist (Toh, 1991). Das Motiv besitzt die Konsensussequenz [LIVMFY]-X-X-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-X-[PASLIVM]-[KR], für das bei Luziferasen und 4-Cumarat:CoA Ligasen der Begriff BoxI verwendet wird und führte zur Bezeichnung der „Acyladenylat-bildenden“ Enzymfamilie (Conti *et al.*, 1997; Dieckmann *et al.*, 1997; Stuitable *et al.*, 2000; Viviani, 2002). Das AMP-Bindemotiv (BoxI) bildet zusammen mit dem ebenfalls innerhalb der Acyladenylat-bildenden Enzymen konservierten Motiv [YGLTE] (Conti *et al.*, 1996, Chang *et al.*, 1997) das ATP/AMP Signaturmotiv (Weimar *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass dieses Motiv an der Katalyse zur Bildung eines Acyladenylats beteiligt ist (Branchini *et al.*, 2000, Viviani *et al.*, 2008a). Um weitere Erkenntnisse über die Funktionsweise und den Aufbau der Enzyme, insbesondere der Luziferasen zu gewinnen, wurde die Kristallstruktur der *Photinus pyralis*-Luziferase, als erstes Mitglied dieser Superfamilie, ohne gebundene Substrate untersucht (Conti *et al.*, 1996). Das Ergebnis der 3D-Struktur (s. Abb. 13) ergab für die Enzymfamilie eine einheitliche molekulare Architektur. Sie sind aufgebaut aus einer großen N-terminalen Domäne (As₁ - As₄₃₆), die über eine flexible Schleife (As₄₃₆ - As₄₄₀) mit der kleineren C-

terminalen Domäne (As₄₄₀ - As₅₅₀) verbunden ist. Während der N-Terminus aus einer kompakten Domäne besteht, die, flankiert von α -Helices (5-Schicht-Struktur $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$), ein verdrehtes, antiparalleles β -Fass und zwei β -Faltblätter enthält, ist die kleinere C-terminale Domäne aus einer $\alpha + \beta$ Struktur aufgebaut. Die Oberflächen der beiden Domänen sind einander zugewandt und bilden einen Spalt, welcher möglicherweise das „Aktive Zentrum“ darstellt. Während der Biolumineszenz unterliegt das Enzym einer erheblichen Konformationsänderung, so dass die Domänen das Substrat umschließen und eine optimale Umgebung für die Reaktion schaffen können (Conti *et al.*, 1996; Viviani*).

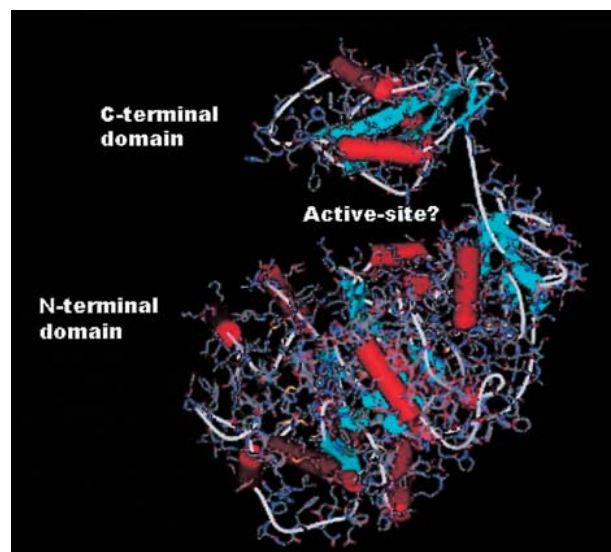


Abbildung 13: 3D-Modell der *Photinus pyralis* (firefly)-Luziferase.

Das Modell wurde anhand der Vorlage LC1.pdb mit dem Lite-viewer Programm angefertigt. Es zeigt die 3-dimensionale Struktur der Luziferase von *Photinus pyralis*. Sie weist einen Aufbau aus einer großen N-terminalen und einer kleinen C-terminalen Domäne auf, die über eine flexible Schleife mit einander verbunden sind. © Viviani (2002).

Für die Identifizierung von Aminosäuren, die für die Bindung von AMP und D-Luziferin verantwortlich sind, wurden sowohl die As-Sequenzen als auch die Kristallstrukturen weiterer Proteine der Acyladenylat-bildenden Enzymfamilie miteinander verglichen. Genutzt wurde dabei vor allem die Kristallstruktur der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramacidin-S-Synthetase I (PheA) in einem Komplex mit Phenylalanin (Phe), Mg-Ionen und AMP (Conti *et al.*, 1997). Es wird beschrieben, dass sich das „Aktive Zentrum“ der PheA an der Oberfläche von zwei Domänen befindet, welche in Größe und Form den korrespondierenden Domänen der Luziferasen ähneln. Mit Hilfe der Kristallstruktur der PheA konnten Modelle von Kristallstrukturen der Luziferase erstellt werden, die u. a. auch zur Untersuchung der verwandten 4-Cumarat:CoA Ligase dienen (Lindermayr, 2002).

Es existieren Modelle von Kristallstrukturen der Luziferasen sowohl ohne gebundene Substrate als auch in Verbindung mit zwei Molekülen Bromoform. Eines der Moleküle Bromoform, welches ein Anästhetikum und einen reversiblen Luziferase-Inhibitor darstellt, bindet in der Kristallstruktur der Luziferase an eine Stelle, von der vermutet wird, die potenzielle Luziferinbindestelle zu sein (Franks *et al.*, 1998).

Ebenso bedeutend sind Mutationsstudien an verschiedenen Aminosäuren der Luziferasesequenzen, denen eine Beteiligung an der Determinierung der jeweiligen Biolumineszenzfarbe zugesprochen wird. Es wird vermutet, dass sich einige der wichtigen As, mit Ausnahme vom Lysin K⁵²⁹, generell im Bereich des „Aktiven Zentrums“ befinden. Anhand der von Viviani (2002) gekennzeichneten konservierten Motive unter den Acyladenylat-bildenden Enzymen (BoxI - III) und den potenziellen Luziferinbindestellen (LBSI + II) ist zu erkennen, dass diese sich im N-Terminus befinden, der den Bereich des „Aktiven Zentrums“ bildet. Neueren Erkenntnissen zufolge, zählt das zum ATP/AMP Signaturmotiv der Acyladenylat-bildenden Superfamilie gehörende, strukturelle Motiv [YGLTE] AS₃₄₀ - AS₃₄₄ (in Luziferasen) zu den Aminosäuren, die u. a. für die Bindung des D-Luziferins verantwortlich sind (Viviani, 2008a). Laut Branchini *et al.* (2001) spielt das Motiv eine Rolle in der Katalyse der Reaktionen, welche in Leuchtkäfern zur Emission von Licht führt.

Wie Untersuchungen von Komponenten der Biolumineszenzmechanismen in Leuchtkäfern zeigten, handelt es sich beim D-Luziferin um eine polyheterocyclische organische Säure [2-(6-hydroxybenzothiazol-2-yl)-2-thiazoline-4-Carbonsäure] (Bitler & McElroy, 1957). Das Produkt der Licht-emittierenden Reaktion wirkt inhibierend auf die Luziferase, da es mit dem D-Luziferin in Konkurrenz steht (Gates & DeLuca, 1975; Suzuki & Goto, 1971). In Proteinfractionen extrahierter Laternen von *Photinus pyralis* entdeckte man die Aktivität von regeneriertem Luziferin aus dem Produkt Oxyluziferin. Die enzymatisch katalysierte Reaktion erfolgt durch das Luziferin regenerierende Enzym (LRE), welches bereits aus einigen Leuchtkäfern isoliert wurde. Das LRE konvertiert das OxyLuziferin zu 2-cyano-6-hydroxybenzothiazol und Thioglycolsäure. In Anwesenheit von D-Cystein wird das Zwischenprodukt 2-cyano-6-hydroxybenzothiazol zu D-Luziferin umgewandelt (Gomi & Kajiyama, 2001). Die Charakterisierung der cDNAs einiger LREs zeigte, dass es sich um einfache Polypeptide mit Längen zwischen 307 und 309

As mit einem Molekulargewicht von ca. 33 - 34 kDa handelt (Gomi & Kajiyama, 2001). Analysen der LRE-Sequenzen mit Hilfe von Proteindatenbanken (z. B. SWISS-PROT) ergaben Homologien zum Seneszenz Marker Protein 30 (SMP30) aus Insekten und Säugetieren. Das SMP30 kommt in der Leber und der Niere von Säugetieren vor, in denen die Menge an Protein mit zunehmendem Alter des Organismus abnimmt (Fujita *et al.*, 1995). Untersuchungen weisen darauf hin, dass das SMP30 und das Regucalcin identisch sind (Shimokawa & Yamaguchi, 1993; Shimokawa *et al.*, 1995a/b; Murata & Yamaguchi, 1997). Aufgrund der Genomstruktur von LRE und SMP30 wird vermutet, dass sie bereits vor der Verzweigung von Invertebraten und Vertebraten entstanden sind (Day & Bailey, 2003).

1.2.7 Biolumineszenz mariner Organismen

Im Verlauf der Evolution entstand die Biolumineszenz mehrfach unabhängig voneinander. Sie ist primär, bis auf wenige Ausnahmen, ein marines Phänomen, welches für die verschiedensten Organismen im größten Lebensraum der Erde, der Tiefsee, die vorherrschende Lichtquelle darstellt. Bei marinen Organismen liegt die Emission der Biolumineszenz im Bereich von 450 - 490 nm. Die Transmission von Licht im Meerwasser ist bei einer Wellenlänge von 470 nm am besten. Hier liegt bei vielen Bewohnern der Tiefsee die höchste Sensitivität visueller Pigmente (Hosseinkhani*). Schätzungsweise 80 - 90 % aller Tiere, die in der Dämmerzone leben, sind in der Lage, Licht auszusenden (Herring, 1978; Douglas *et al.*, 2000; Widder, 2001).

Die als Mesoplagial bezeichnete Zwiellichtzone zwischen 200 - 1000 m umfasst den Bereich, ab den man im Allgemeinen von der Tiefsee spricht. Sie wird als ein homogener Lebensraum betrachtet, der jedoch von extremen Bedingungen geprägt ist. Da in Wassertiefen ab 200 - 300 m kein Sonnenlicht gelangt, ist es dunkel und gleichmäßig kalt (bis 1000 m ca. 4 - 5 °C, unterhalb von 2000 m um 3,6 °C und in polaren Regionen um -1 °C). Außerdem ist die Tiefsee durch akuten Nahrungsmangel gekennzeichnet, da im Durchschnitt nur 1 % der Biomasseproduktion aus der euphotischen Zone des Ozeans als Detritus den Tiefseeboden erreicht. Der zunehmende Druck, von bereits 100 kg/cm² Körperoberfläche in 1000 m Tiefe, stellt ebenfalls eine Belastung für die Organismen dar (Gage & Tyler, 1991). Dennoch existiert in der Tiefsee eine erstaunliche Artenvielfalt, bei

dem die Organismen neben der Biolumineszenz, zahlreiche und bizarre Anpassungen entwickelt haben. Unter den Bewohnern dieser und tieferer Regionen befinden sich mind. 1000 Fischarten, von denen viele mit Bakterien in Symbiose leben, die Licht emittieren. In der Dämmerzone findet man z. B. Leuchtfische mit silbrigen Seiten und riesigen, oft teleskopartigen Augen, transparente Quallen, Tintenfische und rote Garnelen, während viele Organismen in den tieferen und lichtlosen Regionen meist keine Sehorgane mehr besitzen.

Das bekannteste Beispiel für eine effektive Tarnung (s. Abs. 1.2.5) im Mesopelagial sind Silberbeilfische (z. B. *Argyroteleus affinis*). Sie besitzen einen schwarzen Rücken, um sich nicht vom dunklen Untergrund abzuheben. Auf den Flanken sind die Fische silbrig, was ihnen ermöglicht, dass schwache Restlicht zu spiegeln. Durch die Biolumineszenz, welche von den zahlreichen Leuchtorganen auf der Bauchseite emittiert wird, zeichnen sich die Silberbeilfische zudem nicht gegen hellere Wasserschichten über ihnen ab. Des Weiteren besitzen z. B. *Polyipnus spinosus* und andere Tiefseefische riesige Augen, um das wenige Restlicht in der Zwiellichtzone zu verstärken. Da die Temperatur der Tiefsee ziemlich konstant bei ca. 4 °C liegt und Körperfunktionen nur langsam arbeiten, haben die dort lebenden Tiere infolge niedriger Körpertemperatur eine geringere Stoffwechselrate und wachsen langsamer. Im Durchschnitt sind viele Fische und marine Invertebraten nur 20 - 25 cm groß (Lohmann, 2000). Ausnahmen sind z. B. Silberbeilfische mit 2 - 14 cm, der Furchenkrebs (*Munida sp.*) mit 4 cm oder Riesenkalmar mit bis zu 10 m Länge.

1.2.7.1 Biolumineszenz bei marinen Invertebraten

Zu den 90 % der Organismen im Mesopelagial, die in der Lage sind, Licht zu produzieren, gehören neben den Fischen auch Krebstiere. Die Zahl der biolumineszenten Quallen ist noch höher (Haddock, 2004). Eine der bekanntesten Vertreter der *Coelenterata* ist *Aequorea victoria* (s. Abs. 1.2.2), die neben dem erwähnten Photoprotein Aequorin, das bekannte Grün Fluoreszierende Protein (GFP) besitzt. Es nimmt die Energie der Biolumineszenzreaktion von Aequorin auf und emittiert grünes Fluoreszenzlicht ($\lambda_{\max} = 508 \text{ nm}$). Von großer Bedeutung ist das GFP in der molekularbiologischen Forschung, wo es in Assays für die Expression und Funktion von Proteinen eingesetzt wird (Widder, 2001). Als weitere Calcium-abhängige Photoproteine konnten z. B. Clytin (Inouye *et al.*,

1993), Mitrocomin (Fagan *et al.*, 1993) und Obelin (Illarionov *et al.*, 1995) identifiziert werden. Die entsprechenden Organismen, wie z. B. *Obelia geniculata*, stammen meist aus der Klasse der Hydrozoa. Zur Klasse der Anthozoa gehört z. B. die Seeanemone (*Renilla reniformis*), dessen Luziferase ebenfalls in der Forschung eingesetzt wird.

Wie viele *Cnidaria* zeichnen sich auch die marinen *Mollusca* durch eine hohe Anzahl an biolumineszenten Organismen aus, die in den Klassen der *Cephalopoda*, *Gastropoda* und *Bivalvia* zu finden sind (Tsuji, 1985). Viele Kalmare wie *Lycoteuthis*, *Histioteuthis* und *Enoploteuthis* sind selbstleuchtend. Im Gegensatz dazu entsteht die Biolumineszenz des hawaiianischen *Cephalopoda Euprymna scolopes* durch die Symbiose mit dem Leuchtbakterium *Vibrio fischeri*. Beispiele für biolumineszente *Mollusca* aus der Klasse der *Gastropoda* sind *Flabellina iodinea*, *Phyllirrhoe* und *Planaxis*. *Pholas dactylus* ist die bekannteste marine Art aus der Klasse der *Bivalvia*, aus der das Photoprotein Pholasin isoliert wurde. Es ist verantwortlich für die Biolumineszenzreaktion, bei der blaues Licht emittiert wird ($\lambda_{\max} = 490 \text{ nm}$), und besteht aus einem Luziferin, welches fest an ein Apoprotein gebunden ist (Dunstan *et al.*, 2000).

Auffallend unter den *Crustacea* sind biolumineszente Arten der *Ostracoda* (Muschelkrebse), der *Decapoda* (Zehnfußkrebse) und der *Copepoda* (Ruderfußkrebse). Von den wenigen Arten der *Ostracoda* ist *Cypridina hilgendorffii* (= *Vargula hilgendorffii*) die bekannteste. Bei einer Störung des Organismus wird dessen blau biolumineszierendes Sekret ins Wasser abgeben (Kato *et al.*, 2004).

Innerhalb der *Annelida* (Ringelwürmer) enthalten die *Polychaeta* (marine Würmer) in verschiedenen Familien eine Reihe interessanter leuchtender Organismen (Shimomura, 2006). Im Zyklus des Mondes zeigen z. B. Schwärme des Bermuda-Feuerwurmes *Odontosyllis enopla* ein besonderes Schauspiel. Die weiblichen Würmer steigen nach Sonnenuntergang zur Wasseroberfläche auf, um mit ausgeschütteten Leuchtsekreten die männlichen Würmer anzulocken. Es wird vermutet, dass Kolumbus Zeuge dieses Phänomens wurde, als er 1492 durch die Karibik segelte (Harvey, 1952).

Der Stamm der *Echinodermata* (Stachelhäuter) enthält einige biolumineszente Arten in vier Klassen: *Crinoidea* (Seelilien & Haarsterne), *Holothuroidea* (Seegurken), *Asteroidea* (Seesterne) und *Ophiuroidea* (Schlangensterne). Von wissenschaftlicher Bedeutung sind verschiedene Vertreter der

Ophiuroidea, da mehr als 40 % der leuchtenden *Echinodermata* dieser Klasse angehören (Mallefet, 1999). Untersuchungen von *Ophiopsila californica* zeigten, dass das emittierte Licht ein Signal zur Feindabwehr darstellt (Basch, 1988; Grober, 1988). Die Arbeit am Schlangensterne *Amphipholis squamata* hatte ergeben, dass es sich um eine intrazelluläre und auf Photocyten begrenzte Biolumineszenz handelte (Deheyn *et al.*, 1996). Ebenso von Bedeutung war die Erkenntnis, dass die Emission von Licht aus den Photocyten einer nervösen Kontrolle unterliegt (De Bremaeker *et al.*, 1996/2000). Sie lieferte die Grundlage zur Arbeit mit natürlicher Biolumineszenz als genetischen Marker für die Arten der *Ophiuroidea*.

1.2.7.2 Biolumineszenz in Schwämmen

Bis heute ist das Interesse an der Biolumineszenz ungebrochen. Man geht davon aus, dass weitere biolumineszente Lebewesen, in bislang noch unbekanntem Bereichen der Erde, wie z. B. Teilen des Regenwaldes und der Tiefsee, existieren (Viviani*). Es ist bekannt, dass die biolumineszenten Systeme nicht evolutionär konserviert sind. Die Gene, welche für Luziferasen kodieren, sind nicht homolog, und auch die Luziferine sind hinsichtlich ihrer chemischen Klasse verschieden (Hastings, 1995). Gerade die Vielfalt der marinen Biolumineszenz, insbesondere unter den Invertebraten, eröffnet den Wissenschaftlern die Möglichkeit, die Liste biolumineszenter Arten zu erweitern. Die Beobachtung der Biolumineszenz ist jedoch nicht einfach, da sie möglicherweise mit einer hellen Pigmentierung und iridisierenden Oberflächen verwechselt werden kann oder von der Anwesenheit kontaminierender Mikroorganismen herrührt (Haddock, 2006).

Über die Biolumineszenz bei Schwämmen existieren eine Reihe unbestätigter Beobachtungen. In diversen Aufzählungen von biolumineszenten Organismen werden die *Porifera* mit aufgeführt. Die bekanntesten Hinweise stammen aus den „Studien der Biolumineszenz“ von Prof. E. Newton Harvey aus dem Jahr 1921 (s. Abs. 1.2.3). Sie beschreiben u. a. Experimente an einem Schwamm der Gattung *Grantia* sp., von dem, wenn man an ihm rieb, eine gelbliche Lumineszenz ausging. Jedes einzeln untersuchte Teil des zerkleinerten Schwammes schien zu leuchten, während z. B. ein anderer Schwamm, *Esperella* sp., nach einer Berührung nur einzelne Lichtpunkte zeigte. Mikroskopische Untersuchungen sollten klären, ob es sich in diesem Fall um echte

Biolumineszenz handelte, oder ob sie von leuchtenden Organismen ausging, die sich im Schwamm befanden. Während keine Hydroiden, Radolarien, Dinoflagellaten oder gar *Noctilucaeae* beobachtet wurden, fand man jedoch Grünlagen (*Desmidiaceae*), Diatomeen, Würmer und Infusorien. Da diese Formen nicht leuchteten, ging Prof. E. Newton Harvey davon aus, dass es sich bei den Beobachtungen um echte Biolumineszenz handelte. In einer Übersicht über biolumineszente Organismen von E. A. Widder (2001) wurden die Experimente von Harvey als Quelle angegeben (<http://comenius.susqu.edu/bi/2002/AnimalPix/grantia.htm>), ohne dass jedoch der Link nachvollzogen werden kann. Des Weiteren wird auf eine umfangreiche Liste aus der „Systematischen Verbreitung von Biolumineszenz in lebenden Organismen“ von P. J. Herring (1987) hingewiesen. Steven H. D. Haddock (2006) gruppiert die *Porifera* zusammen mit den *Bryozoa* zu den nicht leuchtenden Organismen, da in den letzten 60 Jahren keine weiteren Beobachtungen die früheren Berichte stützen. Dennoch geht er davon aus, dass sie fähig sind, Licht zu produzieren und dies eines Tages überzeugend demonstriert werden kann.

Als sessile Filtrierer, ohne erkennbare Bewegung ordnete man Schwämme für einen langen Zeitraum den Pflanzen zu; hielt sie für primitiv und schutzlos. Die Definition für Tiere erfolgt über ihren Bau, ihre Ernährung und ihren Entwicklungszyklus. Tiere sind vielzellige, heterotrophe Eukaryoten, die feste Nahrung aufnehmen. Tierische Zellen haben keine Zellwände. Muskel- und Nervengewebe gibt es nur bei Tieren. Die Embryonalentwicklung schliesst gewöhnlich ein Blastulastadium ein. Diesem folgt die Gastrulation, durch welche die embryonalen Gewebeschichten (die Keimblätter) entstehen. Alle Tiere, und nur Tiere, zeichnen sich durch den Besitz von *Hox*-Genen aus, welche die Entwicklung der Körpergestalt regulieren (Reichert, 2007). Erst die zunehmende Anwendung molekularbiologischer Techniken ermöglichte genauere Untersuchungen (s. Abs. 1.1.1). Die Entdeckung verschiedener Bestandteile in Schwämmen, wie die Identifizierung von *Hox*-Genen in *Suberites domuncula* bewies, dass die *Porifera* die grundlegenden Eigenschaften des charakteristischen Bauplans von Metazoen besitzen (Wiens *et al.*, 2003). Ihr Erfolg als älteste, noch existierende Metazoen und ihr bis heute nahezu unveränderter Bauplan macht die *Porifera* zu wichtigen Modellorganismen und bildet z. B. die Grundlage zur Erforschung des Ursprungs vielzelliger Lebens. Auch wenn Schwämme eine Reihe von Systemen für Zell-

und Gewebeinteraktionen aufweisen, die ihnen den Aufbau eines funktionalen, multizellulären Körpers ermöglichen (Müller *et al.*, 2004), fehlt ihnen doch ein entscheidendes Kommunikationssystem von Zellen und Gewebe – das den Tieren zugeschriebene Netzwerk von Neuronen (Pavans de Ceccatty, 1974a/b; Bergquist, 1978; Mackie, 1979). Mit der Identifizierung und Klonierung des metabotropischen Glutamat/GABA-ähnlichen Rezeptors aus *Geodia cydonium* (Perović *et al.*, 1999) wurde jedoch bekannt, dass Schwämme Rezeptoren besitzen, die in evolutionär jungen Tierstämmen an Nervensystemen beteiligt sind (Müller *et al.*, 2009). Seit längerem ist bekannt (Aristotle, 1498; Lieberkühn, 1859; Schmidt, 1866; Weissenfels, 1990), dass Schwämme trotz ihrer offensichtlichen Bewegungslosigkeit in der Lage sind, sich zu kontrahieren. In Experimenten mit gefärbtem Wasser kann die aktive Pumpbewegung, wie am Beispiel von *Tethya lyncurium*, veranschaulicht werden (Thakur *et al.*, 2005). Weitere Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass Schwämme, die u. a. beträchtliche Größen von 1 m und mehr erreichen können, auf externe Stimuli ebenfalls mit Kontraktion reagieren (McNair, 1923; Emson, 1966; Pavans de Ceccatty, 1979; Simpson, 1984 und Leys & Mackie, 1997). Studien belegen, dass diese Kontraktionen nicht die einzigen Bewegungen darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass adulte Schwämme verschiedener Arten langsame, kriechende Bewegungen vollziehen können (McNair, 1923; Kilian, 1967; Jones, 1957; Fishelson, 1981; Bond & Harris, 1988 und Bond, 1992). Die Integration und Koordinierung dieser Bewegungen wurde in den letzten 50 Jahren viel diskutiert (Nickel, 2004).

Ein großes Interesse liegt u. a. darin, zu untersuchen, in welchem Maße Licht bei Schwämmen von Bedeutung ist. Intensive Forschungen an Schwamm-Larven konnten schon früh zeigen, dass sie Licht wahrnehmen und darauf reagieren (Wapstra & van Soest, 1987). Aktuelle Studien demonstrieren das lichtabhängige Verhalten der Larven und indizieren, dass es sich bei den Photorezeptoren möglicherweise um einen posterioren Ring aus säulenförmigen Epithelzellen mit einer Geißel (120 µm lang) handelt, die pigmenthaltige Vorsprünge aufweisen (Leys & Degnan, 2001; Gaino *et al.*, 2007). Das Wissen um die Fähigkeit zur Kontraktion und ihr Verhalten gegenüber Licht führte den Blickpunkt der Forschung erneut auf die Frage, ob Schwämme ein Nervensystem besitzen oder nicht (Nickel, 2004). So vermuten Gaino & Sara (1994), das z. B. in *Tethya seychellensis* (*Demospongiae*) ein alternatives interzelluläres Signalsystem

existiert – ähnlich einem neuronalen Kommunikationssystem (Müller *et al.*, 2009). Aufgrund der Untersuchung von verschiedenen, mit den Schwämmen assoziierten Mikroorganismen fand man heraus, dass sich unter ihnen auch photosynthetisierende Algen befinden. Gaino & Sara (1994) nahmen an, dass die Nadeln des Schwammes lichtleitende Eigenschaften besitzen und dadurch die grundlegenden Bedingungen für die Photosynthese der mit ihm assoziierten, faserartigen Grünalge der Gattung *Ostreobium* sp. liefern.

Herkömmliche Kabel und Leitungen, die zur Übertragung von Licht im sichtbaren sowie im UV- und infraroten Bereich verwendet werden, bezeichnet man als Lichtwellenleiter. Sie bestehen aus flexiblen Lichtleitern, zu denen u. a. gebündelte, hochtransparente Einzel-Glasfasern aus Kieselglas bzw. Quarzglas (reines Siliziumdioxid) gehören. Glasfasern leiten das Licht nach dem Prinzip der Totalreflexion und dienen so der optischen Datenübertragung. Eine einzelne, zylindrische Glasfaser besteht aus hochbrechendem Kernglas, einem Mantel aus Glas mit niedrigerem Brechungsindex und einer Schutzbeschichtung gegen mechanische, chemische und thermische Zerstörung. Innerhalb der Grenzfläche zwischen den beiden transparenten Medien mit unterschiedlichem Brechungsindex wird das Licht nahezu verlustfrei reflektiert und geleitet. Bei der Art der Lichtführung („Mode“) in der Glasfaser unterscheidet man zwischen Single- und Multimode. Singlemode-Fasern sind sehr dünne Lichtleiter, die eine schnelle Datenübertragung ermöglichen, da sich das Licht geradlinig und ohne Aufprall an der Grenzlinie ausbreitet. Dagegen sind die Multimode-Fasern dickere Lichtleiter mit unterschiedlichen Wegen des Lichtstrahls (Moden), die sich wiederum in zwei Typen von Fasern unterteilen lassen. Bei der Stufen-Index-Faser wird die Totalreflexion ausgenutzt und die innerhalb des Grenzwinkels ins Kernglas eintretenden Lichtstrahlen werden durch Reflektion an den Berührungsflächen von Kern und Mantel durch die Faser geleitet. Während der Brechungsindex der Stufen-Index-Faser vom Kernglas nach außen hin sprunghaft abnimmt, geschieht dies bei der Gradienten-Index-Faser nur allmählich. Das Licht wird hier stetig zur Achse hin zurückgelenkt, was auf eine Ummantelung mit niedrigerem Brechungsindex, dem sog. *cladding*, zurückzuführen ist.

Die Nadeln der Schwämme (lat. *spiculae*), denen lichtleitende Eigenschaften zugesprochen werden, sind Bestandteile von Skeletten, die von den phylogenetisch älteren *Demospongiae* und *Hexactinellida* gebildet werden. Sie

bestehen aus Biosilicat, d. h. ebenfalls aus Siliziumdioxid, während die *Calcarea*, als anatomisch einfachste Klasse, *Spiculae* aus Calciumcarbonat besitzen (Louch*). Die Bildung eines Skelettgerüsts erfolgt durch das Verhaken von verschiedenen Nadeln und die Verbindung mit Siliziumdioxid (*Hexactinellida*) oder mit Spongin (*Demospongiae*). Je nach Schwamm weisen die *Spiculae* eine spezifische Morphologie und individuelle Anordnung auf (Müller *et al.*, 2009). Bei Studien zur Symbiose von Schwämmen mit Algen und anderen photosynthetischen Partnern fiel die besondere Aufmerksamkeit auf den in größeren Tiefen der Antarktis lebenden Schwamm *Rosella racovitzae* (150 - 200 m). Seine nach außen stehenden Nadeln sind ca. 10 - 20 cm lang und enden in einer Art sternenförmigen Kappe. Inwieweit die *Spiculae* den modernen lichtleitenden Systemen ähneln, sollte in anschließenden Experimenten mit Nadeln des *Hexactinelliden* überprüft werden (Cattaneo-Vietti *et al.*, 1996; Sarikaya *et al.*, 2001). Die verschiedenen untersuchten Eigenschaften deuteten auf eine Funktion als Lichtleiter hin. Hierzu wurde z. B. der Brechungsindex, d. h. das Verhältnis von der Geschwindigkeit des Lichts im Vakuum zu der im jeweiligen Material gemessen. Für die *Spiculae* von *Rosella racovitzae* ergab die Messung einen Wert von 1,49 im Vergleich zur herkömmlichen Glasfaser mit Werten von 1,44 bis 1,48. Bezüglich des Meerwassers als Verkleidung ergibt sich für die *Spiculae* ein Index von 1,37, welcher einen größeren Aufnahmewinkel des Lichts erlaubt (Weiss, 2001). Des Weiteren wurden spezielle Biegetests durchgeführt. Sowohl das Elastizitätsmodul als auch die Werte für die Flexibilität und Härte schneiden bei Biosilicatfasern im Vergleich zu kommerziellen Glasfasern deutlich besser ab (Sarikaya *et al.*, 2001).

Ebenso maßgebend für die Erforschung der lichtleitenden Eigenschaften der Nadeln, die z. B. bei *Euplectella aspergillum* denen der Glasfasern aus der kommerziellen Telekommunikation ähneln (Sundar *et al.*, 2003), sind die Studien über die chemische Zusammensetzung und Struktur seiner speziellen Anker-nadeln (lat. *basalia*). Der bezüglich seiner Form als „Gießkannenschwamm“ bezeichnete *Hexactinellid* wird aufgrund seiner Symbiose zu Krabben auch „Venusblumenkörbchen“ genannt (s. Abb. 2 & 14). Die *Basalia* dienen, dem in Tiefen von 35 - 5000 m vorkommenden *Euplectella aspergillum*, der Verankerung im Sediment. Aizenberg *et al.* (2004) konnten durch Untersuchungen der Nadeln zeigen, dass sie innerhalb der Zusammensetzung des organischen Glases einen

charakteristischen geschichteten Aufbau mit spezifischen strukturellen Variationen aufweisen. In durchgeführten Biegetests stellten sich auch die *Basalia* von *Euplectella aspergillum* als deutlich bruchresistenter heraus als vergleichbare industrielle Fasern aus Siliziumdioxid.

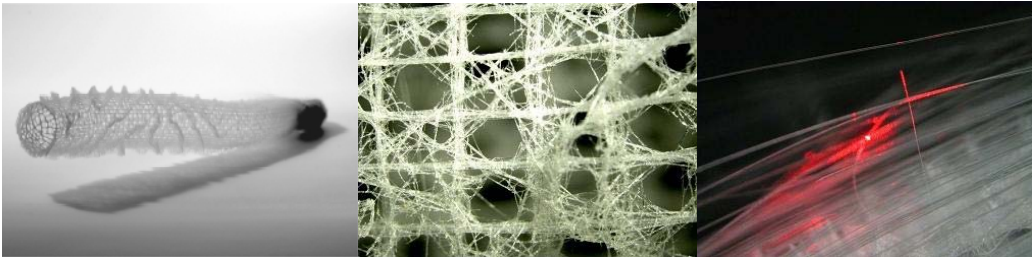


Abbildung 14: *Euplectella aspergillum* als Vertreter der Glasschwämme mit lichtleitenden Eigenschaften.

In der linken Abbildung ist das gesamte Biosilicatskelett des „Venusblumenkörbchens“ zu sehen, welches bei lebenden Exemplaren von ein paar Krabben bewohnt wird, die in Symbiose mit dem Schwamm leben (Aizenberg *et al.*, 2004). Daneben ist ein vergrößerter Ausschnitt der Gerüststruktur aus Siliziumdioxid abgebildet, die u. a. als Vorbild für die Architektur von Gebäuden verwendet wird (Kane, 2005). Die rechte Aufnahme zeigt die Ankerinadeln mit ihren lichtleitenden Eigenschaften. © W. E. G Müller, Universität Mainz.

Die Biosilicatifasern weisen mit einem hochbrechendem Kern und einer niedrigbrechenden Ummantelung ebenfalls ein nicht gleichmäßiges Profil der Brechungsindizes auf. Sie funktionieren zudem wie die kommerziellen Glasfasern als Singlemode-, Wenigmode- oder Multimode-Fasern (Aizenberg *et al.*, 2004). Besonders große Silicatnadeln einiger *Hexactinelliden*, welche durchaus Größen von mehr als 100 mm erreichen können, bilden die Grundlage weiterer Studien, wie z. B. die großen *Spiculae* [40 - 120 mm lange Ankerinadeln] von *Hyalonema sieboldi* (Müller *et al.*, 2006) und die großen Basalnadeln [3000 mm] von *Mono-rhaphis* (Wang *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die *Spiculae*, die aus bis zu 700 konzentrisch angeordneten Lamellen aus Siliziumdioxid aufgebaut sind, spezielle Fähigkeiten zur Lichttransmission besitzen und wie optische Glasfasern funktionieren. Dabei stellte sich heraus, dass (i) nur Licht mit Wellenlängen zwischen 615 und 1310 nm die Fasern passieren kann und (ii) das Licht unterhalb von 615 nm bzw. über 1310 nm komplett ausgeblendet wird.

Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt die Vermutung nahe, dass die Silicatifasern in diesen Tieren möglicherweise an einem System der Photo-rezeption beteiligt sein könnten (Müller *et al.*, 2006). Um diese Theorie zu untermauern, wurden bereits Gene aus Schwämmen kloniert, wie z. B. ein Gen aus dem *Hexactinelliden* *Aphrocallistes vastus*, welches für ein mit der Photolyase

verwandtes Protein kodiert (Schröder *et al.*, 2003a; Wang *et al.*, 2007). Dennoch fehlt ein essentielles Molekül, um zu klären, ob die *Spiculae*, ähnlich einem neuronalen Netzwerk, auch im Körper von Schwämmen als Wellenleiter zur Transformation von Licht bzw. elektrischer und/oder chemische Signale dienen könnten. Es bleibt zu überprüfen, ob ein solches Molekül zur Generierung von Licht, wie die Luziferase oder ein ähnliches Molekül, in den *Porifera* existiert (Müller *et al.*, 2009). Aufgrund von zahlreichen Studien an den lichtleitenden Strukturen in *Hexactinelliden*, ist die Existenz eines derartigen Luziferase-Systems in Schwämmen durchaus vorstellbar. Unter den *Porifera* eignet sich besonders der marine Schwamm *Suberites domuncula* (*Demospongiae*) als Untersuchungsobjekt, da man dessen Genom, bezüglich der Zahl an identifizierten Genen und den entsprechenden Funktionen, zurzeit am besten versteht (Müller *et al.*, 2004). Wie schon die Silicatnadeln der beschriebenen *Hexactinelliden* zeigen auch die für gewöhnlich kleineren [$< 200 \mu\text{m}$] siliziumhaltigen Nadeln der *Demospongiae* die gleiche chemische Beschaffenheit (Sandford, 2003; Müller *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2008). Mit der Identifizierung eines Luziferase-Systems im phylogenetisch ältesten, noch heute existierenden Tierstamm, den *Porifera*, eröffnen sich neue Möglichkeiten, die Entstehung der Biolumineszenz zu erforschen.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Biolumineszenz verkörpert eines der faszinierendsten Phänome in der Tierwelt. Sie beschreibt die Fähigkeit lebender Organismen, sichtbares Licht durch enzymatische Reaktionen eines Luziferin/Luziferase Systems erzeugen zu können. Für die meisten Organismen der Tiefsee stellt die Biolumineszenz die einzige Lichtquelle dar. Um die Bedeutung dieses Phänomens (s. Abs. 1.2.5) und die damit verbundenen Prozesse der Evolution besser zu verstehen, werden seit längerer Zeit biolumineszente Lebewesen und ihre Mechanismen erforscht.

Die Identifizierung des metabotropischen Glutamat/GABA-ähnlichen Rezeptors aus *Geodia cydonium* und der Nachweis lichtleitender Eigenschaften der *Spiculae* einiger *Hexactinelliden* (Cattaneo-Vietti *et al.*, 1996; Sarikaya *et al.*, 2001) lieferten die Grundlage für die molekularbiologische Untersuchung eines möglichen Biolumineszenzsystems in Schwämmen. Bisherige Untersuchungen bestätigen, dass sowohl Schwammlarven als auch adulte Exemplare auf Lichtreize reagieren (Wapstra & van Soest, 1987). Daraufhin wurde für Schwämme der Besitz von Photorezeptoren postuliert (Leys & Degnan, 2001; Gaino *et al.*, 2007).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in Schwämmen ein alternatives interzelluläres Signalsystem vorliegt (Gaino & Sara, 1994; Müller *et al.*, 2006). In dieser Arbeit sollte dies für *S. domuncula* untersucht werden, in dem zunächst das Enzym des enzymatischen Systems zur Erzeugung von Licht – die Luziferase – mit molekularbiologischen Methoden identifiziert, mittels Sequenz- und Strukturanalysen charakterisiert sowie dessen Funktion anhand des rekombinanten Proteins ermittelt werden soll. Darüber hinaus sollte im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Enzym identifiziert und charakterisiert werden. Neben der Klonierung des Luziferin regenerierenden Enzyms sollten erste Hinweise auf eine Aktivität geliefert und hierfür auch dieses Protein rekombinant hergestellt werden.

2. ERGEBNISSE

2.1 Die Luziferase aus *Suberites domuncula*

2.1.1 Klonierung und Charakterisierung der für die Luziferase (LUC_SUBDO) kodierenden cDNA (*SDLUC*) aus dem Schwamm *Suberites domuncula*

Ein Durchsuchen der Schwamm-cDNA-Datenbank von *Suberites domuncula* (*S. domuncula*) nach Sequenzen, die für eine mögliche Luziferase kodieren, lieferte einen Sequenzabschnitt (EST-Datenbank, Nr. s3631), welcher Homologien zu Luziferasen aus Insekten aufzeigte. Im Zentrum des Interesses standen dabei abgeleitete Aminosäuren (As) von charakteristischen Domänen und Motiven, wie z. B. das AMP-Bindemotiv und die As der Luziferinbindestellen. Das Fragment bestand aus 795 Nukleotiden (Nt) und umfasste mit den As₃₀₃ bis As₅₄₉ einen Teil des offenen Leserahmens (ORF) der Luziferase von *S. domuncula*. Die Kombination fragment- und vektorspezifischer Primer (s. Abs. 4.4) ermöglichte anschließend, mittels der PCR-Technik (s. Abs. 5.1.1.2), das Vervollständigen der cDNA-Sequenz (s. Abb. 15). Sowohl die resultierenden Teilfragmente, als auch die im Contig (Vector NTI[®]) entstandene Komplettssequenz wurden nachfolgend einer Datenbankanalyse (Blastp-Algorithmus) unterzogen. Dabei konnten Homologien zu Luziferasen und Luziferase-ähnlichen Proteinen aus Insekten und zu anderen Proteinen aus der Superfamilie der Acyladenylat-bildenden Enzyme nachgewiesen werden.

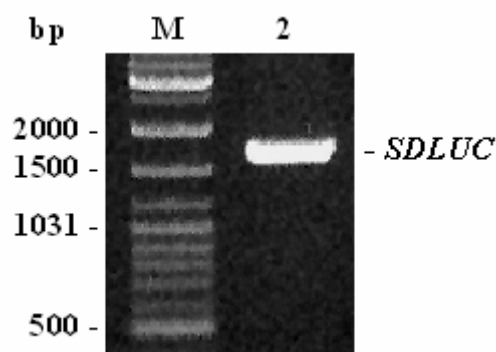


Abbildung 15: Amplifikation der Luziferase aus *Suberites domuncula*.

Zur spezifischen Amplifikation der kodierenden Sequenz von *SDLUC* wurden die Primer SD_F1cLUC und SD_R1cLUC verwendet (s. Abs. 4.4.2, Tab. 5). Das PCR-Produkt wurde anschließend in einem 1-prozentigen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Spur 2) und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Positionen des in Spur 1 aufgetragenen Markers sind links gekennzeichnet.

Für weitere Analysen der vollständigen Basensequenz und der daraus abgeleiteten As-Sequenz, sowie für anschließende Expressionsversuche erfolgte die Amplifikation des offenen Leserahmens (ORF) der Luziferase (s. Abb. 15) mit dem spezifischen Primerpaar SD_F1cLUC: 5`-ATGCATCGGTTATCAAGATTCTG T-3` und SD_R1cLUC: 5`-CTACTTGCTCTGATCTCTGAG-3`. Nach der Ligation der kodierenden Sequenz in den pGEM[®]-T-Vektor, der Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen und der Sequenzierung konnte ein fehlerfreier Klon isoliert werden, der für die weitere Arbeit zur Verfügung stand. Die vollständige cDNA der Luziferase von *S. domuncula* wurde als *SDLUC* bezeichnet.

2.1.2 Analyse und Charakterisierung der Basensequenz und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz

Die Gesamtlänge der als *SDLUC* bezeichneten cDNA beträgt 2038 Nukleotide (Nt) und umfasst einen ORF von 1743 Nt, der für ein potenzielles Protein von 581 As kodiert (s. Abb. 16). Am 5`-Ende befindet sich ein nicht-kodierender Bereich von 73 Nt, während der nichtkodierende Bereich am 3`-Ende 225 Nt umfasst (poly(A) und Stoppcodon ausgenommen).

```

GTGAGTCCGACCTCTTATGCTTATTCTTGAAATCTATTGTCGCCTAGAACAGCAG -73
      M H R L S R F C W Q F A S R S P 16
GACTGAAGTAAGAGCACAAATGCATCGGTTATCAAGATTCTGTTGGCAATTTGCCTCTCGATCACCG 48
L S S S H A S L Q A L K P H P I S L L Y H S 38
TTAAGTTCAAGTCACGCCTCTTTACAAGCCTTGAAGCCCCACCCAATATCATTGCTGTACCATTCC 114
T Q A R S Y T F G H T I Q P T N I V T S P F 60
ACTCAAGCTCGAAGCTATAcATTGGCCATACCATCCAACCACAAAACATTGTCACTAGTCCCTTT 180
P E I E P S P V D F Y R H V L Q D F S K F G 82
CCTGAGATCGAACCTTCTCCAGTTGATTTCTATCGACATGTTCTTCAAGATTTCTCCAAATTTGGC 246
K K I A I V D G I S W K E Y S F N Q I D E L 104
AAGAAGATTGCGATTGTAGATGGTATAAGTTGGAAGGAATACTCGTTTAACCAGATTGACGAGTTG 312
T S K F S S G L K R I G F K T G D V L S I V 126
ACAAGCAAAGTTTTTCATCTGGCTTGAAGAGAATTGGGTTCAAAAACCTGGAGATGTTCTTTCAATCGTG 378
A P N S P E Y S V L F F G A L A S G G V V T 148
GCACCAAATTTCTCCCGAGTATTCCGTCCTTGTTTTTTGGAGCCCTAGCGTCTGGTGGAGTTGTGACC 444
T C N P T Y T A D E I C F Q F K N S N A K M 170
ACATGTAATCCAACCTTATACTGCAGATGAAATTTGTTTCCAGTTTAAGAATTCCAATGCCAAGATG 510
V A T I P A L L P T I Q E A C K G S N I E T 192
GTAGCGACAATTCCAGCCCTTCTCCCGACTATTCAAGAAGCTTGCAAGGGTAGCAACATTGAGACA 576
I I V L D D E P R R A R D G L V S Y Q S L I 214
ATTATCGTTCTTGACGATGAACCACGGCGAGCACGAGACGGGTTAGTTTCTTACCAGTCACTCATA 642

```

I I V L D D E P R R A R D G L V S Y Q S L I	214
ATTATCGTTCTTGACGATGAACCCAGGCGAGCAGCAGACGGGTTAGTTTCTTACCAGTCACTCATA	642
S D S G S L F D P P S I D L H E T A V L P Y	236
AGTGACAGCGGTTCCCTATTTCGATCCCCCGTCCATTGACCTACACGAAACAGCCGTGCTACCATAC	708
S S G T T G L P K G V M L S H K N I A S N V	258
TCCAGTGGCACAACAGGTCTGCCAAAAGGTGTCATGCTCAGCCATAAAAAATATCGCTTCAAATGTC	774
T Q M H H S E F F D L S I E G S C L I G V L	280
ACCCAGATGCACCATTCTGAGTTCTTTGATCTTTACATAGAAGGATCTTGTCTCATTGGAGTCTTG	840
P F F H I Y G M I V I R A S S L R Y G S R L	302
CCTTTCTTTTACATTTATGGCATGATAGTCATCAGGGCCTCTTCTCTACGTTACGGTAGCCGACTG	906
V T L P K F E P E T F L A A F Q N H R V N T	324
GTAACTCTACCAAAATTTGAGCCAGAAACATTTCTTGCCCTTTCCAAAACCATCGAGTGAACACTG	972
A P L V P P L V L F L A K H P L V N S Y N L	346
CACCTCTTGTTCCCTCTCTCGTTCTGTTGCTAGCCAAACATCCATTAGTCAACAGCTACAACCTC	1038
S S L D Q I M T G A A P V G G E T V K A T K	368
TCCTCGTTAGACCAGATAATGACAGGGGCAGCCCCAGTTGGAGGGGAGACCGTAAAGGCCACTAAA	1104
E R V G C R V I R Q L Y G L T E T G P V T H	390
GAGAGAGTCGGGTGTAGAGTAATCCGTCAGCTGTATGGTCTAACAGAGACTGGTCCGGTCACACAC	1170
M T P K Q Q G M T K P D S V G V C L R S V N	412
ATGACTCCTAAACAACAGGGCATGACTAAACCAGATTCTGTCCGGTGTGTGCCTAAGAAGTGTGAAC	1236
T K I V S P E T G E A L P N G E E G E L L I	434
ACAAAAGATAGTCAGTCCCTGAAACTGGCGAGGCTCTACCTAACGGGGAAGAAGGAGAGTTGCTGATC	1302
S G P N V M K G Y L N R P D A T K E C I N E	456
AGTGGGCCTAATGTCATGAAAGGCTACTTGAACAGACCTGATGCTACAAAAGAATGCATCAATGAG	1368
D G W F S T G D I G Y Y D N E G Y F Y I T D	478
GATGGGTGGTTTTAGCACTGGAGATATTGGCTATTACGATAATGAGGGCTACTTTTACATCACTGAC	1434
R L K E L I K V K G L Q V A P A E I E A L L	500
AGACTCAAGGAGCTCATTAAAGGTCAAAGGTCTTCAGGTCGCTCCGGCAGAAATCGAAGCCCTTTTA	1500
V L H P K I A E A A V I G L P D E R Q G E S	522
GTCCTGCACCCAAAAATTTGCTGAAGCAGCAGTTATTGGGTTACCTGATGAACGTCAAGGGGAATCC	1566
P K A F V V K K D E G V N E K E V V D Y I A	544
CCCAAGGCATTTGTGGTCAAGAAGGATGAGGGAGTCAATGAGAAAAGAGGTTGTGGACTATATCGCC	1632
K K L A V H K H L T G G V E F V D V I P K S	566
AAAAAGTTGGCTGTCCACAAACACCTCACTGGTGGAGTAGAGTTTGTGACGTCATTCCCAAGTCT	1698
A S G K I L R R M L R D Q S K *	581
GCCTCAGGCAAGATCCTACGAAGGATGCTCAGAGATCAGAGCAAGTAG	1743
CATTAAGCTGTTTTAGTATGATTGTGGAATATTCAACATGGTTATTTTTCGAAGCTTGCCGAATGAAA	1812
TTTTATTTTTGAGAATGTGTGTATGTGAACAAGTATTGTGTATGACTGTGTGAGTTATTGTGTGTA	1878
CTTTAATGAGGTGGTTTTCTAGATTTGATATCAGCTAATGGTTCTAAACTATTTCTTTCTATTT	1944
GACAATCTTTTCTCAACCTTTTCC (A) n	1965

Abbildung 16: Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz von LUC_SUBDO.

Untranslatierte Bereiche am 5'-, bzw. 3'-Ende der Sequenz sind blau, kodierende Bereiche sind schwarz dargestellt. Rot markiert sind Start- und Stoppcodon der Sequenz. Die für die Acyladenylat-bildenden Enzyme charakteristischen Motive BoxI (AMP-Bindemotiv) und BoxII sind gelb bzw. hellblau unterlegt. Die für das Vervollständigen des cDNA-Fragmentes (EST-Datenbank, Nr. s3631; türkis) und die Amplifikation der kodierenden Sequenz verwendeten Primer sind unterstrichen. Das Polyadenylierungssignal (blau) ist ebenfalls unterstrichen.

Der bei Vertebraten für eine effiziente Translationsinitiation bedeutende Bereich um das Startmethionin (**ATG**) entspricht hier nicht der bekannten und für eukaryotische Systeme optimalen Konsensussequenz GCC **A/G C**CA**TGG** (Kozak, 1991). Die Sequenz AGC **A CA**ATGC**** weicht mit Ausnahme der Purinbase A an Position -3 von der Konsensussequenz ab. Dem Stoppcodon an Position 1746 folgt das Polyadenylierungssignal (AATGAA) an Position 1805. Es ist nicht 100-prozentig homolog zur eukaryotischen Konsensussequenz **AATAAA** (Zarkower *et al.*, 1986) und stellt demnach ein alternatives Signal zur effizienten Spaltung und Polyadenylierung der prä-mRNAs *in vivo* (Beaudoing *et al.*, 2000) dar. Die abgeleitete As-Sequenz des *SDLUC* umfasst 581 AS und wird im Folgenden als LUC_SUBDO bezeichnet. Das kalkulierte Molekulargewicht (MW) des Proteins beträgt 63,968 kDa und der errechnete Isoelektrische Punkt liegt bei 6,42 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>). LUC_SUBDO besteht aus 61 stark sauren (D, E), 58 stark basischen (K, R), 152 polaren (N, C, Q, S, T, Y) und 202 hydrophoben Aminosäuren (A, I, L, F, W, V). Die Analyse der As-Sequenz mit ScanProsite ergab folgende allgemeine Motive posttranslationaler Modifikationen:

1) N-Glykosylierung eines Asparaginrestes

(Konsensus: N-{P}-[ST]-{P}; Marshall, 1972):

As₂₅₇ - As₂₆₀ (NVTQ); As₃₄₅ - As₃₄₈ (NLSS)

2) Phosphorylierung eines Threoninrestes durch eine Proteinkinase C

(Konsensus: [ST]-x-[RK]; Kishimoto *et al.*, 1985): As₉₂ - As₉₄ (SwK);

As₁₀₅ - As₁₀₇ (TsK); As₂₀₀ - As₂₀₂ (SrR); As₂₅₀ - As₂₅₂ (ShK); As₂₉₅ - As₂₉₇ (SLI);

As₃₆₃ - As₃₆₅ (TvK); As₄₇₇ - As₄₇₉ (TdR); As₅₂₂ - As₅₂₄ (SpK); As₅₆₈ - As₅₇₀ (SgK)

3) Phosphorylierung eines Serin-/Threoninrestes durch eine Caseinkinase II

(Konsensus: [ST]-x(2)-[DE]; Pinna, 1990): As₆₆ - As₆₉ (SpvD); As₉₂ - As₉₅ (SwkE);

As₁₅₅ - As₁₅₈ (TadE); As₁₈₀ - As₁₈₃ (TiqE); As₁₈₈ - As₁₉₁ (SniE); As₂₁₉ - As₂₂₂ (SIfD);

As₃₄₇ - As₃₅₀ (SsID); As₃₉₉ - As₄₀₂ (TkpD); As₄₆₁ - As₄₆₄ (StgD).

4) C-terminale Amidierung

(Konsensus: x-G-[RK]-[RK]; Kreil, 1984): As₈₁ - As₈₄ (fGKR)

5) N-Myristoylierung eines Glycinrestes

(Konsensus: G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}; Towler *et al.*, 1988):

As₁₃₉ - As₁₄₄ (GalaSG); As₁₄₄ - As₁₄₉ (GGvTT); As₁₄₅ - As₁₅₀ (GVvtTC);

As₂₄₂ - As₂₄₇ (GLpkGV); As₂₄₆ - As₂₅₁ (GVmISH); As₃₈₁ - As₃₈₆ (GLteTG).

2.1.3 Datenbankanalyse von LUC_SUBDO

Die weitere Analyse der As-Sequenz von LUC_SUBDO mittels diverser Datenbanken (Expasy, NCBI, etc.) ermöglicht die Zuordnung des Proteins zu einer Enzymfamilie, den Vergleich mit ähnlichen Sequenzen und das Identifizieren konservierter Domänen.

2.1.3.1 Die Einordnung der Luziferase aus *Suberites domuncula* in die Superfamilie der Acyladenylat-bildenden Enzyme

Mit Hilfe des Blastp-Algorithmus (NCBI) wurde eine Analyse der As-Sequenz von LUC_SUBDO durchgeführt, die eine Zugehörigkeit zur Superfamilie der AMP-bindenden Enzyme (s. Abb. 17) ergab. Charakteristisch für die Proteine dieser Enzymfamilie ist die ATP-abhängige kovalente Verknüpfung des AMPs an das Substrat (s. Abs. 1.2.6). Die Luziferase von *S. domuncula* enthält von As₉₇ - As₅₁₁ die AMP-Bindedomäne („Expect value [E]“ = $3e^{-96}$ (Coligan *et al.*, 2000), die eine Homologie zu AMP-bindenden Enzymen (Pfam: AMP-binding, PF00501) aufzeigt. Für die Region von As₁ bis As₅₈₁ wurde eine Homologie zur Acetyl:CoA Synthetase (EC 6.2.1.1) ermittelt (E -Wert = $6,3^{-05}$). Zu den Enzymen dieser Superfamilie gehören neben den Luziferasen (EC 1.13.12.7) und Acetyl:CoA Synthetasen, Langkettige Fettsäure:CoA Ligasen (EC 6.2.1.3), 4-Cumarat:CoA Ligasen (EC 6.2.1.12) und weitere verwandte Enzyme (Schröder, 1989).

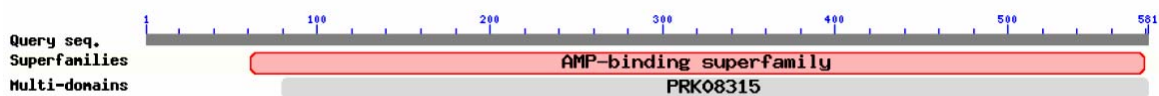


Abbildung 17: Vorhergesagte konservierte Domänen aus der Protein-Alignmentanalyse mit dem Blastp-Algorithmus.

Der dunkle Balken repräsentiert die Proteinsequenz von LUC_SUBDO. Anhand des roten Balkens ist die Zuordnung zur Superfamilie der Acyladenylat-bildenden Enzyme (Accession-Nummer: cl00401) zu erkennen (E -Wert = $3e^{-96}$). Die Proteinsequenz von LUC_SUBDO weist weiterhin Ähnlichkeiten zu Multidomänen-Proteinen, wie Acyl-CoA Synthetasen (z. B. Acc.-Nr.: PRK08315) auf (E -Wert = $2e^{-74}$). Für die Luziferase von *Photinus pyralis* (Firefly) ist in der NCBI-Datenbank für die Region von der As₁₆ - As₅₄₁ der Name „PRK08315“ als „Acyl-CoA Synthetase“ angegeben (Acc.-Nr.: CAA59281).

Eine weitere Analyse der As-Sequenz von LUC_SUBDO bezüglich konservierter Domänen erfolgte mit Hilfe von SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), dem Simple Modular Architecture Research Tool. Die beschriebene Einordnung in die

oben genannte Enzymfamilie wird mit einem hohen E -Wert von $9,00e^{-120}$ (AMP-binding) bestätigt. Ähnliche Ergebnisse für die Zuordnung zu AMP-Bindeenzymen wurden durch die Analyse mit PfamA (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) mit einem E -Wert von $3,5e^{-120}$ und mit MotifScan (<http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/PFSCAN>) ermittelt (E -Wert = $8,7e^{-122}$). Die Acyladenylat-bildenden Enzyme besitzen trotz ihrer Unterschiede in der Proteingröße, sowie der Vielfalt an Substraten und Produkten gemeinsame strukturelle Elemente (s. Abb. 17). In der AMP-Bindedomäne der Luziferase aus *S. domuncula* (As₉₇ bis As₅₁₁) existiert ein für diese Enzymfamilie charakteristisches, hoch konserviertes Motiv, welches die As₂₃₄ - As₂₄₅ umfasst (s. Abb. 16, 18; gelb markiert). Es ist für die Bindung des ATPs und die Erzeugung des Acyl-AMPs verantwortlich (Chang *et al.*, 1997) und besitzt bei *S. domuncula* die Sequenz [LPYSSGTTGLPKG]. Die Region des AMP-Bindemotivs (PROSITE PS00455) ist Ser/Thr/Gly-reich und durch ein konserviertes Pro/Lys/Gly-Triplett charakterisiert.

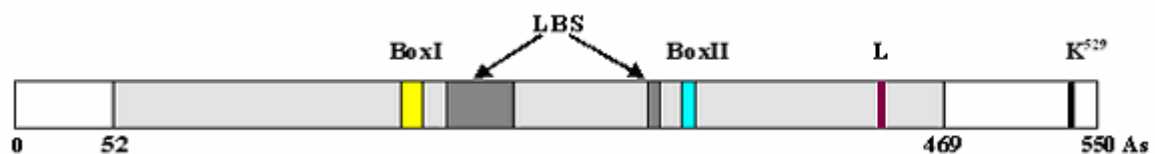


Abbildung 18: Gemeinsame Struktur von Adenylat-bildenden Enzymen am Beispiel von der *Photinus pyralis*-Luziferase (CAA59281).

Zu den gemeinsamen Strukturelementen der Adenylat-bildenden Enzyme gehören das hoch konservierte AMP-Bindemotiv mit der Konsensussequenz [SSGSTGLPKG] (Box I für Luziferasen und 4-Cumarat:CoA Ligasen), eine Domäne mit der Konsensussequenz [G(YF)GLTE(TS)] (Box II für Luziferasen), ein Linkermotiv [LK(DE)LI] zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Domäne des Proteins (L) und ein an der Katalyse beteiligtes Lysin (K⁵²⁹). Der hellgrau unterlegte Bereich von As₅₂ bis As₄₆₉ ist die unter den Acyladenylat-bildenden Enzymen konservierte AMP-Bindedomäne (Pfam: AMP-binding, PF00501). Dunkelgrau sind die potenziellen Luziferinbindestellen (LBS) dargestellt.

Das Motiv besitzt die Konsensussequenz [LIVMFY]-X-X-[STG]-[STAG]-G-[ST]-[STEI]-X-[PASLIVM]-[KR], für die bei Luziferasen und 4-Cumarat:CoA Ligasen der Begriff Box I verwendet wird (Conti *et al.*, 1997; Dieckmann *et al.*, 1997; Stuible *et al.*, 2000; Viviani, 2002/2008 a, b). Wie die Luziferasen der Insekten enthält die *S. domuncula*-Luziferase neben dem AMP-Bindemotiv Box I ein weiteres Motiv mit der Sequenz [YGLTE] von As₃₇₉ bis As₃₈₅. Die Box I bildet zusammen mit diesem ebenfalls innerhalb der Acyladenylat-bildenden Enzymen konservierten Motiv [YGLTE] (Conti *et al.*, 1996, Chang *et al.*, 1997) das ATP/AMP Signaturmotiv (Weimar *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass das bei Luziferasen als Box II bezeichnete Motiv an der Katalyse der Acyladenylat-Bildung beteiligt ist (Branchini

et al., 2000/2001, Viviani *et al.*, 2008a). Das Lys⁵²⁹ (*Photinus pyralis*) gehört unter den Adenylat-bildenden Enzymen zu den stark konservierten Aminosäuren, denen eine Beteiligung an der Katalyse nachgewiesen wurde. In LUC_SUBDO an Position 570 vorkommend (s. Abb. 16, 18), wird dieses Lysin von Branchini *et al.* (2000) als kritische As für die effektive Substratorientierung beschrieben. 1997 wurde bereits die Bedeutung des Lysins für die Phenylalanin-aktivierende Domäne (PheA) der Gramacidin-S-Synthetase aus *Bacillus brevis* (1AMUA) durch Untersuchungen von Conti *et al.* nachgewiesen.

In diesem Fall zeigte die Kristallstruktur von PheA, dass das Lysin die Stabilisierung des Übergangszustandes bei der Adenylat-Bildung durch polare Interaktionen mit der Carboxygruppe des Substrats und der Phosphatgruppe des AMPs ermöglicht. Vergleiche mit weiteren Kristallstrukturen der Luziferase (Conti *et al.*, 1996) und der des 2,3-Dihydroxybenzoesäure aktivierendes Enzyms (DhbE; May *et al.*, 2002) ermöglichten einen Einblick in die typische Faltung der Proteine. Die ermittelte Zuordnung von LUC_SUBDO zu den Luziferasen deutet auf eine für die Adenylat-bildenden Enzyme charakteristische Struktur mit einer größeren N-terminalen und einer kleineren C-terminalen Domäne hin (s. Abb. 13). Verbunden sind die beiden Domänen durch einen flexiblen Linker, dessen Sequenz in *S. domuncula* enthalten ist und die As₄₈₀ bis As₄₈₅ umfasst (Branchini *et al.*, 2003; Branchini *et al.*, 2006).



Abbildung 19: Vorhergesagte konservierte Domänen aus der Protein-Alignmentanalyse mit dem Blastp-Algorithmus innerhalb der Insekten.

Der dunkle Balken repräsentiert die Proteinsequenz von LUC_SUBDO. Anhand des roten Balkens erfolgt eine Zuordnung zur LuxE Superfamilie (Acc.-Nr.: cl10450). Im Fall der in Abb. 12 angegebenen Firefly-Luziferase (Acc.-Nr. CAA59281) ist nun der Name „LuxE“ als „Acyl-Protein Synthetase für die Region AS₄₈ - AS₅₃₀ vermerkt. Wie schon in Abb. 12 beschrieben, weist die AS-Sequenz von LUC_SUBDO Ähnlichkeiten zu Multidomänen-Proteinen, wie Acyl-CoA Synthetasen (hier „CaiC“; Acc. COG0318) auf.

Eine erneute, zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführte Analyse der Luziferase mit dem Blastp-Algorithmus zeigte eine Veränderung bzw. eine Aktualisierung der NCBI-Datenbank. In diesem Fall ergab sich eine, ebenfalls bei den Luziferasen angegebene Zugehörigkeit zur LuxE Superfamilie (s. Abb. 19). Ein E-Wert ist nicht angegeben.

Die Acyl-Protein Synthetase LuxE katalysiert in biolumineszenten Bakterien, ausgehend von einem Protein und einer Fettsäure, die Bildung eines Acyl-Protein-Thioesters. Im zweiten Schritt der Fettsäurereduktion wird Tetradecansäure zum Aldehyds substrat der von der Luziferase katalysierten Biolumineszenzreaktion umgewandelt. Die Analyse der LuxE-Sequenz von *Photobacterium phosphoreum* ermittelte ein konserviertes Cystein an Position 364. Es wird möglicherweise während der Übertragung der Acylgruppe von der Synthetaseuntereinheit zur Reduktase acyliert. Dem C-Terminal der Synthetase wird zugeschrieben, als flexibler Arm für die Übertragung der Acylgruppen zwischen den Bindestellen für Aktivierung und Reduktion zu fungieren (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd_srv.cgi?uid=127381).

Die aus der Blastp-Analyse und in den Abbildungen 17 & 19 beschriebene Zuordnung der LUC_SUBDO zu Multidomänen-Proteinen wird in der neueren Analyse bestätigt. In Abb. 19 ist die Darstellung der ermittelten, möglichen konservierten Domänen der Luziferase ($E\text{-Wert} = 6e^{-112}$) zu sehen. Die Bezeichnung „CaiC“ (Acc.-Nr.: COG0318) steht für Acyl-CoA Synthetasen (AMP-bildend/ AMP-Säure Ligasen II), welche eine Rolle im Fettstoffwechsel sowie in der Biosynthese und im Transport von Sekundärmetaboliten spielen. Die Region mit dem Namen „CaiC“ ist in der NCBI-Datenbank u. a. bei den Luziferasen und den 4-Cumarat:CoA Ligasen als konservierte Domäne angegeben. Für die Luziferase von *Photinus pyralis* umfasst die „CaiC“ Region die As₁₁ - As₅₄₅.

Die Sequenzhomologie von LUC_SUBDO zu Luziferasen der Insekten als Multidomänen-Proteine wird auf struktureller Ebene verdeutlicht. Die strukturelle Klassifizierung der Luziferasen ist am Beispiel der Firefly-Luziferase in der folgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 1: Strukturelle Klassifizierung der Luziferase in der SCOP-Datenbank.

Strukturelle Klassifizierung von Proteinen (SCOP) (http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.f.ce.b.b.html).	
Enzymklasse:	Multidomänen Proteine (alpha and beta) [56572]
Faltung:	Acetyl-CoA synthetase-like [56800]
Superfamilie:	Acetyl-CoA synthetase-like [56801]
Familie:	Acetyl-CoA synthetase-like [56802]
Protein:	Luziferase [56803]
Spezies:	Firefly (<i>Photinus pyralis</i>) [TaxId: 7054] [56804]

Ein E -Wert von $4e^{-80}$ aus der SMART-Analyse gibt mögliche strukturelle Ähnlichkeiten des Proteins aus *S. domuncula* (As₅₄ - As₅₇₈) zur Kristallstruktur der Luziferase von *Luciola cruciata* (PDB:2D1S|A2d1s) an (Nakatsu *et al.*, 2006). Dies wird ebenfalls durch die Ähnlichkeit zur Kristallstruktur der Luziferase von *Photinus pyralis* unterstrichen (As₅₄ - As₅₇₉) und mit dem hohen E -Wert von $1e^{-112}$ belegt (Conti *et al.*, 1996). Hinterlegt ist diese Sequenz ebenfalls in der Proteindatenbank (PDB:1LCI) und in der SCOP Datenbank (SCOP:d1lci). Ein weiterer Vergleich der abgeleiteten As-Sequenz der Luziferase mit bekannten Protein-3D-Strukturen des MATRAS-Programmes bestätigte die Ergebnisse. Die Analyse lieferte erneut einen Nachweis für die Ähnlichkeit von LUC_SUBDO zu den Luziferasen (*Luciola cruciata*; 2d1sA; E -Wert von $2e^{-82}$).

Zusätzlich wurde die As-Sequenz der Luziferase aus *S. domuncula* mit Hilfe des PHYRE-Servers analysiert, welcher die Homologie zu anderen Proteinen bezüglich der Proteinfaltung untersucht. Die Ähnlichkeit zur Faltung der Luziferase von *Photinus pyralis* wird mit einer Übereinstimmung von 32 % und einem E -Wert von $5,2e^{-20}$ angegeben (SCOP:d1lci; Acetyl-CoA:Synthetase-ähnlich; s. Tab. 1). Parallel zur Vorhersage der potenziellen Proteinstruktur wurde eine Sequenzanalyse mit Pcons (*Protein Structure Prediction Meta Server*) durchgeführt. Hier wurden die Ergebnisse aus den beschriebenen Analysen der Schwamm-Luziferase mit den höchsten E -Werten bezüglich der in der Datenbank enthaltenen Kristallstrukturen untermauert. Für die Homologie zu den Luziferasen aus *Photinus pyralis* (PDB:1LCI) und *Luciola cruciata* (PDB:2D1SA) ergaben sich die E -Werte von $1e^{-154}$ und $1e^{-150}$. Unter den angegebenen PDB-Codes ist u. a. die in Tab. 1 für Luziferasen dargestellte SCOP-Klassifizierung zu finden. Die geringere Homologie zur Acetyl-CoA:Synthetase aus *S. cerevisiae* mit einem E -Wert von $6,3^{-05}$ bezüglich der Region von As₁ bis As₅₈₁ spiegelt sich in der aus der Pcons-Analyse ermittelten Übereinstimmung mit der Kristallstruktur des Enzyms (PDB:1RY2) wieder (E -Wert = $1e^{-129}$).

2.1.3.2 Sequenzvergleich von LUC_SUBDO mit Luziferasen der Insekten

Mit Hilfe der aus den Sequenzanalysen von LUC_SUBDO ermittelten und unter 2.1.3.1 beschriebenen Motive und Domänen konnte eine deutliche Homologie zu den Luziferasen der Insekten und damit die Zuordnung zu den Adenylat-bildenden Enzymen bestätigt werden. Der Vergleich der As-Sequenz mit den Sequenzen

anderer Luziferasen (Blastp-Algorithmus) ergab eine hohe Übereinstimmung mit der Luziferase von *Photinus pyralis* (CAA59281.1). Abbildung 20 stellt das aus der NCBI-Datenbank erhaltene As-Sequenzalignment dar.

```
>emb|CAA59281.1| firefly luciferase [Photinus pyralis] Length=550
Score = 301 bits (770), Expect = 8e-85, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 191/527 (36%), Positives = 284/527 (53%), Gaps = 37/527 (7%)

Query 76  QDFSFKGKRIAVDG-----I SWKEYS FNQIDEWTSKFSSGLKRIGFKTGDVL 123
          +   K KR A+V G             I++ EY      E + + + +KR G T +
Sbjct 24  EQLHKAMKRYALVPGTIAFTDAHIEVNITYAEYF-----EMSVRLAEAMKRYGLMTMHR 78

Query 124 SIVAPNSPEYSVLFPGALASGGVVITCNPTYTAD EICFQFKNSNAKMV-ATIPALLPTIQ 182
         ++ NS ++ + GAL G V N Y E+      S +V + L +
Sbjct 79  VVCSENSLQFFMPVLGALFI GVAVAPANDIYNERELLNSMNI SQPTVVVFSKKG LQKILN 138

Query 183 EACKGSNIETIIVLDESRRARDGLVSYQSLISD-----SGSLFDPSPIDLHKT-AVLP 235
          K I+ II+D S+   G S + ++      + F P S D KT A++
Sbjct 139 VQKKLP IIQKII IMD--SKTDYQGFQSMYTFVTSHLPPGFNEYDFVPE S FDRDKTIAIIM 196

Query 236 YSSGTTGLPKGYMLSHKNIASVNTQMHHSEFFDL SIEGSCLIGVLPFPHHLYGMI/IRASS 295
          SSG+TGLPKGY L H+      + F + I + ++ V+PF H +GM      ++
Sbjct 197 NSSGSTGLPKGYALPHRTACVRFSHARDPIFGNQIIPDTAL LSVVPPFHHGFCMF----TT 252

          Boxl                               LBS
Query 296 LRY---GSRLVTLPKFEPETFLAAFQNHVRNTAFLVPPPLVLFLAKHPLVNSYMLSSLDQI 352
          L Y   G R+V + +FE E FL + Q++++ +A LVP L F AK L++ Y+LS+L +I
Sbjct 253 LGYLICGFRVVLMYRFEELFLRSLQDYKIQSAILVPTLFSFFAKSTLIDKYDLSNLHEI 312

Query 353 MTGAAPVGGETVKATKEVVGCRVIRQLYGLTEGVPVTHMTPEQQGMTKPD SVGVC LRSVN 412
          +G AP+ E +A +R   IRQ YGLTEG +TPE G KP VG +
Sbjct 313 ASGGAPLSKEVGEAVAKRFHLPGRQCYGLTEGTSAILITPE--GDDKPGGVGKVPFFFE 370

          LBS                               Boxl
Query 413 TKIVSPETGEALPNGEEGELLISGPNVMKGYLNRPDATKECINEDGWFSTGDIGYYDNEG 472
          K+V +TG+ L + GEL + GP +M GY+M P+AT I++DGW +GDI Y+D +
Sbjct 371 AKVVDLDTGKTLGVNQRGELCVRGPMIMSGYVMNPEATNALIDKDGWLHSGDIAYWDEDE 430

Query 473 YFYITDFLKELIKVKGLQVAPAEIEALLVLHPKIAEAAVIGLPDERQGESPKAFVV-KKD 531
          +F+I DFLK LK KG QVAPAE+E++L+ HP I +A V GLPD+ GE P A VV +
Sbjct 431 HFFIWDPLKSLIKYKGYQVAPAELESILLQHPNIFDAGVAGLPDDDAGELPAAVVVLEHG 490

          Linker
Query 532 EGVNEKEVVDYIAEKLAHVHKLHTGGVEFVDVIPKPVSGIILRRMLRD 578
          + + EKE+VDY+A ++ K L GGV FVD +PK ++GK+ R +R+
Sbjct 491 KTMTEKEIVDYVASQVTTAKKLRGGVVFVDEVPKGLTGKLDARKIRE 537

          K570
```

Abbildung 20: Aminosäuresequenzalignment von LUC_SUBDO mit der Luziferase von *Photinus pyralis* aus der Datenbankanalyse mit Blastp-Algorithmus (NCBI).

Die unter Acyladenylat-bildenden Enzymen konservierten Motive Boxl (gelb) und BoxlI (hellblau) sind gekennzeichnet. Farblich hervorgehoben sind unter anderem der Linker zwischen N- und C-terminaler Domäne (LKELI) und die potenziellen Luziferinbindestellen (LBS). Schwarz unterlegt sind außerdem die Aminosäuren, welche die Substratbindetasche bilden (Viviani, 2008a). Boxl: AMP-Bindemotiv (LPYSSGTTGLPKG); BoxlI: (LYGLTET); K⁵⁷⁰: katalytisch aktives Lysin.

Die unter Acyladenylat-bildenden Enzymen konservierten Motive Boxl und BoxlI sind farblich gekennzeichnet. Ebenfalls farblich hervorgehoben sind der Linker zwischen N- und C-terminaler Domäne (LKELI) und die potenziellen Luziferinbindestellen (LBS). Schwarz unterlegt sind außerdem die Aminosäuren, welche

die Substratbindetasche bilden (Viviani *et al.*, 2008a), zu der ebenfalls das katalytisch aktive Lysin K⁵⁷⁰ zählt. Die Sequenzhomologie zwischen den beiden Luziferasen wird durch den *E*-Wert von $8e^{-85}$ angegeben. Von den im Alignment verglichenen Aminosäuren sind 53 % ähnlich, 36 % davon identisch.

In dem in Abb. 21 dargestellten multiplen Alignment werden As-Sequenzen von Luziferasen (LUC) und Luziferase-ähnlichen Enzymen aus Insekten sowie LUC_SUBDO miteinander verglichen. Für das Erstellen des Alignments wurde die As-Sequenz der Luziferase aus *S. domuncula*, die entsprechenden Luziferasen aus *Photinus pyralis* (LUC_PHOPY, CAA59281.1), *Pyrophorus plagiophthalmus* (LUC_PYRPL, AAQ11712.1), *Culex pipiens quinquefasciatus* (LUC_CULQU, EDS40370.1), *Rhagophthalmus ohbai* (LUC_RHAOH, BAF34360.1), *Phrixothrix hirtus* (LUC_PHRHI, AAD34543.1) und die Luziferase-ähnlichen Enzyme aus *Agrypnus binodulus binodulus* (LUC_AGRBI, BAF96580.1) und *Drosophila melanogaster* (CG6178_DROME, NP_651221.1) verwendet.

Wie zuvor in Abb. 20 sind im Alignment die charakteristischen Motive sowie die As eingezeichnet, welche laut Viviani *et al.* (2008a) die Substratbindetasche bilden. Die aus einer Polypeptidkette bestehenden Luziferasen besitzen durchschnittlich eine Länge von 542 - 555 As, während LUC_SUBDO aus 581 As besteht.

```

LUC SUBDO      : MHRLSRFCWQFASRSP LSSSHASLQALKPHPI SLLYHSTQARSYTFGHTI QPTMIVT SFFPETEPS PV : 68
LUC PHOPY      : -----MEDAKNIKKG PAFYPLEDG : 20
LUC1_AGRBI     : -----MSKESMIVYGVGAAPVLES : 20
LUC PYRPL      : -----MMKREKNVIYGEPLHPLEDK : 21
LUC RHAOH      : -----MPNETILHCAKRPDPLDLG : 19
LUC PHRHI      : -----MEEENWVNGDRPRDLVFPG : 19
LUC CULQU      : -----MASKDES RFLISGGPEPQMITG F : 24
CG6178_DROME   : -----MTSKLLPGNIWYGVVTERQAQDS : 24
[AcCoA-ähnlich]

LUC SUBDO      : D FYRHLQDFSKFGKRI---AIVDGISWKEYS ERMQIDENISRFSSGDKRIG-FKGTGVLSTIVAPMSPE : 132
LUC PHOPY      : TAGEQDHKAMKRYALVPGTI AFTDAHIEVNIITYAEYFEMSVRLAEAMKRYG-LMTNHRIVWCSEMSTLQ : 87
LUC1_AGRBI     : TAGKQDFDSLKCHGHL P--QATIDYQTKQSI SYKMDFFAATCKLAHSLEEY G-LKQNDVVAICSEMNLN : 85
LUC PYRPL      : TAGEMDFRALRCHSHLP--QAIYDVVFGDESLSYKFFFEATCLLAQSLHNC G-YKMDVWVSTICAEPMKR : 86
LUC RHAOH      : TAGIQDYRALTNFSFLR--EALIDAHTEEVWSYADILENSCRLAKCYENY G-LRQNSVWISVCEMSTI : 84
LUC PHRHI      : TAGLQVYQSLYKYSYIT--DGLIDAHTNEVLSYAOIFETS CRLAVSLEKY G-LDHNNVVAICSEMNIH : 84
LUC CULQU      : GSMGAFVRNRMVRNGND--VAVIDGVYGTWQYLELLEQSVRLAECLRTLACIRVGVVIGIVSEMRLE : 90
CG6178_DROME   : RSLGQYILDKYK SFGDR--TVLVDAVNGVEYSASFVHKSI VRLAYILQKLG-VKQNDVWGLSEM SVN : 89

LUC SUBDO      : YSVLFFGALASG GVVITCMPVYTADEL CFQFKNSNAKWTATIPALPTIQEACKGSNIETIIVLDDDES : 200
LUC PHOPY      : FEMPVLGALFICGAVAVAPANDIYNEREL LNSMNTSQPTVYVYSKRG LQKILNVQKLPITQKIIIMDSK : 155
LUC1_AGRBI     : FYKPVCAALYCGIVLAPLMDSYSEGEYVNALNISEPKLIFCSK KCLPRLVGLKARCSFLKGFVVIDST : 153
LUC PYRPL      : FFIPPIAAMVIGMIVAPVME SYIPDELCKVNGISKPQIVFCTRNLNKNVLEWQSRTNF IKRUIILD TV : 154
LUC RHAOH      : FFYPVIAALYMGVITATVMDSYTERELLETHNISKPELVFC SKKAIKMMALKRNVNFKKKVLLD SK : 152
LUC PHRHI      : FFGPIIAALYQGI PMATSMQMYDEREMIGHNNTSKPCLMFC SKKSLPFLIKVQKHLDF IKRVIID SM : 152
LUC CULQU      : FPAVLFGALFVGATVAPINL VYSERELEHAFSLSKPKLIVVSPFSADRVVAAARRNRHIVQKVVIFGD : 158
CG6178_DROME   : PALAMFAGLAVGATVAPLNWVYSREVDHANNLSKPKLIVVSPFSADRVVAAARRNRHIVQKVVIFGD : 157

```


Innerhalb der Luziferasen der *Luciola*-Familie wird eine Homologie von über 80 % beschrieben, die, geht man von der As₂₀₀ aus, sogar über 90 % beträgt. Weniger homolog sind die *Luciola*-Luziferasen zur *P. pyralis*-Luziferase (67 %) und zu den Luziferasen der *Elateridae* mit 43 % (Ugarova & Brovko, 2002). Wie im Sequenzvergleich zu sehen ist, nimmt ab der BoxI (As₁₉₅, LUC_PHOPY) die Ähnlichkeit der Sequenzen zueinander zu. Bis zur As₁₉₄ besteht innerhalb der Luziferasen eine Sequenzähnlichkeit von 22 %, welche ab der As₁₉₅ bis zum C-Terminus bei 45 % liegt (Sala-Newby *et al.*, 1996). Die Homologie der Luziferasen zur *S. domuncula*-Sequenz beträgt bis zur As₁₉₅ 14 % und liegt danach bei durchschnittlich 41 %. Für die gesamte As-Sequenz liegt die Übereinstimmung mit den Luziferasen durchschnittlich bei 50 % an ähnlichen As (bezüglich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften), wovon 32 % identisch sind.

2.1.3.3 Sequenzvergleich von LUC_SUBDO mit verwandten Enzymen aus der Superfamilie

Im Gegensatz zur hohen Ähnlichkeit in der As-Sequenz von LUC_SUBDO zu den Luziferasen aus Insekten, zeigt das in Abb. 22 dargestellte multiple As-Sequenzalignment die geringere Homologie zu den angegebenen Mitgliedern der Adenylatbildenden Enzymfamilie. Für den Vergleich mit der Luziferase aus *S. domuncula* wurden folgende As-Sequenzen verwendet: die Acetyl-CoA Synthetase von *Saccharomyces cerevisiae* (ACS_YEAST; EDN59709), die Acyl-CoA Synthetase 2 von *Homo sapiens* (ACS2_HUMAN; AAH14123), die 4-Cumarat:CoA Ligasen aus *Arabidopsis thaliana* (4CL4_ARATH; Q9LU36.1), *Nicotiana tabacum* (4CL1_TOBAC; O24145.1) und *Pinus taeda* (4CL_PINTA; P41636.1) sowie die 4-Chlorobenzoat:CoA Ligase von *Alcaligenes sp.* AL3007 (4CLL_ALCSC; 1T5H; AAN10109).

Wie für die Luziferasen ist die Ähnlichkeit von LUC_SUBDO zu den 4-Cumarat:CoA Ligasen höher als zu den anderen Enzymen der Adenylatbildenden Superfamilie. Im Vergleich mit Langkettigen Acyl:CoA Synthetasen, Acetyl:CoA Synthetasen und 4-Cumarat:CoA Ligasen sind die Luziferasen mehr mit den letzteren verwandt (Ehltling *et al.*, 2001).


```

LUC_SUBDO : MTP---EQQGMTRPDSVGVCLRSVNTKIVSPETGEALPNGEEGELLIS-----GPNVMKGY : 443
ACS2_HUMAN : AHFP--EDTVEQKAESVGRIMPHTEARIMNMEACTLAKLNTPGELCIR-----GYCVMLGY : 472
ACS_YEAST : LVTPLAGGVTPMHPGSASFPPFFGIDAVVLDPNICEELNTSHAEGVLAVKAAWPSFARTIWK : 538
4CLL_ALCSC : MNSLYMRQPKTGTEMAPGFFSEVIRIVRIGGGVDEIVANGEEGELIVAA-----SDSAFVGY : 365
4CL1_TOBAC : MCLAFAKEPFDIKSGACCTVVRNAEMKIVDPDTCESLPRNQPGEICIR-----GDQIMKGY : 404
4CL_PINTA : MNLAFAKNPFVVKSGSCCTVVRNAQIKILDTECESLPHNQAGEICIR-----GPEIMKGY : 399
4CL4_ARATH : KSLAFARNPFKTKSGACCTVIRNAEMKVVDTETGICISLPRNKSGEICVR-----GHQLMKGY : 427
~~~~~
LUC SUBDO : LNRFPDAKKECINEDGWFSTGDIGYYDNEGYFYITDFLKELIKVKGLQVAPAEIEALLVLP : 504
ACS2_HUMAN : WGEPOKIEEAVDQDKVYWTGDVATMNEQGFCKIVGFSKDMIIRGGENIYPAELEDFHHTP : 533
ACS_YEAST : NHDRYLDTYLNPYPGYFFTGDAARKDKGYIMILGFVDDVWVJVS GHRLESTAEIEAAIIE : 599
4CLL_ALCSC : LNQPQATAEKIQ-DGUYRTSDVAVUTPEGTVRIIGFVDDMIISGGENIHPSEIERVLTGAP : 425
4CL1_TOBAC : LNDPEATTRTIDKEGULHTGDIGFIDEDDELFIIVDFLKELIKYGKGFQVAPAEIEALLNHP : 465
4CL_PINTA : INDPESTAATIDEEGULHTGDVEYIDDEEIFIVDFVKEIKYKGFQVAPAELEALLVAHP : 460
4CL4_ARATH : LNDPEATARTIDKDGULHTGDIGFVDDDEEIFIVDFLKELIKFKGYQVAPAELEALLISHP : 488
~~~~~
LUC SUBDO : KIAEAAVIGLPDERQGESPKAFVVKKDEGVNEKEVVDYIAE-----KLAVHKHLTG : 555
ACS2_HUMAN : KWQEVQVVGKDDRMGEEICACIRLKDGEETVVEELKAFCK-----GKISHPKIPK : 584
ACS_YEAST : IWAECAVVGFNDDLTCQAVAAVWLNKNSSTATDDELQDIKKHLVFTVRKDIGPFAAPK : 660
4CLL_ALCSC : GWTEVVVIGLADQRWQCSVTDQVVPRLGETLSADALDTFCRS-----SELADFKRPK : 477
4CL1_TOBAC : NISDAAVVPMKDEQAGEVPPVAFVWRSNGSATTEDEVKDFIS-----KQVIFYKRVK : 516
4CL_PINTA : SIADAADVPOKHEEAGEVPPVAFVWKS--SEISEQEIKEFVA-----KQVIFYKRIH : 509
4CL4_ARATH : SIDDAAVVMKDEVADEVPPVAFVWRSQGSQLEDDVKSQVYV-----KQVIFYKRIK : 539
~~~~~
LUC SUBDO : GVEFVDVTPKPVSGKILRRRLRDSK----- : 581
ACS2_HUMAN : YIVFVINYELTISGKIQKFKLREQLERHLNL----- : 615
ACS_YEAST : LIILVDDLPKTRSGKIMRRILRKILAGESDQLGDVSTLSNPGIVRHLIDSVKL : 713
4CLL_ALCSC : RYFILDQLPKNALNKVLRRLVQQVSS----- : 504
4CL1_TOBAC : RYFFVETVPKSPSGKILRKDLRRLAAGVPN----- : 547
4CL_PINTA : RYVFDVATPKSPSGKILRKDLRRLAAK----- : 537
4CL4_ARATH : MFFFIEVTPKAVSGKILRKDLRRLAETMCSK----- : 570
~~~~~
~L~~~~~]
AcCoA-ähnlich]

```

Abbildung 22: Alignment von LUC_SUBDO und verwandten Mitgliedern der Acyladenylat-bildenden Enzyme.

Für den Vergleich wurden folgende Sequenzen herangezogen: die 4-Chlorobenzoat:CoA Ligase von *A. sp.* AL3007 (4CLL_ALCSC; 1T5H AAN10109.2), die Acyl-CoA Synthetase 2 von *H. sapiens* (ACS2_HUMAN; AAH14123.1), die Acetyl-CoA Synthetase von *S. cerevisiae* (ACS_YEAST; EDN59709.1) und die 4-Cumarat:CoA Ligasen von *A. thaliana* (4CL4_ARATH; Q9LU36.1), *N. tabacum* (4CL1_TOBAC; O24145.1) und von *P. taeda* (4CL_PINTA; P41636.1). Die nach der BLOSUM 62 Matrix vorgenommene Farbmarkierung (Henikoff & Henikoff, 1992) zeigt den Grad der Übereinstimmung (schwarz $\geq 95\%$, dunkelgrau $\geq 85\%$, hellgrau $\geq 60\%$ konservierte As). Das Alignment wurde mit ClustalX 2.0 erstellt und mit GeneDoc 2.6 bearbeitet. Die für die Luziferasen, als Mitglieder der Acyladenylat-bildenden Enzyme, konservierten Motive (BoxI und BoxII) sind farbig hervorgehoben.

Aus dem Sequenzalignment ergeben sich für die Luziferase aus *S. domuncula* ca. 48 % ähnliche As zu den 4CL, von denen ca. 30 % identisch sind. Diese Werte entsprechen in etwa denen der Luziferasen aus Insekten im Vergleich mit den 4CL. Eine wesentlich geringere Ähnlichkeit in der As-Sequenz besteht zu Enzymen, wie z. B. der Acetyl:CoA Synthetase aus *S. cerevisiae* mit 30 % an As mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften und ca. 14 % identischen As. Ein geringer *E*-Wert von $6,3e^{-05}$ bestätigt die geringere Homologie von

LUC_SUBDO zur Acetyl:CoA Synthetase (EC 6.2.1.1) Domäne, welche für den gesamten Sequenzbereich von As₁ bis As₅₈₁ angegeben ist. Zwischen den Insekten-Luziferasen und der Acetyl:CoA Synthetase aus *S. cerevisiae* sind ca. 28 % der As ähnlich, von denen ca. 12 % identisch sind. Werden wie im Alignment der Abb. 16 die Bereiche vor und hinter der As₁₉₅ (LUC_PHOPY) miteinander verglichen, zeigt sich zwischen den Luziferasen und den CoA Ligasen eine geringe Ähnlichkeit von 8 % vor der As₁₉₅ und von bis zu 30 % ab der As₁₉₅ (Sala-Newby *et al.*, 1996). Im Vergleich mit den 4CL zeigt LUC_SUBDO bis zur As₁₉₅ ca. 33 % ähnliche As, während im Bereich danach die Ähnlichkeit zunimmt (59 %). Die beschriebene geringe Ähnlichkeit zur Acetyl:CoA Synthetase aus *S. cerevisiae* wird durch 24 % ähnliche As für den Bereich vor der As₁₉₅ und 36 % für den Bereich nach der BoxI verdeutlicht.

2.1.4 Phylogenetische Analyse der *S. domuncula* Luziferase

Die Luziferase aus *S. domuncula* wurde mit Luziferasen und weiteren Adenylatbildenden Enzymen, wie Acyl:CoA Synthetasen und 4-Cumarat:CoA Ligasen bezüglich ihrer evolutionären Verwandtschaft untersucht. Ausgehend von den aus dem Blastp-Algorithmus der NCBI-Datenbank gewonnenen As-Sequenzen wurde zunächst ein multiples Sequenzalignment erstellt.

Die Analyse der As-Sequenzen erfolgte mittels BLOSUM-Matrices (Henikoff & Henikoff, 1992) und der Bootstrapping-Methode (Felsenstein, 1993) des Clustal-X 2.0-Programmes. Mit dem Programm GeneDoc 2.6 wurde die manuelle Nachbearbeitung der Sequenzen durchgeführt. Die anschließende Darstellung des berechneten Phylogrammes erfolgte mit TreeView (s. Abb. 23). Für den mit der „Neighbor-Joining“ Methode erstellten Stammbaum wurde die 4-Cumarat:CoA Ligase (4CL4) von *Arabidopsis thaliana* als Außengruppe verwendet. Es ist zu sehen, dass die anderen 4CL-Sequenzen zusammen mit der 4CL4 von *A. thaliana* eine Gruppe bilden. Innerhalb dieses phylogenetischen Stammbaums steht sie an der Basis der weiteren Gruppierung. Dabei sind die Sequenzen der Acyl:CoA Synthetasen zusammen angeordnet. Dem gegenüber steht die Gruppe mit den Luziferasen und Luziferase-ähnlichen Enzymen der Insekten, welche die Luziferase aus *Suberites domuncula* einschließt.

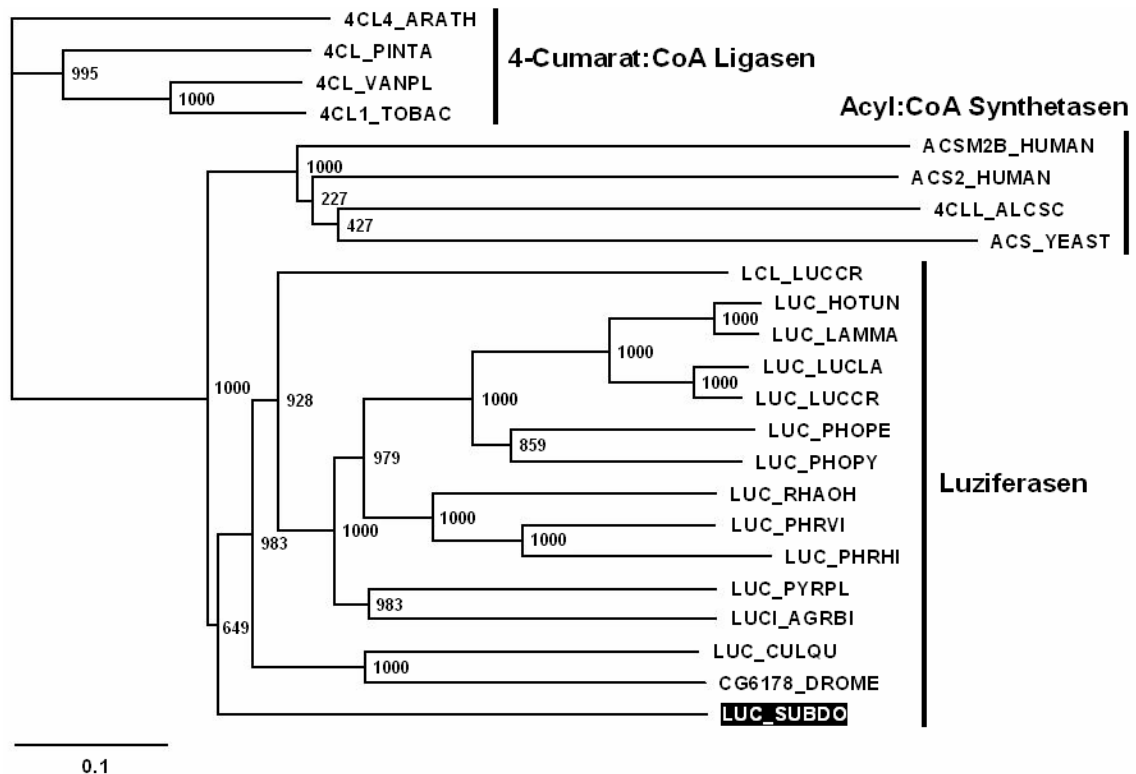


Abbildung 23: Phylogenetische Analyse von LUC_SUBDO mit Luziferasen und verwandten Proteinen.

Die Aminosäuresequenz von LUC_SUBDO wurde phylogenetisch verglichen mit den Luziferasen von *P. pyralis* (LUC_PHOPY; CAA59281.1), *C. pipiens quinquefasciatus* (LUC_CULQU; EDS40370.1), *P. plagiophthalmus* (LUC_PYRPL; AAQ11712.1), *P. hirtus* (LUC_PHRHI; AAD34543.1), *P. viviani* (LUC_PHRVI; AAD34542.1), *R. ohbai* (LUC_RHAOH; BAF34360.1), *P. pennsylvanica* (LUC_PHOPE; BAA05005.1), *L. cruciata* (LUC_LUCCR; P13129.1), *H. unmunšana* (LUC_HOTUN; AAN40975.1), *L. lateralis* (LUC_LUCLA; AAN73267.1), *L. maculata* (LUC_LAMMA; AAZ74651.1); den Luziferase-ähnlichen Proteinen von *D. melanogaster* (CG6178_DROME; NP_651221.1), *A. b. binodulus* (LUCI_AGRBI; BAF96580.1), *L. cruciata* (LCL_LUCCR; BAE80728.1); den Acyl:CoA Synthetasen von *H. sapiens* (ACS2_HUMAN; AAH14123.1 und ACSM2B_HUMAN; Q68CK6.1), der Acetyl:CoA Synthetase von *S. cerevisiae* (ACS1_YEAST; EDN59709.1), der 4-Chlorobenzoat:CoA Ligase von *Alcaligenes sp.* AL3007 (4CLI_ALCSC; 1T5H AAN10109.2) und den 4-Cumarat:CoA Ligasen von *N. tabacum* (4CL1_TOBAC; O24145.1), *V. planifolia* (4CL_VANPL; O24540.1), *P. taeda* (4CL_PINTA; P41636.1) und *A. thaliana* (4CL4_ARATH; Q9LU36.1). Das phylogenetische Diagramm wurde mit ClustalX 2.0 erstellt. Dabei wurde zur Konstruktion eines gewurzelten Stammbaumes die pflanzliche Sequenz der 4-Cumarat:CoA Ligase von *A. thaliana* als Außengruppe verwendet. Die Skala bezeichnet den evolutionären Abstand von 0,1 As-Substitutionen pro Position in der Sequenz.

2.1.5 Vergleich der As-Sequenz im Bereich zwischen der Box I und BoxII von LUC_SUBDO mit Luziferasen der Insekten

Die Ergebnisse der Datenbankanalyse von LUC_SUBDO (2.1.3) und die Struktur der *Photinus pyralis*-Luziferase (s. Abb. 18) bilden die Grundlage für die in Abb. 24 dargestellte Genstruktur der Luziferase mit den typischen Strukturmotiven.

Ein Vergleich der As-Sequenzen zwischen den konservierten Motiven BoxI und BoxII zeigt eine Homologie der *S. domuncula*-Sequenz zu den Luziferasen von 62 %, bezogen auf physikalisch-chemische Eigenschaften der Aminosäuren. 38 % der As sind identisch. Innerhalb der hoch konservierten BoxI, welche hier die As₂₃₄ - As₂₄₅ umfasst, besteht eine Sequenzähnlichkeit von 85 % (75 % identische As) zwischen den verglichenen Luziferasen. Die Erkennungssequenz des AMP-Bindemotivs ist gelb eingerahmt. Für das Motiv [YGLTE], welches im Alignment hellblau eingerahmt ist, liegt die Identität bei 65 %, der Anteil der ähnlichen As liegt bei 75 %. Die in Anlehnung an Viviani *et al.* (2008a) schwarz unterlegten As sind für die Substratbindung der Luziferasen verantwortlich. Mit Ausnahme der As₃₂₆ und As₃₇₀ (LUC_SUBDO) liegen die gekennzeichneten As in den von Viviani (2002) beschriebenen potenziellen Luziferinbindestellen.

2.1.6 Heterologe Expression der *SDLUC*-cDNA und Western Blot-Analyse

Die Expression der rekombinanten Luziferase aus dem Schwamm *Suberites domuncula* erfolgte mit dem im Abschnitt 5.2.2 beschriebenen *E. coli* Expressionssystem mit Gateway[®] Technologie (Invitrogen). Das rekombinante Enzym bildete u. a. die Grundlage für die Herstellung eines spezifischen polyklonalen Antikörpers (s. Abs. 5.2.7), welcher anhand immunologischer Methoden die Luziferase in Gewebeschnitten und Extrakten nachweisen kann. Zudem bietet die Überexpression die Möglichkeit, die Luziferaseaktivität des rLUC_SUBDO *in vitro* aufzuzeigen.

Der vollständige Leserahmen der *SDLUC*-cDNA, welcher für die Luziferase aus *S. domuncula* kodiert, wurde mit den spezifischen Primern *SDLUC_attB1* SP forward und *SDLUC_attB2* ASP reverse (s. Abs. 4.4.2) amplifiziert. Die durch die Touchdown-PCR (s. Abs. 5.1.1.3) an die *SDLUC*-cDNA-Sequenz angefügten *attB*-Rekombinationsstellen werden für die Klonierung eines positiven Luziferase-Klons mit dem GATEWAY[®] System benötigt (s. Abs. 5.2.2.1). Im Anschluss an die Transformation in die *E. coli* One Shot[®] BL21-AI[™] (s. Abs. 5.1.4.4) wurde das rekombinante Protein exprimiert (s. Abs. 5.2.2.2 & s. 5.2.2.3). Mit der am 5'-Ende des Expressionsvektors pDEST[™] 17 liegenden 6x His-kodierenden Sequenz (His-Tag) lässt sich die rekombinante Luziferase aus den lysierten *E. coli*-Zellen unter Verwendung einer Ni-NTA-Affinitätschromatographie isolieren. Die anschließende

Analyse der exprimierten Luziferase erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese (SDS-PAGE, s. Abs. 5.2.8) und Western Blot (s. Abs. 5.2.9).

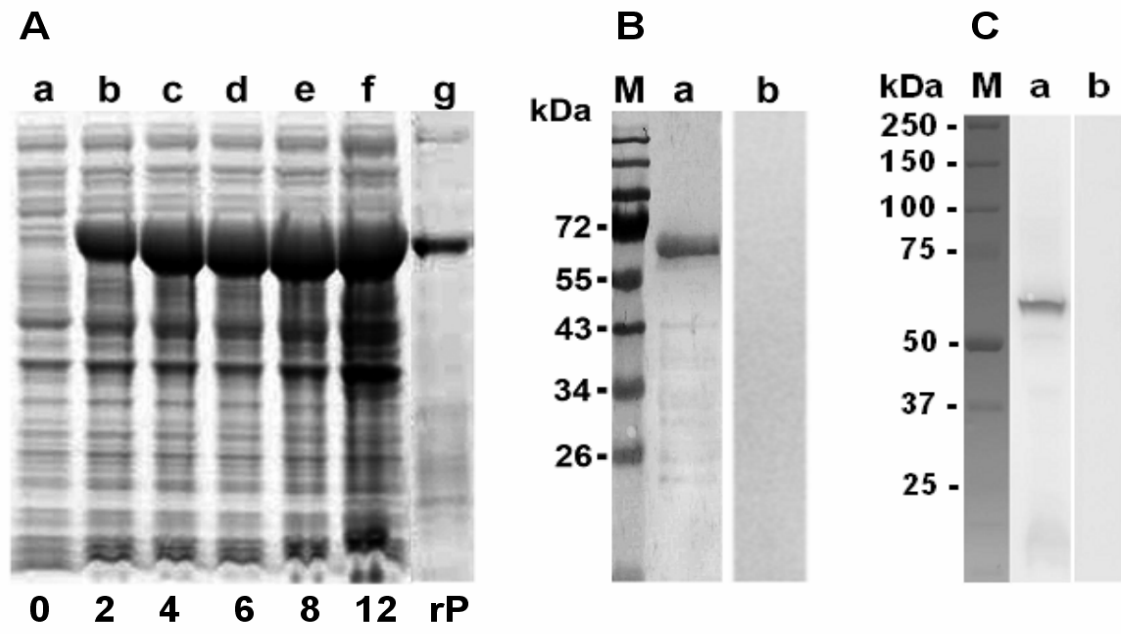


Abbildung 25: Heterologe Expression der für die Luziferase kodierenden cDNA *SDLUC*.

(A) Dargestellt ist die Expression von LUC_SUBDO in *E. coli* Zellextrakten. Die Kultur wurde mit L-Arabinose induziert und bis zu 12 h bei 20°C inkubiert (s. Abs. 5.2.2.2). Die bakteriellen Lysate der Rohextrakte (Spuren a - f) wurden in einem 4 - 12%-igen NuPAGE Gel (Invitrogen) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie® Brilliant Blau G-250 angefärbt. Dabei enthält Spur a das Lysat zum Zeitpunkt 0 vor der Induktion und die Spuren b - f die bakteriellen Lysate nach der Induktion zu den angegebenen Zeiten. Mit ca. 67 kDa entspricht die Bande in etwa dem errechneten Molekulargewicht rLUC_SUBDO (63,928 kDa + 2,6 kDa vom N-terminalen Histidin-Hexamere). Das polyhistidinmarkierte Protein (rP) wurde mit Ni-NTA Agarose aufgereinigt (Spur g).

(B) Western Blot-Analyse des rekombinanten Proteins. Detektion von rLUC_SUBDO mit dem gegen das rekombinante Protein hergestellten polyklonalen Antikörper (PoAB-aLUCSUBDO) und einem sekundären Antikörper anti-Kaninchen mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (s. Abs. 4.12). Das Antiserum (PoAB-aLUCSUBDO) erkennt die Bande von ca. 67 kDa (Spur a), während das Präimmunserum das gelelektrophoretisch aufgetrennte rekombinante Protein nicht erkennt. M: Protein-Molekulargewichtsstandard (s. 4.5).

(C) Western Blot-Analyse der Luziferase aus einem *S. domuncula*-Proteinextrakt. Detektion der *S. domuncula*-Luziferase mit dem spezifischen Ak PoAB-aLUCSUBDO und einem sekundären Ak anti-Kaninchen mit gekoppelter Peroxidase (s. Abs. 4.12). Der PoAB-aLUCSUBDO erkennt die Bande von ca. 64 kDa, während das Prä-Immunsereum keine Reaktion mit dem Protein zeigt. M: Protein-Molekulargewichtsstandard (s. Abs. 4.5).

Aus der SDS-PAGE (s. Abb. 25 A) ist zu erkennen, dass das rekombinante Protein bereits 2 h nach der Induktion mit L-Arabinose eine deutliche Überexpression aufweist. Die in den Spuren b - f aufgetragenen Zellysate (s. Abs. 5.2.2.2) zeigen, dass die Intensität der Proteinbande bis zu 12 h nach Induktion der Expression ansteigt. Mit den beschriebenen Banden, welche sich auf der Höhe des errechneten Molekulargewichts von ca. 67 kDa befinden (63,928 kDa

LUC_SUBDO + 2,6 kDa für den His-Tag), kann die Authentizität des Proteins nachgewiesen werden. Ein Bakterienlysat vor Induktion der Expression wurde als Kontrolle in Spur a aufgetragen. Zusätzlich wurde das rekombinante Protein, welches im Folgenden als rLUC_SUBDO bezeichnet wird, erfolgreich durch die Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. In Spur g aufgetragen, konnte es, durch die Färbung des Polyacrylamid-Gels mit Coomassie® Brilliant Blau G-250, als einzelne Bande mit ca. 67 kDa nachgewiesen werden. Anschließend wurde das gereinigte rekombinante Protein zur Herstellung des spezifischen polyklonalen Antikörpers (PoAB-aLUCSUBDO) verwendet (s. Abs. 5.2.7).

Mittels Western Blot wurde die erfolgreiche Expression der rekombinanten Luziferase erneut überprüft. Nach der Aufreinigung des Proteins aus den Bakterienzellen wurde es in einem 4 - 12%-igen NuPAGE Gel (Invitrogen) elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (s. Abs. 5.2.9). In Abbildung 25 B ist zu erkennen, dass das Antiserum (1:3000 verdünnt) das rekombinante Protein mit einer ca. 67 kDa erkennt (Spur a). In Spur b dagegen ist keine Reaktion der rekombinanten Luziferase mit dem Prä-Immunsereum zu beobachten. Der sekundäre Anti-Kaninchen Antikörper (1:4000 verdünnt) war mit alkalischer Phosphatase gekoppelt (s. Abs. 4.12). Die Detektion erfolgte mit NBT und BCIP (s. Abs. 5.3.1).

Des Weiteren wurde der Antikörper (Ak) PoAB-aLUCSUBDO für den Nachweis der Luziferase-Expression im Schwammextrakt verwendet. Nach der im Abschnitt 5.2.4 beschriebenen Herstellung des Proteinrohextraktes aus *Suberites domuncula* erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem 4 - 12%-igen NuPAGE Gel (Invitrogen). Für die Western Blot-Analyse wurde das Protein nach der SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach Absättigung unspezifischer Bindungen mit Blockierungspuffer, wurde die Membran mit dem Ak PoAB-aLUCSUBDO (1:1000 verdünnt) inkubiert. Der gebundene Ak konnte anschließend mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (s. Abs. 4.12, 1:10000 verdünnt) nachgewiesen werden. Die Detektion des sekundären Ak erfolgte mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL, s. Abs. 5.3.1). In Abbildung 25 C ist die vom Ak PoAB-aLUCSUBDO erkannte Bande zu erkennen (Spur a). Trotz der Verwendung eines Protein-Molekulargewichtsstandards mit abweichenden Größen zum Marker in Abb. 25 B wird deutlich, dass die hier nachgewiesene Bande in etwa bei 64 kDa liegt.

2.1.7 Funktionsanalyse der Luziferase

Emission von Biolumineszenzlicht durch Gewebe von *S. domuncula*

Aufgrund der bereits in der Einleitung (s. Abs. 1.2.7.2) beschriebenen Hinweise auf das Vorkommen von Biolumineszenz bei Schwämmen (s. S. 31/32) und der für die *Spiculae* nachgewiesenen Fähigkeit zur Lichtleitung (s. S. 35/36) wurde im folgenden Experiment (s. Abb. 26) untersucht, ob Schwämme in der Lage sind, Biolumineszenzlicht zu emittieren.

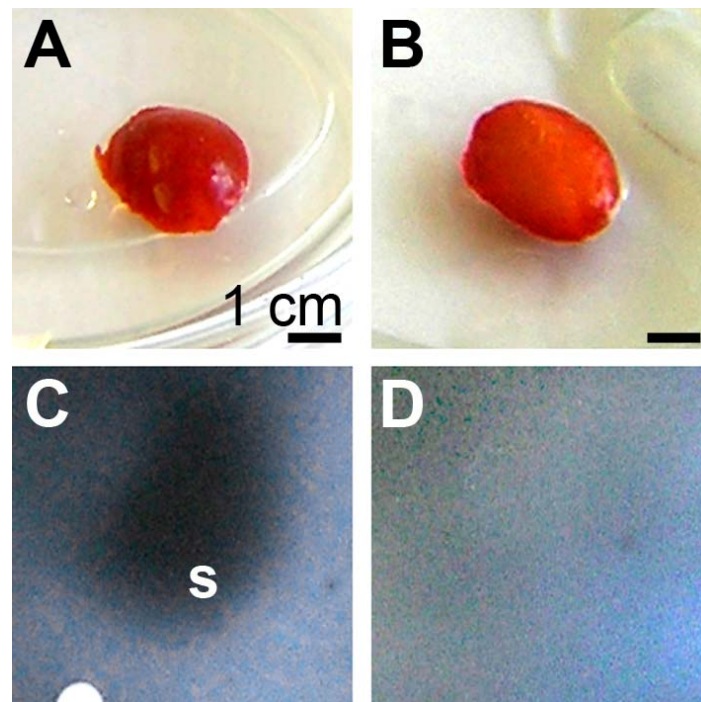


Abbildung 26: Erzeugung von Biolumineszenzlicht durch Gewebe von *S. domuncula*.

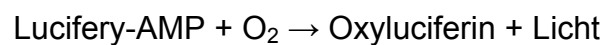
Das vom Schwammgewebe emittierte Licht wurde durch den Chemilumineszenz-Detektionsfilm (Roche) detektiert. Die Durchführung ist unter 5.2.10.1 beschrieben. Auf die an die Dunkelheit adaptierten Gewebestücke von *S. domuncula*, unbehandelt (**A**) bzw. prä-inkubiert mit Rotenon (**B**) wurde jeweils der Film aufgelegt (Silikonringe verhindern direkten Kontakt zum Schwamm). Nach einer Expositionszeit von 24 h wurden die Filme entwickelt und fixiert (Kodak GBX). In (**C**) ist das von *S. domuncula* emittierte Licht als Schwärzung des Chemilumineszenz-Detektionsfilms zu sehen. Das mit Rotenon prä-inkubierte Gewebestück zeigt in (**D**) kein Signal.

Hierfür wurden Schwammstücke eines *S. domuncula*-Exemplars verwendet, welches zuvor für drei Tage an die Dunkelheit adaptiert wurde (s. Abs. 5.2.10.1). Die Emission des Lichtes konnte auf dem Chemilumineszenz-Detektionsfilm (Lumi-Film; Roche Mannheim) nach dessen Entwicklung und Fixierung (Kodak GBX) nachgewiesen werden. In Abbildung 26 C ist zusehen, dass das Gewebestück, welches für 24 h Kontakt zu dem auf einem Silikonring liegenden Lumi-Film hatte (s. Abb.26 A), ein deutliches Signal liefert. Als Kontrolle diente ein Gewebe-

stück, welches parallel für zwei Tage mit Rotenon prä-inkubiert wurde (s. Abs. 5.2.10.1). Nachdem darüber ebenfalls ein Film für 24 h, auf einen Silikonring getützt, aufgelegt wurde (s. Abb. 26 B), konnte wie in Abb. 26 D zu sehen ist, kein Signal festgestellt werden.

Messung der Bioaktivität der rekombinanten Luziferase

In Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und O_2 katalysiert die Luziferase der Insekten die Oxidation des Luziferins über das Intermediat Luciferyl-AMP zu Oxyluziferin nach folgender Reaktion (s. auch Abb. 12):



Bei der Umsetzung des Substrates D-Luciferin wird Licht emittiert und kann z. B. mit einem Luminometer (s. 5.2.10.2) nachgewiesen werden.

Die gereinigte und renaturierte rekombinante Luziferase aus *S. domuncula* wurde im Folgenden auf ihre biologische Aktivität hin überprüft. Dabei erfolgte die unter 5.2.10.2 beschriebene Durchführung der luminometrischen Messungen leicht variierend nach den ausgearbeiteten Lumineszenz-Assays von Michel *et al.* (2001) und Oba *et al.* (2003). Die Ergebnisse der dargestellten Messungen sind in RLU (relative light units) mit logarithmischer Skala angegeben (s. Abb. 27).

Der in der Abbildung angegebene Hintergrund (background) wurde durch die Messung des Standard-Reaktionsansatzes (s. Abs. 4.10) ohne rekombinantes Enzym bestimmt und liegt bei 920 RLU. Geringfügig höhere RLU-Werte lieferten die Messungen des Proteins in Abwesenheit von ATP und CoA. Die aus dem Assay mit der rekombinanten Luziferase und dem Standard-Reaktionsansatz ermittelten RLU sind wesentlich höher und in der Abbildung 23 dargestellt. Bei einer Konzentration von 0,5 μg wird für das Enzym eine spezifische Aktivität von 72000 RLU ermittelt. Das aus der Reaktion von 3 μg rLUC_SUBDO emittierte Licht wird mit 150000 RLU angegeben und ist damit entgegen den Vermutungen nur doppelt so hoch wie die Werte aus der Reaktion von 0,5 μg Protein. Eine mögliche Begründung könnte in einem Einfluss von zurückgebliebenen Verunreinigungen während der Enzympräparation liegen. Dagegen zeigten die Messungen mit geringeren Konzentrationen der rLUC_SUBDO die erwartete proportionale Abnahme des emittierten Lichtes. Für die Reaktionsansätze mit je 0,1 μg und 0,05 μg Protein wurden 22000 und 12000 RLU gemessen. Parallel wurde die Lumineszenz-Messung mit der rekombinanten Luziferase aus *P. pyralis*

durchgeführt. Sie zeigt unter den angegebenen Standard-Bedingungen eine spezifische Aktivität von 346000 RLU/ μg Enzym.

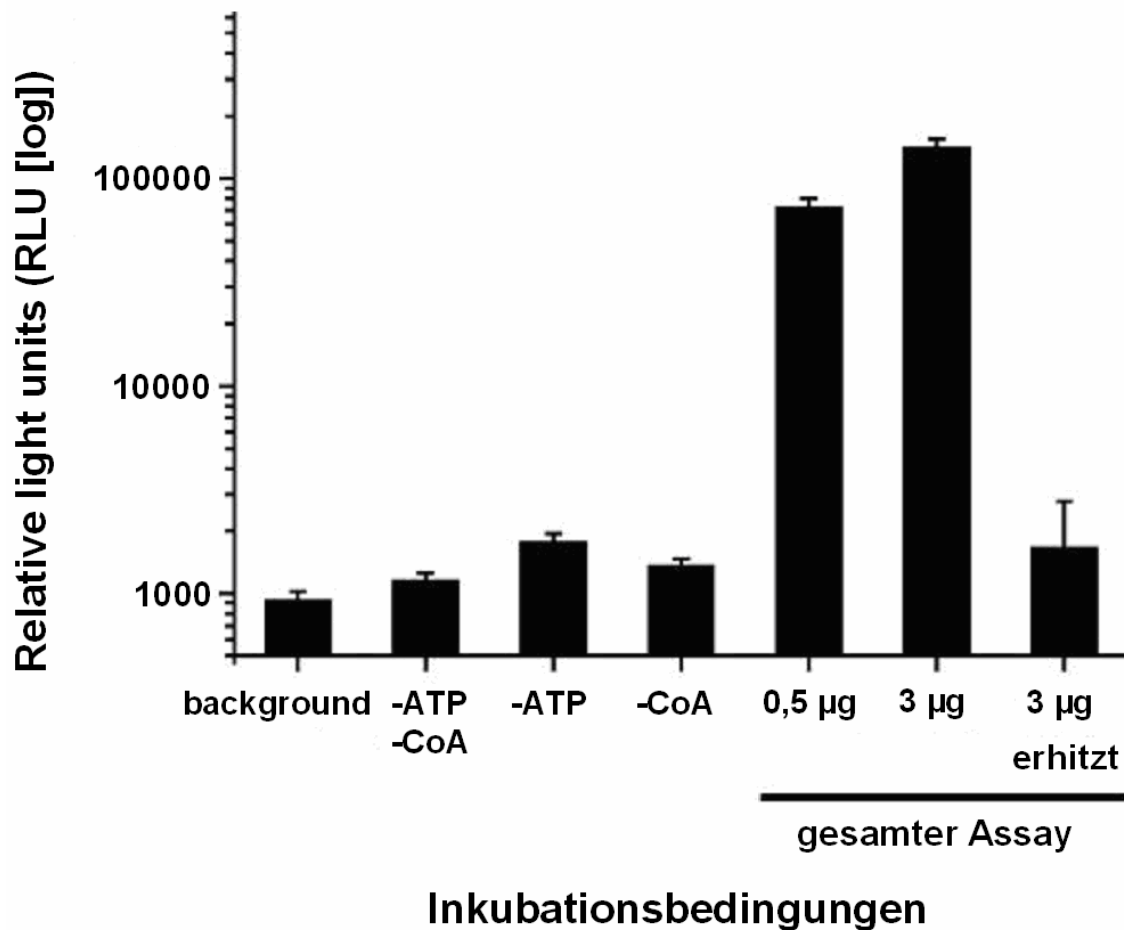


Abbildung 27: Ergebnisse aus den Lumineszenzmessungen der rLUC_SUBDO.

Die Luziferase aus *S. domuncula* wurde kloniert (s. 5.2.2.1) und exprimiert (s. 5.2.2.3). Um die Bioaktivität des rekombinanten Proteins zu messen, wurde die Luziferase im Anschluss an die Renaturierung (s. 5.2.5) in einem „Lumineszenz-Assay“ eingesetzt (s. 5.2.10.2). Für die Biolumineszenzmessung wurden eine Reihe paralleler Ansätze (z. B. in Abwesenheit von ATP und/oder CoA bzw. mit unterschiedlichen Konzentrationen der rekombinanten Luziferase) verwendet (Sachs, 1974). In einem Kontrollansatz wurde das Protein eingesetzt, nach dem es für 5 min einer Temperatur von 95 °C ausgesetzt war. Die Messung der Lichtemission erfolgte im Luminometer „Lumat 9501“ der Firma Berthold. Die Werte sind in RLU (relative light units) mit einer logarithmischen Skala dargestellt.

Aus den Ergebnissen ist zu sehen, dass die in dieser Arbeit analysierte *SDLUC*-cDNA für eine Luziferase kodiert. Wie durch die Luziferasen der Leuchtkäfer wird in Anwesenheit von D-Luziferin, ATP und Mg^{2+} Licht emittiert. Die spezifische Aktivität der rekombinanten Luziferase wurde durch die Messung des zuvor auf 95 °C erhitzten Proteins bestätigt. In diesem Ansatz konnte keine Aktivität festgestellt werden. Das Ergebnis stimmt mit der für die Luziferasen der Insekten ermittelten Hitzeempfindlichkeit überein (Oba *et al.*, 2003).

Zudem zeigten Biolumineszenzstudien von Ugarova *et al.* (2005), dass die von den Luziferasen der Leuchtkäfer katalysierte Biolumineszenzreaktion pH-abhängig ist. Bezüglich der vorhandenen Homologie zu den *Lampyridae* wurden weitere Messungen der Schwamm-Luziferase bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Während bei den bisher beschriebenen Bedingungen mit einem pH von 8,0 (0,4 M Tris-HCl) die spezifische Aktivität bei 72000 RLU/0,5 µg Protein lag, stieg die Lichtemission bei pH 9,0 auf 83000 RLU/0,5 µg rLUC_SUBDO. Im Gegensatz dazu nahm die spezifische Aktivität bei pH 10,0 mit 59000 RLU/0,5 µg Protein und bei pH 7,0 mit 51000 RLU/0,5 µg Protein ab.

In einer weiteren Messreihe wurde der aus dem Schwammgewebe präparierte Proteinrohextrakt verwendet (s. Abs. 5.2.4). Für den Lumineszenz-Assay mit dem für die rekombinante Luziferase verwendeten Standard-Reaktionsansatz (s. Abs. 4.10) wurden Aliquots von je 10 µg Protein eingesetzt. Diese Proben wiesen mit durchschnittlich 25300 ± 3200 RLU ebenfalls eine Luziferaseaktivität auf. In den durchgeführten Kontrollen mit einem Reaktionsansatz ohne ATP und CoA bzw. erhitztem Proteinextrakt konnten nur geringe Aktivitäten von $RLU < 1000$ gemessen werden.

In vitro Biolumineszenz-Emissionsspektrum der rLUC SUBDO

Die Ergebnisse aus dem *in vitro* Bioaktivitätstest der Luziferase zeigen, dass sowohl für den Proteinrohextrakt als auch für die rekombinante Luziferase eine Emission von Licht gemessen werden konnte. Die emittierte Lichtmenge wird vom „Lumat 9501“ mit einem Photomultiplier im Spektralbereich zwischen 390 - 620 nm ermittelt. Zur eindeutigen Identifizierung wurde daher in Anwesenheit von D-Luziferin und ATP die spektrale Signatur der Biolumineszenz bei pH 8,0 aufgenommen (s. Abb. 28).

Das *in vitro* Biolumineszenz-Emissionsspektrum der rekombinanten Luziferase wurde, wie unter 5.2.10.3 beschrieben, mit dem Perkin-Elmer LS55 Fluoreszenz Spektrophotometer gemessen. Die Messung erfolgte über einen Wellenlängenbereich von 450 nm - 650 nm. In Abb. 28 ist zu sehen, dass sich das emittierte Licht im gelb-grünen Bereich des Spektrums befindet. Das Emissionsspektrum des Proteins aus *S. domuncula* weist ein Maximum bei 548 nm mit einer Schulter bei 590 nm auf und zeigt eine Übereinstimmung mit den Biolumineszenz-

spektren des Luziferin/Luziferase Systems der Leuchtkäfer, die im Wellenlängenbereich von 520 nm - 620 nm liegen (Biggley *et al.*, 1967).

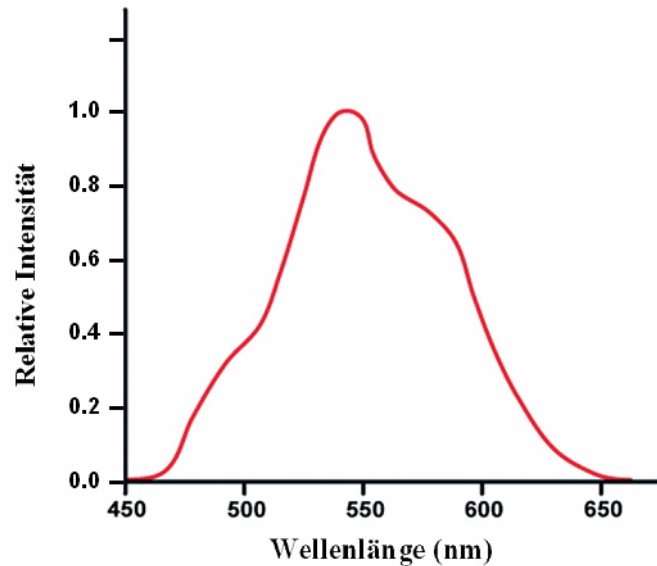


Abbildung 28: *In vitro* Biolumineszenz-Emissionsspektrum der rekombinanten Luziferase aus *S. domuncula*.

Die Biolumineszenzreaktion wurde in 0,4 M Tris-HCl Puffer mit pH 8,0 durchgeführt (s. Abs. 4.10). Das Spektrum wurde für die Geräteparameter korrigiert gemessen.

2.1.8 Immunhistologische Analyse

Für die Untersuchung der Lokalisation des Proteins im Schwammgewebe wurden histologische Schnitte von *Suberites domuncula* angefertigt (s. Abs. 5.3.2.1) und anschließend mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (s. Abs. 5.3.2.3). Dabei wurde der gegen die Luziferase gerichtete polyklonale Antikörper PoAb-aLUCSUBDO (s. Abs. 5.2.7) als primärer Ak verwendet, der wie im Abschnitt 2.1.6 beschrieben, die Luziferase bereits aus einem *S. domuncula*-Proteinextrakt und als rekombinantes Protein erkannte. Der eingesetzte sekundäre anti-Kaninchen Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Indodicarbocyanin) konjugiert (s. Abs. 4.7 & 4.12).

Die Abb. 29 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der mittels Immunfluoreszenzfärbung analysierten Gewebeschnitten von *Suberites domuncula*. Mit der Nomarsky-Optik des Fluoreszenzmikroskops AH3 von Olympus sind im Gewebe von *S. domuncula* das Kanalsystem (ca) und einzelne *Spiculae* (sp) zu erkennen (s. Abb. 29 A). Die Verteilung der Zellen wird durch die Zellkernfärbung

mit DAPI (s. Abb. 29 B) visualisiert und bestätigt die spezifische Färbung durch den Ak PoAb-aLUCSUBDO (s. Abb. 29 C) innerhalb einer Zelle.

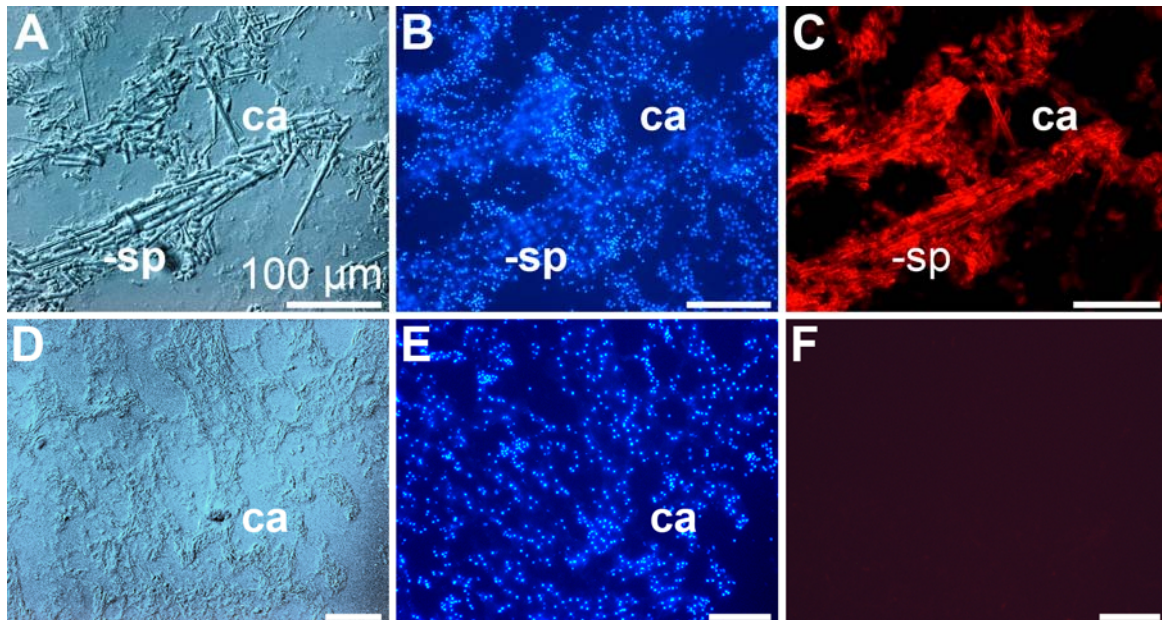


Abbildung 29: Mikroskopische Analyse der Lokalisation der Luziferase in Gewebe von *S. domuncula* mittels Immunfluoreszenzfärbung.

Nach der Präparation der Gewebeschnitte erfolgte die im Abschnitt 5.3.2.2 beschriebene immunocytochemische Färbung der Schnitte. In dieser wurden die Schnitte durch ein System aus polyklonalem LUC_SUBDO-Antikörper (PoAB-aLUCSUBDO) und Fluorochrom-gekoppeltem Sekundärantikörper markiert. Zur Visualisierung der Zellkerne (blau) wurde eine Doppelfärbung mit DAPI durchgeführt. Bei entsprechender Lichtanregung wurde die Färbung mit dem Mikroskop analysiert. (A) Mit der Nomarsky-Lichtmikroskopie sind im Gewebeschnitt Kanäle (ca) und die *Spiculae* (sp) zu erkennen. (B) Darstellung der im Fluoreszenzmikroskop sichtbaren Zellkerne (blau) durch die Doppelfärbung mit DAPI. (C) Immunfluoreszente Visualisierung der Reaktion mit dem polyklonalen Luziferase-Antikörper und daran gekoppelten Cy3-konjugierten sekundären Antikörper. Die Abbildungen D - F zeigen den mit dem Prä-Immunsersum behandelten Gewebeschnitt. (D) Die Betrachtung des mit Prä-Immunsersum inkubierten Schwammgewebes mit dem Nomarsky-Lichtmikroskop. (E) Parallele Darstellung der mit DAPI gefärbten Zellkerne (blau). (F) Kein Signal bei der Behandlung mit dem Prä-Immunsersum und dem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper.

Wie im Anschluss an die DAPI-Kernfärbung fluoreszenzmikroskopisch im untersuchten Gewebeschnitt zu sehen ist, liegen die gefärbten Zellen im Bereich der *Spiculae* (s. Abb. 29 C). Zur Bestätigung der Antikörperspezifität wurden die Gewebeschnitte parallel mit dem entsprechenden Prä-Immunsersum inkubiert (Abb. 29 D - F). In der abgebildeten Kontrolle ist lediglich eine schwache Hintergrundfärbung zu erkennen (s. Abb. 29 F). Neben den mit der Nomarsky-Optik des Mikroskops betrachteten Gewebestrukturen (s. Abb. 29 D) sind in Abb. 29 E die durch DAPI-Doppelfärbung gekennzeichneten Zellkerne zu sehen.

2.2 Das Luziferin regenerierende Enzym aus *Suberites domuncula*

2.2.1 Klonierung und Charakterisierung der für das Luziferin regenerierende Enzym kodierenden cDNA (*SDLRE*) aus *S. domuncula*

Parallel zu den Arbeiten mit der Luziferase konnte in der Schwamm-cDNA-Datenbank die Existenz eines Sequenzabschnittes mit der EST Datenbank Nr. sd002_005d festgestellt werden, welcher Homologien zu den LRE (Luziferin regenerierende Enzyme) der Insekten aufwies. Die Vorgehensweise zur Suche der vollständigen *SDLRE*-cDNA glich der für die Luziferase beschriebenen. Das vorliegende, in Abb. 31 grün markierte cDNA-Fragment bestand aus 720 Nt und umfasste mit den AS_3 - AS_{245} einen Teil des ORFs des potenziellen Luziferin regenerierenden Enzyms aus *S. domuncula*. Anhand des cDNA-Fragmentes wurden genspezifischen Primer (s. Tab. 7) konstruiert, die zusammen mit vektor-spezifischen Primern in einer PCR eingesetzt wurden (s. Abs. 5.1.1.2). Die entstandenen PCR-Produkte wurden anschließend in den Vektor pGEM[®]-T ligiert (s. Abs. 5.1.4.2), in *E. coli* One Shot[®] TOP10 Zellen transformiert (s. Abs. 5.1.4.4) und sequenziert (s. Abs. 5.1.5). Ein Vergleich der resultierenden Teilfragmente mit der bereits vorliegenden cDNA-Sequenz ergab eine Übereinstimmung im überlappenden Bereich, so dass die komplette Nukleotidsequenz auch über die untranslatierten Regionen am 5`- und 3`-Ende (bis zur PolyA-Sequenz) ermittelt werden konnte. Die im Contig (Vector NTI[®]) entstandene Komplettssequenz und die amplifizierten Teilsequenzen wurden einer Datenbankanalyse (BLAST-Algorithmus) unterzogen.

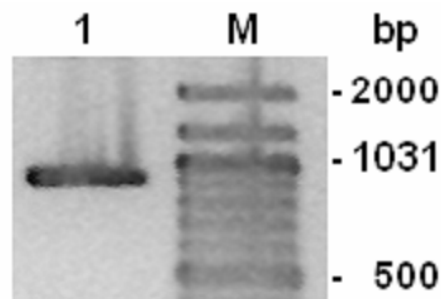


Abbildung 30: Agarose-Gel zur Überprüfung der Amplifikation des kompletten LREs aus *Suberites domuncula*.

Agarose-Gel zur Überprüfung der spezifischen Amplifikation der kodierenden Sequenz von *SDLRE*. Es wurden die Primer SD_FcLRE und SD_RcLRE verwendet. Das PCR-Produkt wurde in einem einprozentigen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Spur 1) und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Positionen des in Spur 2 aufgetragenen Markers sind rechts gekennzeichnet.

Mit Hilfe der genspezifischen Primer SD_FcLRE: 5`-ATGGAGAAGTCAGGTCTTA ATC-3` und SD_RFcLRE: 5`-TCAACACTTGAACCTGTTGGCA konnte in einer PCR (s. Abs. 5.1.1.2) ein vollständiger und fehlerfreier Klon aus der cDNA-Bank amplifiziert werden (s. Abb. 30). Die vollständige cDNA des Luziferin regenerierenden Enzyms von *S. domuncula* wurde als *SDLRE* bezeichnet.

2.2.2 Analyse und Charakterisierung der Basensequenz und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz

Die vollständige Sequenz des potenziellen LREs aus *S. domuncula* besitzt eine Gesamtlänge von 1150 bp (exklusive PolyA). An Position 17 beginnt die kodierende Sequenz mit dem Initiationsstartcodon AGA **AACATGG**, welches sich innerhalb der charakteristischen Konsensussequenz GCC **A/GCCATGG** für die Initiation der Translation bei Eukaryoten (Kozak, 1991) befindet. Die Sequenz beinhaltet einen ORF von 918 bp (306 As). Die untranslatierte Region (UTR) am 3'-Ende besteht aus 213 Basenpaaren, 191 bp vor dem polyA-Ende liegt ein **AATAAA**-Polyadenylierungssignal, welches zu 100 Prozent der eukaryotischen Konsensussequenz **AATAAA** (Zarkower et al., 1986) entspricht. Zusätzlich liegt zwischen den Nukleotiden 1042 und 1647 mit der Sequenz **AATGAA** ein weiteres, weniger effizientes Polyadenylierungssignal vor.

	M E K S G L N P S P T V E L L Y	16
GTTAGACAAAAGAA ACATGG AAGAAGTCAGGTCTTAATCCTAGTCCTACTGTGGAGCTGCTCTAT		48
D G K A E I G E G P F F E P E T N Q L L W V		38
GATGGAAAAGGCTGAAATAGGTGAAGGGCCATTCTTTGAGCCTGAGACAAATCAGTTGCTCTGGGTG		114
D I Y K C T I N F L N L A T I E N R S M Q L		60
GACATTTATAAGTGCACATATAAACTTTCTCAACCTGGCAACAATTGAGAACAGATCCATGCAGCTA		180
P E K V G F V I P V E G S S N L L A G I G		82
CCAGAGAAGGTTGGGTTTGTATTTCCTGTTGAAGGATCAAGCAATCTTTTAGCTGGGATTGGGACA		246
K L C L V N R E T	G D I V E E L A C V D G D	104
AAACTATGTCTTGTCAACAGAGAAAACAGGTGATATTGTGCAAGAGCTTGCCTGTGTTGACGGAGAT		312
K P N R F N D A K C D A N G R L W A G T M A		126
AAACCCAACAGGTTCAATGATGCAAAAGTGTGATGCTAATGGAAGGTTGTGGGCTGGTACAATGGCT		378
L A A G P S G L S K N E G T L Y S F V A G K		148
TTAGCAGCTGGACCTAGCGGTCTATCTAAGAATGAGGGAACACTGTACAGTTTTGTAGCAGGAAAA		444
V T P C V P G V T I S N G L G W S L D N S K		170
GTGACTCCTTGTGTACCTGGTGTGACAATCTCCAATGGCCTGGGATGGAGTCTAGACAACAGCAAA		510
M Y Y I D S I P Q K V Y S F D Y N F A D G T		192
ATGTACTACATTGACAGCATTCTCAGAAAAGTGTACTCGTTTGATTACAACCTTTGCTGATGGTACT		576
I A N Q K T F V D Y V S D D S S G F P D G M		214
ATCGCAAAATCAAAAAGACGTTTGTGGATTATGTATCTGATGACAGTTCTGGATTTCCCGATGGCATG		642

C T D I E G R L W V A S F G G G C V T C W D	236
TGCACTGATATTGAAAGGTCGTTTGTGGGTTGCTAGTTTTGGTGGAGGATGTGTCACCTTGTGGGAC	708
S K T G D K L A R L D I P G A K N I T S C C	258
TCTAAAACCGGTGACAAAACCTTGCTCGCTTGGATATTCTGGAGCTAAAAACATCACTTCTTGTGTGC	774
F G G P D H S W L F V T C G S A H V E D L S	280
TTTGGGGACCTGACCACAGCTGGCTCTTTGTGACCTGTGGAAGTGCTCACGTCGAAGATCTGAGC	840
K E P N A G G I F V V K D S G T K G L P A N	302
AAAGAGCCAAAACGCGGGAGGAATTTTGTGCGTTAAGGATTCAGGAACCAAAGGATTGCCT GGCCAAAC	906
R F K C *	306
AGGTTCAAGTGTTGA	918
<u>ACCAAGACTGGGACTAAA<u>AAATAAA</u>GCTAACTGTGCGGTATTTTCTACGAACAGGTGTGAACTTTGAAC</u>	987
<u>TGTGTATAGTCTAACTATATACATGTTTGTATTTTTTACCAGTTTTGTGTGATA<u>AAATGAA</u>ATCATTT</u>	1053
<u>TAGTTAGTAAAAGATCATCATTGCTGCATGCAGCATCAAAAAGTACAAGTGTGTACTTTACATAATCCA</u>	1119
<u>TAATGGGTCTTAATG (A_n)</u>	1134

Abbildung 31: Nukleotidsequenz der LRE-cDNA und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des LREs aus *Suberites domuncula*.

Die Sequenz besteht aus 1150 bp und der offene Leserahmen beginnt mit dem der Kozak-Konsensussequenz entsprechendem Startcodon **ATG** an Position 17 und endet mit dem Stoppcodon **TGA** an Nukleotidposition 919. Untranslatierte Bereiche am 5'- bzw. 3'- Ende der Sequenz sind **dunkelblau**, kodierende Bereiche sind schwarz dargestellt. Die Polyadenylierungssignale sind unterstrichen. Die für das Vervollständigen des Fragmentes (**grün**) und die Amplifikation der kodierenden Sequenz verwendeten Primern sind **unterstrichen** bzw. **fettgedruckt** hervorgehoben. Grün markiert sind die potenziellen Domänen für die Luziferinbindung.

Das abgeleitete Protein umfasst 306 Aminosäuren und wurde als LRE_SUBDO bezeichnet (s. Abb. 31). Das errechnete theoretische Molekulargewicht beträgt 32,841 kDa und der Isoelektrische Punkt liegt bei 4,68 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>). Der Instabilitätsindex mit 30,91, welcher sich auf die *in vitro* Eigenschaften des Proteins bezieht, klassifiziert das Protein als stabil. Die Sequenzanalyse mit ScanProsite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>) und SOFTBERRY (<http://www.softberry.ru/cgi-bin/programs/proloc/psite.pl>) lieferte folgende Motive potenzieller posttranslationaler Modifikationen.

1) N-Glykosylierung eines Asparaginrestes

(Konsensus: N-{P}-[ST]-{P}; Marshall, 1972):

As₅₅ - As₅₈ (NRSM); As₂₅₃ - As₂₅₆ (NITS)

(2) Leucin-Zipper

(Konsensus: L-x(6)-L-x(6)-L-x(6)-L; Landschulz *et al.*, 1988): As₁₂₀ - As₁₄₁

(3) Phosphorylierung eines Serin-/Threoninrestes durch eine Caseinkinase II

(Konsensus: [ST]-x(2)-[DE]; Pinna, 1990): As₁₃₅ - As₁₃₈ (SKNE);

As₁₉₈ - As₂₀₁ (TFVD); As₂₁₆ - As₂₁₉ (TDIE); As₂₃₃ - As₂₃₆ (TCWD).

(4) N-Myristoylierung eines Glycinrestes

(Konsensus: G-{EDRKHPFYW}-x(2)-[STAGCN]-{P}; Towler *et al.*, 1988):

As₈₁ - As₈₆ (GTKLCL); As₁₃₃ - As₁₃₈ (GLSKNE); As₁₃₉ - As₁₄₄ (GTLYSF);
 As₁₅₅ - As₁₆₀ (GVTISN); As₁₆₁ - As₁₆₆ (GLGWSL); As₁₉₁ - As₁₉₆ (GTIANQ);
 As₂₂₉ - As₂₃₄ (GGCVTC); As₂₃₀ - As₂₃₅ (GCVTVW); As₂₉₈ - As₃₀₃ (GLPANR).

2.2.3 Datenbankanalyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Der Vergleich der Proteinsequenz des LRE_SUBDO mit der NCBI-Datenbank (Blastp) ergab eine Homologie zu den Luziferin regenerierenden Enzymen (LRE) der Insekten. Des Weiteren bestehen Ähnlichkeiten zum Seneszenz Marker Protein 30 (SMP30) und zur Gluconolactonase verschiedener Organismen. In Abb. 32 ist die für LRE_SUBDO mit einem E -Wert von $3e^{-63}$ aus der Blastp-Analyse vorhergesagte „SGL“-ähnliche Region (pfam08450) dargestellt. Sie ist in einer Vielzahl von eukaryotischen und prokaryotischen Proteinen enthalten. Zusammen mit dem SMP30 (EC 3.1.8.2) und der Gluconolactonase (EC 3.1.1.17) bildet das Luziferin regenerierende Enzym (LRE) die Grundlage für die Bezeichnung der „SGL“-ähnlichen Region. Eine weitere für die LRE_SUBDO-Sequenz vorhergesagte Region liegt im Bereich der As₁₀ - As₃₀₀ (E -Wert = $4e^{-50}$). Das COG3386 kennzeichnet Gluconolactonasen.

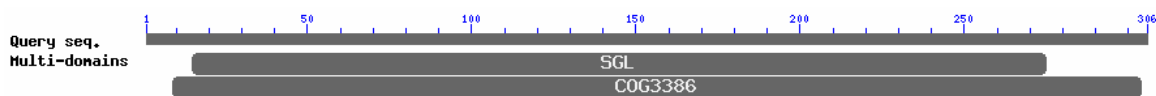


Abbildung 32: Vorhergesagte konservierte Domäne aus der Protein-Alignmentanalyse mit dem Blastp-Algorithmus.

Der obere Balken repräsentiert die Proteinsequenz (306 As) des LRE_SUBDO. Die Sequenzanalyse mit BLASTp (NCBI) ergab eine Homologie zur „SGL“-ähnlichen Region (E -Wert = $3e^{-63}$). Mit der Bezeichnung pfam08450 ist ein Bereich beschrieben, der laut <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrezdb=cdd&cmd=search&term=pfam0845> mehr als eine Domäne umfasst, jedoch keiner Domänen-Superfamilie zugeschrieben wird. Außerdem wird für den Sequenzbereich des LRE_SUBDO von As₁₀ bis As₃₀₀ die Ähnlichkeit zu Gluconolactonasen (COG3386) angegeben.

Mit der Pfam- und SMART-Analyse (<http://pfam.sanger.ac.uk/>; <http://smart.embl-heidelberg.de/>) wurde die Homologie zur genannten „SGL“-ähnlichen Region bestätigt, welche den Bereich von As₁₅ - As₂₇₃ umfasst (Pfam Acc.-Nr.:PF08450; E -Wert = $4,5^{-86}$). Strukturell wird ebenfalls aus der SMART-Analyse, jedoch mit einem geringeren E -Wert von $9e^{-23}$, eine Homologie zur 2ghs|a-Domäne vorhergesagt. Diese Region umfasst hier die As₂₂ bis As₂₈₉ und bezieht sich auf einen Bereich des Regucalcins aus dem *Agrobacterium tumefaciens* (15155668;

AAK86512.1). Es ist in der EMBL-EBI-Datenbank mit seiner Kristallstruktur in einer 1.55 Å-Auflösung unter der Bezeichnung „2ghs“ eingetragen. Einen weiteren Nachweis für die Homologie des LRE_SUBDO zu Proteinen mit der „SGL“-ähnlichen Region ergab die Analyse mit InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Für die untersuchte LRE-Sequenz wurden Homologien zur „SGL“-ähnlichen Region (IPR013658; PF08450), zur SMP30 Familie (IPR005511; PR01790) und zum Regucalcin (IRP008367; PR01791) prognostiziert.

2.2.3.2 Sequenzvergleich von LRE_SUBDO mit Luziferin regenerierenden Enzymen der Insekten

Die Ähnlichkeit von LUC_SUBDO zu den Luziferin regenerierenden Enzymen der Insekten ist in dem in Abb. 33 dargestellten As-Sequenzalignment mit dem LRE aus *P. pyralis* (AAO66431.1) zu sehen.

```
>gb|AA066431.1 luciferin-regenerating enzyme [Photinus pyralis] Length=308
Score = 138 bits (347), Expect = 5e-36, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 104/315 (33%), Positives = 154/315 (48%), Gaps = 27/315 (8%)

Query 10  PTVELLYD-GKAEIGEGPFFPETNQLLWVDIYKCTINFLNLATIENRSMQLPEKVGFI 68
          P VE + + GK +GEGP ++ ET L +VD + T + + + ++ + V F+I
Sbjct 3   PVVEKIAELGKYTVGEGPHWDHETQTLYFVDITVEKTFHKYVPSQKQYTFCKVDKLVSFII 62

Query 69  PVEGSSNLLAGIGTKLCLVNRETEGDI-----VEELACVDGD-KPNRFMDAKCDA 116
          P+ GS          G + + RE          +          +E + V+ K NR MD K D
Sbjct 63  PLAGSP-----GRFVVSLEREIALLTWDGVSAAPT SIEAIVMVEPHIKNNRLMDGKADP 116
          LBD1

Query 117 NGRLWAGTMALAAG-PSGLSKNEGTLYSFVA-GKVTPCVPGVTISNGLGWSLDNSKMYII 174
          G LW GTMA+ AG P G          G+LY A KV          + I+NGL WS D KMYII
Sbjct 117 LGNLWTGTMAIDAGLPVG--PVTGSLYHLGADKKVKMHESNIAIANGLAWSNDLKKMYII 174

Query 175 DSIPQKVYSFDYMFADGTIANQKTFVDYVSDSSGFPDGMCTDIEGRLWVAFSGGGCVTC 234
          DS ++V +DY+ + +I+NQ+ + + G+PDG D EG LWVA F G +
Sbjct 175 DSGKRRVDEYDYDASTLSISNQRPLFTFEKHEVPGYPDGQTIDAEGNLWVAVFQGQRIIK 234

Query 235 WDSKTGDKLA-RLDIPGAKNITSCCFGDPHSWLFVTCGSAHVEDLS--KEPNAGGIFVW 291
          ++ + L + IP + +TS FGGP+ L+VT ++D S K G ++ W
Sbjct 235 ISTEQPEVLLDTVKIPDPQ-VTSVAFGGPNLDELIVTSAAGLQLDDSSFDKSLVNGHVYFV 293

Query 292 KDSGTRKSLPANRFKC 306
          G K + K
Sbjct 294 TGLGVKSLFAGVKVKL 308
          LBD2
```

Abbildung 33: Aminosäuresequenzalignment von LRE_SUBDO mit dem Luziferin regenerierenden Enzym von *Photinus pyralis*.

In dem aus der Blastp-Analyse resultierenden Sequenzalignment des LRE_SUBDO und dem LRE aus *P. pyralis* sind die potenziellen Domänen für die Luziferinbindung in Luziferin regenerierenden Enzymen grün eingrahmt (Day & Bailey, 2003).

Von den im Alignment verglichenen Aminosäuren sind 48 % ähnlich und davon sind 33 % identisch (E -Wert = $5e^{-36}$). Die zwei potenziellen Bindedomänen für Luziferin/Oxyluziferin (Day & Bailey, 2003) umfassen in der Luziferasesequenz aus *S. domuncula* die Bereiche der As₈₂ - As₉₁ (LBD1) und As₂₉₀ - As₂₉₇ (LBD2). Sie sind im Alignment grün eingerahmt.

```

LRE_SUBDO : -----MEKSGMNP--SHTVELLYD-GKAEI GEGPFEPETNQLLWVDLYKCTLN-FMNLATI : 53
LRE_PHOPY : -----M---GFWVEKIAELGKYTVGEGPHWDHCTQTLVYFVDIVVEKTFHKYVP--SQ : 46
LRE_LUCCR : -----M---AFTVEQLVELGTYLLAESPHWDDTQSLYFVDIVGRSVMKYVP--IT : 46
LRE_LUCLA : -----M---SFWIEQLTEVDNFQIGEGPHWDDTQSLYFVDIVLEKSDHKYVP--ST : 46
LRE_TRICA : -----M---AFTVEQLVELGTYLLAESPHWDDTQSLYFVDIVFGQAIDHKYVP--ST : 44
LRE_ACYPI : MSLLKCNVLLSLMAVTSGAWNYNGASIREVADDVM-VH-GEGPFWDSENNVLYFVDIVSQHRVYRFYENRLE : 70
                                     [SGL-ähnlich]

LRE_SUBDO : ENRSMQLPEK--VGFVIVPESSNLLAGIGTKLCLMREI GDI-----VEEILACVD---GDKPMRF : 109
LRE_PHOPY : KKYTFCKVDKL-VSFIIPVACSP-----GFWVSLEREIALLTMDGVSAAPTSTIETVNVVE--PHIKMRL : 109
LRE_LUCCR : KTHITQLKFDKMP-SFIIPVKECS-----DRFVSLEREIALLTMDGASSAPSKIEKIAVDFNTPEKSEMRL : 111
LRE_LUCLA : KQHITKMI LNKRP-SFIIPVKECS-----DRFVSLEREIALLTMDGVSATPSHLEITVTVD--TGIEGNTF : 109
LRE_TRICA : NTHAKVVIIEGGPVTHVIVPEETI-----DKFLVSLGRKLVIVTMDGTSDKISNSLLEVEWENKSGYFMRRF : 110
LRE_ACYPI : HVQLDGDV---GFWIVVHQQ-----GLFVIGIGTTLATLRWLNNE-STNKVVKLITVDM--NKPGMRW : 128
                                     [SGL-ähnlich]

LBD1

LRE_SUBDO : NDAKCDANGRLWAGTMAL--AAGPSGLSKNEGILYSFVAG---K--WTPCWPGWITISNGLGWSLDNSKMYII : 174
LRE_PHOPY : NDGKADPLGNLWAGTMAL--DAGLPVG--PVTGSLRHUGAD---K-KVVMHESNDAIANGLAWSMDLRKMYII : 174
LRE_LUCCR : NDGKADPLGNLWAGTMAM--GSDHTTGT-PVRCGLSSLSN---K-QVKEHVSEVCIISNGLAWSKDLKKFYII : 176
LRE_LUCLA : NDGKADAFGNLWAGTLYS-KFDIEKQG-PNTGTLSSLSN---K-QLRKHISNIFLSNGLAWSMDLKKFYII : 174
LRE_TRICA : NDGKADPTGRLWAGTMGP-EPEIGKLE-KEKALYTVG---KHQVKTHTLKVSTIANGLAWSMDLKKMYII : 176
LRE_ACYPI : NDAKADTNGYLWAGTMGFEDAAAGNI--PPGRCTLYKNDTSCFKS-LEPVLPGVWSVSNGLAWSMDGNTRKMYII : 197
                                     [SGL-ähnlich]

LRE_SUBDO : DSIPQKVVYFDNMFADGTLIAKQKTFVDYVSDSSGFPDGMCTDIEGRLWVASFGGGCVTCWDSKTDGDKLARL : 246
LRE_PHOPY : DSGKRVWDEYDNDASTLSTSNQRPLTFEKEHWPGYPDGQTIDAEGNLWVAVFQGRITIKISTEQPEVLLDT : 246
LRE_LUCCR : DSAVQVWDFDNDAKNLSLSNRQPLTFDFKHGDMGSPDGQTIDAEGNLWVATCQGRVLLKIDTSTPETLLGI : 248
LRE_LUCLA : DSNKRTIDQFDNDSENLITSNCQPLTLDKHCQGLPDAQIDENDNLWVALVVRGKVINI GIKQPEVLLGV : 246
LRE_TRICA : DSPRRTVWDEYDMLLEKGEICMRKVVRLDVAHDVPGVPDGMTDIDGNLWVAVFDGGCLLHVNPRTSELL-NT : 247
LRE_ACYPI : DSPTQIAVFNMPVTAISNRKTFYDFKTDNIPGVPDGMTIDANGDLWIANYDGAQVLYHSCTSAKLL-LGK : 268
                                     [SGL-ähnlich]

LRE_SUBDO : -DIPGAKNITSCCFGGPDHSMFLVVTGSAHWEDL--SKEPNAGGIFVWKSCTKGLPANRFRC----- : 306
LRE_PHOPY : WKIPDP-QVTSWAFGGPMLDELYVTSAGLQDDSSFDKSLWNGHVVVVTGLGVKGFACVKKVRL----- : 308
LRE_LUCCR : WEIPEH-QVTSWCIGGAELNLYVVTASIKIPGADETK-PMRGAINVVTGLGVKGLPGDRVRL----- : 309
LRE_LUCLA : IMMPES-LITSVCFGGSKLDELYVVTSGIKEYETDSTK-LVKGGLYVVTGLGVKGLPAHRFSL----- : 307
LRE_TRICA : IMFPAR-QITSAAFGGEMLDELYVTSAGLVKGA--TQPHFAGALFVVTGLGVKGFACVKKVRL----- : 308
LRE_ACYPI : LKIPAEK-VSSVTFGGPQLDKLYVVTISRGTPEKFMFVPLTGKVLVWVSGLGVKGLKMNRLREKCFRQL : 336
                                     [SGL-ähnlich]

LBD2

```

Abbildung 34: Alignment der LRE-Sequenz von *S. domuncula* mit LRE-Sequenzen aus Insekten.

Für den Vergleich wurden folgende LRE-Sequenzen herangezogen: *P. pyralis* (LRE_PHOPY; AAO66431.1), *L. cruciata* (LRE_LUCCR; BAB85479.1), *L. lateralis* (LRE_LUCLA; BAB85478.1) und die LRE aus *T. castaneum* (LRE_TRICA; XP_967986.1) und *A. pisum* (LRE_ACYPI; XP_001951053.1). Das multiple Sequenzalignment wurde mit ClustalX 2.0 erstellt und mit GeneDoc 2.6 bearbeitet. Die nach der BLOSUM 62 Matrix vorgenommene Farbmarkierung (Henikoff & Henikoff, 1992) zeigt den Grad der Übereinstimmung (schwarz $\geq 95\%$, dunkelgrau $\geq 85\%$, hellgrau $\geq 60\%$ konservierte As). Die potenziellen Domänen für die Luziferinbindung sind grün eingerahmt (Day & Bailey, 2003). Gekennzeichnet ist ebenfalls die „SGL“-ähnliche Region.

Für den weiteren Sequenzvergleich des LREs aus *S. domuncula* mit Luziferin regenerierenden Enzymen aus Insekten wurde das in Abb. 34 dargestellte multiple

Sequenzalignment erstellt. Dazu wurden im Anschluss an die Blastp-Analyse (NCBI) die As-Sequenzen der LREs aus dem amerikanischen Glühwürmchen *Photinus pyralis* (LRE_PHOPY; AAO66431.1), aus den japanischen Glühwürmchen *Luciola cruciata* (LRE_LUCCR; BAB85479.1) und *Luciola lateralis* (LRE_LUCLA; BAB85478.1) sowie die LRE-ähnlichen Enzyme aus dem roten Mehlkäfer *Tribolium castaneum* (LRE_TRICA; XP_967986.1) und der Erbsenblattlaus *Acyrtosiphon pisum* (LRE_ACYPI; XP_001951053.1) herangezogen. Nach dem Erstellen des Sequenzvergleiches mittels BLOSUM-Matrices der ClustalX 2.0 Software erfolgte die manuelle Korrektur mit GeneDoc 2.6, zur Erhöhung übereinstimmender As. Wie zuvor in Abb. 33 sind im dargestellten Alignment die potenziellen Domänen zur Substratbindung eingerahmt (Day & Bailey, 2003). Ebenfalls gekennzeichnet ist die „SGL“-ähnliche Region.

Das Alignment in Abbildung 34 zeigt, dass sich das LRE aus *S. domuncula* mit 306 As im Bereich der As der LRE aus *P. pyralis*, *L. cruciata* und *L. lateralis* mit 308; 309 und 307 Aminosäuren befindet. Für das LRE_SUBDO liegt das errechnete Molekulargewicht von 32,839 kDa etwas unter dem der LRE mit 33,806 kDa (*P. pyralis*), 33,802 kDa (*L. cruciata*) und 34,283 kDa (*L. lateralis*). Wie im Sequenzalignment ersichtlich und in Tab. 2 zusammengestellt ist, besteht zwischen dem Schwammprotein und den LRE aus Insekten eine Ähnlichkeit, wie sie zwischen der Schwamm-Luziferase und den Insekten-Luziferasen ermittelt worden ist. 31 % der As sind identisch, während 50 % den physikalisch-chemischen Eigenschaften nach ähnlich sind. Im Gegensatz dazu ist die Übereinstimmung der LRE aus Insekten mit 52 - 57 % untereinander geringer als die Ähnlichkeit zwischen den drei beschriebenen Luziferasen (Gomi *et al.*, 2002).

Tabelle 2: Homologie der LRE und Luziferase unter den Glühwürmchen *P. pyralis* (PHOPY), *L. cruciata* (LUCCR) und *L. lateralis* (LUCLA) sowie im Vergleich zu den Sequenzen aus *S. domuncula* (SUBDO).

	LRE	LUC
SUBDO : PHOPY	31 % (50 %)	32 % (49 %)
SUBDO : LUCCR	31 % (51 %)	32 % (50 %)
SUBDO : LUCLA	32 % (50 %)	31 % (50 %)
PHOPY : LUCCR	57 % (72 %)	67 % (81 %)
PHOPY : LUCLA	52 % (72 %)	67 % (81 %)
LUCCR : LUCLA	57 % (74 %)	93 % (97 %)

(in Anlehnung an Gomi *et al.*, 2002). In den Klammern sind die nach physikalisch-chemischen Eigenschaften ähnlichen Aminosäuren angegebenen. Die dargestellten Werte wurden mit Hilfe des „paarweisen“ Vergleichens der BLOSUM 30 Matrix des ClustalX 2.0 Programmes ermittelt.

2.2.3.3 Sequenzvergleich von LRE_SUBDO und verwandten Proteinen

Die Blastp-Analyse der LRE-Sequenz aus *S. domuncula* zeigte die ebenfalls für die LRE aus Insekten beschriebene Ähnlichkeit zum Seneszenz Marker Protein 30 (SMP30). Shimokawa & Yamaguchi (1993) zeigten, dass es sich beim SMP30 der Säugetiere, dessen Expression in der Leber und Niere im Laufe des Alterungsprozesses abnimmt (Ishigami *et al.*, 2001), um das Calcium-bindende Protein Regucalcin handelt. Ihre molekularbiologische Untersuchungen legten offen, dass das 1978 entdeckte Regucalcin (SMP30) nicht das typische EF-Hand Motiv enthält, welches sich in der Ca^{2+} -Bindedomäne befindet (z. B. bei Calmodulin). Wie Gomi *et al.* (2002) zusammenfassten, spielt das Regucalcin (kurz: RGN) aus Säugetieren eine „multi-funktionale“ Rolle in der Leber, der Niere und in neuronalen Hirnzellen. Dazu gehören z. B. die Regulierung verschiedener zellulärer Funktionen, die Kontrolle der Überexpression proliferierender Zellen und die Regulierung von intrazellulären Signalwegen.

Von den Regucalcinsequenzen, welche nach der Datenbankanalyse (NCBI) Ähnlichkeiten zum LRE_SUBDO aufwiesen, wurden das humane Regucalcin (RGN_HUMAN; BAD97080.1) und das Regucalcin aus *Mus musculus* (RGN_MOUSE; NP_033086.1) sowie aus *Xenopus laevis* (RGN_XENLA; BAA93719.1) und *Danio rerio* (RGN_DANRE; AAQ94576.1) zur Erstellung des Sequenzalignments (s. Abb. 35) verwendet.

```

LRE_SUBDO      : MEKSGLNPTWELLVDGKAEIGGGPFFPETNQLLIWDLYKCTINFLNLAIEIEMRSMDIPE : 62
RGN_HUMAN      : -----M-SSIKIECVLPENCRCGESPVWVEVSNLSLFFVDIPAKKWCROD SFDKQVQRVMDA : 56
RGN_MOUSE      : -----M-SSIKVECVIRENYRCGESPVWVEEASQSLFFVDIPSKIICROD TVSNQVQRVMDA : 56
RGN_XENLA      : -----M-SSIKIECVVSETYKIGESPVWVEEKEGTLFFVDITGQKWCRODPSDKKVQSVSVEA : 56
RGN_DANRE      : -----M-SSIKVECVLKEKNEVGESEPVWVEEKDSSLFFVDITGQKWSRMSLQKQIESMITEK : 56
RGN1_9CHRO     : -----M--NNELELVMTQALLGECPCDDHHKQLLYWVDILNKQLHIYSQNNNTDRIIQDEE : 55
                [SGL-ähnlich~~~~~]

LRE_SUBDO      : KWGFVIPVEGSSNLLAGIGTKLCLVMRETEDIVEELACVDGDKPDRFNDARCDANGRLDAGT : 124
RGN_HUMAN      : PWSWVALRQ-SGGYVATIGTKFCALNMKEISAVVLAIVDNDKKMRFMD GKVDPAGRYFAGT : 117
RGN_MOUSE      : PWSWVALRQ-LGGYVATIGTKFCALNMENISVFFVLAIVDEDKKMRFMD GKVDPAGRYFAGT : 117
RGN_XENLA      : PIGSWALRK-SGGYVLAIGNTFSALNVEDISVITLARVDEDKPNRFD GKVDPEGRYFAGT : 117
RGN_DANRE      : LWGCWVPRQ-AGGYVIAEGTREAIFYDVKRSITAVAEVNE-KPNDRFMD GKVDPAGRYFAGT : 116
RGN1_9CHRO     : YWSCWVPRS-SGGVWLGATGFAALDLDSDIVKFLAKPENHPPTDRFMD GKCDPAGRYFAGT : 116
                ~~~~~
                LBD1
                ~~~~~

LRE_SUBDO      : MALAAGPSCISKNEGTLYSFFVAG-KWTPCVPGVTTISNGLGWSLDNSKMYIIDSLPQKWYSFD : 185
RGN_HUMAN      : MAEETAPAVLERHQCALYSLFPDHHVKKYFDQVDISNGLDWSLDHKIFYYIDSLSYSVDADF : 179
RGN_MOUSE      : MAEETAPAVLERHQCSLYSLFPDHSVKKYFDQVDISNGLDWSLDHKIFYYIDSLSYTVDADF : 179
RGN_XENLA      : MSQEIRPAVVERNQCSLFTLYPDHSVKKHFDQVDISNGLDWSLDHKTLYIIDSLSEKVDALD : 179
RGN_DANRE      : MSMDMKPDVVD---AALYNLQPDHSVVRHFDQVHLNGLDWSLDHRVFFYYIDSLAFMVEADF : 175
RGN1_9CHRO     : MDFEQR-----ENAFLYTLESNLIQIKQLDHTTIVANGGWSPDYSTLYFIDSPTQTIFADF : 173
                ~~~~~

```

```

LRE_SUBDO      : YNFADGTTAMQKTFVDYVSDSSGFPDGMCTDIEGRLLVASFGGECWTCWDSKTCGDKLARLD : 247
RGN_HUMAN      : YDIQTGQISMRRSVYKDEKEE--QIPDGMCTDAEGKLUVACYNGGRVIRLDPEVTKRLQITWK : 239
RGN_MOUSE      : YDIQTGQISMRRIIVYKMEKDE--QIPDGMCTDAEGKLUVACYNGGRVIRLDPEVTKRLQITWK : 239
RGN_XENLA      : YDMKTGKSSMRRTLYKLLQDE--GIPDGMCTDAEGKLUVACYNGGRVIRLDPEVTKRLQITWK : 239
RGN_DANRE      : YDIQTGGLSMRRTIVYKMEKDE--GIPDGMCTDAEGKLUVACFNGGRVIRLDPEVTKRLQITWK : 235
RGN1_9CHRO     : YDIQDGTIKRREAIKIPDGE--GFPDGMITDLEGMINVALMAGARVWRWNNENTGELLQITIP : 233
~~~~~
LRE_SUBDO      : LPGAKNITSCCFGGPDHSLFVTCG--SAHVEDLSKEPNAGGIFVWKSCTRGLPANRFKC : 306
RGN_HUMAN      : LP-VDKITSCCFGGKDYSEMYVTCARDGMDPEGLLRQPEAGGIFTITGLGVKGIAPYSYAG : 299
RGN_MOUSE      : LP-VDKITSCCFGGKDYSEMYVTCARDGLMAEGLLRQPDAGNIFTITGLGVKGIAPYSYAG : 299
RGN_XENLA      : LP-IDKITSCCFGGPDYSEMYVTSACDGMDEDWKKRQPSGGIYITSGLVKGIAPYAFAG : 299
RGN_DANRE      : LP-AERITSCCFGGKDYSDLYITTSAYIGMDAEALAKQPEAGCTFTITGLGVKGIAPPYSYTG : 295
RGN1_9CHRO     : LP-ARNVTSCITFGGQNMNELYITTDARQDMEDDFQKYPQTGSLFTLK-TDWWGHTNFERR : 292
~~~~~$GL-ähnlich]

```

LBD2

Abbildung 35: As-Sequenzalignment des LRE_SUBDO mit verwandten Proteinen.

In dem mittels ClustalX 2.0 aufgestellten multiplen Sequenzalignment wurden folgende Proteine mit dem LRE_SUBDO verglichen: das humane Regucalcin (RGN_HUMAN; BAD97080.1), das Regucalcin aus *Mus musculus* (RGN_MOUSE; NP_033086.1), *Xenopus laevis* (RGN_XENLA; BAA93719.1) und *Danio rerio* (RGN_DANRE; AAQ94576.1). Grün eingrahmt sind die für die LRE potenziellen Domänen zur Luziferinbindung (Day & Bailey, 2003). Die nach der BLOSUM 62 Matrix vorgenommene Farbmarkierung (Henikoff & Henikoff, 1992) zeigt den Grad der Übereinstimmung (schwarz $\geq 95\%$, dunkelgrau $\geq 85\%$, hellgrau $\geq 60\%$ konservierte As) an. Gekennzeichnet ist ebenfalls die „SGL“-ähnliche Region. Die Sequenz der Gluconolactonase aus *Cyanotheca sp.* (RGN1_9CHRO; P_002375404.1) wurde zur Konstruktion eines gewurzelten Stammbaumes als Außengruppe verwendet.

Die Sequenz der Gluconolactonase aus *Cyanotheca sp.* (RGN1_9CHRO; P_002375404.1) wurde als Regucalcin-ähnliches Protein ebenfalls mit in das As-Sequenzalignment aufgenommen. Es stellt für die spätere phylogenetische Untersuchung die Außengruppe dar. Im dargestellten Alignment (s. Abb. 35) sind die den beschriebenen Proteinen gemeinsame „SGL“-ähnliche Region und die potenziellen Luziferinbindedomänen der LRE gekennzeichnet. Der Vergleich der Sequenzen zeigt, dass mit 37 % identischen und 53 % ähnlichen Aminosäuren eine größere Ähnlichkeit des LRE_SUBDO zum Regucalcin besteht, als zu den LRE der Insekten. Diese Gemeinsamkeit an As entspricht jedoch der für die LRE aus Insekten angegebenen Zahl an identischen As (ca. 39 %) bezüglich der SMP30-Sequenz der Säugetiere (Gomi *et al.*, 2002). Aus der hohen Sequenzübereinstimmung des LRE aus *Photinus pyralis* und anderen Glühwürmchen mit dem SPM30 schließen Day & Bailey (2003), dass das LRE neben der Regeneration des D-Luziferins weitere Funktionen besitzen kann. In den von Day & Bailey beschriebenen Untersuchungen des Regucalcins durch Yamaguchi (2000) wird vermutet, dass die 24 Aminosäuren Aspartat und 16 Aminosäuren Glutamat der Regucalcinsequenzen aus Ratten und Mäusen zur Bindung von Calcium beitragen. Da diese As zum Calcium-bindenden EF-Hand Motiv anderer Calcium-

bindepoteine gehören, wurden die LRE-Sequenzen von Day & Bailey (2003) nach anteiligen Aspartat- und Glutamat-Resten untersucht. Für die LRE der oben beschriebenen drei Glühwürmchen ergeben sich 21 - 22 As Aspartat (D) und 17 As Glutamat (E). Tab. 3 gibt die Anzahl der As Aspartat und Glutamat an, die in den für die Alignments verwendeten Enzyme LRE und RGN enthalten sind. Des Weiteren sind die jeweiligen Molekulargewichte, die theoretischen isoelektrischen Punkte sowie die Gesamtzahl an As der Enzyme zusammengefasst.

Tabelle 3: Vergleich der LRE und RGN hinsichtlich der As-Zahl, des Molekulargewichts, des isoelektrischen Punktes und der Anzahl an den As Aspartat und Glutamat.

Enzym	Spezies	As	MW (kDa)	pI	Asp	Glu
LRE	SUBDO	306	32,839	4,68	22	16
LRE	PHOPY	308	33,806	5,65	21	17
LRE	LUCCR	309	33,802	5,45	22	17
LRE	LUCLA	307	34,283	5,55	21	17
LRE	TRICA	308	33,583	6,09	18	17
LRE	ACYPI	336	36,894	7,12	20	13
RGN	HUMAN	299	33,250	5,90	22	16
RGN	MOUSE	299	33,404	5,16	24	16
RGN	XENLA	299	33,071	5,18	25	17
RGN	DANRE	295	32,806	5,39	22	18
RGNI	9CHRO	292	32,922	4,65	21	18

Wie in der Tabelle zu sehen ist, enthält das LRE_SUBDO 22 Aspartat- und 16 Glutamat-Reste. Die Anzahl liegt im Bereich der angegebenen Menge für die LRE und RGN. Die Alignments der Abb. 30 und 31 zeigen, dass sich viele dieser Aminosäuren homologe Positionen mit dem Regucalcin teilen (Day & Bailey, 2003).

2.2.4 Phylogenetische Analyse

Ausgehend von Vergleichen der As-Sequenz der LRE und RGN wurde ein phylogenetischer Baum („Neighbor-Joining“) erstellt, um die verwandtschaftlichen Beziehungen zu analysieren (s. Abb. 36). Der Stammbaum wurde mittels BLOSUM-Matrices (Henikoff & Henikoff, 1992) und der Bootstrapping-Methode (Felsenstein, 1993) der ClustalX 2.0 Software konstruiert. Die Sequenz des RGN-ähnlichen Proteins von *Cyanothece sp.* (RGNI_9CHRO; P_002375404.1) wurde als Außengruppe verwendet. Visualisiert wurde das Baumdiagramm mit TreeView. Das Schwamm-LRE gruppiert sich darin mit den LRE aus Insekten (Gomi & Kajiyama, 2001; Gomi *et al.*, 2002).

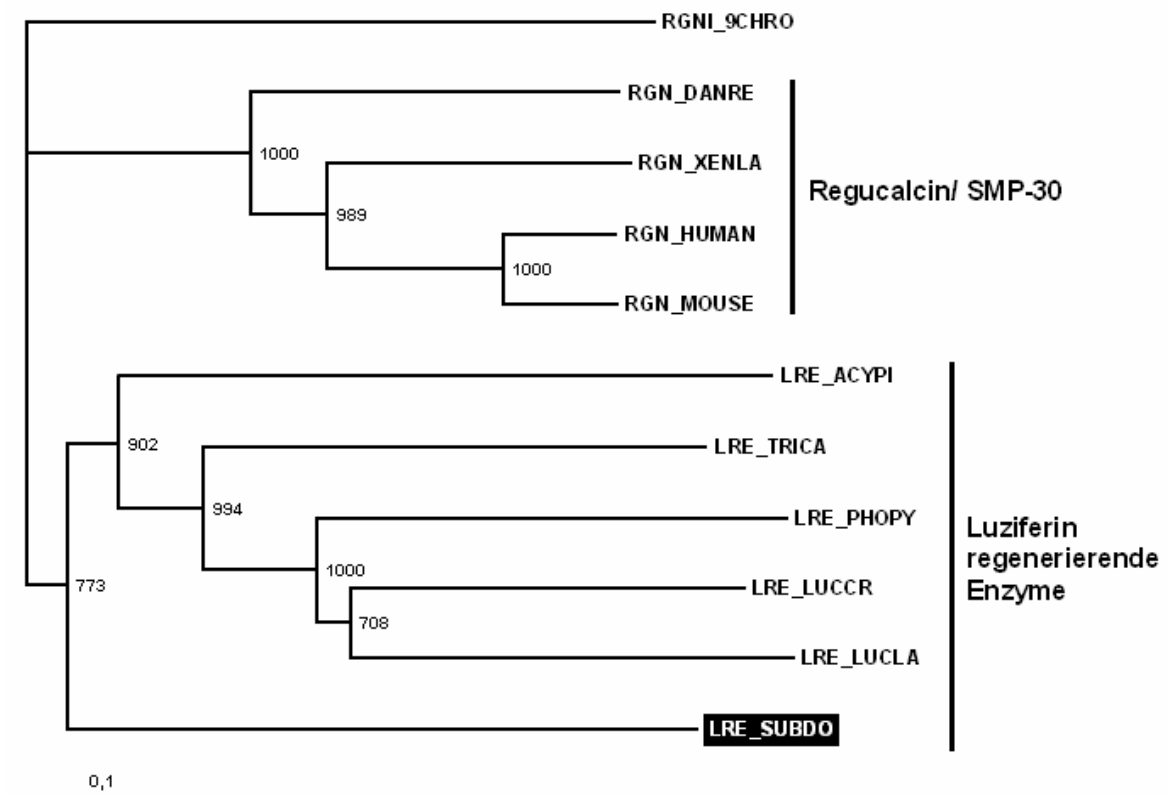


Abbildung 36: Phylogenetische Analyse von LRE_SUBDO mit Luciferin regenerierenden Enzymen und verwandten Proteinen.

Folgende Sequenzen wurden mit der As-Sequenz von LRE_SUBDO verglichen und für die Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes verwendet: die LREs des amerikanischen Glühwürmchens *Photinus pyralis* (LRE_PHOPY; BAB60700.1), der japanischen Glühwürmchen *Luciola cruciata* (LRE_LUCCR; BAB85479.1) und *Luciola lateralis* (LUC_LUCLA; BAB85478.1), die LREs der Erbsenblattblattlaus *Acyrtosiphon pisum* (LRE_ACYPI; XP_001951053.1) und des roten Melhkäfers *Tribolium castaneum* (LRE_TRICA; XP_967986.1), die humane Regucalcinsequenz (RGN_HUMAN; BAD97080.1) und die Regucalcinsequenzen von *Mus musculus* (RGN_MOUSE; NP_033086.1), *Xenopus laevis* (RGN_XENLA; BAA93719.1) und *Danio rerio* (RGN_DANRE; AAQ94576.1). Zur Konstruktion des gewurzelten Stammbaumes wurde die Regucalcin-ähnliche Sequenz von *Cyanothece sp.* (RGN_9CHRO; P_002375404.1) als Außengruppe verwendet. Die Skala bezeichnet den evolutionären Abstand von 0,1 As-Substitutionen pro Position in der Sequenz.

2.2.5 Heterologe Expression

Um das LRE_SUBDO u. a. als Antigen zur Antikörperproduktion einsetzen zu können, wurde das rekombinante Protein aus *S. domuncula* über das pBAD/gIII Expressionssystem hergestellt. Mit spezifischen Primern, welche die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *NcoI* und *EcoRI* enthielten (s. Abs. 4.4.2, Tab. 7) wurde der kodierende Bereich der *SDLRE*-cDNA aus der *S. domuncula* cDNA-Bank amplifiziert (s. Abs. 5.1.1.3). Die entsprechende Vorbereitung von Insert und Vektor (s. Abs. 5.1.4.1) erlaubte die effiziente Ligation in den

Expressionsvektor pBAD/gIII A (s. Abs. 5.1.4.2). Zur Kontrolle wurde das Plasmid mit den pBAD/gIII A-spezifischen Vektorprimern (*pBAD F/pBAD R*) sequenziert. Das mittels PCR korrekt amplifizierte und in pBAD/gIII A ligierte Fragment konnte durch *E.coli* (One Shot® TOP10) zur Expression (s. Abs. 5.2.3) gebracht werden.

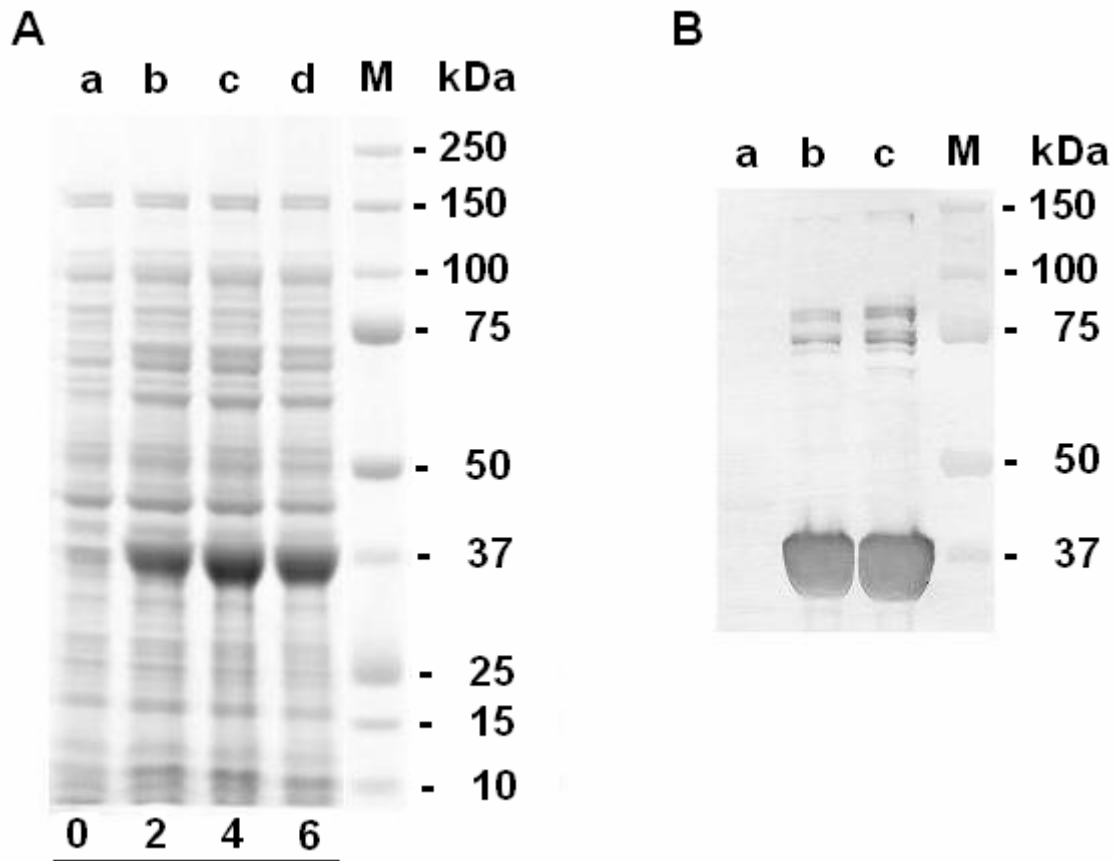


Abbildung 37: SDS-Polyacrylamid-Gel der LRE-Expressionskultur (A) und Western Blot-Analyse zur Verifizierung des rekombinanten Proteins (B).

(A) Die Kultur wurde mit L-Arabinose induziert und bis zu 6 h bei 20°C inkubiert (s. Abs. 5.2.3.2). Die bakteriellen Lysate der Rohextrakte (Spuren a - d) wurden in einem 4 - 12%-igen NuPAGE Gel (Invitrogen) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie® Brilliant Blau G-250 angefärbt. Dabei enthält die Spur a das Lysat zum Zeitpunkt 0 vor der Induktion und die Spuren b - d die bakteriellen Lysate nach Induktion mit L-Arabinose zu den angegebenen Zeitpunkten. Die unter 37 kDa liegende Bande entspricht in etwa dem errechneten Molekulargewicht des rLRE_SUBDO (32,841 kDa + C-terminaler *His*-Tag von 2 kDa).

(B) Dargestellt sind die aus der *E. coli*-Expressionskultur des rLRE_SUBDO erhaltenen bakteriellen Lysate. Nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel und dem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte die Inkubation mit dem primären Anti-*His*-Antikörper (1:1000 verdünnt). Die Detektion des an das rLRE_SUBDO gebundenen anti-*His* Ak erfolgte nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:4000 verdünnt), welcher an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist (s. Abs. 4.12). Spur a enthält das Lysat der zum Zeitpunkt 0 nicht induzierten Kultur, Spur b das Bakterienlysat des Klons SDLRE_pBAD/gIII A_1f (6 h nach Induktion) und Spur c das Bakterienlysat eines weiteren Klons SDLRE_pBAD/gIII A_2b (6 h nach Induktion). M: Protein-Molekulargewichtsstandard (s. 4.5).

Abbildung 37 A zeigt das Ergebnis der Pilotexpression mit dem ca. 35 kDa großen LRE_SUBDO (einschließlich *His-Tag*) als SDS-Polyacrylamid-Gel. Zu erkennen

ist, dass das rekombinante Protein (Spur b) bereits 2 h nach Induktion mit L-Arabinose deutlich exprimiert wird, im Vergleich zur Probe zum Zeitpunkt 0 (Spur a). Des Weiteren ist zu beobachten, dass die Intensität der Proteinbande im Verlauf der Expression zunimmt (Spuren c und d). Eine weitere Überprüfung des Proteins wurde durch einen gegen das C-terminale *His-Tag* gerichteten Ak (s. Abs. 4.12, 1:1000 verdünnt) ermöglicht. Dazu wurde die Proteinbande im Anschluss an die elektrophoretische Trennung in einem 4 - 12%-igen NuPAGE Gel auf eine Nitrocellulose-Membran im *Dry Blotting*-Verfahren (Invitrogen) transferiert (s. Abb. 37 B). Der Nachweis erfolgte über den gegen den anti-*His*-Antikörper gerichteten sekundären anti-Maus-Antikörper (1:4000 verdünnt), welcher an die alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Die Detektion erfolgte mit NBT/BCIP im AP-Puffer (s. Abs. 4.10). In Abbildung 37 B ist zu sehen, dass der gegen den *His-Tag* gerichtete Antikörper mit der im Bereich von ca. 35 kDa liegenden Bande aus den Bakterienlysaten der untersuchten rLRE-Klone reagiert (Spuren b und c; 32,841 kDa + C-terminaler *His-Tag* von 2 kDa). Bei dem als Kontrolle aufgetragenen Lysat zum Zeitpunkt 0 ist dagegen keine Reaktion zu beobachten.

3. Diskussion

Der Begriff der Biolumineszenz (griech. βίος *biós* „Leben“ und lat. *lumen* „Licht“) beschreibt die Fähigkeit lebender Organismen, sichtbares Licht zu emittieren. Im Verlauf der Evolution entstand dieses Phänomen mehrfach unabhängig voneinander (Wilson & Hastings, 1998). Zu den biologischen Funktionen der Lichtemission zählen die Beuteanlockung, die Verteidigung, die Tarnung und die Kommunikation. Bis auf wenige bekannte Ausnahmen sind biolumineszente Organismen rein mariner Natur. Sie bewohnen sowohl die Tiefsee, in der die Biolumineszenz die vorherrschende Lichtquelle darstellt, als auch den mesopelagischen Bereich zwischen 200 und 1000 m.

Eine Vielzahl von Schwämmen (ca. 9000 rezente Arten) besiedelt erfolgreich ebenfalls große Gebiete der marinen Umwelt (s. Abs. 1.1.2). Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise galten sie lange Zeit als schutzlos und primitiv. Die *Porifera* besitzen gleichwohl Mechanismen, die z. B. eine Erkennung und Bekämpfung fremder Zellen erlauben und vor toxischen Sekundärmetaboliten anderer Meeresorganismen schützen (Müller & Schröder, 1997). Außerdem konnten in einigen Schwämmen Rezeptoren identifiziert werden (s. Abs. 1.2.7.2), die in evolutionär jungen Tierstämmen an Nervensystemen beteiligt sind (Müller *et al.*, 2009). Neben der aktiven Filtration und dem Ausstoß von Meerwasser (Thakur *et al.*, 2005) konnte ergänzend gezeigt werden, dass Schwämme trotz fehlender Nervenzellen (Pavans de Ceccatty, 1974a) in der Lage sind, sich zu kontrahieren (Simpson, 1984). Bekannt für seine Aktivitäten ist der Schwamm *Tethya wilhelma*. Es stellte sich heraus, dass er kriechende Bewegungen von $2 \text{ mm} \cdot \text{h}^{-1}$ ausführt. Des Weiteren berichtete Nickel (2004), dass sich der gesamte Körper dieser Spezies sowohl rhythmisch als auch durch externe Stimulation kontrahieren kann.

Untersuchungen dieser Bewegungen enthüllten, dass z. B. einige Schwämme mit der Kontraktion des Osculum auf Licht reagieren (Reiswig, 1971). Nachfolgend konnte für eine Reihe von Schwämmen die Existenz von Lichtreaktionen beobachtet werden (Wapstra & van Soest, 1987). Forschungen zufolge besitzen sowohl adulte Tiere als auch Schwamm-Larven die Fähigkeit, auf Lichtreize zu reagieren (Pavans de Ceccatty, 1974a/b; Mackie, 1979). Leys & Degnan (2001) und Leys *et al.* (2002) brachten zudem in Erfahrung, dass Schwämme in ihrer Reaktion auf Licht zwischen verschiedenen Wellenlängen

unterscheiden können. Schwamm-Larven, dessen Verhalten gegenüber Licht untersucht wurde, ließen die stärksten Reaktionen bei blauem Licht im Bereich von 440 nm und 600 nm erkennen (Leys *et al.*, 2002). Bereits im Jahr 1994 vermuteten Gaino & Sara, dass möglicherweise die Nadeln der Schwämme das Licht in das Innere des Körpers leiten könnten, in welchem photosynthetisch aktive Mikroorganismen nachgewiesen wurden. Zwei Jahre später untersuchten Cattaneo-Vietti *et al.* die Silikatnadeln des mit einer photosynthetischen Alge in Symbiose lebenden Schwammes *Rosella racovitzae* auf ihre lichtleitenden Eigenschaften (s. Abs. 1.2.7.2).

Kürzlich konnte an *Tethya aurantium* (s. Abb. 38) gezeigt werden, dass die *Spiculae* tatsächlich ein Lichttransmissionssystem darstellen und Umgebungslicht ins Innere des lebenden Schwammes weiterleiten (Brümmer *et al.*, 2008). Es stellte sich heraus, dass die phototrophen Mikroorganismen nicht nur in äußeren Gewebeschichten vorkommen, sondern dank der Lichtleitung durch die *Spiculae* auch in tieferen Regionen des Schwammes sowie in der Umgebung der *Spiculae* anzutreffen sind.



Abbildung 38: *Tethya aurantium*.

Das linke Bild zeigt *Tethya aurantium* im natürlichen Lebensraum, hier im Limskikanal nördlich von Rovinj (Kroatien) in der Nordadria (© Universität Hohenheim). *Tethya* bildet zahlreiche radiär verlaufende Bündel aus Silikatnadeln aus (rechts; © Universität Stuttgart/ Zoologie; Forschungsprojekt „BIOTECmarin“).

Bislang wurde die Lichtleiterfunktion an herauspräparierten Skelettnadeln mit eingekoppeltem Laserlicht gezeigt (Cattaneo-Vietti *et al.*, 1996; Aizenberg *et al.*, 2004). Aufgrund der ermittelten optischen Eigenschaften der *Spiculae*, als Singlemode-, Wenigmode- oder Multimode-Fasern zu funktionieren und der nachgewiesenen Lichtleitung im lebenden Schwamm (Brümmer *et al.*, 2008) wird

momentan davon ausgegangen, dass das von den *Spiculae* weitergeleitete Licht voraussichtlich von den mit dem Schwamm in Symbiose lebenden Organismen generiert wird. Dennoch bleibt zu überprüfen, in wieweit ein sensorisches und lebenswichtiges System, in einer störungsanfälligen Symbiose wie zwischen Mikroorganismen und Schwämmen aufrechterhalten werden kann. Für die seit über 600 Mio. Jahren erfolgreichen Schwämme mit ihren auf Siliziumdioxid aufbauenden *Spiculae* ist anzunehmen, dass deren lichtleitenden Eigenschaften nicht nur zufällig vorhanden sind (Müller *et al.*, 2007a/ 2009).

In so gut wie allen Tiergruppen der *Metazoa* sind, mit Ausnahme der *Porifera*, Lichtsinneszellen (Photorezeptoren) vorhanden, an denen Synapsen beteiligt sind. Generell existieren jedoch wenige Systeme zur Photorezeption, die kein Auge beinhalten, wie das Linsen-freie Photorezeptionssystem in Schnecken (z. B. *Lymnaea stagnalis*), bei dem die Photorezeptoren ein rezeptorisches Epithel bilden (Chono *et al.*, 2002). Ein weiteres Beispiel stellt die Photorezeption bei Fröschen dar, welches im Gegensatz zu den Augen der Orientierung dient. Justis & Taylor (1976) dokumentierten die Bedeutung dieser extraocularen Photorezeptoren. Wurde blinden Fröschen, wie *Rana catesbeiana* die Rezeptoren auf dem Kopf verdeckt, zeigten diese sich, im Vergleich zu blinden Exemplaren ohne verdeckte Rezeptoren, orientierungslos.

2006 wurden von Müller *et al.* Überlegungen über das Bestehen eines neuen Photorezeptionssystems in Schwämmen vorgestellt. Sie beziehen sich auf die nachgewiesenen lichtleitenden Eigenschaften der *Spiculae* von *Hyalonema sieboldi* und der möglichen Existenz einer Luziferase und eines Luziferin regenerierenden Enzyms im Schwamm *Suberites domuncula*. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Bestätigung dieser Überlegungen, d. h. die Existenz eines Licht-generierenden Systems aufzuzeigen, angestrebt. Der Nachweis und die anschließenden Untersuchungen der Luziferase aus *S. domuncula* bilden die Voraussetzung dafür, dass die Schwämme mit ihren *Spiculae* nicht nur im Besitz optischer Lichtleiter, sondern auch in der Lage sind, das Licht durch die Luziferasereaktion zu emittieren, welches durch die *Spiculae* weitergeleitet werden kann.

3.1 *Spiculae* aus *S. domuncula* besitzen lichtleitende Eigenschaften

Die in der Vergangenheit beschriebenen optophysikalischen Eigenschaften der *Spiculae* einiger *Hexactinellida*-Spezies zeigen, dass die aus Siliziumdioxid bestehenden Nadeln als biologische Lichtleiter angesehen werden können (Gaino & Sara, 1994; Sarikaya *et al.*, 2001; Aizenberg *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2007b). Analysen zur Beschaffenheit der Nadeln stellten eine Reinheit fest, welche an die von Quarzglas heranreicht und für dessen Entstehung ein hoher Energieaufwand notwendig scheint (Müller *et al.* 2008). Zudem weisen sie im Vergleich zu herkömmlichen Lichtleitern eine ungewöhnliche Härte auf, die auf eine geringe Kationenkonzentration zurückgeführt wird (Mayer, 2005). Die Bildung der *Spiculae* wird als „Spiculogenese“ bezeichnet. Sie ist durch die Aufnahme der Kieselsäure aus der marinen Umgebung mittels einer ATP-betriebenen Pumpe gekennzeichnet (Schröder *et al.*, 2004), welche bis zur Nadelbildung (Uriz *et al.*, 2000) in speziellen Vakuolen (Schröder *et al.*, 2007) angereichert wird.

Sandford (2003) und Müller *et al.* (2008) dokumentierten für die kleineren [$< 200 \mu\text{m}$] *Spiculae* der *Demospongiae* die gleiche chemische Beschaffenheit wie für die Nadeln der *Hexactinellida*-Spezies (s. Abs. 1.2.7.2). Aktuelle Untersuchungen (Müller *et al.*, 2009) können für die *S. domuncula*-*Spiculae* ebenfalls lichtleitende Eigenschaften nachweisen. Sie deuten darauf hin, dass sowohl die Nadeln in den *Hexactinellida* als auch die *Spiculae* in den *Demospongiae* die Funktion einer biologischen Glasfaser einnehmen. Den *Spiculae* von *R. racovitzae* wird aufgrund der vorhandenen Symbiose mit photosynthetisch aktiven Mikroorganismen eine Licht-sammelnde Funktion zugeschrieben. Innerhalb der *Hexactinellida* gehört *R. racovitzae* zu den wenigen Schwämmen, die in flacheren Regionen zu finden sind (Cattaneo-Vietti *et al.*, 1996; Sarikaya *et al.*, 2001). Die meisten Spezies dieser Klasse besiedeln jedoch Tiefen von 1000 m und mehr (Aizenberg *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). Folglich ist vorstellbar, dass das Licht von symbiotischen Mikroorganismen, wie z. B. in *E. aspergillum*, *H. sieboldi*, oder *M. chuni* stammt, oder wie in der vorliegenden Arbeit experimentell gezeigt werden konnte, von den Schwämmen selbst – mit Hilfe eines Luziferin/Luziferase Systems.

3.2 Identifizierung und Klonierung der Luziferase

Die im Abschnitt 3.1 geschilderten optophysikalischen Eigenschaften der *Spiculae* aus *S. domuncula* bildeten die Grundlage zur Überprüfung der entsprechenden cDNA-Bank auf Sequenzen, die Hinweise auf Homologien zu Luziferasen geben. Unter anderem erfolgte eine Suche nach den für Insekten-Luziferasen typischen Bereichen, wie die konservierten Motive BoxI und BoxII (s. Abs. 1.2.6). Der ermittelte Sequenzabschnitt, welcher in der EST-Datenbank die Nummer s3631 trägt, umfasste 795 Nt, die von der As₃₀₃ bis As₅₄₉ einen Teil des offenen Leserahmens der Luziferase darstellten. Dieser enthielt das innerhalb der Insekten-Luziferasen konservierte Motiv BoxII [YGLTE] (Conti *et al.*, 1996, Chang *et al.*, 1997), welches zusammen mit dem AMP-Bindemotiv BoxI (Conti *et al.*, 1997; Dieckmann *et al.*, 1997; Stuible *et al.*, 2000; Viviani, 2002) das ATP/AMP Signaturmotiv bildet (Weimar *et al.*, 2002). Dagegen konnten keine Übereinstimmungen zu Luziferasesequenzen aus „Leuchtbakterien“ und weiteren marinen biolumineszenten Organismen ausgemacht werden. Anhand des vorliegenden cDNA-Fragments (s3631) wurden genspezifische Primer erstellt und in Kombination mit Vektorprimern (s. Abs. 4.4.1) zur Subklonierung mittels PCR (s. Abs. 5.1.1.2) eingesetzt. Die gewonnenen Teilsequenzen stimmten im überlappenden Bereich der Ausgangssequenz überein. Sowohl die Teilsequenzen als auch die komplette Contigsequenz bestätigten die Homologie zur Sequenz der Luziferasen aus Leuchtkäfern.

3.2.1 Sequenzanalyse der Luziferase

Die Gesamtlänge der hier als *SDLUC* bezeichneten cDNA-Sequenz beträgt 2038 Nukleotide, von denen 1743 Nt für das Protein kodieren. Wie die Northern-Blot-Analyse (Müller *et al.*, 2009) zeigt, stimmen die Länge der klonierten *SDLUC*-cDNA und die Länge des Transkriptes (2,3 kb) überein. Im Gegensatz zum konstitutiv exprimierten β -Tubulin (ohne Abb.; Müller *et al.*, 2009) zeigten die Transkripte der Luziferase in den im Licht bzw. im Dunkeln gehaltenen Primormorphen unterschiedliche Expressionslevel (s. Abb. 7C a & b; Müller *et al.*, 2009). Sowohl die Anwesenheit einer Polyadenylierung der transkribierten mRNA als auch die Organisation der genomischen Sequenz deuten auf die Herkunft der Luziferasesequenz aus dem Schwamm *S. domuncula* hin und nicht auf die einer

bakteriellen Kontamination (Müller *et al.*, 2009). Das in der 3'-UTR der Luziferase vorhandene Polyadenylierungssignal [AATGAA] entspricht jedoch nicht dem typischen Signal der Vertebraten [AATAAA] überein (Zarkower *et al.*, 1986).

Polyadenylierungsaktivität

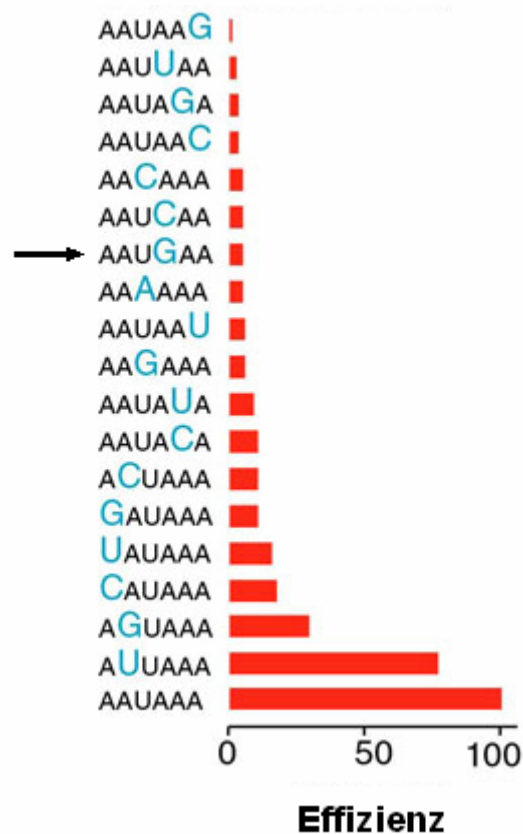


Abbildung 39: Effizienz der Polyadenylierungssignale.

Das mit dem Pfeil gekennzeichnete und in der Luziferasesequenz aus *S. domuncula* vorhandene Polyadenylierungssignal stellt eine weniger effiziente Alternative zum typischen Signal der Vertebraten [AATAAA] dar (Zarkower *et al.*, 1986).

(Quelle: <http://online-media.uni-marburg.de/biologie/genetik/boelker/VL-Molekulargenetik/RNA%20Prozessierung-1.pdf>).

Das Nukleotidhexamer stellt eines der Polyadenylierungssignale dar (s. Pfeil in Abb. 39), welche eine Adenylierung der mRNA veranlassen, jedoch mit geringerer Effizienz als das typische Signal der Vertebraten (Beaudoing *et al.*, 2000). Mit der Existenz des abweichenden Polyadenylierungssignals wird ein bei Schwämmen häufig beobachtetes Phänomen bestätigt (Pfeifer *et al.*, 1993). Das Startmethionin befindet sich nicht in dem als Kozaksequenz [GCC A/G CCA TGG] bezeichneten Bereich, der eine gesteigerte Translationseffizienz bei Eukaryoten ermöglicht (s. Abb. 16).

3.2.2 Proteinbiochemische Untersuchung der Luziferase

3.2.2.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Wie beschrieben enthielt das in der cDNA-Datenbank von *S. domuncula* identifizierte und analysierte Fragment s3631 das innerhalb der Luziferasen aus Insekten konservierte Motiv BoxII [YGLTE] (Conti *et al.*, 1996, Chang *et al.*, 1997). Die abgeleitete As-Sequenz der mittels PCR aus der cDNA-Bibliothek vollständig isolierten cDNA (*SDLUC*, s. Abs. 2.1.3.1) bestätigte nach Datenbankanalysen die Homologie zu den Luziferasen aus Insekten (s. Abs. 2.1.3). Wie für die Luziferasen, Acetyl:CoA Synthetasen oder 4-Cumarat:CoA Ligasen, ist die Anwesenheit des konservierten AMP-Bindemotivs BoxI (Conti *et al.*, 1997; Dieckmann *et al.*, 1997; Stuble *et al.*, 2000; Viviani, 2002), mit der Sequenz [LPYSSGTTGIPK] in der *S. domuncula*-Luziferase, ein entscheidendes Kriterium für die Zuordnung in eine Gruppe Acyladenylat-bildender Enzyme. Die zwei Motive (BoxI & BoxII), wie sie die Primärstruktur aufzeigt, sind allen Luziferasen aus Insekten konserviert. Sie bilden zusammen das für die Familie der Acyladenylat-bildenden Enzyme charakteristische ATP/AMP Signaturmotiv (Weimar *et al.*, 2002).

Die Homologie von LUC_SUBDO zu den Insekten-Luziferasen zeigt sich u. a. auch in den As (s. Abb. 24), denen eine Bedeutung für die Substratbindung zugesprochen wird (Viviani, 2008a). Zur strukturellen Einschätzung der Funktionsweise der Luziferase wurde mit Hilfe von FOLDpro (<http://mine5.ics.uci.edu:1026/foldpro.html>) eine Proteinfaltung vorhergesagt (s. Abb. 40 A). Als Matrize diente die Kristallstruktur der *P. pyralis* Luziferase aus der Proteindatenbank (PDB:1LCI; s. Abb. 40 B). Die Darstellung erfolgte mit dem 3D-Mol-Viewer (Vector NTI®). In den abgebildeten Strukturmodellen der Luziferasen aus *S. domuncula* und *P. pyralis* ist zu erkennen, dass sich die Motive BoxI (gelb) und BoxII (hellblau) am Rand der potenziellen Substratbindetasche befinden. Des Weiteren sind in der Abbildung 40 die Aminosäuren schwarz markiert, welche bei Luziferasen wahrscheinlich an der Bildung der Substratbindetasche beteiligt sind (Viviani, 2008a). Für die Vorhersage der 3D-Struktur und das aktive Zentrum der Luziferasen wurde u. a. die dreidimensionale Struktur der Phenylalanin-aktivierenden Untereinheit der Gramacidin-S-Synthetase (PheA) aus *Bacillus brevis* verwendet (Viviani, 2002). In PheA ist die spezifische Bindetasche für den

aromatischen Rest des Phenylalanins am Boden durch den Indolring von Trp 239 ausgekleidet, an einer Seite durch Ala 236, Ile 330 und Cys 331, auf der anderen Seite durch Ala 322, Ala 301 und Thr 278 (Conti *et al.*, 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Substrate für PheA und Luziferase zeichnen sich geringe Abweichungen innerhalb dieser für die Substratbindung verantwortlichen Aminosäuren ab. Dennoch liegen diese korrespondierenden Aminosäuren in der 3D-Struktur der Luziferase, ebenso wie bei PheA, am Übergang zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne und markieren somit die mögliche Substratbindetasche der Luziferase (s. Abb. 40 B; Lindermayr, 2002)

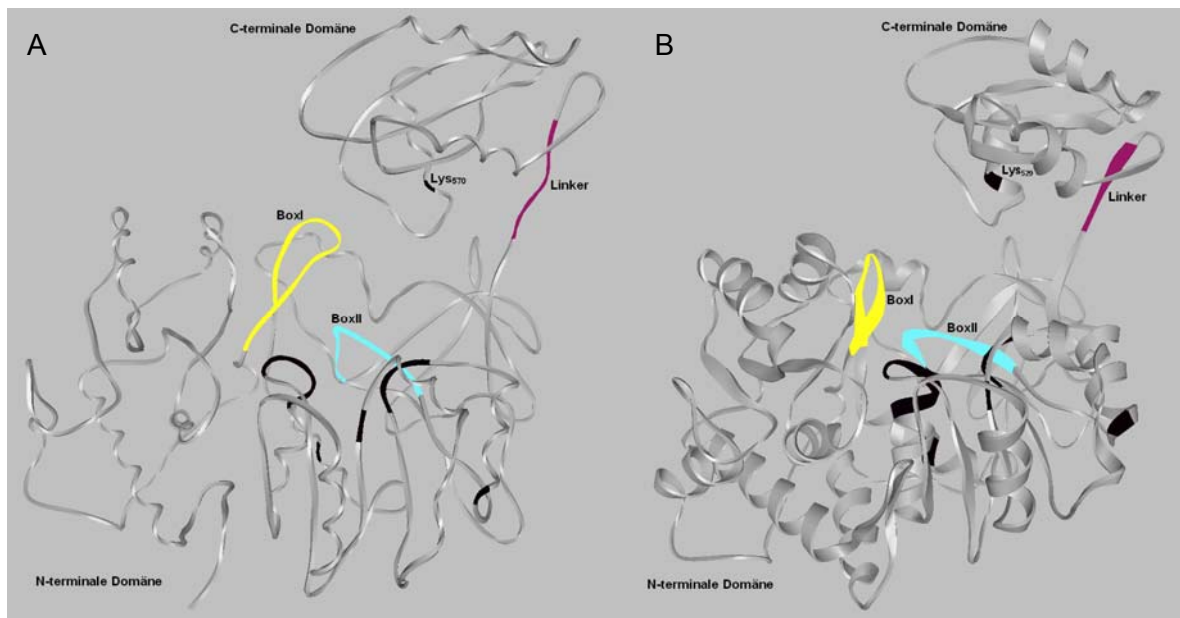


Abbildung 40: Vergleich der Kristallstruktur der Luziferase (LUC) aus *Photinus pyralis* (PDB:1LCI) und der vorhergesagten Molekülstruktur der LUC_SUBDO.

Die dreidimensionale Struktur der *Firefly*-Luziferase (B) wurde über die Proteindatenbank (PDB) bezogen. Mit Hilfe von FOLDpro wurde die Molekülstruktur für die Luziferase aus *S. domuncula* (A) vorhergesagt. Das 3D-Strukturmodell wurde mit der MODELLER Software Version 7v7 erstellt (Cheng & Baldi, 2006), bei der die Struktur der Luziferase aus *P. pyralis* als Matrize diente. Die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm 3D-Mol Viewer (einer Komponente aus Vectort NTI Suite 9.0.0). Das Modell der LUC_SUBDO enthält die As 82 - 581, da für diesen N-terminalen Bereich eine geringe Homologie zur Luziferase besteht. Wie für die bisher gezeigten As-Sequenzvergleiche sind die innerhalb der Luziferasen konservierten Motive BoxI (gelb) und BoxII (hellblau) gekennzeichnet. Der Linker, welcher die große N-terminale Domäne mit der kleineren C-terminalen Domäne verbindet, ist ebenfalls farbig hervorgehoben. Schwarz markiert sind die As, die für die Substratbindung verantwortlich sind (Viviani, 2008a).

Der Sequenzvergleich dieser 21 Aminosäuren, von denen acht die BoxII bilden, zeigt mit 85 % ähnlichen und identischen Aminosäuren (bezogen auf ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften) die hohe Übereinstimmung der Luziferase aus dem Schwamm zu den Luziferasen aus Insekten. Die Aminosäuren

befinden sich ebenfalls am Übergang zwischen N-terminaler und C-terminaler Domäne (s. Abb. 40 A), so dass sie die potenzielle Substratbindestelle bilden können. Bereits 2002 vermutete Viviani das aktive Zentrum der Luziferase an diesem Übergang zwischen den zwei Domänen, welche bei der Biolumineszenzreaktion eine Konformationsänderung durchlaufen, um das Substrat einschließen zu können. Da die Homologie von LUC_SUBDO zu den Luziferasen hoch ist und LUC_PHOPY (PDB:1LCI) als Vorlage für die Vorhersage der 3D-Struktur verwendet wurde, überrascht es nicht, dass im Modell (s. Abb. 40 A) auch die Luziferase aus *Suberites domuncula* die für Acyladenylat-bildende Enzyme typische Faltung in eine größere N-terminale und eine kleinere C-terminale Domäne aufweist (Conti *et al.*, 1997). Aufgrund der Sequenzhomologie zu Luziferasen aus Insekten, insbesondere der für die Bildung des aktiven Zentrums verantwortlichen Aminosäuren, und der ähnlich vorhergesagten 3D-Struktur kann für LUC_SUBDO angenommen werden, dass sowohl die Bindung von D-Luziferin als auch dessen Umsetzung möglich erscheint.

3.2.2.2 Phylogenetische Analyse

Die phylogenetische Analyse (s. Abs. 2.1.4) spiegelt deutlich die aus der Analyse der As-Sequenz ermittelte verwandtschaftliche Beziehung der Luziferase aus *S. domuncula* zum Luziferase-System der Insekten wieder. Wie in Abb. 23 zu sehen ist, fällt die Schwamm-Luziferase im Vergleich zu den ebenfalls verwandten Acetyl:CoA Synthetasen in die Gruppe von Luziferasen (Oba *et al.*, 2003). Für eine Reihe von Genen konnte bereits gezeigt werden, dass sie im Verlauf der Evolution bei einigen Tiergruppen verloren gingen, jedoch bei den Schwämmen, den ursprünglichen *Metazoen*, noch vorhanden sind (Gamulin *et al.*, 2000). Phylogenetische Analysen dokumentierten ausserdem, dass viele Proteine aus dem Schwamm, ausgehend von der cDNA-Sequenz, hohe Sequenzähnlichkeiten mit Proteinen aus Wirbeltieren (*Vertebrata*) aufweisen (Müller *et al.*, 2001b). Einige Ausnahmen offenbaren Proteine mit einer Verwandtschaft zu den Wirbellosen, die an der Immunantwort beteiligt sind, wie z. B. Tachylectin (Schröder *et al.*, 2003b), oder wie hier mit der Luziferase aus Insekten.

3.2.3 Expression der Luziferase

Die *SDLUC*-cDNA wurde, wie im Abschnitt 5.2.2.1 beschrieben, in den Expressionsvektor pDESTTM 17 einligiert, in *E. coli* BL21-AITM One Shot[®] exprimiert und anschließend aufgereinigt. Mit Hilfe des verwendeten *E. coli* Expressionssystems mit GATEWAY[®]-Technologie (Invitrogen) gelang es in relativ kurzer Zeit, das Protein zu exprimieren (s. Abs. 2.2.5), während vorherige Versuche mit anderen Systemen scheiterten. Es ist denkbar, dass das rekombinante Protein eine toxische Wirkung auf die Bakterienstämme besaß. Der hier verwendete *E. coli*-Stamm BL21-AITM ist speziell für die Expression von Genen angepasst, die für andere BL21 Stämme toxisch sein können.

3.2.4 Funktionelle Charakterisierung

Linne *et al.* (2007) beschrieben die Familie der Acyladenylat-bildenden Enzyme (synonym: Acyl aktivierende Enzyme (AEE) (Shockey *et al.*, 2003) als weit verbreitet in der Natur, welche z. B. Enzyme wie die tRNA-Synthetasen, die Fettsäure-Acyl:CoA Synthetasen, die Acetyl:CoA Synthetasen (Acs), die Firefly-Luziferase und von nichtribosomalen Peptidid Synthetasen (NRPSs) abgeleiteten Adenylierungsdomänen (A-Domänen) beinhaltet. Charakteristisch für diese Enzyme ist eine Reaktion, welche in zwei Stufen erfolgt und in Abb. 41 am Beispiel der Luziferase aus Leuchtkäfern dargestellt ist.

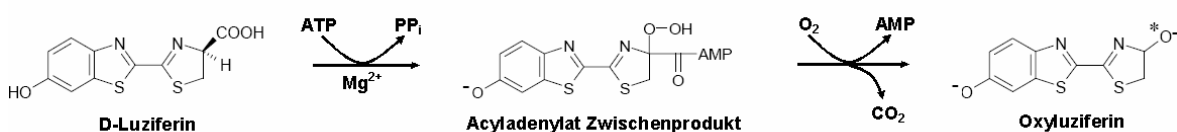


Abbildung 41: Reaktionsmechanismus der Acyladenylat-bildenden Enzyme am Beispiel der Aktivierung von D-Luziferin in der Biolumineszenzreaktion der Luziferase aus Insekten.

Im ersten Schritt erfolgt die Bildung des Luziferyl-Adenylats unter Verbrauch von ATP. Im zweiten Schritt entsteht das angeregte Oxyluziferin unter Freisetzung von AMP und CO₂. Das Erstellen der Reaktionsgleichung erfolgte in Anlehnung an die von J. C. Day, 2009. (<http://www.bioluminescentbeetles.com/>)

Im ersten Schritt wird das D-Luziferin nach der Spaltung von ATP und unter Freisetzung von Pyrophosphat in das entsprechende Adenylat umgewandelt, welches instabil ist und an das aktive Zentrum gebunden bleibt. Im zweiten Schritt bildet das Adenylat in Anwesenheit von Sauerstoff ein Peroxid-Zwischenprodukt.

Durch das Abspalten des AMP bildet sich anschließend das energiereiche Dioxetan-Zwischenprodukt, dessen Zerfall das angeregte Oxyluziferin hervorbringt, welches beim Übergang in den Grundzustand ein Photon sichtbaren Lichts emittiert. Linne *et al.* (2007) führten ebenfalls an, dass zusätzlich zum gemeinsamen Reaktionsmechanismus innerhalb dieser Enzymgruppe, viele Mitglieder ebenfalls eine hohe strukturelle Homologie teilen (s. Abb. 40).

Zur funktionellen Charakterisierung der rekombinanten Schwamm-Luziferase (rLUC_SUBDO) wurde in Anlehnung an Michel *et al.* (2001) und Oba *et al.* (2003) ein Luziferase-Assay durchgeführt. Der Nachweis der Enzymaktivität der Luziferase aus *S. domuncula* erfolgte über den Luminometer „Lumat LB 9501“ (s. Abs. 2.1.7 und 5.2.10.2). Aufgrund der Unlöslichkeit des rekombinanten Proteins und der deshalb unter denaturierenden Bedingungen durchgeführten Aufreinigung (s. Abs. 5.2.2.4) war eine Renaturierung der Luziferase (s. Abs. 5.2.5) erforderlich. Diese erwies sich als Herausforderung. Eine erfolgreiche Renaturierung zeigte sich jedoch nach einer an Herbst *et al.* (1997) und Zako *et al.* (2000) angelehnten Durchführung und der anschließenden im Luminometer nachgewiesenen Enzymaktivität (s. Abs. 2.1.7).

Die in *E. coli* rekombinant hergestellte und im Luminometer analysierte Schwamm-Luziferase erwies sich als bioaktiv. Sie zeigte eine Abhängigkeit von ATP und die Empfindlichkeit gegenüber Hitze, wie die verwandten Luziferasen aus den Leuchtkäfern (Oba *et al.*, 2003). Im Fluoreszenz-Spektrophotometer weist die enzymatische Reaktion der rekombinanten Luziferase aus *S. domuncula* ein Biolumineszenz-Emissionsspektrum im Bereich von 490 nm bis 620 nm aus. Die Ergebnisse und Parameter stimmten mit denen der bisher präparierten und untersuchten Luziferasen aus Insekten überein (Branchini *et al.*, 2006).

2003 schilderten Oba *et al.*, dass bereits 1958 Airth *et al.* bei der Zugabe von Luziferin und ATP zum Reaktionsmix der Luziferase die Lichtemission eine schnelle Inhibition der Lumineszenz beobachten. Diese konnte durch die Zugabe von Coenzym A (CoA) verringert werden. Im Jahr 2005 beschrieben sowohl Branchini *et al.* als auch Fraga *et al.* den Effekt von CoA auf die Biolumineszenzreaktion der Luziferasen. Auch wenn das CoA nicht für die Biolumineszenz benötigt wird, hat dieser Cofaktor einen stimulierenden Effekt auf die Lichtproduktion (Branchini *et al.*, 2005). Es stellte sich heraus, dass CoA nicht als allosterischer Effektor, sondern als Substrat von der Luziferase umgesetzt werden

kann und somit die Biolumineszenzreaktion beeinflusst (Fraga *et al.*, 2005). Die Ergebnisse aus der funktionellen Analyse der Schwamm-Luziferase stimmen mit diesem beschriebenen Effekt von CoA überein.

Für die Enzymaktivität der Luziferase aus *S. domuncula* konnte in dieser Arbeit zudem die für die Luziferasen der Leuchtkäfer beschriebene Sensitivität gegenüber dem pH-Wert festgestellt werden. Modell- und Mutationsstudien ermöglichten es Viviani *et al.* (2008a), einen Bereich von Aminosäuren auszumachen „Loop 223 - 235“ (für LUC_PHOPY), der eine Rolle bei der pH-Sensitivität und der Biolumineszenzfarbe spielt. Diese Aminosäuren sind nicht direkt am aktiven Zentrum beteiligt, können jedoch indirekt einen Einfluss auf die Struktur ausüben (Viviani *et al.*, 2008a, b).

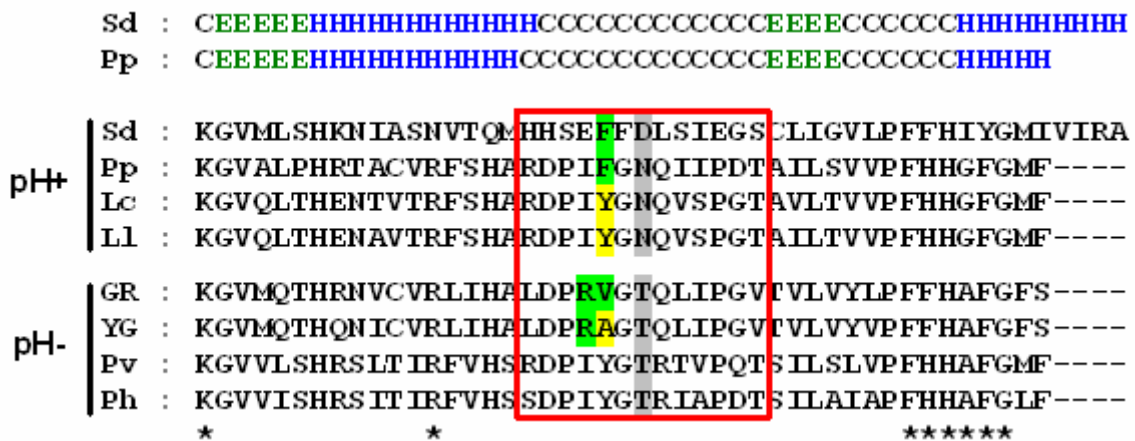


Abbildung 42: Alignment der Region zwischen den As₂₄₅ und As₂₉₃ (Nummerierung für LUC_SUBDO) in Luziferasen.

Grau schattiert sind die konservierten Aminosäuren, welche sich zwischen den pH-sensitiven (pH+) und pH-insensitiven (pH-) Luziferasen unterscheiden. Die potenziellen Aminosäuren für das aktive Zentrum sind mit einem Sternchen (*) markiert. Verglichen mit der Luziferase aus *S. domuncula* wurden die pH-sensitiven Luziferasen aus *P. pyralis* (Pp), *L. cruciata* (Lc), *L. lateralis* (Ll;) und die pH-insensitiven Luziferasen aus *P. plagiophthalmus* (die Isoformen GR = grün und YG = gelb-grün), *P. viviani* (Pv) und *P. hirtus* (Ph). Der rot markierte Bereich stellt einen von Viviani (2008a) beschriebenen Loop dar, der einen Einfluss auf das Biolumineszenzspektrum in den Luziferasen der Leuchtkäfer besitzt.

Die Sekundärstrukturvorhersage für LUC_SUBDO wurde mit Hilfe von PORTER (Protein Secondary Structure Prediction at University College Dublin; <http://distill.ucd.ie/porter/>) vorgenommen und mit der Sekundärstruktur der *P. pyralis*-Luziferase verglichen. Für beide Luziferasen ist die Art der berechneten Sekundärstruktur, α-Helices (H), β-Faltblatt-Struktur (E) und coiled (C) über dem As-Sequenzalignment angegeben. Sie basiert auf PDB Vorlagen (Sequenzähnlichkeit bis zu 33 %).

Die Abbildung 42 stellt diesen Bereich (rot eingerahmt) innerhalb eines Sequenzvergleiches der As₂₄₅ bis As₂₉₃ (für LUC_SUBDO) dar. Mit den Aminosäuren 266FFD268 weist LUC_SUBDO Ähnlichkeiten zu den pH-sensitiven Luziferasen,

wie z. B. von *Photinus pyralis* (Pp) auf. Laut Viviani *et al.* (2008a) beeinflusst das „Triplet“ 227YGN229 (227FV/YGR229) entscheidend das Biolumineszenzspektrum, sowohl für pH-sensitive als auch für pH-insensitive Luziferasen. Die gelb-grünes Licht emittierende *P. pyralis*-Luziferase ist durch das Phenylalanin an der Position 227 gekennzeichnet. Die Übereinstimmung für das in der Luziferase-Sequenz von *S. domuncula* an Position 266 liegende Phenylalanin entspricht dem für die Schwamm-Luziferase ermittelten Biolumineszenzspektrum, welches eine Emission von gelb-grünem Licht zeigt (s. Abb. 28). Für Y227 und N229 (F266/D268 in LUC_SUBDO) wird angenommen, dass sie für diesen flexiblen Loop einen Ankerpunkt zum Proteinkern darstellen (Viviani *et al.*, 2008a). Große hydrophobe Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Valin an Position 227 (Phenylalanin in LUC_SUBDO;) scheinen in die hydrophobe Tasche der Luziferase hineinzureichen. Viviani *et al.* (2008a) beschrieben ausserdem, dass ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken ausgemacht wurde, an dem die Aminosäuren N229-S284-E311-R337 beteiligt und möglicherweise wichtig für die Bedingungen der Biolumineszenzfarbe sind. Die korrespondierenden Aminosäuren in der Luziferase aus *S. domuncula* D268-T324-Q351-R376 besitzen sowohl identische als auch ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften. Nicht nur die im Luziferase-Assay signalisierte pH-Abhängigkeit sondern auch das gemessene Biolumineszenz-Emissionsspektrum wird durch den in Abbildung 42 gezeigten As-Sequenzvergleich bestärkt. Dieser weist für die Schwamm-Luziferase auf eine Homologie zu pH-sensitiven Luziferasen mit einer gelb-grünen Lichtemission (*Photinus pyralis*) hin. Untermuert werden diese Untersuchungen durch die im Abschnitt 2.1.7 beschriebenen Experimente, in denen sowohl das vom Schwammgewebe, als auch das aus dem Schwamm-extrakt emittierte Licht mit Hilfe eines Filmes detektiert werden konnte.

3.2.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die immunhistologische Analyse gab eine genaue Auskunft über die Lokalisierung der Luziferase im Schwammgewebe. Im Vergleich zum Prä-Immunsereum erkannten die gegen das Protein gerichteten Antikörper im Gewebe Bereiche, in denen sich *Spiculae* befinden (s. Abb. 29 A - C). Dies kann ein Hinweis auf eine mögliche Verbindung zwischen der Lichtreaktion der Luziferase und den optophysikalischen Eigenschaften der *Spiculae* sein.

3.3 Identifizierung des Luziferin regenerierenden Enzyms

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen der Luziferase aus *S. domuncula* konnte ein weiteres cDNA-Fragment (720 Nt) identifiziert werden, welches ebenfalls Homologien zu Proteinen aus Insekten aufwies. Ausgehend von dem Fragment (EST Datenbank Nr. sd002_005d), welches mit den As₃ - As₂₄₅ einen Teil des ORFs für ein potenzielles Luziferin regenerierendes Enzym umfasste, ließen sich mit Hilfe der PCR-Technik (s. Abs. 5.1.1.2) mehrere Klone aus der cDNA-Bank von *S. domuncula* isolieren. Ein Vergleich der verschiedenen Klone ergab mehrere Sequenzen, die im überlappenden Bereich identisch waren und die für das Fragment ermittelte Homologie zu den LRE aus Insekten bestätigte.

3.3.1 Nukleotidsequenz von *SDLRE*

Die vollständige, als *SDLRE* bezeichnete cDNA umfasst 1150 bp (exklusive PolyA) und zeigt innerhalb der Basen, die das Startcodon flankieren [AGA **A** **ACATGG**], eine Übereinstimmung mit der Kozaksequenz [GCC **A/G** **CCATGG**] bei Eukaryoten (Kozak, 1991). Im ersten Triplett weicht die Sequenz davon ab, beinhaltet aber sowohl die minderwichtige Pyrimidinbase C an Position -1, als auch die überaus wichtigen Purinbasen A an Position -3 und G an Position +4 (Kozak 1991). Demnach dürfte der Bereich für eine gesteigerte Translations-effizienz ausreichen, wie sie für *Drosophila* und einige Pflanzen gezeigt werden konnte (Kozak, 1987; Kozak 1991). Das typische Polyadenylierungssignal der Vertebraten, welches zu 90 % in den mRNAs im Menschen enthalten ist (Zhao *et al.*, 1999; Beaudoin *et al.*, 2000; Gilmartin, 2005), lautet [**AATAAA**] (Zarkower *et al.*, 1986). Eine solche Sequenz ist in der 3'-UTR des *SDLRE*, 191 bp vor dem polyA-Ende enthalten. In Abbildung 39 ist dieses typische Polyadenylierungssignal der Eukaryoten zusammen mit zusätzlichen Nukleotidhexameren dargestellt, welche im Vergleich zur [**AATAAA**]-Sequenz eine Alternative zur Adenylierung der mRNA bietet, wenn auch mit geringerer Effizienz. Wie die Northern Blot-Analyse (Müller *et al.*, 2009) zeigt, entspricht die Länge des aus der cDNA-Bank amplifizierten *SDLRE* der Länge des Transkriptes (1,2 kb), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die cDNA die vollständige mRNA repräsentiert.

3.3.2 Proteinbiochemische Untersuchung der Luziferase

3.3.2.1 Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz

Das *SDLRE*-cDNA aus *S. domuncula* umfasst einen offenen Leserahmen von 918 bp (306 As), der für ein ca. 32,8 kDa großes Protein kodiert. Im Datenbankvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigte sich eine Übereinstimmung mit den Luziferin regenerierenden Enzymen aus Insekten (s. Abs. 2.2.3). Mit der Identifikation des LRE_SUBDO und der im Rahmen dieser Arbeit bereits identifizierten und analysierten Luziferase kann eine weitere Verwandtschaft zu Proteinen aus Insekten aufgezeigt werden (s. Abs. 3.2).

Die Luziferin regenerierenden Enzyme aus Insekten besitzen einen Sequenzbereich, der ebenfalls im Regucalcin (SMP30) und in der Gluconolactonase enthalten ist. Aufgrund dieser Gemeinsamkeit werden die Proteine mit der Bezeichnung der enthaltenen „SGL-ähnlichen Region“ zusammengefasst. Sequenzanalysen des LRE_SUBDO identifizierten diese „SGL-ähnliche Region“ für den Bereich der As₁₀ - As₃₀₀ (s. Abs. 2.2.3). Des Weiteren ergaben die Vergleiche der As-Sequenzen, dass LRE_SUBDO mit 37 % identischen und 53 % ähnlichen As eine etwas höhere Übereinstimmung zur Regucalcinsequenz aufweist als zur As-Sequenz der LRE aus Insekten mit 32 % identischen und 50 % ähnlichen Aminosäuren. Ein nahezu identisches Ergebnis zeigt der Vergleich der Aminosäuren (s. Abb. 43), welche in den LRE die potenziellen Bindestellen für das Luziferin darstellen (Day & Bailey, 2003).

LBD1				LBD2			
LRE_SUBDO	81	GTKLCLVNR	91	LRE_SUBDO	291	VKDSGTTK	298
LRE_PHOPY	69	GRFVVSLE	79	LRE_PHOPY	293	VTGLGVK	300
LRE_LUCCR	69	DRFIVSLE	79	LRE_LUCCR	294	VTGLGVK	301
LRE_SUBDO	81	GTKLCLVNR	91	LRE_SUBDO	291	VKDSGTTK	298
RGN_HUMAN	74	GTKFCALN	84	RGN_HUMAN	284	ITGLGVK	291
RGN_MOUSE	74	GTKFCALN	84	RGN_MOUSE	284	ITGLGVK	291

Abbildung 43: Sequenzvergleiche der potenziellen Luziferinbindestellen von LRE_SUBDO, den LRE aus Insekten und den RGN aus Vertebraten.

Der As-Sequenzvergleich für den Bereich der potenziellen Luziferinbindestellen verdeutlicht die Verwandtschaft von Luziferin regenerierenden Enzymen mit dem Regulatorprotein Regucalcin.

Anhand dieser deutlichen Sequenzähnlichkeit sowohl zu den LRE aus Insekten als auch zum Regucalcin gibt die Sequenzanalyse keinen Aufschluss auf eine

mögliche Funktion als LRE in *S. domuncula*, wenn die bereits identifizierte und nachweislich bioaktive Luziferase mit offenkundiger Homologie zu Insekten-Luziferasen eine solche vermuten lässt. Diese Ähnlichkeiten der Aminosäuren, insbesondere in den potenziellen Bindestellen für das Substrat D-Luziferin, entsprechen den Aussagen von Day & Bailey (2003). Sie vermuten, dass aufgrund dieser hohen Sequenzübereinstimmung der LRE aus Leuchtkäfern mit dem SMP30 von weiteren Funktionen der LRE ausgegangen werden kann.

3.3.2.2 Phylogenetische Analyse

Aufgrund des anzunehmenden Zusammenhanges zwischen dem LRE_SUBDO und der ebenfalls im Schwamm identifizierten Luziferase wird, trotz der geringfügig höheren Ähnlichkeit in der As-Sequenz mit dem Regucalcin aus Vertebraten, eine gemeinsame Anordnung mit den LRE aus Insekten erwartet. Diese Voraussage wird für den im Abschnitt 2.4.4 dargestellten phylogenetischen Vergleich bestätigt.

3.3.3 Expression des Luziferin regenerierenden Enzyms

Zur Herstellung des rekombinanten Luziferin regenerierenden Enzyms aus *Suberites domuncula* wurde die *SDLRE*-cDNA, wie im Abs. 5.1.4.2 beschrieben, in den Expressionsvektor pBAD/gIII A einligiert und in *E. coli* One Shot® TOP10 Zellen exprimiert (s. Abs. 5.2.3.2). Jedoch gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, die Gründe aufzudecken, die einer erfolgreichen Aufreinigung des rekombinanten Proteins entgegenwirkten. Über die Funktionsweise des Proteins kann daher nur spekuliert werden. Aufgrund der phylogenetischen Einordnung (s. Abb. 36), den bestehenden Sequenzähnlichkeiten (s. Abb. 34 & Abb. 43) und der bioaktiven Luziferase kann dennoch eine Luziferin regenerierenden Funktion in diesem für den Schwamm *S. domuncula* identifizierten „Luziferin/Luziferase Systems“ angenommen werden.

Für die ermittelte Bioaktivität der rekombinanten Luziferase (s. Abs. 2.1.7), in der die Reaktion von 3 µg rLUC_SUBDO nicht die erwarteten RLU-Werte erreichten, sind eine Reihe von Einflussfaktoren vorstellbar. Zum einen die bereits erwähnten Verunreinigungen, welche bei der Enzympräparation zurückbleiben könnten. Zum anderen konkurriert die korrekte Faltung in der Renaturierung der Luziferase mit zwei inaktiven Zwischenprodukten (Herbst *et al.*, 1998), die somit

einen inhibierenden Effekt auf die Lumineszenzreaktion ausüben könnten. Eine weitere Möglichkeit einer hemmenden Wirkung auf die Luziferasereaktion besteht im Oxyluziferin, welches während der Reaktion entsteht. Für das Oxyluziferin konnte ein inhibierender Effekt auf das Enzym gezeigt werden (Gomi & Kajiyama, 2001), der im kompetitiven Verhalten gegenüber dem Substrat Luziferin begründet liegt und ebenfalls für das Luziferasesystem im Schwamm die Existenz eines Luziferin regenerierenden Enzyms sinnvoll werden lässt.

3.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit im marinen Schwamm *S. domuncula* identifizierten Proteine - die bioaktive Luziferase und das potenzielle Luziferin regenerierende Enzym - bestätigen Hinweise auf die Existenz eines Biolumineszenzsystems in Schwämmen. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Lichtadaptionsstudien mit Primmorphen (Müller *et al.*, 2009). Weitere Studien, beispielsweise Mutationsanalysen oder Untersuchungen des Substratspektrums des Enzyms, könnten entscheidend zur Aufklärung der meist gestellten Frage nach dem Ursprung der Biolumineszenz beitragen.

Zu den Überlegungen der Biolumineszenzentstehung zählt die mögliche Detoxifikation von molekularem Sauerstoff durch frühe Oxygenasen, die für die bakteriellen Luziferasen bereits belegt wurde (Rees *et al.*, 1998). Die Entwicklung der Leuchtkäfer-Luziferasen aus einer ursprünglichen Acyl:CoA Ligase wird durch die entsprechende Homologie und die Übereinstimmung in der Adenylat-bildenden Reaktion bestätigt (Viviani*). Die Existenz einer bioaktiven Luziferase in einem der ältesten, rezent vertretenen Metazoa deutet darauf hin, dass sich die Oxygenasefunktion bereits früher entwickelte, als bisher von Viviani* vermutet.

Im Jahr 2004 bestätigten Dubuisson *et al.* die Vermutungen von Viviani*, dass das D-Luziferin strukturell als Antioxidant funktionieren könnte. Die antioxidativen Eigenschaften des D-Luziferins deuten daraufhin, dass die evolutionäre Entstehung des Biolumineszenzsystems in der Existenz des Substrats D-Luziferin und nicht in der Luziferase begründet ist. Demnach entwickelte sich das D-Luziferin, ausgehend von der Funktion eines Radikalfängers, zu einem Lichtemittierenden Substrat eines Vorläufers der Luziferase (Dubuisson *et al.*, 2004). Ähnliche Hinweise auf die Ursprünge der Biolumineszenz in einer antioxidativen Funktion liefern die Homologien zwischen dem Luziferin regenerierenden Enzym,

dem Regucalcin und der Gluconolactonase. Für das Regucalcin konnte die Gluconolactonase-Funktion in der L-Ascorbinsäure-Biosynthese nachgewiesen werden (Kondo *et al.*, 2006).

Parallel zu den Untersuchungen des Luziferin/Luziferase Systems in Schwämmen liegt eine Aufgabe darin, die Kopplung zwischen dem Licht-generierendem System der Luziferase und dem potenziellen inorganischen Licht-leiter aus Silizium aufzuklären. Weitere, bereits begonnene Analysen betreffen ein System aus Lichtpigmenten in *S. domuncula*. Bislang wurden die β -Carotin-oxygenase und die Retinal-Dehydrogenase, zwei der Schlüsselenzyme des Carotinstoffwechsels, in *S. domuncula* identifiziert und kloniert. Sie sind speziell in Invertebraten an der Lichtrezeption beteiligt (Stark *et al.*, 1990).

4. Material

4.1 Organismen

4.1.1 Schwämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Schwämme der Spezies *Suberites domuncula* stammen aus der nördlichen Adria. Sie wurden in der Nähe der Stadt Rovinj (Kroatien) aus einer Tiefe von 20 - 40 m gesammelt und anschließend in Aquarien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Werner E. G. Müller am Institut für Physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz gehalten.

Unter standardisierten Bedingungen, in künstlichem Seewasser (16°C) und mit definierten Lichtverhältnissen (Tageslichtlampen und weitgehend angepasster Tag-Nacht-Rhythmus) beträgt ihre Überlebensdauer mehrere Jahre.

4.1.2 Bakterienstämme

Die für die molekulargenetischen Arbeiten, wie Klonierung und Expression, verwendeten *Escherichia coli* Stämme für die sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> NovaBlue Singles™	<i>endA1 hsdR17</i> ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) <i>supE44 thi-1</i> <i>recA1gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>ZΔM15</i> ::Tn10(<i>tet</i> ^R)]	Merck, Darmstadt
<i>E. coli</i> One Shot® TOP10	F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ</i> <i>ΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)</i> <i>7697 galU galK rpsL (Str^R) EndA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> One Shot® BL21-AI™	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> ($r_B^- m_B^-$) <i>gal dcm</i> <i>araB::T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen, Karlsruhe

4.2 cDNA Bank

Die für die Arbeiten mit der Luziferase (LUC_SUBDO) verwendete cDNA Bank von *S. domuncula* wurde 1997 von Kruse *et al.* (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Werner E. G. Müller) in den λ-ZAP-Express/pBK-CMV Vektor (4518 bp) von Stratagene, Heidelberg inkloniert. Eine weitere cDNA Bank von *S. domuncula* bildete die Grundlage für die Arbeiten am Luziferin regenerierenden Enzym

(LRE_SUBDO). Sie wurde von Herrn Dr. Anatoli Krasko, ebenfalls aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Werner E. G. Müller, in den TriplEx2-Vektor (Clontech, Heidelberg) einkloniert.

4.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Plasmide und ihre Eigenschaften.

Plasmide	Eigenschaft	Referenz
pBAD/gIII A (4145 bp)	Amp ^r , pBR322 ori, <i>araBAD</i> Promotor, <i>myc</i> Epitop, 6x His C-terminal	Invitrogen, Karlsruhe
pBK-CMV (4518 bp)	Nm ^r , Cm ^R , <i>lacZ</i> , f1 ori, pUC ori, Promotor: <i>lac</i> , CMV, SV40, <i>bla</i>	Stratagene, Heidelberg
pGEM [®] -T (3000 bp)	Amp ^r , <i>lacZ</i> , f1 ori, T7- und SP6-Promotor	Promega, Madison, USA
pDONR [™] 221 (4762 bp)	Cm ^r , Cmp ^r , Zeo ^r , pUC ori, T7-Promotor	Invitrogen, Karlsruhe
pDEST [™] 17 (6354 bp)	Amp ^R , Cm ^R , pBR322 ori, T7-Promotor, 6x His N-terminal	Invitrogen, Karlsruhe
pTriplEx2 (3600 bp)	Amp ^r , f1 ori, pUC ori, <i>lacZ</i> , <i>lac</i> Promoter, T7- und SP6-Promotor	Clontech, Heidelberg

4.4 Primer

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) bezogen.

4.4.1 Vektorspezifische Primer

Die für die Kombination mit genspezifischen Primern und für die Sequenzierung verwendeten, vektorspezifischen Oligonukleotide sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Vektorspezifische Primer.

Vektor	Primer	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]
pBK-CMV	CMV-F	CTT GAT TAC GCC AAG CTC	58,0
	CMV-R	TAG GGC GAA TTG GGT ACA C	58,0
	M13(-20)	TGT AAA ACG ACG GCC AGT G	58,0
	T3	CGG AAT TAA CCC TCA CTA AAG	60,0
	T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	64,0

Fortsetzung Tabelle 6: Vektorspezifische Primer.

Vektor	Primer	Sequenz (5' → 3')	Tm [°C]
pTriplEx2	F2	CCA AGC TCC GAG ATC TGG AC	60,0
	F3	ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG	60,0
	R2	GTG CTG CAA GGC GAT TAA G	58,0
	R3	CGT TTA CAA TTT CCA TTC GCC	60,0
pGEM [®] -T	M13(-20)	TGT AAA ACG ACG GCC AGT G	58,0
	SP6	TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C	60,0
	T7	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG	56,0
pDONR [™] 221	M13(-20)	TGT AAA ACG ACG GCC AGT G	58,0
	M13+	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	54,0
pDEST [™] 17	T7 (2)	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	58,0
pBAD/gIII A	pBAD-F	TAT GCC ATA GCA TTT TTA TCC	55,0
	pBAD-R	GAT TTA ATC TGT ATC AGG	50,0

4.4.2 Genspezifische Primer

Die spezifischen Oligonukleotide, welche zur Vervollständigung, Klonierung und Expression der Luziferase aus *S. domuncula* verwendet wurden, sind in der folgenden Tabelle 7 zusammengefasst. Unterstrichen sind die Start- und Stoppcodons der mittels Vector NTI[®] 9.0 designten Primer für die Klonierung und Expression im *E. coli* Expressionssystem mit Gateway[®] Technologie. Die spezifischen Gateway[®] *attB1* und *attB2* Klonierungsstellen der *SDLUC*-Primer sind blau hervorgehoben.

Tabelle 7: Spezifische Primer für die Klonierung, Sequenzierung und Expression der *SDLUC*

Primer	Sequenz (5' → 3')	Tm [°C]
SD_FLUC	AGG ATG AGG GAG TCA ATG AG	60,0
SD_RLUC	GAG GTG CAG TGT TCA CTC GAT	64,0
SD_F1cLUC	<u>ATG</u> CAT CGG TTA TCA AGA TTC TGT	66,0
SD_R1cLUC	<u>CTA</u> CTT GCT CTG ATC TCT GAG	62,0
Seq_FLUC	GCT GAA GCA GCA GTT ATT GG	60,0
Seq_RLUC	GAG TAT GGT AGC ACG GCT G	60,0
Seq_F2LUC	GAT GGT AGC GAC AAT TCC AG	60,0
<i>SDLUC_attB1</i> SP forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGC TTAGACGATGACGATAAA <u>ATGCATCGGTT</u> ATCAAGATTCTGT	66,0
<i>SDLUC_attB2</i> ASP reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA <u>CTACTTGCTCTGATCTCTGAG</u>	66,0

Tabelle 8 enthält die spezifischen Primer für das Vervollständigen der *SDLRE*-Sequenz und für dessen Klonierung in den Expressionsvektor pBAD/gIII A. *Kursiv* und **blau** sind die Erkennungspalindrome der Restriktionsenzyme *NcoI* und *EcoRI* dargestellt. Start- und Stoppcodon der *SDLRE*-Sequenz sind unterstrichen.

Tabelle 8: Spezifische Primer für die Klonierung und Expression des *SDLRE*.

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]
SD_F1LRE	CAC TGA TAT TGA AGG TCG TTT G	53,0
SD_R1LRE	GTA GGA CTA GGA TTA AGA CC	58,0
SD_FcLRE	<u>ATG</u> GAG AAG TCA GGT CTT AAT C	62,0
SD_RcLRE	<u>TCA</u> ACA CTT GAA CCT GTT GGC A	64,0
SD_FLRE_ <i>NcoI</i>	GGC ACC ATG GTG GAG AAG TCA GGT CTT AAT CC	64,0
SD_RLRE_ <i>EcoRI</i>	CG G AAT TCC ACA CTT GAA CCT GTT GGC AGG C	68,0

Für die Berechnung der Schmelztemperaturen der verwendeten Primer wurden weder die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme, noch die spezifischen Gateway[®] *attB1* und *attB2* Klonierungsstellen berücksichtigt, sondern nur die genspezifischen Nukleotide für die Sequenz.

4.5 Längen- und Molekulargewichtsstandard

Die eingesetzten Marker für die Agarose- und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Längen- und Molekulargewichtsstandard.

Längen- und Molekulargewichtsstandard	bestellt bei
GeneRuler™ DNA Ladder Mix; Nr.: SM0332 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000 , 2500, 2000, 1500, 1200, 1000 , 900, 800, 700, 600, 500 , 400, 300, 200, 100	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color; Nr.: 161-0374 250, 150, 100, 75 , 50, 37, 25 , 20, 15, 10 kDa	Bio-Rad, München
peqGOLD Protein Marker IV; prestained; Nr.: 27689 70, 130, 95, 72 , 55, 43, 34, 26, 17 und 10 kDa	Peqlab Biotech. GmbH, Erlangen

4.6 Chemikalien

Die bei der Arbeit eingesetzten Chemikalien sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	bestellt bei
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-D-galactopyranosid	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Carbenicillin - Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Coenzym A - Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blau	Serva, Heidelberg
Dimethylformamid (DMF)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-Luziferin, freie Säure	AppliChem, Darmstadt
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTP-Mix	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-N',N',N',N'-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fluorwasserstoffsäure (HF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Flüssigstickstoff	Linde, Wiesbaden
Flusssäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gelcode blue stain reagent	Pierce, Bonn
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Harnstoff (Urea)	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-Thiogalacto-pyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
L(+)-Arabinose	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Fortsetzung Tabelle 10: Verwendete Chemikalien.

Chemikalien	bestellt bei
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween [®] 20)	Roth, Karlsruhe
Rotenon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ICN Biomedicals, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe

4.7 Fluorochrome

Für die analytische Anfärbung von DNA und für die Mikroskopie verwendete Fluorochrome sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Fluorochrome.

Farbstoff	Exc _{max} [nm]	Em _{max} [nm]	Anwendung	Referenz
DAPI	359	461	DNA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidium-bromid	510, 523 (260 DNA)	595, 605	DNA	AppliChem, Darmstadt
Cy3	550	570	Protein	Jackson Immuno Research (UK)

4.8 Antibiotika und Substratanaloga

Stammlösungen der verwendeten Antibiotika und Substratanaloga sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Verwendete Antibiotika und Substratanaloga.

Substanz	Stammlösung
Ampicillin	50 mg/ml in <i>Aqua bidest.</i> bzw. 100 mg/ml in <i>Aqua bidest.</i>
Carbenicillin	50 mg/ml in <i>Aqua bidest.</i> bzw. 100 mg/ml in <i>Aqua bidest.</i>
Kanamycin	20 mg/ml in <i>Aqua bidest.</i>
IPTG	0,84 M in <i>Aqua bidest.</i>
X-Gal	50 mg/ ml in DMF

4.9 Bakterienkulturmedien

Die angegebenen Mengen für die verwendeten Medien beziehen sich auf ein Endvolumen von einem Liter in destilliertem Wasser. Nach dem Autoklavieren bei 121°C für 20 min erfolgte bei einigen Medien die Zugabe von Antibiotika:

Carbenicillin 50 mg/ml; Kanamycin 20 mg/ml.

- LB Agar (Luria/Miller)
10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
15 g/l Agar-Agar
pH-Wert = 7,0 ±0,2
- LB Medium (Luria/Miller)
10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/l NaCl
pH-Wert = 7,0 ±0,2
- AIX-Agarplatten (Ampicillin-IPTG-X-Gal-Agar)
1,00 l LB-Agar
zum autoklavierten Agar werden bei ~50°C hinzugeben:
50 µg/µl Ampicillin bzw. Carbenicillin
0,20 mM IPTG
0,05 % X-Gal
- Einfriermedium
25 mM Tris-HCl, pH 8,0
100 mM MgSO₄
65 % Glycerol (v/v)
- SOC-Medium
2% Trypton (w/v)
0,5% Hefeextrakt (w/v)
8,6 mM NaCl
2,5 mM KCl
20 mM MgSO₄
20 mM Glucose

4.10 Lösungen

- 10 %iges APS
10 g APS in 100 ml *Aqua dest.* gelöst, steril filtrieren
- alkalische Phosphatase Puffer
100 mM NaCl
100 mM TrisCl
5 mM MgCl₂ x 6 H₂O
ad 500 ml *Aqua dest.*
- Blockierungspuffer
5 % Magermilchpulver in
1 x TBS-T (v/v)
- BCIP
50 mg/ml BCIP in
100 % Dimethylformamid (v/v)
- Denaturierungspuffer
50 mM NaH₂PO₄ bzw. KH₂PO₄
300 mM NaCl bzw. KCl
6 M Urea
5 mM Imidazol
pH 8,0 (mit NaOH eingestellt)
- Elutionspuffer (Proteinreinigung)
50 mM NaH₂PO₄ bzw. KH₂PO₄
300 mM NaCl bzw. KCl
6 M Urea
250 mM Imidazol
pH 8,0 (mit NaOH eingestellt)

- Ethidiumbromid-Lösung
0,5 µg/ml Ethidiumbromid in
1 x TBE-Puffer
- NBT-Lösung
50 mg/ml NBT in
70 % Dimethylformamid (v/v)
- Ponceau S-Lösung
0,4 % Ponceau S (w/v)
0,1 % Essigsäure (v/v)
- Positivkontrolle (Assay)
1 mM DTT
1 mM EDTA
10 % Glycerol
0,1 mg/ ml LUC firefly
50 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,0)
- Reaktionsansatz (Assay)
0,25 mM D-Luziferin (freie Säure)
(5 mM ATP)
0,3 mM Coenzym A (CoA)
5 mM MgCl₂
0,4 M Tris-HCl Puffer
- SDS-Laufpuffer (10 x)
250 mM Tris
1,92 M Glycin
1 % SDS (w/v)
- 20 x SSC
3 M NaCl
300 mM Natriumcitrat
pH 7 einstellen, autoklavieren
- 10 x TBS
200 mM Tris-HCl
1,5 M NaCl
pH 8,0
- Extraktionspuffer
0,4 M Tris-HCl Puffer (pH 8,0)
50 mM NaCl
5 mM MgCl₂
0,5 mM EDTA
- 10 x PBS
1,4 M NaCl
27 mM KCl
100 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
20 mM KH₂PO₄
pH 7,4
- 6 x Probenpuffer (Agarose Gele)
0,25 % Bromphenolblau (w/v)
40 % Saccharose (w/v)
- 4 x Probenpuffer (SDS Gele)
0,2 M Tris-Cl pH 6,8
8 % SDS
40 % Glycerin (w/v)
0,4 % Bromphenolblau
(0,1 M DTT
oder 20 % β-Mercaptoethanol
separat zugeben)
- Renaturierungspuffer
100 mM KH₂PO₄ (pH 7,8)
1 mM EDTA
1 mM DTT
0,2 % Tween 20
- Sequenzier-Probenpuffer
95 % Formamid (v/v)
1 Kristall Bromphenolblau (w/v)
- 10 x TBE (pH 8.3)
900 mM TrisCl
900 mM Borsäure
25 mM Dinatrium-EDTA·2 H₂O
- 1 x TBS-Tween 20 (TBS-T)
0,1 % Tween 20 in 1 x TBS (v/v)

- Transferpuffer (nach Towbin)
25 mM Tris
190 mM Glycin
20 % Methanol (v/v)
- Waschpuffer (Proteinreinigung):
50 mM NaH₂PO₄ bzw. KH₂PO₄
300 mM NaCl bzw. KCl
(6 M Urea)
(10 mM Imidazol)
pH 8,0 (mit NaOH eingestellt)
- Western Blot-Detektionslösung
(alkalische Phosphatase)
200 µl NBT
100 µl BCIP
In 30 ml AP-Puffer
- Western Blot-Detektionslösung
(Peroxidase)
1 ml Luminol
1 ml Peroxid-Lösung

4.11 Enzyme und Restriktionsenzyme

Die in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme und Restriktionsenzyme sind in Tabelle 13 aufgelistet.

Tabelle 13: Enzyme und Restriktionsenzyme.

Enzyme	bezogen von
DNA <i>Taq</i> Polymerase (1U/µl) (5U/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot Invitrogen, Karlsruhe
rekombinante Luziferase (<i>Photinus pyralis</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Promega, Madison, USA
Restriktionsendonuklease <i>Nco</i> I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsendonuklease <i>EcoRI</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.12 Antikörper

Tabelle 14 enthält die verwendeten Antikörper.

Tabelle 14: Antikörper.

Antikörper	Hersteller
anti-Maus IgG, AP-gekoppelt (sekundär)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
anti-Kaninchen IgG, AP-gekoppelt (sekundär)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt (sekundär)	Invitrogen, Karlsruhe
Maus anti-His (primär)	GE Healthcare
Ziege anti-Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelter F(ab') ₂ (sekundär)	Jackson ImmunoResearch (UK)

4.13 Geräte

In Tabelle 15 sind alle verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 15: Verwendete Geräte.

Geräte	Hersteller
Autoklav Modell C#91294	Webeco, Ober-Ramstadt
DNA-Sequenzierer	MWG Biotech, Ebersberg
Global Edition IR ² Long readir 4200/ 4300	
Elektrophoresekammern	
Agarose-Gele	Bio-Rad, München
Protein-Gele (Mini-Protean II)	Bio-Rad, München
Eismaschine F125 Compact Icematic	Enodis, Herborn
Fluoreszenzmikroskop AH3	Olympus, Planegg
Fluoreszenz Spektrophotometer LS55	
Folien-Schweißgerät	Petra-electric, Burgau
<u>Gefrierschränke:</u>	Perkin-Elmer, USA
-20°C	Liebherr, Schweiz
Modell Basic, -85°C	Nunc, Wiesbaden
Gel Dokumentationssystem GelDoc 2k System	Bio-Rad, München
PC /CCIR Gel	
Gelformen für die Horizontalelektrophorese	techn. Werkstatt des Instituts
<u>Heizblock:</u>	
UNITEK HB-130	Salmon Electronics Ltd, UK
Wealtec HB-1	Peqlab, Erlangen
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Heizplatte	Ika Labortechnik, Staufen
hp psc 1315s All-in-One	Hewlett Packard Instruments GmbH, Böblingen
iBlot™ Dry Blotting System	Invitrogen, Karlsruhe
Infrarot-Detektor Licor <i>Odyssey</i>	MWG Biotech, Ebersberg
<u>Inkubatoren:</u>	
Rollinkubator	techn. Werkstatt des Instituts
Schüttelinkubator CERTOMAT®R	Braun, Melsungen
Kammern und diverse Kämmen für die Horizontalelektrophorese	techn. Werkstatt des Instituts
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Laminar Flow Sterilbank	Köttermann®, Hänigsen
Luminometer Lumat 9501	Berthold, Bad Wildbad
<u>Magnetrührer:</u>	
Heidolph MR 3000/ MR 3001	Heidolph, Kelheim
IKAMAG®	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrowelle-Ofen <i>Selection</i>	Samsung, Schwalbach
pH-Meter (Typ CG 840)	Schott, Mainz
<u>Photometer:</u>	
GeneQuant II	Pharmacia Biotech, England
UV/Visible GelDoc 2K System PC	Bio-Rad, München
Spectorphotometer SmartSpec Plus	Bio-Rad, München

Fortsetzung Tabelle 15: Verwendete Geräte.

Geräte	Hersteller
<u>Powersupply für Gelelektrophorese und Western Blot:</u> Modell 1000/ 500; Modell PowerPac 200	Bio-Rad, München
Rotilabo®-Präparatekasten	Roth, Karlsruhe
Rotoren GSA und HB 6	DuPont, Bad Homburg
<u>Schüttler:</u>	
IKA® VIBRAX VXR basic	Ika Labortechnik, Staufen
Heidolph Polymax 1040	Heidolph, Kelheim
SemiDry-Blottingkammer Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
Sonifier® B-12 Cell Disruptor	Branson Sonic Power Company, Dranbury
<u>Thermocycler:</u>	
i-cycler, MyCycler™	Bio-Rad, München
Perkin Elmer Geneamp 9600	Applied Biosystems, Weiterstadt
UVP White/ UV Transilluminator mit Gel-Dokumentationssystem	UVP Limited, Cambridge, England
Vortexer Reax 2000	Labotech, Wiesbaden
Waage Adventure-Pro	Ohaus Corporation, NJ, USA
Wasserbad Julabo Exatherm electronic U3	Juchheim Labortechnik, Seelbach
Wärmeschrank/ Inkubationsschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
<u>Zentrifugen:</u>	
5415 R	Eppendorf, Hamburg
5415 C	Eppendorf, Hamburg
5804 R	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RC 5B	DuPont, Bad Nauheim

4.14 Verbrauchsmaterialien und weiteres Laborzubehör

Verbrauchsmaterialien und weiteres Laborzubehör wurden in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien und weiteres Labormaterial.

Verbrauchsmaterialien	bestellt bei
Deckgläser, Ø 12 mm	Roth, Karlsruhe
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Entwickler & Fixierer	Kodak, Stuttgart
Falcon Reaktionsgefäße (5, 15 und 50 ml)	Becton & Dickinson, NJ, USA
Filter (5 ml Polypropylene Columns)	Pierce Biotechnology, Rockfort
Filterpapier für Western Blot	Pharmacia, Freiburg
iBlot™ Transfer Stack (Nitrocellulose)	Invitrogen, Karlsruhe
<u>Kolbenhubpipetten:</u>	
0,5 - 2 µl	Gilson, Frankreich
0,5 - 10 µl, 2 - 20 µl, 20 - 200 µl	Eppendorf, Hamburg
100 - 1000 µl	Brand, Wertheim

Fortsetzung Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien und weiteres Laborzubehör.

Verbrauchsmaterialien	bestellt bei
Latexhandschuhe	N.S. Uni Gloves, Sdn. Bhd., Serembau, Malaysia
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche, Mannheim
Microcon [®] YM-50 Centrifugal Filter Units	Millipore GmbH, Schwalbach
Millipore Immobilon-P (PVDF Membran)	Roth, Karlsruhe
Mörser	Haldenwanger, Berlin
Nitrilhandschuhe Rotiprotect	Roth, Karlsruhe
Objektträger SuperFrost [®] Plus	Menzel-Gläser
Parafilm M	American National Can, USA
Pasteurpipetten	Poulton & Graf GmbH, Wertheim
PCR-Pipettenspitzen ART mit Filtereinsatz	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Abgene, Epsom, England
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
Pistill	Haldenwanger, Berlin
Plastikbeutel Plastibrand	Brand, Wertheim
QuadriPERM [®] 4-Kompartiment Zellkulturschale	Heraeus, Hanau
<u>Reaktionsgefäße:</u>	
0,5 ml/ 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Rotilabo [®] -Präparatekasten	Roth, Karlsruhe
Rundbodenröhrchen (5 ml; 75 x 12 mm)	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter Porengröße 0,2 µm/ 0,45 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Videoprinterpapier	Rothhaar & Schröder, Heidelberg

4.15 Kits und gebrauchsfertige Reagenzien

Tabelle 17 enthält die in dieser Arbeit eingesetzten Kits und gebrauchsfertige Reagenzien.

Tabelle 17: Kits und gebrauchsfertige Reagenzien.

Kits und gebrauchsfertige Reagenzien	bestellt bei
<u>Aufreinigung von PCR-Produkten:</u>	
High Pure PCR Product Purification System	Roche, Mannheim
NucleoSpin [®] Extract II	Macherey-Nagel, Düren
<u>Aufreinigung von PCR-Produkten:</u>	
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
BugBuster [®] Protein Extraction Reagent	Novagen, Darmstadt
<u><i>E. coli</i> Expressionssystem mit</u>	
<u>Gateway[®] Technologie:</u>	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway [®] BP Clonase [™] II Enzyme Mix	
Gateway [®] LR Clonase [™] II Enzyme Mix	
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Carpinteria; USA

Fortsetzung Tabelle 17: Kits und gebrauchsfertige Reagenzien.

Kits und gebrauchsfertige Reagenzien	bestellt bei
LB Agar	Roth, Karlsruhe
LB Medium	Roth, Karlsruhe
Loading Dye Solution (6x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Magermilchpulver Sucofin	TSI GmbH & Co.KG
Millipore Immobilon Western Chemilumineszenz	Millipore GmbH, Schwalbach
HRP Substrat (je 25 ml Luminol und Peroxid-Lsg.)	Invitrogen, Karlsruhe
Ni-NTA-Agarose	Roche, Mannheim
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Promega, USA
pGEM [®] -T Vektor System I	Roche, Mannheim
Protease-Inhibitor-Cocktail, <i>Complete mini</i> , EDTA-frei	Invitrogen, Karlsruhe
<u>Protein Gele (Pre-Cast)</u>	
NuPAGE [®] Novex [®] Bis-Tris Mini Gel 4-12%, 1.0 mm, 12 well	
Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins	Macherey-Nagel,
Protino [®] Ni-IDA 1000	
Rapid Ligationspuffer (2x)	Promega, USA
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe
Roti [®] -Load 1; Proteinauftragspuffer, reduzierend	Roth, Karlsruhe
Roti [®] -Quant R250	Roth, Karlsruhe
SequaGel [®] XR; SequaGel [®] Complete	National Diagnostics, USA
SOC-Medium	Novagen, Darmstadt
Technovit 8100	Heraeus Kulzer, Wehrheim
Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit	GE Healthcare Bio- Sciences, Schweden
10x TBE Puffer (Tris-Borat-EDTA)	Applichem, Darmstadt
10x TBS Puffer (Tris gepufferte Saline)	Applichem, Darmstadt

4.16 Computerprogramme und Internet-Dienste

Die für die Datenauswertung verwendeten Programme, sowie Internet-Dienste sind in Tabelle 18 genannt:

Tabelle 18: Computerprogramme und Internet-Dienste für die Datenauswertung.

Programm bzw. Internet-Dienst	Anwendung	Referenz
LI-COR [™] Base ImagelR [®] Data collector and Image Analysis e-Seq V3.0	DNA-Sequenzierung	LI-COR, über MWG Biotech, Ebersberg
Basic Local Alignment Search Tool Service (BLAST)	Vergleich von Nukleotid- & As-Sequenzen, Datenbankvergleich	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST, Altschul <i>et al.</i> , 1997

Fortsetzung Tabelle 18: Computerprogramme und Internet-Dienste.

Programm bzw. Internet-Dienst	Anwendung	Referenz
ClustalX 2.0	Sequenzvergleiche, phylogenetische Analysen	http://www.ebi.ac.uk/embl/ EMBL, Hixton, England; Thompson <i>et al.</i> , 1997
Dnasis	Translation von Nukleotidsequenzen	Hitachi Software Engineering Co., Ltd, Japan
DNASar	Sequenzanalyse	http://www.dnastar.com/ DNASar Inc., USA
ExpASy tool	Charakterisierung von Proteinen (physikalische & chemische Parameter)	http://www.expasy.ch
GeneDoc 2.7	Grafische Umsetzung von Sequenzvergleichen	http://www.psc.edu/biomed / genedoc, Nicholas & Nicholas, 1997
GIMB	Bildbearbeitung	http://www.gimp.org/
InterPro	Datenbank von Proteinfamilien, Domänen, Regionen, Repeats und Bindestellen	http://www.ebi.ac.uk/interpro/
MATRAS <i>MARkovian TRAnsition of Structure evolution</i>	Protein 3D Struktur Vergleich (BLAST)	http://biunit.aist-nara.ac.jp/matras/bltsch.html
Microsoft® Excel 2003	Diagramme, Regressionsanalysen	Microsoft Corp., USA
Microsoft® Paint V 5.1	Bildbearbeitung	Microsoft Corp., USA
Microsoft® Word 2003	Textverarbeitung	Microsoft Corp., USA
NCBI Genbank	Sequenzdatenbank	http://www.ncbi.nih.gov/
Pcons	Meta Server zur Vorhersage der Proteinstruktur	http://pcons.net/
Protein families database of alignments and HMMs (Pfam)	Identifizierung von Proteindomänen	http://pfam.sanger.ac.uk/
Photoshop	Bildbearbeitung	http://www.adobe.com CS Adobe Systems Inc., USA

Fortsetzung Tabelle 18: Computerprogramme und Internet-Dienste.

Programm bzw. Internet-Dienst	Anwendung	Referenz
PHYRE Protein Homology/ analogY Recognition Engine	Ermittlung der potenziellen Proteinfaltung	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/html/index.html
PROSITE	Identifizierung von Familien, Strukturmotiven, Proteindomänen	http://expasy.proteome.org.au/prosite/
ProtParam	Ermittlung verschiedener physikalischer und chemischer Parameter	http://www.expasy.ch/tools/protparam.html
ScanProsite	Identifizierung von Proteindomänen, Motiven	http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/
Simple Modular Architecture Research Tool (SMART)	Identifizierung von Proteindomänen	http://smart.embl-heidelberg.de
Swiss-Prot/TrEMBL	Protein-Datenbank	http://www.expasy.org/sprot
TreeView V 1.6.6	Darstellung phylogenetischer Bäume	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html
Vector NTI [®]	DNA-Editierung, Oligo- design, Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse, Alignments, Genkarten	Invitrogen, Karlsruhe

5. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

5.1.1.1 Standard-PCR

Die PCR (engl.: polymerase chain reaction) ist ein von K. B. Mullis 1983 entwickeltes enzymatisches Verfahren zur gezielten exponentiellen Vervielfältigung bekannter DNA-Sequenzen mittels einer hitzebeständigen DNA-Polymerase. Hierfür sind zwei synthetische Oligonukleotide (Primer) notwendig, welche die DNA-Sequenz flankieren und deren Sequenzen jeweils komplementär zu einem der zu amplifizierenden DNA-Stränge sind. Zusätzlich benötigt die häufig eingesetzte thermostabile DNA-Polymerase I aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq DNA-Polymerase) zur Synthese des DNA-Fragments einen entsprechenden Puffer und freie Desoxyribonukleotide (dNTPs). Die Standard-PCR umfasst drei Schritte, die sich in definierten Zyklen (30 - 35x) wiederholen. Im Einzelnen erfolgt im ersten Schritt der PCR die Strangtrennung der linearen bzw. zirkulären DNA-Matrize (Template) infolge einer Denaturierung der Nukleinsäuren durch das Erhitzen auf 95 °C. Anschließend hybridisieren die spezifischen Primer bei niedriger Temperatur (Annealingtemperatur; T_a) an die einzelsträngige DNA. Ausgehend von den Oligonukleotiden wird im dritten Schritt der zum Template komplementäre DNA-Strang bei der Arbeitstemperatur der verwendeten DNA-Polymerase synthetisiert (Elongation). Die für die Standard-PCR verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 19 aufgelistet.

Tabelle 19: Standard-Protokoll für die PCR.

Standard-Protokoll für die PCR:		
1. primäre Denaturierung des Template`s	95 °C	3-5 min
2. zyklische Denaturierung	95 °C	30 sec
3. „annealing“ der Primer (abh. von Primer)	T_a °C	30 sec
4. Elongation (abh. von der Fragmentgröße)	74 °C	ca. 1 min/1kb
5. finale Elongation (Konstruktion von 3`-A-Enden)	74 °C	10 min
6. Kühlen	4 °C	∞

Die Schritte 2 - 4 wurden, je nach benötigter DNA-Menge, 30 - 35 x wiederholt. Im Allgemeinen wurde eine T_a verwendet, die etwa 2 - 3 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegt (s. Abs. 4.4). Die Elongationsdauer je Zyklus ergibt sich aus der Prozessivität der verwendeten DNA-Polymerase und der zu erwarteten Länge der Syntheseprodukte. Für die Standard-PCR wird von einer Extensionsrate von $1 \text{ Kb} \cdot \text{min}^{-1}$ ausgegangen. Für die Amplifikation der gesuchten DNA-Fragmente diente der in Tabelle 20 angegebene Reaktionsansatz.

Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Standard-PCR.

Standard-Reaktionsansatz (50 µl):	
<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (10x)	5 µl
15 - 25 mM MgCl ₂ oder KCl (falls nicht im Puffer enthalten)	5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
DNA-Matrize (max. 5 µg)	x µl
Primer forward (10 pmol)	1 µl
Primer reverse (10 pmol)	1 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 bzw. 5U/µl)	1-3 U
PCR- <i>Aqua dest.</i>	ad 50 µl

Im Rahmen dieser Arbeit diente die PCR u. a. der gezielten Amplifikation von DNA-Abschnitten aus der cDNA Bank von *S. domuncula*, um bereits vorhandene DNA-Fragmente, welche für eine Luziferase und ein Luziferin regenerierendes Enzym kodieren, zu vervollständigen.

5.1.1.2 Subklonierung mittels PCR

Aufgrund der Erkenntnisse über die lichtleitenden Eigenschaften der *Spiculae* einiger Hexactenilliden wurde die vorhandene *S. domuncula*-cDNA-Datenbank von Prof. Dr. Werner E. G. Müller und Dr. Matthias Wiens auf Sequenzen hin untersucht, die für eine mögliche Luziferase kodieren. Ein identifiziertes Fragment (EST Datenbank Nr. s3631) mit 795 Nt wies nach Sequenzanalyse Homologien zur Luziferase aus Insekten auf und es zeigte sich, dass sowohl das 5`-Ende, als auch das 3`-Ende unvollständig waren. Im Verlauf der Arbeit an der Luziferase-Sequenz erfolgte durch Dr. Matthias Wiens ein weiteres Screenen der cDNA-Bank von *S. domuncula* nach Sequenzen für ein mögliches Luziferin regenerierendes Enzym. Es konnte ein Fragment (EST Datenbank Nr. sd002_005d) mit 720 Nt identifiziert werden. Eine Analyse der Sequenz zeigte ebenfalls Homologien zum

entsprechenden Gen aus Insekten. Wie für die Luziferase stellte sich heraus, dass sowohl das 5`-Ende als auch das 3`-Ende unvollständig waren. Um die fehlenden Bereiche (5`- und 3`-Ende) der Sequenzen aus der cDNA-Bank zu amplifizieren, wurde diese mittels PCR (s. Abs. 5.1.1) nach vollständigen Klonen durchsucht. Dazu wurden, ausgehend vom vorhandenen cDNA-Fragment, genspezifische Primer (forward- und reverse) konstruiert, die jeweils zusammen mit entsprechenden Primern für die Vektoren pBK-CMV bzw. pTriplEx2 in einer PCR eingesetzt wurden (s. Tab. 6 & 7).

Tabelle 21: PCR-Bedingungen und Reaktionsansatz der Standard-PCR mit Temperaturgradient zur Subklonierung der Luziferase aus *Suberites domuncula*.

PCR-Bedingungen		Reaktionsansatz (50 µl):	
1. 95 °C	5 min	<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (10x)	5 µl
2. 95 °C	30 sec	15-25 mM MgCl ₂ oder KCl*	5 µl
3. 56 °C/58 °C	30 sec	dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
4. 74 °C	70 sec	DNA-Matrize (max. 5 µg)	1 µl
5. 74 °C	10 min	Primer forward (10 pmol)	1 µl
6. 4 °C	∞	Primer reverse (10 pmol)	1 µl
		<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
		PCR- <i>Aqua dest.</i>	35 µl

Die Schritte 2 - 4 wurden 35 x wiederholt, *falls nicht im Puffer enthalten.

Für die Amplifikation der gesuchten Sequenzabschnitte diente der in Tabelle 21 angegebene Reaktionsansatz. Ein Thermocycler, der die Einstellung eines Temperaturgradienten erlaubte, wurde für Ansätze mit unterschiedlichen Primerkombinationen für DNA-Fragmente von ähnlicher Länge genutzt.

Tabelle 22: PCR-Bedingungen und Reaktionsansatz der Standard-PCR mit Temperaturgradient zur Subklonierung des LRE aus *Suberites domuncula*.

PCR-Bedingungen		Reaktionsansatz (50 µl)	
1. 95 °C	5 min	<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (10x)	5 µl
2. 95 °C	30 sec	15-25 mM MgCl ₂ oder KCl*	5 µl
3. 56 °C/58 °C	35 sec	dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
4. 74 °C	40 sec	DNA-Matrize (max. 5 µg)	1 µl
5. 74 °C	10 min	Primer vorwärts (10 pmol)	1 µl
6. 4 °C	∞	Primer rückwärts (10 pmol)	1 µl
		<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
		PCR- <i>Aqua dest.</i>	35 µl

Die Schritte 2 - 4 wurden 35 x wiederholt, *falls nicht im Puffer enthalten.

5.1.1.3 Touchdown-PCR

Der komplette offene Leserahmen (ORF = open reading frame) von *SDLUC* wurde für die Klonierung in das *E. coli* Expressionssystem mit Gateway®-Technologie mittels PCR amplifiziert. Auf diese Weise wurde das benötigte Fragment mit den spezifischen Überlappungsabschnitten *attB1* und *attB2* für die weitere Verwendung mit dem Gateway®-System erzeugt. Das Konstruieren der benötigten Primer (s. Abs. 4.4) erfolgte mittels Vector NTI® 9. Zur Erhöhung der Produktspezifität wurde eine Touchdown-PCR durchgeführt (s. Tab. 21). Der Reaktionsansatz und die Amplifikationsbedingungen gestalteten sich dabei folgendermaßen:

Tabelle 23: PCR-Bedingungen und Reaktionsansatz der Touchdown-PCR für die Amplifikation des ORFs von *SDLUC*.

PCR-Bedingungen		Reaktionsansatz (50 µl)	
1. 95 °C	3 min	<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (10x)	5 µl
2. 95 °C	30 sec	25 mM MgCl ₂	5 µl
3. 66 °C	35 sec	dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
4. 72 °C	2 min 15 sec	DNA-Matrize (max. 5 µg)	2 µl
5. 72 °C	10 min	Primer forward (10 pmol)	1 µl
6. 4 °C	∞	Primer reverse (10 pmol)	1 µl
		<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
		PCR- <i>Aqua dest.</i>	34 µl

Die Schritte 2 - 4 wurden 35 x wiederholt, dabei wurde die Temperatur mit jedem Zyklus um 0,1 °C gesenkt.

Für die Amplifikation des ORFs von *SDLRE* wurde ebenfalls ein Touchdown-PCR-Protokoll (s. Tab. 22) durchgeführt.

Tabelle 24: PCR-Bedingungen und Reaktionsansatz der Touchdown-PCR für die Amplifikation des ORFs von *SDLUC*.

PCR-Bedingungen		Reaktionsansatz (50 µl)	
1. 94 °C	3 min	<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (10x) + KCl	5 µl
2. 94 °C	45 sec	50 mM MgCl ₂	5 µl
3. 64 °C	40 sec	dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
4. 72 °C	1 min 20 sec	DNA-Matrize (max. 5 µg)	2 µl
5. 94 °C	45 sec	Primer vorwärts (10 pmol)	1 µl
6. 60 °C	40 sec	Primer rückwärts (10 pmol)	1 µl
7. 72 °C	1 min 20 sec	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
8. 72 °C	10 min	PCR- <i>Aqua dest.</i>	34,8 µl
9. 4 °C	∞		

Die Schritte 2 - 4 wurden 30 x wiederholt, dabei wurde die Temperatur mit jedem Zyklus um 0,1 °C gesenkt. Anschließend wurden die Schritte 5 - 7 10 x, bei einer gleich bleibenden T_a von 60 °C wiederholt.

Die Oligonukleotidprimer für die PCR wurden so gewählt, dass sie Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen aufweisen (s. Abs. 4.11), mit deren Hilfe das amplifizierte DNA-Fragment geschnitten und in den Expressionsvektor pBAD/gIII A ligiert werden konnte (s. Abs. 5.1.4.2).

5.1.1.4 Kolonie-PCR

Zusätzlich wurde die PCR in dieser Arbeit eingesetzt, um rekombinante Klone aus Klonierungsexperimenten zu analysieren. Dazu wurden Bakterienkolonien (s. Abs. 5.1.4.5) in jeweils 12 µl LB-Flüssigmedium (mit Amp bzw. Carb, 50 µg/µl) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von mind. 30 min bei 37 °C wurde jeweils 1 µl der Zellsuspension direkt als Template für einen PCR-Ansatz (10 µl) verwendet. Die eingesetzten Primer sind Oligonukleotide aus dem verwendeten Vektor (pGEM[®]-T), welche das entsprechende Insert einschließen. Auf einem Agarose-Gel nachgewiesen, kann das Insert mit dem PCR-Produkt aus der Standard-PCR verglichen werden.

Tabelle 25: Reaktionsansatz (à 5 PCR-Ansätze) für die Kolonie-PCR

PCR-Bedingungen		Reaktionsansatz (50 µl)	
1. 95 °C	5 min	<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer (10x)	5 µl
2. 95 °C	30 sec	15-25 mM MgCl ₂ oder KCl*	5 µl
3. T _a °C	30 sec	dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
4. 74 °C	x sec	Primer vorwärts (10 pmol)	1 µl
5. 4 °C	∞	Primer rückwärts (10 pmol)	1 µl
		<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	1 µl
		PCR- <i>Aqua dest.</i>	36 µl

Die Schritte 2 - 4 wurden 35 x wiederholt.

5.1.1.5 Primerdesign

Primer werden sowohl zur Amplifikation von Nukleinsäuren, als auch zur speziellen Markierung, zur Sequenzierung oder für den Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten (s. Abs. 5.1.4.1) benötigt. Für die Herstellung dieser kurzen Oligonukleotide (18 - 30 bp), die mit der entsprechenden Zielsequenz (DNA/RNA) stabile, hochspezifische Dimere ausbilden, sind einige Kriterien zu beachten. Dazu gehört z. B. ein GC-Gehalt von 40 - 60 %, um eine ausreichende Stabilität für die Hybridisierung zu erreichen. Um eine Dimerisierung der Primer mit sich selbst und anderen Primern zu vermeiden, sollte eine 3'-terminale Komplementarität vermie-

den werden. Ebenfalls störend wirken Sekundärstrukturen, die zur Ausbildung von Dimeren, „hairpins“ oder „loops“ führen können (Rychilk & Rhodes, 1989; Saiki, 1989; Rychilk, 1993; Rychilk, 1995). Die Schmelztemperatur (T_m) der Primer, bei welcher 50 % der Primer mit der Zielsequenz dimerisieren, lässt sich anhand der folgenden Faustregel (Thein *et al.*, 1986) schätzen:

$$T_m = [4 \text{ °C} \times (\text{G} + \text{C}) + 2 \text{ °C} \times (\text{A} + \text{T})].$$

Die ermittelte T_m von Primern sollte zwischen 55 – 88 °C liegen, wobei diese bei eingesetzten Primerpaaren nicht mehr als 4 °C von einander abweichen sollte.

5.1.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung verschiedener DNA-Proben (PCR-Amplifikate, Fragmente aus dem Restriktionsverdau) im elektrischen Feld und ermöglicht qualitative Aussagen über die Größe von DNA-Fragmenten, sowie quantitative Aussagen über die Menge an aufgetragener DNA. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle erfolgt die Wanderung in der Gelmatrix von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der eingesetzten Fragmente ist reziprok proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes (Helling *et al.*, 1974; McDonell & Studier, 1877). Kurze bzw. kleine Moleküle bewegen sich dabei schneller durch das Gel als längere bzw. größere Moleküle. Die Geschwindigkeit der aufzutrennenden Fragmente wird von der Konzentration der Gelmatrix, der Temperatur, der Stärke des elektrischen Feldes, der Sekundärstruktur der Moleküle, sowie von dem verwendeten Puffer beeinflusst. Ein Längenstandard mit verschiedenen Fragmenten mit bekannter Größe, der separat mitläuft, dient bei Gelelektrophoresen der Größenbestimmung der einzelnen, amplifizierten Fragmente.

5.1.2.1 Herstellung von Agarose-Gelen

Zur Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (s. Abs. 5.1.2; Sambrook *et al.*, 1989). Die DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarose-Gelen nach ihrer Größe aufgetrennt. In der Regel wurden 1 %ige Gele verwendet. Die Agarose wurde in entsprechender Menge Puffer (1 x TBE) suspendiert, bis zur Bildung einer klaren Lösung in der Mikrowelle erhitzt und nach Abkühlen auf ca. 50 °C in die

horizontale Gelkammer luftblasenfrei gegossen. Nach dem Erstarren des Gels, der Herausnahme des Kammes und der Platzierung des Gels in einer Laufkammer mit 1 x TBE wurden ca. 10 µl der Proben mit 2 µl (6 x) Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Vom DNA-Längenstandard wurden 2 µl in eine separate Tasche aufgetragen. Mit einer Spannung zwischen 70 - 100 V (ca. 0 V/cm Gel) wurden die Proben im elektrischen Feld aufgetrennt.

5.1.2.2 Färbung von Agarose-Gelen

Da die in Agarose-Gelen aufgetrennten DNA-Fragmente nativ nicht sichtbar sind, können sie z. B. mit Ethidiumbromid angefärbt werden, da es zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert. Nach Ablauf der Gelelektrophorese wurde die DNA durch die Inkubation des Gels für 2 - 15 min in Ethidiumbromid-Lsg. (0,5 µg/ml) angefärbt. Anschließend wurde das Gel kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht als Banden sichtbar und das Gel konnte auf dem UV-Transilluminator analysiert werden. Zur Dokumentation wurde das Agarose-Gel auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt bzw. als Bilddatei gespeichert.

5.1.3 DNA-Präparation

5.1.3.1 Aufreinigung von PCR-Ansätzen

Um Kontaminationen bei den amplifizierten DNA-Fragmenten durch nicht verbrauchte dNTPs und Primer auszuschließen, ist bei der molekularbiologischen Arbeit eine Aufreinigung der entsprechenden DNA unerlässlich. Das Prinzip der Aufreinigungssysteme beruht auf einer Bindung der DNA an eine Glasfaser-Matrix, welche durch einen Elutionspuffer von der Matrix gelöst wird, nachdem unerwünschte Bestandteile der PCR-Ansätze nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten entfernt wurden. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit Hilfe eines der in Tabelle 17 aufgelisteten Kits nach den Angaben der Hersteller. Die Systeme nutzen die Eigenschaft von Nukleinsäuren, sich in Anwesenheit von chaotropen Salzen an die Oberfläche einer Silikatmembran zu binden. Ein Fehlen dieser Salze verhindert aufgrund der Hydrathülle der DNA eine Interaktion mit der Matrix-Oberfläche. Das Entfernen von kontaminierenden Substanzen, wie Salze, Proteine und anderen zellulären Bestandteilen erfolgt bei

diesen Systemen durch mehrmaliges Waschen. Mit einer Lösung niedriger Salzkonzentration kann die DNA anschließend von der Matrix eluiert und für weitere Untersuchungen verwendet werden.

5.1.3.2 Isolierung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen

Konnte mittels elektrophoretischer Auftrennung in Agarose-Gelen sichergestellt werden, dass ein spezifisches Amplifikat vorliegt, erfolgte die Aufreinigung direkt aus dem Reaktionsansatz (s. Abs. 5.1.3.1). Alternativ wurden entsprechende Banden nach kurzer Exposition unter UV-Licht ausgeschnitten und mit den vorhandenen Kits (s. Tab. 17) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

5.1.3.3 Plasmidaufreinigung

Mit Hilfe der in Tabelle 17 angegebenen Kits wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen nach Herstellerangaben isoliert. Dafür wurden zunächst 2 - 5 ml LB-Medium (50 - 100 µg/ml Amp bzw. Carb) mit 1,5 µl der entsprechenden Bakteriensuspension überimpft und über Nacht (ÜN) bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Ca. 2 - 4 ml dieser Übernachtskultur wurden zur Isolierung der Plasmid-DNA verwendet. Die Systeme basieren auf einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen, bei der die Plasmid-DNA vom Bakterium befreit wird. Anschließend entfernt die zugegebene RNase die gesamte RNA aus dem Lysat. Nach dem Entfernen von Zellbestandteilen durch Waschschriffe und Zentrifugation ist die enthaltende Plasmid-DNA an eine Glasfasermembran gebunden. Die gereinigte Plasmid-DNA kann durch einen speziellen Puffer eluiert und anschließend weiterverwendet werden.

5.1.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Größenbestimmung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte nach der Agarose-Gelelektrophese mit Hilfe des separat aufgetrennten Längenstandards und der anschließenden Dokumentation. Mittels photometrischer Extinktionsmessung (E_{260}) für doppelsträngige DNA erfolgte die Konzentrationsbestimmung entsprechender DNA-Lösungen. Eine optische Dichte von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml DNA. Für die Messung wurden 2 µl der DNA-Lösung mit 98 µl des destillierten Wassers gemischt und in einer sauberen

Glasküvette im Photometer (s. Abs. 4.13) untersucht. Die Verdünnung von 1:50 war anschließend bei der Interpretation zurück zu rechnen. Gleichzeitig wurde die Reinheit einer DNA-Lösung über den Quotienten E_{260}/E_{280} bestimmt. Man bezeichnet die DNA als rein, wenn der Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegt. Bei niedrigeren Werten liegen Verunreinigungen vor.

5.1.4 Klonieren von DNA-Fragmenten

Bei dieser Methode werden PCR-Produkte bzw. Plasmidfragmente zur Vervielfältigung oder Proteinexpression in einen Vektor (Klonierungs- oder Expressionsvektoren) ligiert, der anschließend in *E.coli*-Zellen transformiert wird. Ein Vektor zeichnet sich durch einen selektierbaren Marker (z. B. Ampicillin-Resistenz), einen starken Replikationsursprung (*ori*) und eine „*multiple cloning site*“ (*mcs*) aus, in die der entsprechende DNA-Abschnitt mit Hilfe der T4-DNA-Ligase eingebaut wird. Die „*mcs*“ ist ein Bereich mit einer hohen Dichte an Erkennungssequenzen (Palindrome) für Restriktionsenzyme. Der enzymatisch gespaltene Vektor (s. Abs. 5.1.4.1) kann durch das Einfügen (Ligation, s. Abs. 5.1.4.2) des identisch geschnittenen DNA-Fragments mit Hilfe der T4-DNA-Ligase wieder geschlossen werden. Das erzeugte Plasmid wird in Bakterien eingeschleust (Transformation, s. Abs. 5.1.4.4) und von diesen vermehrt bzw. das entsprechende Protein (bei Expressionsvektoren) exprimiert. Es kann in großen Mengen isoliert und das eingefügte Fragment bzw. das rekombinante Protein anschließend analysiert werden.

5.1.4.1 Vorbereitung von Insert und Vektor - Spaltung mit Restriktionsenzymen

Für die heterologe Expression des rekombinanten LRE_SUBDO wurde der zirkuläre Expressionsvektor pBAD/gIII A verwendet (s. Abs. 4.3). Hierzu wurde sowohl der Vektor als auch das zu klonierende Fragment (*SDLRE*) mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *EcoRI* geschnitten. Die verwendeten Enzyme richteten sich nach den Vektorspezifikationen des Herstellers und der Nukleotidsequenz des zu klonierenden DNA-Fragments. In diesem Fall schneiden die verwendeten, bakteriellen Restriktionsendonukleasen die spezifische Sequenz im DNA-Doppelstrang versetzt, so dass die entstehenden Enden kurze, überstehende Einzelstrangabschnitte besitzen (*sticky ends*). Der Vorgang beruht auf

der Hydrolyse der Phosphodiesterbindung zwischen zwei Nukleotiden. Tabelle 26 enthält die entsprechenden Ansätze für den Restriktionsverdau von Vektor und DNA-Fragment. Die Inkubationszeit betrug 16 h bei 37 °C. Im Anschluss an den Restriktionsverdau wurden die Enzyme durch Erhitzen auf 65 °C für 20 min inaktiviert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid wurden die entsprechenden Banden von Vektor und DNA-Fragment aus dem Gel isoliert und gemäß, der im Abschnitt 5.1.3.2 beschriebenen Isolierung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen, aufgereinigt.

Tabelle 26: Ansätze für den Restriktionsverdau des Vektors pBAD/gIII A und der SDLRE-DNA

Vektor pBAD/gIII A (50 µl)		SDLRE (50 µl)	
Vektor	3 µl	SDLRE	30 µl
<i>NcoI</i>	2 µl	<i>NcoI</i>	2 µl
<i>EcoRI</i>	2 µl	<i>EcoRI</i>	2 µl
Puffer SH*	5 µl	Puffer SH*	5 µl
PCR-Aqua dest.	38 µl	PCR-Aqua dest.	11 µl

*Puffer für Restriktionsverdau mit *NcoI* und *EcoRI* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) 10 x Puffer enthält 500 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 1000 mM NaCl, 10 mM DTT bei 37 °C.

5.1.4.2 Ligation

Die Klonierung von PCR-Produkten (s. Abs. 5.1.1.2; 5.1.1.4) erfolgte mit dem pGEM[®]-T Vektor System gemäß Herstellerangaben. Das System enthält den linearisierten Vektor, der an den 5'-Enden ungepaarte Thymidinreste besitzt (TA-Klonierung). PCR-Fragmente, die mit der *Taq* DNA-Polymerase generiert wurden, konnten direkt in diesen Vektor kloniert werden, da dieses Enzym bei der Amplifikation der DNA an das 3'-Ende einen nicht codierten Adeninrest anfügt. Obwohl die Verknüpfung durch solche kohäsiven Enden spezifisch ist, kann die Orientierung des Fragments im Vektor nicht vorhergesagt werden. Die Verknüpfung wird durch eine DNA-Ligase aus dem T4-Phagen katalysiert.

Tabelle 27: Reaktionsansatz für die TA-Klonierung

TA-Klonierung (10 µl)	
2x Ligasepuffer	5,0 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	3,0 µl
pGEM [®] -T Vektor (50 ng)	1,0 µl
T4-DNA-Ligase 3 Weiss U/µl)	1,0 µl

Das Verhältnis von PCR-Produkt zu Vektor beträgt 3:1.

Sie verknüpft, unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung, die freie OH-Gruppe am 3'-Ende einer DNA-Kette mit der Phosphatgruppe am 5'-Ende einer anderen DNA-Kette. Tabelle 27 enthält den für TA-Klonierungen verwendeten Ligationsansatz. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte überwiegend über Nacht bei 4°C, in einigen Fällen für 2 - 3 h bei RT. Im Anschluss daran können die Ligationsprodukte direkt in kompetente *E. coli*-Zellen (NovaBlue Singles™) transformiert und auf Selektionsagarplatten mit IPTG, X-Gal und Amp bzw. Carb ausplattiert werden (s. Abs. 5.1.4.4).

Für die gerichtete Klonierung des *SDLRE*-Fragments in den Expressionsvektor pBAD/gIIIa wurden sowohl der Vektor als auch das Fragment entsprechend vorbereitet (s. Abs. 5.1.4.1). Nach der Aufreinigung der entsprechenden Banden aus dem Agarose-Gel wurden zwei Ligationsansätze gemäß Tabelle 28 gemischt.

Tabelle 28: Reaktionsansätze für die gerichtete Klonierung

gerichtete Klonierung (30 µl)			
PCR-Aqua dest.	17,5 µl	PCR-Aqua dest.	13,5 µl
10x Ligasepuffer	3,0 µl	10x Ligasepuffer	3,0 µl
geschnittenes PCR-Produkt	4,0 µl	geschnittenes PCR-Produkt	4,0 µl
geschnittener Vektor	4,0 µl	geschnittener Vektor	8,0 µl
T4-DNA-Ligase	1,5 µl	T4-DNA-Ligase	1,5 µl

Für die gerichtete Klonierung wurden das PCR-Produkt und der Vektor zu Verhältnissen von 1:1 bzw. 1:2 eingesetzt.

Die Inkubation der Ansätze erfolgte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag können die Ansätze in kompetente *E. coli*-Zellen (One Shot® TOP10) transformiert werden. Zur Selektion positiver Klone werden die Zellen auf Agarplatten mit Carbenicillin ausplattiert.

Mit Hilfe der im Abschnitt 5.1.1.3 beschriebenen Touchdown-PCR wurde der ORF von *SDLUC* für die Klonierung in das *E. coli*-Expressionssystem mit Gateway®-Technologie amplifiziert. In einer ersten Klonierungsreaktion (BP-Reaktion) erfolgte die Ligation des aufgereinigten *attB*-PCR-Produktes (5 µl) in den Donor-vektor pDONR™221 mit Hilfe der BP-Clonase™ nach Angaben des Herstellers. Anschließend wurden die Entryvektoren in kompetente *E. coli*-Zellen (One Shot® TOP10) transformiert und auf Selektionsagarplatten mit Kanamycin ausplattiert (s. Abs. 5.1.4.4). Die aufgereinigte Plasmid-DNA (5 µl) eines der mittels Kolonie-PCR auf das spezifische Insert untersuchten *SDLUC*-Klone wurde

in einer zweiten Rekombinationsreaktion (LR-Reaktion) nach Angaben des Herstellers in den Expressionsvektor pDEST™17 überführt. Wie bei der BP-Reaktion wurden die erhaltenen Expressionsplasmide in kompetente *E. coli*-Zellen (One Shot® TOP10) transformiert und auf Selektionsagarplatten, jedoch mit Carbenicillin ausplattiert (s. Abs. 5.1.4.4). Über Nacht gewachsene Klone wurden auf das spezifische Insert mit PCR-Koloniescreening überprüft. Positive Klone wurden in je 5 ml LB-Flüssigmedium mit Carbenicillin überführt und nach Inkubation (ÜN) einer Plasmidpräparation unterzogen (s. Abs. 5.1.3.3). Diese wurden anschließend in die kompetenten Expressionszellen *E. coli* (One Shot® BL21-AI™) transformiert und auf Agarplatten ausgestrichen, welche zur Selektion ebenfalls Carbenicillin enthielten. Am folgenden Tag wurden gewachsene Klone in einem Expressionstest mit anschließender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese hinsichtlich der Größe, Expressionsstärke und Löslichkeit untersucht.

5.1.4.3 Vorbereitung selektiver Nährmedien

Für die Kultivierung transformierter Bakterien wurden selektive Agar-Nährböden angelegt. Hierzu wurde der LB-Agar nach Angaben des Herstellers in H₂O angesetzt, autoklaviert und unter 60 °C abgekühlt. Anschließend wurde dieser mit dem für den jeweiligen Vektor benötigten Antibiotikum (Cm, Amp bzw. Carb) in einer Konzentration von 50 µg/ml versetzt. Aufgrund der gezeigten Resistenz können die zu transformierenden, kompetenten Zellen gegen fremde Zellen selektiert werden. Während die Agar-Nährböden für den pGEM®-T Vektor für die Blau-Weiß-Selektion zusätzlich zum Antibiotikum Carbenicillin bzw. Ampicillin auch IPTG und X-Gal enthielten, wurde den Agarplatten für die weiteren Vektoren nur ein Antibiotikum zur Selektion transformierter Zellen zugesetzt. Mit Ausnahme von Kanamycin für den Donorvektor pDONR™221 des *E. coli* Expressionssystem mit Gateway®-Technologie handelte es sich vorwiegend um Carbenicillin, seltener Ampicillin. Das Wachstum von kompetenten Zellen, die kein entsprechend transformiertes Plasmid aufgenommen haben, wird verhindert. Zur weiteren Selektion von Kolonien mit entsprechendem Insert aus der TA-Klonierung in den pGEM®-T Vektor wurde der Agar zusätzlich mit X-Gal und IPTG versetzt. Das IPTG wird als Repressor-Inhibitor eingesetzt, der bewirkt, dass das Plasmid verstärkt abgelesen wird. X-Gal ist ein Substrat der β-Galactosidase, welche dieses zu einem blauen Farbstoff umsetzt. Vektoren, welche für diese Blau-Weiß-

Selektion verwendet werden, enthalten neben den Antibiotikaresistenzgenen auch das Gen der β -Galactosidase in der *mcs*. Die kompetenten *E. coli*-Zellen besitzen den Teil des Gens, der für den C-Terminus kodiert und werden vom komplementären Anteil (*lacZ*) im Vektor ergänzt, welcher für den N-terminalen Teil der β -Galactosidase kodiert. Die *mcs* liegt innerhalb des β -Galactosidase Gens. Wurde hier erfolgreich ein Insert eingebaut, so wird die Expression des Gens gestört. *E. coli* Kolonien, die ein Plasmid ohne Insert enthalten sind somit blau. Zellen mit Insert haben die *lacZ*-Funktion weitgehend verloren, ihre Kolonien erscheinen daher weiß mit einem kleinen graublauen Zentrum. Diese Bakterienkolonien kann man isolieren und vermehren. Bei leuchtend reinweißen Kolonien handelt es sich meist um resistente Zellen, die das Plasmid ausgestoßen haben. Der auf ca. 55°C abgekühlte Agar wurde unter einem sterilen Abzug in Petrischalen ausgegossen. Nachdem Auspolymerisieren wurden die Platten bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt (max. 14 Tage).

5.1.4.4 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Durch die Transformation rekombinanter Klonierungs- und Expressionsvektoren in kompetente Bakterienzellen (hier *E. coli*, s. Abs. 4.1.2) werden diese Organismen gentechnisch verändert (Hanahan, 1983; Cypionka, 1999). In diesem Fall sind die Bakterienzellen aufgrund chemischer Behandlung kompetent, d. h. sie sind in der Lage, rekombinante Plasmide aufzunehmen.

Zur Transformation eines Ligationsprodukts aus der Ligation in den pGEM[®]-T Vektor wurden 50 μ l kompetente *E. coli*-Zellen (NovaBlue Singles[™]) zunächst 5 min auf Eis stehend aufgetaut (50 μ l sind ausreichend für 2 - 3 Transformationsansätze). 2 μ l des Ligationsansatzes wurden anschließend zu 16, 25 bzw. 50 μ l kompetente Zellen gegeben und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Zur besseren Aufnahme der Vektor-DNA erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mittels Hitzeschock, dem die Bakterien für 30 sec im Wasserbad von 42 °C ausgesetzt sind. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 100, 120 bzw. 250 μ l SOC-Medium (RT) zugegeben und für 45 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Abschließend wurden zwischen 80 und 100 μ l des Transformationsansatzes auf Selektionsagarplatten (X-Gal, IPTG, Carb bzw. Amp) ausgestrichen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert.

Die *E. coli*-Zellen (One Shot[®] TOP10) wurden zur Transformation der Ligationsansätze für die Klonierungs- und Expressionsvektoren pDONR[™] 221, pDEST[™] 17 und pBAD/gIIIa verwendet. Sie wurden direkt von -80 °C auf Eis überführt und für 5 min aufgetaut. Anschließend wurden 2 µl des Ligationsansatzes mit ca. 16, 25 bzw. 50 µl kompetenten Zellen gemischt und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Ein Hitzeschock erfolgte im Wasserbad bei 42 °C für 30 sec mit weiteren 2 min Inkubationszeit auf Eis. Nach Zugabe von 120, 150 bzw. 250 µl SOC-Medium (RT) wurde der Transformationsansatz für 45 min im Wärmeschrank bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert und danach ca. 90 µl auf vorgewärmte Agarplatten zur Selektion (X-Gal, IPTG, Cm oder Carb bzw. Amp) ausgestrichen.

Nach positiven Expressionstests mit Klonen der rekombinanten Luziferase aus *S. domuncula* (pDEST[™] 17, *E. coli* One Shot[®] TOP10-Zellen) wurden diese mittels Transformation in weitere Expressionszellen (*E. coli* One Shot[®] BL21-AI[™]) überführt. Die Konzentration des gewünschten Konstrukts wurde photometrisch bestimmt (s. Abs. 5.1.3.4). 5 - 10 ng des gereinigten, rekombinanten Plasmids wurden mit 50 µl kompetente Zellen (auf Eis aufgetaut) vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock im Wasserbad (42 °C, 30 sec) wurde für weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 250 µl SOC-Medium (auf RT erwärmt) versetzt und in Horizontallage für 1 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Nach Ende der Wachstumsphase wurden die Zellen auf Eis gestellt, etwa 50 - 100 µl der jeweiligen Transformationsreaktion auf eine vorgewärmte LB-Platte (versetzt mit 50 µg/ml Carb) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die LB-Platten wurden nach ca. 12-stündiger Inkubation bei 37 °C im Brutschrank bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank (4 °C) gelagert.

5.1.4.5 Anzucht und Selektion transformierter *E. coli*-Zellen

Um Einzelkolonien von *E. coli*-Bakterien aus der TA-Klonierung in den pGEM[®]-T Vektor zu erhalten, wurden die transformierten Zellen, wie im Abschnitt 5.1.4.4 beschrieben, auf Selektionsagarplatten (X-Gal, IPTG, Carb bzw Amp) mit einem Drigalskispatel ausgestrichen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Bei genügendem Wachstum wurden am folgenden Tag weiße-graue Klone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, da sie im Gegensatz zu den blauen Kolonien ein Insert enthalten. Die aufgenommenen Klone wurden in je 12 µl LB-

Flüssigmedium mit 50 µg/ml Carbenicillin eingebracht und wie im Abschnitt 5.1.1.4 beschrieben analysiert. Zur Selektion Insert tragender Zellen der weiteren, in dieser Arbeit verwendeten Vektoren ohne *lacZ*-Gen wurden ausreichend Kolonien gepickt und ebenfalls in je 12 µl LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Carbenicillin aufgenommen und mittels Kolonie-PCR analysiert (s. Abs. 5.1.1.4).

5.1.4.6 Kultivierung von transformierten Bakterien in Flüssigmedien

Ist nach der Analyse mittels Kolonie-PCR das gewünschte Insert enthalten, wurde zur Vermehrung der Bakterien 2 - 5 ml LB-Flüssigmedium (50 µg/ml Carb) mit der entsprechenden Kultur (restliche 11 µl) inokuliert und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Aus diesen Zellen konnte mittels einer Plasmid-Minipräparation die Plasmid-DNA isoliert werden (s. Abs. 5.1.3.3). Für die Anzucht von größeren Volumina wurde die Vorkultur z. B. in 200 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Amp überführt und für weitere 16 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die benutzten Gefäße sollten etwa das Dreifache des eingesetzten Volumens aufnehmen können, um eine ausreichende Belüftung der Kulturen zu gewährleisten. Bakterienkulturen wurden in LB-Flüssigmedium angezogen. Die Zelldichte einer Kultur wurde photometrisch anhand der Absorption von Licht mit 600 nm Wellenlänge ermittelt (Schichtdicke 1 cm). Eine optische Dichte (OD_{600}) von 1 entspricht einer Zahl von 8×10^8 Zellen pro ml (Sambrook *et al.*, 1989).

5.1.4.7 Dauerkonservierung von Bakterien

Zur dauerhaften Aufbewahrung von rekombinanten Klonen wurden 425 µl einer entsprechenden frischen Bakterienkultur vorsichtig mit 75 µl eines vorgelegten sterilen, glycerolhaltigen Einfriermediums (s. Abs. 4.9) gemischt. Nach 1 min in Flüssigstickstoff wurden die Aliquots bei -80 °C aufbewahrt.

5.1.5 Sequenzierung von DNA (Sanger *et al.*, 1977)

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Sequenzierung von DNA beruht auf der wiederholten, von einer spezifischen Oligonukleotid-Bindestelle ausgehenden, linearen DNA-Neusynthese, die durch die Hitzestabilität der DNA-Polymerase (PCR) und dem Kettenabbruch durch den Einbau von 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) möglich ist. Im Unterschied zu den Desoxynukleotiden

(dNTPs) besitzen die ddNTPs (sog. Ketten-Terminatoren) keine 3`OH-Gruppe, so dass die DNA-Kette nach der Anlagerung eines Didesoxynukleotidtriphosphats nicht verlängert werden kann. In der Sequenzier-Reaktion (s. Abs. 5.1.5.2) liegt durch den zufälligen Einbau von dNTPs und ddNTPs, welche in einem definierten Verhältnis vorliegen, am Ende der PCR ein Gemisch aus Nukleotidfragmenten vor, die sich in ihrer Länge jeweils um genau eine Base unterscheiden. Nach der Auftrennung des Reaktionsgemisches in einer hochauflösenden Gelelektrophorese (s. Abs. 5.1.5.3) lässt sich durch die Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer die genaue Nukleinsäuresequenz ermitteln. Durch die Kopplung von Infrarotfarbstoffen IRD₇₀₀ oder IRD₈₀₀ an das 5`-Ende der Primer werden die PCR-Produkte während der elektrophoretischen Trennung im Sequenziergerät beim Passieren eines Lasers angeregt. Die Emission des Lichtes wird von der Software erkannt und gespeichert. Zur Unterscheidung der vier Basen der DNA werden je Fragment vier getrennte Reaktionsansätze mit jeweils nur einem der Didesoxynukleotiden erstellt. In einer festgelegten Reihenfolge wird das Reaktionsgemisch auf das Sequenzier-Gel aufgetragen. Die unterschiedliche Laufweite der Banden ergibt ein charakteristisches Leitermuster, das die genaue Nukleinsäuresequenz darstellt und unter Verwendung der LI-COR Software untersucht werden kann.

5.1.5.1 Polyacrylamid-Gele zur Sequenzierung von DNA

Zur Herstellung des hochauflösenden 6 %igen Polyacrylamid-Gels wurde des *Sequa Gel XR Kit* (s. Abs. 4.14) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Das 0,25 mm dicke und 41 cm lange Gel wurde zwischen zwei speziell angefertigten, zuvor gründlich mit *Aqua dest.* und Isopropanol gereinigten Glasplatten gegossen, die eine Laserdetektion bei IR_{800/700} erlauben. In einem Verhältnis von 4:1 wurden das *Sequa Gel XR* (enthält Harnstoff, Acrylamid und Acrylamid-Derivate) und das *Sequa Gel Complete* (Puffer aus 5x TBE und TEMED) miteinander gemischt und sterilfiltriert. Für ein Gel wurden 30 ml Polyacrylamid-Gel verwendet, zu dem vor dem Gießen 175 µl 10 %iges Ammoniumperoxodisulfat (APS) pipettiert wurden. Die Polymerisation zum fertigen Gel erfolgte innerhalb der nächsten 2 Stunden. Ein eingefügter Vorkamm diente als Platzhalter für die später benötigten Geltaschen.

5.1.5.2 Sequenzier-Reaktion

Für die Probenvorbereitung wurde das Thermo Sequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit with 7-Deaza-dGTP (RPN2438) der Firma GE Healthcare nach Gebrauchsanweisung verwendet. Zu jeder Sequenzier-Reaktion mit vier verschiedenen Ansätzen sind zusätzlich die DNA-Matrize und der fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Primer von MWG Biotech (Ebersberg) zuzugeben. Für die Sequenzier-Reaktion gestalteten sich der Reaktionsansatz und die Amplifikationsbedingungen folgendermaßen:

Tabelle 29: PCR-Bedingungen und Reaktionsansatz der Sequenzier-Reaktion

PCR-Bedingungen		Reaktionsansatz (18,75 µl):	
1. 95 °C	3 min	DNA-Matrize	1,5 µg
2. 95 °C	30 sec	IR-markierter Primer	2 pmol
3. 56 °C	20 sec	PCR- <i>Aqua dest.</i>	ad 18,75 µl
4. 70 °C	45 sec		
5. 95 °C	4 min		

Die Schritte 2 - 4 wurden 35 x wiederholt.

Zuvor wird in vier separaten PCR-Reaktionsgefäßen (200 µl) je 1,5 µl eines Terminationsmixes des Kits vorgelegt und anschließend mit 4,5 µl des Reaktionsansatzes gemischt. Die zyklische Sequenzier-Reaktion (*cycle sequencing*) erzeugt im Gegensatz zu einer Standard-PCR einzelsträngige, primermarkierte Produkte unterschiedlicher Länge. Im Anschluss an die terminale Denaturierung wird die Reaktion des auf 4 °C heruntergekühlten Ansatzes mit je 3 µl Ladepuffer gestoppt. Die Proben können anschließend in die Geltaschen des auspolymerisierten Sequenzier-Gels aufgetragen oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

5.1.5.3 Durchführung der Sequenzier-Gelelektrophorese

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit einem automatisierten DNA-Sequenzierer von LI-COR (LI-Cor Global Edition IR² Long readir 4200 bzw. 4300). Nach Abschluss der Polymerisation des Gels wurden die äußeren Glasplatten erneut mit *Aqua dest.* und Isopropanol gereinigt, der Vorkamm entnommen und die ausgebildete Tasche von Gelresten befreit. Anschließend konnten die Glasplatten mit dem Polyacrylamid-Gel senkrecht in den Sequenzierautomat eingespannt und die Pufferreservoirs mit 1 x TBE-Puffer (s. Abs. 4.10) gefüllt werden.

Das Äquilibrieren des Gels erfolgte im 30-minütigen Pre-Run (Vorlauf) bei 1500 V. Danach wurde der eigentliche Kamm (48 *well sharktooth comb*), der die einzelnen Sequenzieransätze voneinander trennt, eingesetzt und das Gel mit den DNA-Proben (je 1,3 µl) in der Reihenfolge GATC beladen. Um Kompressionen bei der Gelelektrophorese zu vermeiden, enthält der Terminationsmix zusätzlich 7-Deaza-dGTP.

5.1.5.4 Analyse der Sequenzrohdaten

Nach Abschluss der Sequenzier-Gelelektrophorese wurde die gespeicherte Bildinformation mit den Sequenzrohdaten automatisch von der LI-COR Software (s. Abs. 4.16) verarbeitet. Die auf diese Weise angegebene Basenabfolge (*basecalling*) kann dennoch Fehlinterpretationen, fälschliche Insertionen und Deletionen einzelner Basen enthalten. Sie wurde daher einer manuellen Überprüfung und Korrektur unterzogen. Nach der Bestimmung der Basenabfolge wurden die Sequenzdaten für weitere Analysen (s. Abs. 5.2.1) im FASTA-Format abgespeichert.

5.2 Proteinanalytische Methoden

5.2.1 Rechnergestützte Sequenz- und Datenbankanalyse

5.2.1.1 Sequenzanalysen

Die bioinformatische Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen erfolgte mit den im Abschnitt 4.16 aufgelisteten Computerprogrammen und Internet-Diensten. Zu den Arbeiten zählten die Ermittlung von passenden Primerbindungsstellen, die Editierung und Assemblierung von Sequenzen, die Identifizierung von ORFs aus Nukleinsäuresequenzen, die Übersetzung von Nukleinsäuresequenzen in Proteinsequenzen sowie der Vergleich von Sequenzen und Datenbanken. Im Anschluss an die Bestimmung der Basenabfolge wurden die Sequenzen erneuten korrigiert. Die Editierung umfasste sowohl die Sequenzen der Klonierungs- und Expressions-vektoren als auch die PolyA-Sequenzen. Zunächst wurden die DNA-Sequenz-daten mit der Computersoftware Lasergene-Seqman (DnaStar Inc., USA) bzw. der Vector NTI Suite[®] v9.0 Software (contig express, Invitrogen) zu sog. Klustern (*Contigs*) zusammengefasst (Selzer *et al.*, 2004). Ein Cluster enthält

Sequenzen, die aufgrund von überlappenden Sequenzbereichen zusammen gehören. Zudem wird von allen Teilsequenzen im *Contig* eine Consensus-Sequenz generiert. Die Assemblierung durch die genannten Programme gliedert sich in drei Schritte: der Bestimmung überlappender Regionen, der Bildung von *Contigs* und der Generierung der Konsensussequenz. Der Ablauf der hier beschriebenen Assemblierung von Sequenzen entspricht dem der Bildung eines *Multiplen Sequenz Alignments* (s. Abs. 5.2.1.3), zur dessen Erstellung das Programm ClustalX 1.83/2.0 verwendet wurde. Diese *Contigs* wurden anschließend mit Datenbanken verglichen (s. Abs. 5.2.1.2).

5.2.1.2 Annotierung und Homologiesuche in Datenbanken

Zur genaueren Identifizierung der DNA werden die erhaltenen Sequenzen mit weiteren Programmen, wie z. B. GeneDoc V2.0 und DNAsis V5.00 (s. Abs. 4.16) bearbeitet. Sie geben z. B. Aufschluss über offene Leseraster mit Start- und Stoppcodons sowie über die Zuordnung zu möglichen Funktionen. Weitere Merkmale, wie die kodierende Sequenz und Motive können über die Homologiesuche in Datenbanken ermittelt werden. Mit Hilfe der Vergleichsalgorithmen der Programmgruppe *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; Altschul et al., 1997)* an den Sequenzdatenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information; USA) konnten Sequenzvergleiche mit bereits bekannten Nukleotid- und Proteinsequenzen erfolgen. Zum Vergleich der Sequenzen wurden weitere Datenbanken, wie z. B. *Expasy* und *Swiss-Prot* verwendet. Die Homologiesuche erfolgte auf Proteinebene, nachdem eine DNA-Sequenz je nach Leseraster (reading frame) in die möglichen Proteinsequenzen translatiert worden war. Im Gegensatz zur Homologiesuche auf DNA-Ebene werden hier die Detektion weiter entfernter Homologie ermöglicht. Die Proteine mit den größten Übereinstimmungen wurden anschließend für weitere Analysen genutzt (s. Abs. 5.2.1.3 & 5.2.1.4).

Weitere Datenbanken und Adressen:

ClustalX	ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/dos/clustalx/clustalx1.83.zip http://mac.softpedia.com/get/Math-Scientific/ClustalX.shtml
GeneDoc 2.6	Nicholas & Nicholas, 1997 http://www.psc.edu/biomed/genedoc/
PSORT	http://psort.nibb.ac.jp/form2.html

5.2.1.3 Erstellung von Sequenzalignments

Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm ClustalX 2.0 (Thompson *et al.*, 1997; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) durchgeführt, wobei die Standardbedingungen für die Alinierungen der Sequenzen unverändert blieben. Die Darstellung und die manuelle Nachbearbeitung der computergenerierten Sequenzalinierung erfolgten mit dem Programm GeneDoc 2.6 (Nicholas & Nicholas, 1997; <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>). Dabei wurden unnötige Lücke oder verschobene Sequenzabschnitte beseitigt bzw. Lücken eingefügt, um Übereinstimmungen zu maximieren.

5.2.1.4 Phylogenetische Analyse

Für phylogenetische Analysen von As-Sequenzen wurden zunächst multiple Sequenzalignments nach dem *Neighbor joining*-Verfahren (Saitou & Nei, 1987) mit Hilfe von ClustalX 2.0 erstellt. Die graphische Darstellung der phylo-genetischen Stammbäume erfolgte mit dem Computerprogramm TreeView (PAGE 1996; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). Dabei können verschiedene Parameter, wie z. B. die Außengruppe des Stammbaumes festgelegt und der Stammbaum entsprechend umgewandelt werden.

5.2.2 Heterologe Expression der rekombinanten Luziferase in *E. coli*

Die Konstruktion der Expressionsplasmide der Luziferase aus *S. domuncula* erfolgte mittels GATEWAY[®]-Technologie von Invitrogen (s. Anleitung „GATEWAY[®] Cloning Technology“; www.invitrogen.com). Diese Methode ermöglicht eine schnelle, gerichtete Klonierung von Genen und Genfragmenten unabhängig von Restriktionsschnittstellen.

Das GATEWAY[®]-System nutzt das natürlich vorkommende und positions-spezifische Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda (λ). Es basiert auf zwei Reaktionen, der sog. BP-Clonase-Reaktion (Integration) und der sog. LR-Clonase-Reaktion (Excision). Dabei stellt die BP-Reaktion der GATEWAY[®]-Technologie die bei der Lysogenie des Lambda-Phagen ablaufende Reaktion dar, bei welcher Lambda als Prophage in das Genom von *E. coli* aufgenommen wird. Bei dieser Reaktion werden die *attP*-Stellen des Bakteriophagen Lambda mit den *attB*-Stellen im Genom von *E. coli* (hier das entsprechende *attB*-PCR-Produkt)

rekombiniert. Katalysiert wird die Lysogenie (Integration) sowohl von der Integrase des Lambda-Phagen als auch vom Integration Host Factor aus *E. coli*. Aus der Rekombination zwischen den *attB*- und *attP*-Stellen entstehen neue Klonierungsstellen, die *attL*- und *attR*-Stellen, welche die integrierte Lambda-DNA flankieren. Dabei enthält der erzeugte Eingangsklon das gewünschte Gen mit den benötigten *attL*-Stellen. Das Wiederherausschneiden (Excision) der Lambda-DNA wird vom Integration Host Factor, zusammen mit den beiden Lambda-Phagen-Proteinen Integrase und Exisionase katalysiert. In der *in vitro* GATEWAY[®] LR-Reaktion werden die im Eingangsvektor generierten *attL*-Stellen mit den *attR*-Stellen des Expressionsvektors rekombiniert. Daneben werden wieder die *attB*- und *attP*-Stellen generiert. Im GATEWAY[®]-System wurden die für diese Rekombinationsreaktionen notwendigen *att*-Bereiche (attachment) modifiziert und in verschiedene Vektoren integriert. Als negativer Selektionsmarker befindet sich in jedem „GATEWAY“-Vektor das *ccdB*-Gen, das von den Rekombinationsstellen eingerahmt ist. Das Gen kodiert für eine wachstumshemmende bakterielle DNA-Gyrase. Bei den Rekombinationen werden das *ccdB*-Gen und das einzubringende Gen ausgetauscht (Wesley *et al.*, 2001).

5.2.2.1 Konstruktion des Expressionsklons mittels GATEWAY[®] Klonierung

Die zu exprimierende Luziferase (LUC_SUBDO) wurde über die im Abschnitt 5.1.1.3 beschriebene Touchdown-PCR mit den für die BP-Reaktion des GATEWAY[®] Systems benötigten *attB*-Rekombinationsstellen versehen. Der Eingangsvektor enthält als Gegenstücke die *attP*-Stellen. Diese flankieren das *ccdB*-Gen. Als zusätzlicher Selektionsmarker fungiert die Kanamycinresistenz. Um die für das Erstellen des *Entry*-Klons erforderlichen *attB*-Stellen anzuhängen, wurden Primer designt (s. Abs. 5.1.1.5). Dies geschah mit Hilfe der Vector NTI[®] Software von Invitrogen, die, nach Eingabe des kompletten ORFs der Luziferase und der entsprechend gewählten Vektoren (Donorvektor pDONR[™] 221, Expressionsvektor pDEST[™] 17), folgende Primer (s. auch Abs. 4.4.2) generierte:

- **SDLUC_ *attB*1 SP forward:** 5`-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTAGACGATGACGATAAAATGCATCGGTTATCAAGATTCTGT-3` und
- **SDLUC_ *attB*2 ASP reverse:** 5`-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTACTACTTGCTCTGATCTCTGAG-3`.

In der BP-Reaktion wird das *attB*-PCR-Produkt der Luziferase mit dem Donorvektor und dem BP-Clonase-Enzym-Mix vermischt. Durch eine Rekombination entsteht der *attL*-haltige *Entry*-Klon ohne *ccdB*-Gen, jedoch mit dem eingefügten PCR-Produkt. Die entstandenen *Entry*-Klone können nach der Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen (One Shot® TOP10) durch die Kanamycinresistenz selektioniert werden. Das *ccdB*-Gen des Donorvektors, welches im Nebenprodukt enthalten ist, dient der Gegenselektionierung. Alle aufgenommenen Plasmide mit dem *ccdB*-Gen führen zum Absterben der Bakterientransformanten. Nur wenn das *ccdB*-Gen durch eine Rekombination aus dem Donorvektor entfernt wurde, können Bakterien mit der Kanamycinresistenz selektioniert werden. Damit bei der BP-Reaktion das *attB*-PCR-Produkt in der richtigen Orientierung in den pDONR™ 221 rekombiniert wird, gibt es sowohl zwischen den *attB1*- und *attB2*-Stellen wie auch zwischen den *attP1*- und *attP2*-Stellen kleine DNA-Sequenzunterschiede, die dazu führen, dass *attB1* immer mit *attP1* und *attB2* immer mit *attP2* rekombiniert. Mittels Kolonie-PCR wurden dennoch die über Nacht gewachsenen weißen Kolonien auf ihre erfolgreiche Rekombination überprüft (s. Abs. 5.1.1.4). Aus den positiven Klonen, die in 5 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Kanamycin inokuliert wurden, erfolgte nach einer Inkubation (ÜN, 250 rpm, 37 °C) die Präparation der Plasmide (s. Abs. 5.1.3.3).

Der positive *Entry*-Klon LUC_pDONR221_16 wurde für den Transfer der Luziferasesequenz in den Expressionsvektor pDEST™ 17 verwendet, welcher die für die sog. LR-Reaktion benötigten *attR*-Rekombinationsstellen aufweist. Die Herstellung der Expressionsplasmide aus dem LUC_pDONR221_16 und dem pDEST™ 17 entspricht wiederum der Phagengenom-Excisionsreaktion. Hierbei rekombinieren die zwei *attL*-Stellen des *Entry*-Klons mit den *attR*-Stellen des Expressionsvektors. Auch hier bleibt die gewollte Orientierung der Inserts durch geringfügige DNA-Sequenzunterschiede zwischen *attL1* und *attL2* sowie *attR1* und *attR2* erhalten. Die Enzyme im LR-Clonase-Mix katalysieren die homologe Rekombination zwischen den *attL*- und *attR*-Stellen. Die Transformation des Expressionsvektors erfolgte zunächst ebenfalls im *E. coli*-Stamm One Shot® TOP10 (s. Abs. 5.1.4.4). Zur Selektion enthielten die LB-Agarplatten jedoch 50 µg/ml Carbenicillin. Nach dem Durchführen einer weiteren Kolonie-PCR, wurden positive Klone in 5 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Carbenicillin überführt und über Nacht bei 250 rpm und 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran

wurde der positive Luziferase-Expressionsklon *SDLUC_pDEST17_3* in die kompetenten *E. coli* BL21-AI™ One Shot® transformiert (s. Abs. 5.1.4.4). Die gewachsenen, mit jeweils einer sterilen Spitze aufgenommenen Bakterien wurden ebenfalls in je 5 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Carbenicillin inokuliert. Nach der ÜN-Inkubation bei 37 °C und 250 rpm wurden die gewachsenen Bakterienkulturen für das Anfertigen von Dauerkulturen (s. Abs. 5.1.4.7), für die Präparation der Plasmide (s. Abs. 5.1.3.3) und für einen ersten Expressionstest (s. Abs. 5.2.2.2) verwendet.

5.2.2.2 Testexpression und Zellaufschluss

Testexpression

Für die erste Expression, die „pilot expression“, wurde eine neue 15 ml Kultur mit 200 µl der ÜN-Kultur *SDLUC_pDEST17_3E* in LB Carb (50 µg/ml) angeimpft. Die Inkubation der Kultur erfolgte bei 37 °C und 250 rpm bis zum Erreichen einer $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$. Von der Kultur wurde 1 ml abgenommen, die Bakterien abzentrifugiert und das Bakterienpellet bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert. Zur Induktion der Expression wurde L-Arabinose mit einer Endkonzentration von 0,2 % zur Bakterienkultur dazugegeben und über Nacht bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Im Verlauf der Testexpression wurden weitere Proben (nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und ÜN) entnommen, von denen ebenfalls das abzentrifugierte Bakterienpellet nach der Zentrifugation bei -20 °C gelagert wurde. Bei späteren Expressionen wurden für die Inkubation Parameter wie Temperatur und L-Arabinose-Konzentration variiert.

Zellaufschluss

Die aus der Testexpression gewonnenen Bakterienpellets wurden zuerst in 300 µl BugBuster® (s. Abs. 4.14, mit Proteaseinhibitor und Benzonase) resuspendiert und für 1 h bei RT leicht schüttelnd inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm wurde das Pellet (unlösliche Proteine) mittels SDS-PAGE (s. Abs. 5.2.8) und Western Blot (s. Abs. 5.2.9) analysiert.

5.2.2.3 Überexpression der rekombinanten Luziferase (rLUC_SUBDO)

Die Expression der rekombinanten Luziferase erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21-AI™ One Shot®, welcher ein durch L-Arabinose induzierbares Gen für die T7-

Polymerase besitzt. Die T7-Polymerase bindet an den transformierten Vektor pDEST™ 17 und beginnt beim Startcodon des Vektors mit der Transkription der rekombinanten Luziferase. Aufgrund des im *SDLUC_attB2* ASP reversen Primer enthaltenen Stoppcodons wird die Transkription terminiert. Die mit diesem Vektor exprimierten Proteine werden N-terminal mit einem 6x His-Tag fusioniert, welches eine einfache und effiziente Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie ermöglicht (s. Abs. 5.2.2.4).

Überexpression der rekombinanten Luziferase im kleinen Maßstab (200 ml)

Um spezifische Antikörper für die Immunlokalisation der Luziferase im Schwammgewebe herstellen zu können, wurde nach einer ersten Überexpression die gereinigte rekombinante Luziferase gewonnen. Hierfür wurde eine neue 200 ml Kultur mit 400 µl einer frischen ÜN-Kultur *SDLUC_pDEST17_3E* in LB Carb (50 µg/ml) angeimft. Die Inkubation der Expressionskultur erfolgte bei 37 °C und 250 rpm bis zum Erreichen einer $OD_{600\text{ nm}} = 0,6$. Vor der Induktion der Überexpression mit L-Arabinose (Endkonzentration 0,2 %) wurde eine Probe entnommen, die Bakterien abzentrifugiert und das Pellet bei -20 °C gelagert. Die Inkubation erfolgte für 6 h bei 37 °C und 250 rpm. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 10 min bei 4500 rpm und 10 °C pelletiert. Vor dem Zellaufschluss und der Aufreinigung der rekombinanten Luziferase wurde das Bakterienpellet mit 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert.

Überexpression der rekombinanten Luziferase im großen Maßstab (2000 ml)

Um größere Mengen der rekombinanten Luziferase zu erhalten, wurden die beschriebenen Bedingungen der kleinen Expression (200 ml) für die Expression im großen Maßstab (2000 ml) übernommen und die eingesetzten Mengen proportional vergrößert. Die neue 2000 ml Kultur (2 x 1000 ml) wurde mit je 10 ml der entsprechenden ÜN-Kultur *SDLUC_pDEST17_3E* in LB Carb (50 µg/ml) angeimft. Nach dem Erreichen einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,6 wurde die Überexpression durch die Zugabe von L-Arabinose (Endkonzentration 0,2 %) induziert. Die Expression erfolgte, zur besseren Belüftung der Kultur in zwei 2000 ml-Erlenmeyerkolben, über Nacht auf einem Schüttler bei 225 rpm und 20 °C. Für das Ernten der Zellen wurde die Kultur abzentrifugiert (4500 rpm, 10 °C, 25 min), das Pellet in 1 x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert.

5.2.2.4 Zellaufschluss und Reinigung unter denaturierenden Bedingungen

Für das Aufbrechen der Zellen wurde das gewaschene und getrocknete Pellet in BugBuster (Novagen) resuspendiert und für mindestens 1 h bei RT schüttelnd inkubiert. Auf 1 g Zellen wurden 5 ml der Lysisreagenz BugBuster® (mit Proteaseinhibitor & Benzonase) verwendet. Für die vollständige Isolation der Einschlusskörper (inclusion bodies) wurde das Lysat zusätzlich mit dem Ultraschallgerät (Branson Sonifier® B-12 Cell Disruptor) 3 x 15 sec auf Eis (mit je 15 sec Kühlpause) homogenisiert. Durch Zentrifugation (5 min, RT, 14000 x g) konnten die löslichen Proteine (Überstand) von den unlöslichen Proteinen getrennt werden. Zur Isolation der unlöslichen Proteine wurde das Pellet nach der Extraktion der löslichen Bestandteile in einem denaturierenden Extraktionspuffer (pH 8,0; s. Abs. 4.10) resuspendiert. Im Anschluss an die Lyse (Rühren des Pellets auf Eis, 1 h) wurden die unlöslichen Proteine durch 3 Pulse à 15 sec mit dem oben genannten Ultraschallgerät aufgeschlossen. Das Lysat wurde 20 - 30 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Rohextrakt) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinaufreinigung mit den Puffern entsprechend der Anleitung für die Aufreinigung von 6x His-Tag fusionierten Proteinen (Macherey-Nagel) durchgeführt. Das Prinzip der Affinitätschromatographie nutzt die hohe Affinität von Metall-Ionen (hier Ni²⁺), rekombinate Proteine mit 6x His-Tag zu binden. Die Bindung wird durch Imidazol gelöst.

Für die schnelle Aufreinigung der rekombinanten Luziferase in kleinem Maßstab (200 ml) wurde das Fertigsystem (Protino® Ni-IDA 1000 Kit, Macherey-Nagel) verwendet. Das System enthält Minisäulen für die Aufreinigung durch gravimetrischen Fluss. Als Matrix dient ein Silikat, an das bereits die Ni²⁺-chelatierende Imidodiessigsäure immobilisiert ist. Zu Beginn der Aufreinigung wurde die Säule mit dem denaturierenden Extraktionspuffer äquilibriert. Anschließend wurde der Rohextrakt, auch Cleared Lysate (CL) genannt, auf die äquilibrierte Säule gegeben, der Durchfluss (Flow Through, FT) gesammelt und die Säule mit 2 x 2 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 3 x 0,5 ml Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol. Anschließend wurden die Elutionsfraktionen anhand einer SDS-PAGE auf die Anwesenheit des Zielproteins analysiert. Die bei der Proteinreinigung verwendeten Puffer sind im Abschnitt 4.10 aufgelistet. Der pH-Wert wurde bei den Puffern mit NaOH eingestellt.

Die Ni-NTA-Agarose der Firma Qiagen wurde für die präparative Aufreinigung der rekombinanten, 6x His-*getaggt*en Luziferase aus der 2000 ml Überexpression verwendet. Es handelt sich um eine quervernetzte Agarose, an die NTA-Liganden (-N(CH₂-COOH)₃) kovalent gekoppelt sind. Die NTA-Liganden (Nitrilotriessigsäure) chelatieren Ni²⁺-Ionen über vier koordinative Bindungsstellen. Für die Aufreinigung der rekombinanten Luziferase wurde die Ni-NTA-Agarose nach Herstellerangaben zum Cleared Lysate gegeben, auf einem Drehrad fixiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde der Lysat-Ni-NTA-Agarose-Mix in die Polypropylene Chromatographie Säule (Disposable Polypropylene Columns, Pierce) gegeben und der Durchfluss gesammelt. Nach dem Waschen mit 3 x 2 Säulenvolumen Waschpuffer erfolgte die Elution (3 x) mit 2 x 1,0 ml Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol. Anhand einer SDS-PAGE wurden die Elutionsfraktionen auf die Anwesenheit des Zielproteins analysiert. Die bei der Proteinreinigung verwendeten Puffer sind im Abschnitt 4.10 aufgelistet. Der Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit NaOH.

5.2.3 Heterologe Expression des rekombinanten LREs in *E. coli*

Für die Expression des rekombinanten Luziferin regenerierenden Enzyms (LRE_SUBDO) wurde der Expressionsvektor pBAD/gIIIa (Invitrogen) eingesetzt. Das pBAD-Expressionssystem beruht auf dem araBAD-Operon, welches den Arabinose Metabolismus in *E. coli* kontrolliert. Zusammen mit dem araC-Protein ist der pBAD-Promotor für die Regulation des zu exprimierenden Proteins verantwortlich. Die Gen III Signalsequenz des Vektors ermöglicht die Sekretion des rekombinanten Proteins in den periplasmatischen Raum. Mit Hilfe des enthaltenen C-terminalen 6 x His-*Tags* lässt sich das Protein durch die bereits in Abschnitt 5.2.2.4 beschriebene Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus lysierten Zellen reinigen. Das zusätzlich vorhandene *myc*-Epitop kann für die Detektion des rekombinanten Proteins mit dem anti-*myc*-Antikörper (Invitrogen) genutzt werden.

5.2.3.1 Konstruktion des Expressionsklons

Zur Herstellung des Expressionskonstruktes für das LRE_SUBDO wurde das Amplifikat aus der Touchdown-PCR (s. Abs. 5.1.1.3) über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NcoI* und *EcoRI* (unterstrichen) in den zirkulären und zuvor

ebenfalls geschnittenen Vektor pBAD/gIII A eingefügt (s. Abs. 5.1.4.2). Die folgenden Primer wurden für die Amplifikation des SDLRE designt und verwendet:

- **SD_FLRE_NcoI:** 5`-GGCACCATGGTGGAGAAGTCAGGTCTTAATCC-3`
und
- **SD_RLRE_EcoRI:** 5`-CGGAATTCCACACTTGAACCTGTTGGCAGGC-3`.

Vor der Ligation in den Vektor wurden sowohl das Amplifikat als auch der Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen *NcoI* und *EcoRI* geschnitten (s. Abs. 5.1.4.1). Das erzeugte Plasmid SDLRE_pBAD/gIII A_1 wurde in *E. coli* (One Shot® TOP10) transformiert (s. Abs. 5.1.4.4). Auf LB-Agar gewachsene Klone wurden mit jeweils einer sterilen Spitze aufgenommen, mittels Kolonie-PCR auf die erfolgreiche Rekombination untersucht und in je 5 ml LB-Flüssigmedium mit 50 µg/ml Carbenicillin inokuliert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte über Nacht bei 37 °C und 250 rpm. Anschließend wurden die Plasmide präpariert (s. Abs. 5.1.3.3) und ein erster Expressionstest (s. Abs. 5.2.3.2) mit dem Klon SDLRE_pBAD/gIII A_1f durchgeführt.

5.2.3.2 Testexpression und Zellaufschluss

Testexpression

Mit den Klonen SDLRE_pBAD/gIII A_1f und SDLRE_pBAD/gIII A_2b wurden Testexpressionen in LB-Flüssigmedium im 20 ml Maßstab durchgeführt. Hierfür wurde je eine neue 20 ml Kultur mit 200 µl der entsprechenden ÜN-Kultur (s. Abs. 5.1.4.5) in LB Carb (50 µg/ml) angeimft. Bis zum Erreichen der optischen Dichte ($OD_{600\text{ nm}}$) von 0,6 wurden die Kulturen bei 37 °C schüttelnd bei 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden für die Stunde 0 je 1 ml abgenommen, die Bakterien abzentrifugiert und das Bakterienpellet bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert. Nach Zugabe von 200 µl 20 %-iger L-Arabinose (Endkonzentration 0,2 %) wurden sie bei RT über Nacht inkubiert. Im Verlauf der Testexpressionen wurden weitere Proben (nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und ÜN) entnommen, von denen ebenfalls das abzentrifugierte Bakterienpellet (1 min, max.) bei -20 °C gelagert wurde.

Zellaufschluss

Die aus den Testexpressionen gewonnenen und nach der Lagerung bei -20 °C gelagerten Bakterienpellets wurden zuerst in 300 µl BugBuster® (s. Abs. 4.15, mit

Proteaseinhibitor und Benzonase) resuspendiert und für 1 h bei RT leicht schüttelnd inkubiert. Nach je 3 Pulsen à 15 sec (je 15 sec Kühlpause) mit dem Ultraschallgerät (Branson Sonifier[®] B-12 Cell Disruptor) wurden die Lysate für 5 min bei 10 °C und 14000 x g zentrifugiert. Die Pellets (unlösliche Proteine) wurden mittels SDS-PAGE (s. Abs. 5.2.8) und Western Blot (s. Abs. 5.2.9) analysiert.

5.2.4 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus *Suberites domuncula*

Um Proteine aus *S. domuncula* zu isolieren, wurde sowohl Gewebe von gehälterten Schwämmen entnommen, als auch von Exemplaren, die nach Ankunft am Institut sofort bei -80 °C gelagert wurden. Für die Herstellung des Proteinrohextraktes wurde je 1 g Schwammgewebe in 4 ml des Extraktionspuffers (s. Abs. 4.10) aufgenommen. Um den Proteinabbau durch endogene Proteasen zu verhindern, wurden die Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. In einem vorgekühlten Mörser wurde das Gewebe im frisch angesetzten Extraktionspuffer zuerst mit einem sterilen Skalpell zerkleinert und anschließend mit dem gekühlten Pistill homogenisiert. Die Suspension wurde nach einer kurzen Ultraschallbehandlung (auf Eis) unter Rühren für 1 h bei 0 °C inkubiert und anschließend geteilt. Während von der einen Suspension nach einem Zentrifugationsschritt von 20 min bei 20000 x g und 4 °C der Überstand aliquotiert wurde, blieb die andere Hälfte unbehandelt. Für die Analyse des Proteinrohextraktes (s. Abs. 2.1.6 & 2.1.7) wurden sowohl frische Aliquots als auch bei -20 °C gelagerte Aliquots verwendet. Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde spektrophotometrisch nach Bradford bestimmt (s. Abs. 5.2.6).

5.2.5 Renaturierung und Konzentration der rekombinanten Luziferase

Die Elutionsfraktionen der rekombinanten Luziferase aus der Reinigung über die Nickelchelate-Affinitätschromatographie (s. Abs. 5.2.2.4) wurden durch eine schnelle Verdünnung im Rückfaltungspuffer (s. Abs. 4.10) bei niedrigen Temperaturen inkubiert. Eine schnelle Umpufferung hat sich besonders bei hydrophoben Proteinen oder höheren Proteinkonzentrationen als erfolgreich erwiesen (s. Roth; Gebrauchsanweisung für Roti[®]-Fold).

Der bevorzugte Konzentrationsbereich liegt bei $>0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Durchführung der Renaturierung durch Umpufferung erfolgte in Anlehnung an Herbst *et al.* (1997) und Zako *et al.* (2000). Hierfür wurde das Eluat im frisch angesetzten und 4°C kalten Renaturierungspuffer auf eine Endkonzentration von $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt. Anschließend wurde die Rückfaltungslösung bei 10°C im Kühlraum für mind. 48 h inkubiert. Vor der Biolumineszenzmessung wurde die Proteinlösung durch Zentrifugation auf Microcon-Filtern (s. Abs. 4.14) bei 4°C und 5.000 g eingeeengt und die Proteinkonzentration bestimmt (s. Abs. 5.2.6).

5.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Der Proteingehalt von Enzymlösungen und Rohextrakten wurde photometrisch nach der Methode von Bradford über eine Eichgerade mit definierten BSA-Verdünnungen als Protein-Standard ermittelt. Bei dieser Methode wird die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie[®] Brilliant Blau G250 (Roti[®]-Quant R250, s. Abs. 4.14), an Proteine zu binden, genutzt. Durch diese Bindung verändern sich beim Farbstoff, der in zwei Farben (rot und blau) existiert, sowohl die Ladung als auch die Absorptionseigenschaften. Vor allem die Bindung an basische As überführt den Farbstoff in den anionischen Zustand, so dass das Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm verschoben wird, dessen blaue Farbe im Photometer gemessen werden kann. Die Bindung des Proteins an den Farbstoff erfolgt innerhalb von 2 min , der Komplex bleibt etwa eine Stunde stabil in der Lösung erhalten. Ein großer Vorteil der Proteinquantifizierung nach Bradford besteht darin, dass wenige Interferenzen durch gebräuchliche Laborreagenzien auftreten. Lediglich Natriumdodecylsulfat (SDS) und Triton X-100 geben falsch positive Ergebnisse.

Zur Konzentrationsbestimmung wurden zunächst $5 - 10 \mu\text{l}$ unverdünnte Proteinlösung, sowie die Standardreihe und Kontrolle mit jeweils 1 ml zuvor $1:5$ in *Aqua bidest.* verdünnten Roti[®]-Quant vermischt. Die Extinktion der Proteinlösungen wurde nach einer 5 bis 10 -minütigen Inkubation bei RT in einem ELISA-Reader bei 595 nm gegen die Extinktion des verdünnten BSA-Standards vermessen. Alle Messungen erfolgten in zweifacher Ausführung, aus denen der Mittelwert berechnet wurde. Die Ermittlung der Proteinkonzentration in $\mu\text{g}/\text{ml}$ erfolgte durch den Vergleich der gemessenen Extinktion mit den Werten einer BSA-Eichgeraden.

5.2.7 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Der polyklonale Antikörper gegen die Luziferase von *Suberites domuncula* (PcAb-aLUCSUBDO) wurde durch mehrfache Immunisierung eines weiblichen Kaninchens mit dem rekombinanten Protein (rLUC_SUBDO) aus der Expression in *E. coli* gewonnen (Ausubel *et al.*, 1994). Er bildete die Grundlage für den immunologischen Nachweis der Luziferase, wie z. B. bei der Detektion von Proteinen nach der Übertragung auf Membranen (s. Abs. 5.3.1) oder beim immunhistologischen Nachweis in Gewebeschnitten von *S. domuncula* (s. Abs. 5.3.2). Die Immunisierung, die Serumzubereitung und die Titerbestimmung erfolgte durch die freundliche Unterstützung von Frau Dr. Bärbel Diehl-Seifert (Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Werner E. G. Müller)

5.2.8 Auftrennung von Proteinen in der SDS-PAGE nach Laemmli (1970)

Proteine können mit Hilfe der diskontinuierlichen vertikalen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) proportional zu ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt werden. Eine Hitzedenaturierung, die reduzierende Reagenz β -Mercaptoethanol und das stark anionische Detergenz SDS, welches an die denaturierten Proteine bindet, gewährleisten die Dissoziation der Proteine in ihre einzelnen Polypeptide und deren Linearisierung. Das negativ geladene SDS kompensiert durch seine Bindung die Nettoladung der Proteine. Da die Menge an gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht des entsprechenden Polypeptids ist (Shapiro *et al.*, 1967), wandern die SDS-Polypeptid-Komplexe bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Abhängigkeit von der Größe des Proteins unterschiedlich weit im Polyacrylamid-Gel, so dass eine Auftrennung der unterschiedlichen Polypeptide erfolgt. Um anschließend das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, ist die gleichzeitige Auftrennung eines Markers mit bekannten Molekulargewichten (s. Abs. 4.5) notwendig. Der Trennbereich der Gele ist von der Polyacrylamidkonzentration abhängig. Die aufgetrennten Proteine können nach der Gelelektrophorese entweder mit dem Farbstoff Coomassie[®] Brilliant Blau G-250 angefärbt (s. Abs. 5.2.8.3) oder auf eine Membran transferiert werden (s. Abs. 5.2.9), um anschließend bestimmte Proteine mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen.

5.2.8.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Lämmli (1970) in der Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell von Bio-Rad (München) oder in der XCell SureLock™ Mini-Cell von Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Neben den verwendeten NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gelen mit einer Gelmatrix aus einem 4 - 12 %igen Acrylamid/Bisacrylamid-Gradienten wurden weitere Polyacrylamid-Gele angefertigt. Zunächst wurde das 12 %-ige Trenngel, in dem die Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht stattfindet, nach angegebenem Schema pipettiert (s. Tab. 30). APS (Ammoniumperoxodisulfat) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) werden erst direkt vor dem Gießen zu den jeweiligen Lösungen hinzugegeben. Die Polymerisation der Gellösungen wird durch die Zugabe von APS gestartet und durch TEMED beschleunigt.

Tabelle 30: Pipettierschema für die eingesetzten SDS-Polyacrylamid-Gele

Bestandteile	Trenngel (12 %)	Sammelgel (6 %)
Rotiphorese Gel 30	4,0 ml	2,0 ml
1,0 M Tris HCl, pH 6,8	-	2,5 ml
1,5 M Tris HCl, pH 8,8	2,5 ml	-
10 %iges SDS (w/v)	0,05 ml	0,05 ml
<i>Aqua bidest.</i>	3,3 ml	5,3 ml
10 %iges APS (w/v)	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

Anschließend wurde das gegossene Trenngel sofort mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation (30 min) wurde das Isopropanol entfernt und das obere Sammelgel gegossen, welches der Konzentrierung und Ausrichtung aller SDS-Polypeptid-Komplexe dient.

5.2.8.2 Probenvorbereitung und Durchführung der SDS-PAGE

Der eingesetzte Kamm, der die benötigten Geltaschen ausbildet, konnte nach weiteren 30 min Polymerisation entfernt werden. In der Zwischenzeit wurden die Proben für das Beladen der Taschen vorbereitet. Nach dem Mischen der Proben mit 4 x Probenpuffer (s. Abs. 4.15) wurden sie bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Zum weiteren Zellaufschluss wurden die Homogenate mit Ultraschall (Standard-Mikrotip-Spitze der Pulsiereinrichtung (s. Abs. 4.13) behandelt. Die verwendeten Polyacrylamid-Gele wurden nach dem Säubern der Taschen mit gleichen Mengen

der denaturierten Proteine geladen und die Elektrophorese unter Verwendung eines Tris-Laufpuffers (Laemmli-Puffer für angefertigte Gele) bzw. eines MOPS SDS-Laufpuffers (NuPAGE Gele) bei 120V/90min durchgeführt.

5.2.8.3 Färbung der SDS-Gele mit Coomassie-Blau

Zur Detektion der in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteine können die Gele mit dem Farbstoff Coomassie[®] Brilliant Blau G-250 nach Anweisung des Herstellers gefärbt werden. Um SDS und Puffersalze zu entfernen, wurden die Gele 3 x 5 min mit 100 - 200 ml *Aqua dest.* gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit der Färbelösung inkubiert. Durch erneutes und mehrmaliges Waschen mit 100 - 200 ml *Aqua dest.* für 1 - 2 h wurde der Hintergrund solange entfärbt, bis die blauen Proteinbanden deutlich auf der farblosen Gelmatrix zu erkennen waren. Für das Färben der gegossenen Polyacrylamid-Gele wurde die Färbelösung „GelCode[®] Blue Stain Reagent“ (Pierce) verwendet. Zum Anfärben der in NuPAGE-Gelen aufgetrennten Proteine wurde die Färbelösung SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen) genutzt.

5.2.9 Western Blot - Elektrotransfer von Proteinen auf Träger-Membranen

Wie im Abschnitt 5.2.8 beschrieben, können die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine nicht nur mit dem Farbstoff Coomassie[®] Brilliant Blau G-250 angefärbt werden. Beim Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Trenngel auf eine Trägermembran übertragen. Unter geeigneten Bedingungen bleibt nach diesem Transfer sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine, z. B. deren enzymatische Aktivität erhalten.

Der Nachweis der auf Membranen transferierten Proteine durch die Bindung geeigneter Antikörper erfolgt bei der Immunodetektion (s. Abs. 5.3.1). Dafür werden die aufgetrennten Proteine durch ein elektrisches Feld auf eine Nitrozellulose-Membran (NC) bzw. eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF) transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Ermöglicht wird das aufgrund der, durch das SDS erhaltenen, negativen Ladung der Proteine, welche durch den pH-Wert des Transferpuffers erhalten bleibt. Die Bindung der Antikörper an die immobilisierten Proteine kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Bei der hier verwendeten indirekten Nachweismethode wurde ein spezifischer Primärantikörper durch einen

Sekundärantikörper nachgewiesen, der seinerseits in geeigneter Weise markiert war. Je nach verwendetem Polyacrylamid-Gel wurde entweder ein „Semi-Dry“ oder ein „Dry“ Blot durchgeführt.

5.2.9.1 *Semi-Dry* Blot

Die in gegossenen Polyacrylamid-Gelen, elektrophoretisch getrennten Proteine (s. Abs. 5.2.9.1) wurden auf PVDF bzw. Nitrocellulose-Membranen übertragen. Der Transfer erfolgte nach dem „Semi-Dry“ Blot-Verfahren bei RT in einem diskontinuierlichen Puffersystem (Westermeier, 1990). Dazu wurden die SDS-PAGE-Gele für 5 min in Transfer-Puffer (Towbin-Puffer; s. Abs. 4.10) für PVDF mit 20 % (v/v) Methanol inkubiert. Für das Aktivieren der PVDF-Membran wurde diese vor dem Äquilibrieren für ca. 10 sec in Methanol eingelegt. Nach dem Äquilibrieren der auf Gelgröße zurechtgeschnittenen Membran und benötigten Blotting-Papiere in Transfer-Puffer wurde der Blot zwischen den Plattenelektroden der SemiDry-Blottingkammer von BioRad (München) folgendermaßen aufgebaut: Zunächst wurden vier Lagen in Transfer-Puffer getränktes Filterpapier, die um einige Millimeter größer waren als das Polyacrylamid-Gel, luftblasenfrei auf die Graphit-anode platziert. Es folgte das Auflegen der Membran. Danach wurde das Polyacrylamid-Gel ebenfalls, wie zuvor das Papier und die Membran, luftblasenfrei aufgelegt und wiederum mit vier Lagen getränktes Blotting-Papier bedeckt. Da dieses Verfahren (Kyhse-Andersen, 1984) lediglich die in getränkten Filterpapieren vorhandene Flüssigkeitsmenge als Pufferreservoir nutzt, wurde überschüssiger Puffer an den Rändern entfernt. Die Apparatur wurde mit der oberen Elektrodenplatte verschlossen und die Proteine bei 1 mA/cm^2 für 60 min geblottet.

5.2.9.2 *Dry* Blot

Das iBlot™ Dry Blotting System (Invitrogen) ermöglichte ein schnelles (7 min) und trockenes Elektroblotten der in den NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini Gelen aufgetrennten Proteine. Für den zügigen Transfer der Proteine nutzt das sog. Puffer-freie System die in der Gelmatrix enthaltenen Puffer und eine in den iBlot™ Gel Transfer Lagen integrierte Nitrocellulose-Membran. Die Durchführung erfolgte im iBlot™ Gel Transfer Apparat mit integriertem Powersupply nach Angaben des Herstellers.

5.2.9.3 Anfärben der Träger-Membran mit Ponceau S

Um den Erfolg des Transfers zu kontrollieren, wurde zum einen das geblottete Polyacryamid-Gel mit dem Farbstoff Coomassie® Brilliant Blau G-250 (s. Abs. 5.2.8.3) angefärbt. Eine weitere Möglichkeit zur Kontrolle der Bahnbeladung und des Transfers bietet das unspezifische und reversible Anfärben der immobilisierten Proteine mit einer Ponceau S-Lösung. Die Membran wurde hierzu kurz mit *Aqua bidest.* gespült und 1 - 3 min unter leichter Bewegung in der Ponceau S-Färbelösung (mehrfach verwendbar) inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut mit *Aqua bidest.* gespült, bis die Proteinbanden auf der Membran sichtbar sind. Markerproteine können gegebenenfalls mit einem wasserfesten Stift gekennzeichnet werden. Vor dem nachfolgenden immunologischen Nachweis, welcher durch die Ponceau S-Färbung nicht beeinflusst wird, wurde die Membran durch Inkubation in 1 x TBS-T vollständig entfärbt.

5.2.10 Biolumineszenztests

Beim Phänomen der Biolumineszenz von Insekten wird, wie bereits beschrieben (s. Abs. 1.2.6), das Substrat Luziferin in einer ATP-abhängigen Reaktion und in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen und Luftsauerstoff zu Oxyluziferin oxidiert, wobei eine Lichtemission erfolgt. Diese erfolgt in der Biolumineszenzreaktion durch den Zerfall eines Zwischenproduktes (1,2-Dioxetans) in Oxyluziferin und CO_2 . Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit der Schwamm die Fähigkeit zur Biolumineszenz besitzt. Dabei wurden, wie in 5.2.10.1 beschrieben, Gewebestücke von *S. domuncula* an die Dunkelheit adaptiert und auf Biolumineszenz untersucht. Des Weiteren wurde das Luminometer (LUMAT 9501; Berthold, Bad Wildbad) zur Messung der Luziferaseaktivität von Proteinextrakten und der renaturierten Elutionsfraktionen der rekombinanten Luziferase von *S. domuncula* genutzt.

5.2.10.1 Emission von Biolumineszenzlicht durch Gewebe von *S. domuncula*

Für die Untersuchung von Schwämmen im Hinblick auf das Phänomen der Biolumineszenz wurden Exemplare von *S. domuncula* für drei Tage an die Dunkelheit adaptiert. Eine ausreichende Wasserströmung und optimale Belüftung wurde für diesen Zeitraum gewährleistet (LePennec *et al.*, 2003). Nach der

Dunkeladaption wurden zwei ca. gleich große Gewebestücke (Ø 2 cm) entnommen und in Petrischalen (Ø 5 cm, 0,4 cm hoch) gegeben. Für die Abgrenzung zwischen der Schwammstückes und dem Chemilumineszenz Detektionsfilm (Lumi-Film; Roche Mannheim) diente ein Ring aus Silikon. Nachdem der Lumi-Film (Ø 8 cm) auf die Silikonringe gebracht wurde, erfolgte eine Detektion in einem Zeitraum von 24 Stunden. Anschließend wurde der Film entwickelt und fixiert (Kodak GBX).

Ein Gewebestück, welches für zwei Tage in einem Medium mit 1 mM Rotenon (ein Furocumarin-Derivat aus der Tubawurzel (*Derris elliptica*) präinkubiert wurde, diente als Kontrolle. Rotenon inhibiert den Enzymkomplex NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, dem Komplex I der mitochondrialen Atmungskette (Igamberdiev *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003). Durch das Verhindern der Elektronenübertragung wird der Stoffwechsel der Zellen reduziert.

5.2.10.2 Messung der Bioaktivität der rekombinanten Luziferase

Nach der heterologen Expression der rekombinanten Luziferase, deren Reinigung über die Ni-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie und der anschließenden Renaturierung wurde die Lichtemission mit Hilfe des Luminometers „Lumat LB 9501“ (Berthold, Bad Wildbad) gemessen. Die emittierte Lichtmenge wird vom Luminometer mit einem Photomultiplier im Spektralbereich zwischen 390 - 620 nm gemessen. Die Messwerte werden als relative Lichteinheiten (RLU = relative light units) angegeben. Treffen die Photonen auf den Photomultiplier, werden diese in Elektronen umgewandelt und als Einzelimpulse verstärkt. Die Durchführung des Assays erfolgte in Anlehnung an Michel *et al.* (2001) und Oba *et al.* (2003) bei 22 °C. Pro Messung wurde die rekombinante Luziferase (0,5 µg oder 3 µg) in ein 5 ml Rundbodenröhrchen (s. Abs. 4.14) überführt, in die Probenaufnahmeverrichtung des Luminometers gestellt und die Messung gestartet. Dabei wurden 100 µl des Reaktionsansatzes (s. Abs. 4.10) in die Proteinlösung injiziert und die Lichtmenge der Reaktion durch Integration der Lichtimpulse für 60 s ermittelt. Parallel wurden Ansätze untersucht, in denen Parameter wie die Anwesenheit von ATP bzw. CoA variierten. Zudem wurde die Aktivität des rekombinanten Proteins in einem Kontrollversuch geprüft, im dem sie zuvor 5 min bei 95 °C inkubiert wurde. In einer weiteren Serie von Messungen der Lichtemission wurde der Proteinrohextrakt (s. Abs. 5.2.4) aus *S. domuncula*-Gewebe eingesetzt. Dazu

wurden je Messung 10 µg Proteinextrakt in ein 5 ml Rundbodenröhrchen (s. Abs. 4.14) überführt. Die Inkubation mit dem Reaktionsansatz und die Ermittlung der emittierten Lichtmenge erfolgten nach den Standardbedingungen des „Luziferase-Assays“, wie sie oben für die rekombinante Luziferase beschrieben wurde.

5.2.10.3 *In vitro* Biolumineszenz-Emissionsspektrum der rLUC_SUBDO

Parallel zur Messung der Luziferaseaktivität wurde das *in vitro* Biolumineszenzspektrum der rekombinanten Luziferase aus *S. domuncula* ermittelt. Dazu wurde die Biolumineszenz der Luziferase mit D-Luziferin, Mg^{2+} und ATP bei pH 8,0 mit dem Perkin-Elmer LS55 Fluoreszenz Spektrophotometer gemessen. Die Messung wurde über einen Wellenlängen-Bereich von 450 nm - 650 nm und für die Geräteparameter, wie z. B. Verschluss- und Verzögerungszeiten bzw. Scan-Rate korrigiert vorgenommen. Das Spektrum wurde direkt nach dem Mischen von 3 µg rekombinanten Protein und 100 µl des Reaktionsansatzes (s. 4.10) in einer Glasküvette bestimmt.

5.3 Immunlogische Methoden

5.3.1 Immunodetektion der immobilisierten Proteine

Vor dem immunologischen Nachweis der auf die Membran transferierten Proteine müssen unspezifische Bindungsstellen der Membran abgesättigt werden. Hierfür wird diese für mindestens 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer (s. Abs. 4.10) inkubiert. Anschließend bzw. am Folgetag erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Ak) in geeigneter Verdünnung in Blockierungspuffer, je nach Ak 1 - 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Überschüssiger, nicht gebundener Ak wurde in Waschsritten von 6 x 5 min mit 1 x TBS-T entfernt.

Nach diesem Waschen wurde die Membran mit dem sekundären, überwiegend an die alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten Ak in geeigneter Verdünnung in Blockierungspuffer für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss an weitere Waschsritte mit je 4 x 5 min in 1 x TBS-T und 2 x 5 min in 1 x TBS (s. Abs. 4.10) wurde die Membran kurz in AP-Puffer (s. Abs. 4.10) äquilibriert und

mit dem Substrat der alkalischen Phosphatase (200 µl NBT/100 µl BCIP in 30 ml AP-Puffer) entwickelt. Der entwickelte Blot wurde getrocknet und eingescannt (hp psc 1315s All-in-One, Hewlett Packard Instruments GmbH, Böblingen), da die Signale mit der Zeit verblassen.

Für die verwendeten sekundären Ak, welche an die Peroxidase („horseradish peroxidase“, HRP) konjugiert sind, erfolgte die Entwicklung des Blots mit dem Millipore Immobilon Western Chemilumineszenz HRP Substrat. Bei dieser Lumineszenz- oder auch ECL-Methode (Whitehead *et al.*, 1979; ECL: Enhanced Chemiluminescence) erfolgt die Reaktion durch die von der Peroxidase in Anwesenheit von Hydrogenperoxid katalysierte Oxidation von Luminol. Das beim Abklingen des angeregten Zustands vom Luminol emittierte Licht kann bei der Wellenlänge 428 nm detektiert werden. Dazu werden zunächst gleiche Teile der Lösung 1 (enthält H₂O₂) mit Lösung 2 (Luminol) gemischt und die Membran für 1 min damit überschichtet. Nach der Inkubation wird die Membran in Folie eingeschweißt und bis zur Entwicklung in eine Exponierkassette gelegt. Der in der Dunkelkammer auf die Membran aufgelegte Film wird für verschiedene Zeiträume exponiert, wodurch eine Schwärzung des Films erfolgt. Die Entwicklung wurde mit der Entwicklermaschine durchgeführt.

5.3.2 Immunhistologischer Nachweis von Proteinen im Schwammgewebe

In der Immunhistochemie wird, wie z. B. für die Detektion von immobilisierten Proteinen nach dem Western Blot (s. Abs. 5.2.9), eine Antigen-Antikörper-Reaktion verwendet, um das Auftreten und die Verteilung des Antigens (hier die Luziferase) in den verschiedenen Bereichen des biologischen Gewebes (hier *S. domuncula*) zu untersuchen. Hierfür werden ebenfalls zwei verschiedene Ak eingesetzt. Der erste Ak ist spezifisch für das nachzuweisende Protein, welcher wiederum vom zweiten Ak detektiert werden kann. Im Gegensatz zur Immundetektion (s. Abs. 5.3.1) nach dem Western Blot ist der zweite Ak hier mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der durch die Anregung mit Licht entsprechender Wellenlänge in der Immunfluoreszenzmikroskopie visualisiert werden kann.

5.3.2.1 Vorbereitung und Präparation der Gewebeschnitte

Um das Schwammgewebe für die Präparation der Schnitte vorzubereiten, wurden ca. 1 cm große Schwammstücke für 3 h mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) in

1 x PBS (in DMPC-H₂O) fixiert. Anschließend wurden die Gewebestücke 3 x 5 min in 1 x PBS gewaschen, um das PFA zu entfernen. Da die Lokalisation und Verteilung der Luziferase u. a. im Bereich der *Spiculae* untersucht werden soll, erfolgte in diesem Fall ein 15-minütiger Verdau mit einer Flusssäure-Lösung (10 M NH₄F, 20 % HF in DMPC-H₂O). Werden dünnere Gewebeschnitte bzw. keine *Spiculae* für die immunhistologische Untersuchung benötigt, werden die Nadeln im Allgemeinen durch eine 1-stündige Inkubation mit Flusssäure-Lösung vollständig entfernt. Das Einbetten des Schwammgewebes erfolgte laut Herstellerprotokoll in Kunststoff, unter Verwendung von Technovit 8100 (Hereaus Kulzer, Wehrheim), nachdem die Flusssäure durch ein erneutes Waschen mit 1 x PBS von 5 x 5 min entfernt wurde. Die 8 µm dicken Mikrotomschnitte wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Klaus Kropf angefertigt und bei -80 °C in Präparatekästen gelagert.

5.3.2.2 Immuncytochemische Färbung der Gewebeschnitte

Im Anschluss an ein langsames Auftauen bei RT im Präparatekasten wurden die Gewebeschnitte für 30 min in 4 % PFA fixiert. Zwischen zwei Waschschrinen mit 1 x PBS von je 1 x 5 min wurde das Schwammgewebe mit Ethanol (EtOH) entfärbt. Hierfür wurden die Schnitte für 2 min mit 50 % EtOH, 5 min mit 100 % EtOH und weitere 2 min mit 50 % EtOH überschichtet. Nach dem Waschen mit 1 x PBS erfolgte eine 30-minütige Behandlung mit 0,1 %igem Saponin und 0,3 %igem BSA in 1 x PBS, um die Poren zu öffnen und unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Schnitte wurden nachfolgend mit dem PoAb-aLUCSUBDO (s. Abs. 4.12) inkubiert, welcher in 1 x PBS (0,1 % Saponin/0,3 % BSA) 1:3000 verdünnt wurde. Mit Parafilm abgedeckt und in Feuchtkammern (QuadriPERM[®]; Heraeus, Hanau) aufbewahrt erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4 °C. Nach dem Waschen der Gewebeschnitte mit 1 x PBS für 3 x 20 min wurde der sekundäre Indodicarbocyanin [cy3] Rhodamin Ak Ziege-anti-Kaninchen (s. Abs. 4.12) 1:100 in 0,3 % BSA verdünnt und für 2 h bei 37 °C im Dunkeln appliziert. Dieser wurde ebenfalls durch zwei Waschschrine à 10 min mit 1 x PBS entfernt. Als Kontrolle wurde das Prä-Immuserum verwendet. Anschließend wurden die Schwammschnitte zusätzlich mit DAPI (5 µg/ml in 2 x SSC) behandelt, um die DNA der Zellkerne anzufärben. Die Inkubation erfolgte für 30 min im Dunkeln und bei RT. Nach erneutem Waschen (2 x 5 min in 1 x PBS) wurden die

Gewebeschnitte im Gel/Mount Antifading-Eindickmedium (DAKO Biomedica, Kalifornien) eingebettet und die Ränder der Deckgläser nach Aushärtung mit farblosem Nagellack versiegelt. Bis zur Betrachtung der gefärbten Gewebeschnitte konnten die erkalteten Einbettungen dunkel bei 4 °C gelagert werden.

5.3.2.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Beurteilung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte im Stereomikroskop AHBT3 von Olympus. Das Mikroskop ermöglichte sowohl die Betrachtung der Objekte im Fluoreszenzlicht als auch im Hellfeld. Um die Fluoreszenzemission des an den Farbstoff Cy3 gekoppelten Sekundärantikörpers zu detektieren (575 nm), wurden die präparierten Schnitte mit Licht definierter Wellenlänge (553 nm) angeregt. Die Auflicht-Fluoreszenzaufnahmen wurden mit der Filterkombination 450/490 nm (DAPI) durchgeführt. Sie ermöglicht, die emittierte Fluoreszenz aus der Anregung mit Licht von 344 nm aufzunehmen, welche im Rahmen der Doppelfärbung die DNA der Zellkerne darstellt. Für die Dokumentation und Bearbeitung der über eine angeschlossene CCD-Kamera digitalisierten Bilder wurde die Software Olympus analySIS (V 3.0) verwendet.

6. Abkürzungsverzeichnis

6.1 Abkürzungen

A	Abb. Abs. AcCoA ACS <i>A. b. binodulus</i> ; AGRBI Ak ALCSC AMP Amp Amp ^r . AP APS As <i>A. thaliana</i> ; ARATH ATP <i>Aqua dest./bidest.</i>	Abbildung Abschnitt Acetyl-CoA:Synthetase Acyl/ Acetyl-CoA:Synthetase <i>Agrypnus binodulus binodulus</i> Antikörper <i>Alcaligenes sp.</i> Adenosinmonophosphat Ampicillin Ampicillinresistenz alkalische Phosphatase Ammoniumperoxodisulfat Aminosäure <i>Arabidopsis thaliana</i> Adenosintriphosphat einfach/zweifach destilliertes Wasser (<i>Aqua destillata/ Aquabi destillata</i>)
B	BCIP bp bzw.	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat Basenpaare beziehungsweise
C	ca. Carb cDNA CoA Cm Cm ^R . 4CL 4CLL CULQU °C	circa Carbenicillin komplementäre Desoxyribonukleinsäure Coenzym A Kanamycin Kanamycinresistenz 4-Cumarat:CoA Ligase 4-Chlorobenzoat:CoA Ligase <i>Culex pipiens quinquefasciatus</i> Grad Celsius
D	ddNTP d. h. DMF DNA dNTP <i>D. melanogaster</i> ; DROME	Didesoxynukleosidtriphosphat das heißt Dimethylformamid Desoxyribonukleinsäure Desoxyribonukleosidtriphosphat <i>Drosophila melanogaster</i>

E	<i>E. coli</i> EDTA <i>et al.</i> EtBr	<i>Escherichia coli</i> Ethylendiamin-N',N',N',N'-tetraacetat lat.: und andere Ethidiumbromid
F	F FMN FMNH ₂	Forward Flavinadeninmononukleotid Reduziertes Flavinadeninmononukleotid
G	GTP g	Guanosintriphosphat Gramm bzw. relative Zentrifugal- beschleunigung
H	h His <i>H. unmunšana</i> ; HOTUN HRP HUMAN	Stunde(n) Histidin <i>Hotaria unmunšana</i> <i>horseradish peroxidase</i> , <i>Homo sapiens</i>
I	IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
K	kDa	Kilodalton
L	l <i>L. maculata</i> ; LAMMA lat. LB-Medium LUC <i>L. cruciata</i> ; LUCCR <i>L. lateralis</i> ; LUCLA	Liter <i>Lampyroidea maculata</i> lateinisch Luria Bertani-Medium Luziferase <i>Luciola cruciata</i> <i>Luciola lateralis</i>
M	M mg Mio. μg min mind. ml μl mM MW	Molar (mol/l) Milligramm Millionen Mikrogramm Minute(n) mindestens Milliliter Mikroliter millimolar (mmol/l) Molekulargewicht

N	NBT Nm ^f nm Ni-NTA <i>N. tabacum</i> ; TOBAC	Nitroblautetrazoliumchlorid Neomycinresistenz Nanometer Nickel-Nitrilotriessigsäure <i>Nicotiana tabacum</i>
O	OD ORF	Optische Dichte Offener Leserahmen
P	PCR PheA <i>P. pyralis</i> ; PHOPY <i>P. pennsylvanica</i> ; PHOPE <i>P. hirtus</i> ; PHRHI <i>P. viviani</i> ; PHRVI pmol <i>P. taeda</i> ; PINTA PoAB-aLUCSUBDO PVDF <i>P. plagiophthalmus</i> ; PYRPL	Polymerasekettenreaktion Phenylalanin-aktivierende Untereinheit der Gramicidin-S-Synthetase <i>Photinus pyralis</i> <i>Photuris pennsylvanica</i> <i>Phrixothrix hirtus</i> <i>Phrixothrix viviani</i> Picomol <i>Pinus taeda</i> polyklonaler anti-Luziferase Antikörper Polyvinylidendifluorid <i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>
R	R <i>R. ohbai</i> ; RHAOH rLUC_SUBDO RNA RNase rpm RT RP-HPLC	Reverse <i>Rhagophthalmus ohbai</i> rekombinante <i>S. domuncula</i> -Luziferase Ribonukleinsäure Ribonukleas Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>) Raumtemperatur Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>)
S	s. (S.) <i>S. cerevisiae</i> ; YEAST <i>S. domuncula</i> ; SUBDO SDS SDS-PAGE sec SOC-Medium SSC	Siehe (Seite) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Suberites domuncula</i> Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate) SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese Sekunde(n) Spiroorthocarbonat Medium <i>Saline-Sodium Citrate</i>

T	Tab. TBE TEMED T _a T _m Tris Tween [®] 20	Tabelle Tris-Borat-EDTA Puffer N, N, N', N'-Tetramethyldiamin Annealingtemperatur Schmelztemperatur Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	U u. a. ÜN U/μl UV	Unit(s) = Enzymeinheit; μmol Substratumsatz pro Minute unter anderem über Nacht Units pro Mikroliter Ultraviolett
V	V v. Chr. <i>V. planifolia</i> ; VANPL (v/v)	Volt vor Christus <i>Vanilla planifolia</i> Volumen je Volumen (<i>volume per volume</i>)
W	(w/v)	Gewicht je Volumen (<i>weight per volume</i>)
X	X-Gal	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
Z	z. B. Zeo ^r .	zum Beispiel Zeozinresistenz

6.2 Abkürzungscodes für Aminosäuren und Basen

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

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

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die marine Spezies <i>Clathrina coriacea</i> als Vertreter der <i>Calcarea</i>	2
Abbildung 2: Das Skelett des Tiefseeschwammes <i>Euplectella aspergillum</i>	3
Abbildung 3: Modelorganismus <i>Suberites domunula</i>	3
Abbildung 4: Morphologie der <i>Porifera</i>	5
Abbildung 5: Transmission des Sonnenlichtes in verschiedenen Wassertiefen.	7
Abbildung 6: Chemische Struktur des D-Luziferins aus Insekten.....	11
Abbildung 7: Chemische Struktur des Luziferins aus Dinoflagellaten.....	11
Abbildung 8: Chemische Struktur des bakteriellen Luziferins.....	12
Abbildung 9: Chemische Struktur des Coelenterazins.	13
Abbildung 10: Chemische Struktur des D-Luziferins aus <i>Latia neritoides</i>	13
Abbildung 11: Biolumineszenzspektrum der Insekten.....	21
Abbildung 12: Mechanismus der von der Leuchtkäfer-Luziferase katalysierten Biolumineszenzreaktion.....	22
Abbildung 13: 3D Model der <i>Photinus pyralis</i> (firefly)-Luziferase.....	25
Abbildung 14: <i>Euplectella aspergillum</i> als Vertreter der Glasschwämme mit lichtleitenden Eigenschaften.....	35
Abbildung 15: Amplifikation der Luziferase aus <i>Suberites domuncula</i>	38
Abbildung 16: Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz von LUC_SUBDO...	40
Abbildung 17: Vorhergesagte konservierte Domänen aus der Protein- Alignmentanalyse mit dem Blastp-Algorithmus.	42
Abbildung 18: Gemeinsame Struktur von Adenylat-bildenden Enzymen am Beispiel von der <i>Photinus pyralis</i> -Luziferase (CAA59281).	43
Abbildung 19: Vorhergesagte konservierte Domänen aus der Protein- Alignmentanalyse mit dem Blastp-Algorithmus innerhalb der Insekten.	44
Abbildung 20: Aminosäuresequenzalignment von LUC_SUBDO mit der Luziferase von <i>Photinus pyralis</i> aus der Datenbankanalyse mit Blastp- Algorithmus (NCBI).	47
Abbildung 21: Alignment von LUC_SUBDO mit Luziferasen und LUC-ähnlichen Proteinen.	49
Abbildung 22: Alignment von LUC_SUBDO und verwandten Mitgliedern der Acyladenylat-bildenden Enzyme.	52
Abbildung 23: Phylogenetische Analyse von LUC_SUBDO mit Luziferasen und verwandten Proteinen.	54
Abbildung 24: Vergleich der Aminosäuresequenzen von LUC_SUBDO mit Luziferasen.....	55
Abbildung 25: Heterologe Expression der für die Luziferase kodierenden cDNA <i>SDLUC</i>	57
Abbildung 26: Erzeugung von Biolumineszenzlicht durch Gewebe von <i>S. domuncula</i>	59
Abbildung 27: Ergebnisse aus den Lumineszenz-Messungen der rLUC_SUBDO.	61
Abbildung 28: <i>In vitro</i> Biolumineszenz-Emissionsspektrum der rekombinanten Luziferase aus <i>S. domuncula</i>	63

Abbildung 29: Mikroskopische Analyse der Lokalisation der Luziferase in Gewebe von <i>S. domuncula</i> mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	64
Abbildung 30: Agarose-Gel zur Überprüfung der Amplifikation des kompletten LREs aus <i>Suberites domuncula</i>	65
Abbildung 31: Nukleotidsequenz der LRE-cDNA und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des LREs aus <i>Suberites domuncula</i>	67
Abbildung 32: Vorhergesagte konservierte Domäne aus der Protein-Alignmentanalyse mit dem Blastp-Algorithmus.	68
Abbildung 33: Aminosäuresequenzalignment von LRE_SUBDO mit dem Luziferin regenerierenden Enzym von <i>Photinus pyralis</i>	69
Abbildung 34: Alignment der LRE-Sequenz von <i>S. domuncula</i> mit LRE-Sequenzen aus Insekten.....	70
Abbildung 35: As-Sequenzalignment des LRE_SUBDO mit verwandten Proteinen.....	73
Abbildung 36: Phylogenetische Analyse von LRE_SUBDO mit Luziferin regenerierenden Enzymen und verwandten Proteinen.	75
Abbildung 37: SDS-Polyacrylamid-Gel der LRE-Expressionskultur (A) und Western Blot-Analyse zur Verifizierung des rekombinanten Proteins (B)..	76
Abbildung 38: <i>Tethya aurantium</i>	79
Abbildung 39: Effizienz der Polyadenylierungssignale.	83
Abbildung 40: Vergleich der Kristallstruktur der Luziferase (LUC) aus <i>Photinus pyralis</i> (PDB:1LCI) und der vorhergesagten Molekularstruktur der LUC_SUBDO.	85
Abbildung 41: Reaktionsmechanismus der Acyladenylat-bildenden Enzyme am Beispiel der Aktivierung von D-Luziferin in der Biolumineszenzreaktion der Luziferase aus Insekten.	87
Abbildung 42: Alignment der Region zwischen den As ₂₄₅ und As ₂₉₃ (Nummerierung für LUC_SUBDO) in Luziferasen.	89
Abbildung 43: Sequenzvergleiche der potenziellen Luziferinbindestellen von LRE_SUBDO, den LRE aus Insekten und den RGN aus Vertebraten.	92

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Strukturelle Klassifizierung der Luziferase in der SCOP-Datenbank. ...	45
Tabelle 2: Homologie der LRE und Luziferase unter den Glühwürmchen <i>P. pyralis</i> (PHOPY), <i>L. cruciata</i> (LUCCR) und <i>L. lateralis</i> (LUCLA) sowie im Vergleich zu den Sequenzen aus <i>S. domuncula</i> (SUBDO).	71
Tabelle 3: Vergleich der LRE und RGN hinsichtlich der As-Zahl, des Molekulargewichts, des Isoelektrischen Punktes und der Anzahl an den As Aspartat und Glutamat.	74
Tabelle 4: Bakterienstämme.	96
Tabelle 5: Plasmide und ihre Eigenschaften.	97
Tabelle 6: Vektorspezifische Primer.	97
Tabelle 7: Spezifische Primer für die Klonierung, Sequenzierung und Expression der <i>SDLUC</i>	98
Tabelle 8: Spezifische Primer für die Klonierung und Expression des <i>SDLRE</i>	99
Tabelle 9: Längen- und Molekulargewichtsstandard.	99
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien.	100
Tabelle 11: Fluorochrome.	101
Tabelle 12: Verwendete Antibiotika und Substratanaloga.	101
Tabelle 13: Enzyme und Restriktionsenzyme.	104
Tabelle 14: Antikörper.	104
Tabelle 15: Verwendete Geräte.	105
Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien und weiteres Labormaterial.	106
Tabelle 17: Kits und gebrauchsfertige Reagenzien.	107
Tabelle 18: Computerprogramme und Internet-Dienste für die Datenauswertung.	108
Tabelle 19: Standard-Protokoll für die PCR.	111
Tabelle 20: Reaktionsansatz für die Standard-PCR.	112
Tabelle 21: PCR-Bedingungen und Reaktionsansatz der Standard-PCR mit Temperaturgradient zur Subklonierung der Luziferase aus <i>Suberites domuncula</i>	113
Tabelle 22: PCR-Bedingungen und Reaktionsansatz der Standard-PCR mit Temperaturgradient zur Subklonierung des LRE aus <i>Suberites domuncula</i>	113
Tabelle 23: PCR-Bedingungen und Reaktionsansatz der Touchdown-PCR für die Amplifikation des ORFs von <i>SDLUC</i>	114
Tabelle 24: PCR-Bedingungen und Reaktionsansatz der Touchdown-PCR für die Amplifikation des ORFs von <i>SDLUC</i>	114
Tabelle 25: Reaktionsansatz (à 5 PCR-Ansätze) für die Kolonie-PCR.	115
Tabelle 26: Ansätze für den Restriktionsverdau des Vektors pBAD/gIIIa und der <i>SDLRE</i> -DNA.	120
Tabelle 27: Reaktionsansatz für die TA-Klonierung	120
Tabelle 28: Reaktionsansätze für die gerichtete Klonierung	121
Tabelle 29: PCR-Bedingungen und Reaktionsansatz der Sequenzier-Reaktion	127
Tabelle 30: Pipettierschema für die eingesetzten SDS-Polyacrylamid-Gele	141

9. Literatur

- Aizenberg, J.; Sundar, V.; Yablon, A. D.; Weaver, J. C. und Chen, G. (2004).**
Biological glass fibers: correlation between optical and structural properties.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **101**, 3358 - 3363.
- Alberte, R. S. (1993).**
Bioluminescence: The fascination, phenomena, and fundamentals.
Naval Research Reviews, **45**, 2 - 12.
- Aristotle (1498).**
De Natura Animalium Libri Novem; De Partibus Animalium Libri Quatuor; De Generatione Animalium Libri Quinque
(ed. T. Gaza), 89p. Rome: Domini Octaviani Scoti.
- 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
- Babbitt, P. C.; Kenyon, G. L.; Martin, B. M.; Charest, H.; Sylvestre, M.; Scholten, J.D.; Chang, K.-H.; Liang, P.-H. und Dunaway-Mariano, D. (1992).**
Ancestry of the 4-chlorobenzoate halogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases.
Biochemistry. **31**:5594 - 5604.
- Baird, R. C. & Jumper, G. Y. (1995).**
Encounter models and Deep-Sea fishes: Numerical simulations and the mate location problem in *Sternoptyx diaphana* (Pisces, Sternoptychidae). *Deep Sea Research Part 1 Oceanographic Research Papers* **42**: 675 - 96.
- Basch, L. V. (1988).**
Bioluminescent anti-predator defense in a subtidal ophiuroid.
In *Echinoderm Biology* (ed. R. D. Burke, P. V. Mladenov, P. Lambert and R. L. Parsley), pp. 503 - 515. Rotterdam: Balkema.
- 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
- Beebe, W. M. (1937).**
Preliminary list of Bermuda deep-sea fishes.
Zoologica. N.Y. **22**:197 - 208.
- Bergquist, P.R. (1978):**
Sponges,
Hutchinson, London
- Biggley, W. H., Lloyd, J. E. und Seliger, H. H. (1967).**
The spectral distribution of firefly light.
J. Gen. Physiol. **50**, 1681 - 1692.
- Bitler, B. & McElroy, W. D. (1957).**
The preparation and properties of crystalline firefly luciferin.
Arch Biochem Biophys. Dec;**72**(2):358 - 68

- Blumbach, B.; Diehl-Seifert, B.; Seack, J.; Steffen, R.; Müller, I. M. und Müller, W. E. G. (1999).**
Cloning and expression of new receptors belonging to the Immunoglobulin superfamily from the marine sponge *Geodia cydonium*.
Immuno-Genetics. **49**:751 - 763.
- Bond, C. & Harris, A. K. (1988).**
Locomotion of sponges and its physical mechanism.
J. Exp. Zool. **246**, 271 - 284.
- Bond, C. (1992).**
Continuous cell movements rearrange anatomical structures in intact sponges.
J. Exp. Zool. **263**, 284 - 302.
- Boyle, R. (1672).**
Transactions of the Royal Society.
- Branchini, B. R.; Murtiashaw, M. H.; Magyar, R. A. und Anderson, S. M. (2000).**
The Role of Lysine 529, a Conserved Residue of the Acyl-Adenylate-Forming Enzyme Superfamily, in Firefly Luciferase.
Biochemistry, **39**, 5433 - 5440
- Branchini, B. R.; Magyar, R. A.; Murtiashaw, M. H. und Portier, N. C. (2001).**
The Role of Active Site Residue Arginine 218 in Firefly Luciferase Bioluminescence.
Biochemistry. **40**:2410 - 2418.
- Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; Murtiashaw, M. H.; Boije, H. und Fleet, S. E. (2003).**
A Mutagenesis Study of the Putative Luciferin Binding Site Residues of Firefly Luciferase.
Biochemistry. **43**:10429 - 10436.
- Branchini, B. R.; Southworth, T. L.; DeAngelis, J. P.; Roda, A. und Michelini, E. (2006).**
Luciferase from the Italian firefly *Luciola italica*: molecular cloning and expression.
Comp. Biochem. Physiol. Part B **145**, 159 - 167.
- Branchini, B. R. (2008).**
FIREFLY BIOLUMINESCENCE.
Department of Chemistry; Connecticut College New London, CT 06320
brbra@conncoll.edu; <http://www.photobiology.info/Branchini.htm>
- Brümmer, F.; Pfannkuchen, M.; Baltz, A.; Hauser, T. und Thiel, V. (2008).**
Light inside sponges.
J. Exp. Marine Biol. Ecol. **367**(2):61 – 64.
- Buck, J. B. (1948).**
The anatomy and physiology of the light organs in fireflies.
Ann. N.Y. Acad. Sci. **49**: 397 - 483
- Carter, T. J. N. & Kricka, L. J. (1982).**
Luminescence: historic aspects.
In *Clinical and Biochemical Luminescence*. L. J. Kricka, and T. J. N. Carter, editors.
Marcel Dekker Inc, New York. 2 - 5.
- Cattaneo-Vietti, R.; Bavestrello, G., Cerrano, C., Sara, M.; Benatti, U.; Giovine, M. und Gaino, E. (1996).**
Optical fibres in an Antarctic sponge.
Nature **383**, 397 - 398.
- 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

- Chang, K.-H.; Xiang, H. und Dunaway-Mariano, D. (1997).**
Acyl-adenylate motif of the acyl-adenylate /thioester-forming enzyme superfamily: a site-directed mutagenesis study with the *Pseudomonas* sp. strain CBS3 4-chlorobenzoate:coenzyme A ligase.
Biochemistry. **36**:15650 - 15659.
- Cheng, J. & Baldi, P. (2006).**
A Machine Learning Information Retrieval Approach to Protein Fold Recognition.
Bioinformatics, vol. **22**, no. 12, pp. 1456 - 1463
- Chono, K.; Fujito, Y. und Ito, E. (2002).**
Non-ocular dermal photoreception in the pond snail *Lymnaea stagnalis*.
Brain Res. **951**, 107 - 112.
- Cody, M. A., (1999).**
What is Bioluminescence Used For?
<http://www.bio.davidson.edu/Courses/anphys/1999/Cody/usedfor.htm>
- Coligan, J. E.; Dunn, B. M.; Ploegh, H. L.; Speicher, D. W. und Wingfield, P. T. (2000).**
Current Protocols in *Protein Science*. pp. 2.0.1 - 2.8.17.
John Wiley & Sons, Chichester, USA.
- Conti, E.; Franks, N. P. und Brick, P. (1996).**
Crystal structure of firefly Luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes.
Structure. **4**:287 - 298.
- Conti, E.; Stachelhaus, T.; Marahiel, M. A. und Brick, P. (1997).**
Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S.
EMBO J. **16**:4174 - 4183.
- Cormier, M. J. (1978).**
Comparative biochemistry of animal systems.
In: *bioluminescence in Action*, pp. 75 - 108, Herring P. J. (ed.), *Academic Press*, New York
- Cukovic, D.; Ehlting, J.; VanZiffle, J. und Douglas, C. J. (2001).**
Structure and evolution of 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) gene families.
Biol. Chem. **382**:645 - 654.
- Cypionka, H. (1999).**
Grundlagen der Mikrobiologie,
Springer Verlag Berlin und Heidelberg
- Day, J. C. & Bailey, M. J. (2003).**
Structure and evolution of the luciferin-regenerating enzyme (LRE) gene from the firefly *Photinus pyralis*.
Insect Molecular Biology **12**(4), 365 - 372
- De Bremaeker, N.; Mallefet, J. und Baguet, F. (1996).**
Luminescence control in the brittlestar *Amphipholis squamata*: effect of cholinergic drugs.
Comp. Biochem Physiol **115C**, 75 - 82.
- De Bremaeker, N.; Dewael, Y.; Baguet, F. und Mallefet, J. (2000).**
Involvement of cyclic nucleotides and IP(3) in the regulation of luminescence in the brittlestar *Amphipholis squamata* (Echinodermata).
Luminescence. May-Jun; **15**(3):159 - 63.
- DeWet, J. R.; Wood, K. V.; Helinsky, D. R. und DeLuca, M. (1985).**
Cloning of firefly Luciferase cDNA and expression of active Luciferase in *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 7870 - 7873

- Deheyn, D. ; Alva, V. und Jangoux, M. (1996).** Fine structure of the photogenous areas in the bioluminescent ophiuroid *Amphipholis squamata* (Echinodermata, Ophiuridea). *Zoomorphology* **116**:195 - 204; Springer-Verlag
- Dieckmann, R.; Pavela-Vrancic, M.; Pfeifer, E.; von Döhren, H. und Kleinkauf, H. (1997).** The adenylation domain of tyrocidine synthetase 1. *Eur. J. Biochem.* **247**, 1074 - 1082
- Douglas, R. H.; Mullineaux, C. W. und Partridge, J. C. (2000).** Long-wave sensitivity in deep-sea stomiid dragonfish with far-red bioluminescence: evidence for a dietary origin of the chlorophyll-derived retinal photosensitizer of *Malocosteus niger*. *Phil. Trans. R. Soc.Lond. B.* **355**:1269 - 1272.
- Douglas, R. H. & Partridge, J. C. (1997).** On the visual pigments of deep-sea fish. *J. of Fish Biol.* **50**:68 - 85.
- Dubuisson, M. Marchand, C. & Rees, J.-F. (2004).** Firefly luciferin as antioxidant and light emitter: the evolution of insect bioluminescence. *Luminescence.* **19**(6), 339 - 344
- Dunstan, S. L.; Sala-Newby, G. B.; Fajardo, A. B.; Taylor, K. M. und Campbell, A. K. (2000).** Cloning and expression of the bioluminescent photoprotein pholasin from the bivalve mollusc *Pholas dactylus*. *J Biol Chem.* Mar 31;**275**(13):9403 - 9.
- Ehltling, J.; Shin, J. J. K. und Douglas, C. J. (2001).** Identification of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *The Plant J.* **27**:455 - 465.
- Emson, R. H. (1966).** The reactions of the sponge *Cliona celata* to applied stimuli. *Comp. Biochem. Physiol.* **18**, 805 - 827.
- Fagan, T. F.; Ohmiya, Y.; Blinks, J. R.; Inouye, S. und Tsuji, F. I. (1993).** Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca²⁺-binding photoprotein, mitrocomin. *FEBS* **3**:301 - 305.
- Felsenstein, J. (1993).** PHYLIP, ver. 3.5. University of Washington, Seattle.
- Fishelson, L. (1981).** Observations on the moving colonies of the genus *Tethya* (Demospongia, Porifera): 1. Behavior and cytology. *Zoomorphol.* **98**, 89 - 100.
- Fogel, M. & Hastings, J. W. (1971).** A substrate-binding protein in the Gonyaulax bioluminescence reaction. *Arch Biochem Biophys.* Jan;**142**(1):310-21
- Fogel, M. & Hastings, J. W. (1972).** Bioluminescence: mechanism and mode of control of scintillon activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar; **69**(3):690 - 3.
- Fraga, H.; Esteves da Silva, J. C. und Fontes, R. (2004).** Identification of Luziferyl adenylate and Luziferyl coenzyme a synthesized by firefly Luciferase. *Chembiochem.* **5**:110 - 115.

- Fraga, H.; Fernandes, D.; Fontes, R. und Esteves da Silva, J. C. G. (2005).**
Coenzyme A affects firefly luciferase luminescence because it acts as a substrate and not as an allosteric effector.
FEBS J. **272**, 5206 -5216.
- Franks, N. P.; Jenkins, A.; Conti, E.; Lieb, W. R. und Brick, P. (1998).**
Structural basis for the inhibition of firefly Luciferase by a general anesthetic.
Biophys. J. **75**:2205 - 221.
- Fulda, M.; Heinz, E. und Wolter, F. P. (1994).**
The *fadD* gene of *Escherichia coli* K-12 is located close to *rnd* at 39.6 min of the chromosomal map and is a new member of the AMP-binding protein family.
Mol. Gen. Genet. **242**:241 - 249.
- Fujita, T; Mandel, J. L.; Shirasawa, T.; Hino, O.; Shirai, T. und Maruyama, N. (1995).**
Isolation of cDNA clone encoding human homologue of senescence marker protein-30 (SMP30) and its location on the X chromosome.
Biochim Biophys Acta. Sep 19;**1263**(3):249 - 52.
- Gage, J. D. & Tyler, P. A. (1991).**
Deep-sea Biology.
CUP, 504pp.
- Gaino, E. & Sara, M. (1994).**
Siliceous spicules of *Tethya seychellensis* (Porifera) support the growth of a green alga: a possible light conducting system.
Mar. Ecol. Prog. Ser. **108**, 147 - 151.
- Gaino, E.; Balzacconi, R. und Corriero, G. (2007).**
Post-larval development of the commercial sponge *Spongia officinalis* L. (Porifera, Demospongiae).
Tissue Cell. Oct;**39**(5):325 - 34.
- Gamulin, V.; Müller, I.M. und Müller, W.E.G. (2000).**
Sponge proteins are more similar to those of *Homo sapiens* than to *Caenorhabditis elegans*.
Biol. J. Linnean Soc., **71**: 821-828.
- Gates, B. J. & DeLuca, M. (1975).**
The production of oxyluciferin during the firefly luciferase light reaction.
Arch Biochem Biophys. Aug; **169**(2):616 - 21.
- Gilmartin, G. (2005).**
Eukaryotic mRNA 3' processing: a common means to different ends.
Genes Dev. **19**:2517 - 1521
- Göthel, H. (1997).**
Farbatlas Mittelmeerfauna: Niedere Tiere und Fische.
1. Aufl. 319 Seiten. Ulmer, Stuttgart.
- Gomi, K. & Kajiyama, N. (2001).**
Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin.
J. Biol. Chem. **276**, 36508 - 36513.
- Gomi, K.; Hirokawa, K. und Kajiyama, N. (2002).**
Molecular cloning and expression of the cDNAs encoding luciferin regenerating enzyme from *Luciola cruciata* and *Luciola lateralis*.
Gene **294**,157 - 166.

- 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
- Grober, M. S. (1988).**
Brittle-star bioluminescence functions as an aposematic signal to deter crustacean predators.
Animal bahavior, Elsevier, **36**:22, 493 - 501.
- Gruner, H.E.; Grell, K.G. und Kilian, E.F. (1993).**
Wirbellose Tiere 1. Teil: Einführung Protozoa, Placozoa, Porifera,
Gustav Fischer Verlag, Jena & Stuttgart & New York, 251 - 273
- Greer, L. F. 3. & Szalay, A. A. (2002).**
Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review.
Luminescence. Jan-Feb;17(1):43 - 74. Review.
- Haddock, S. H. D. (2004).**
The Diversity of Light-Producing Marine Organisms.
http://www.photobiology.info/prev_mod33.htm.
- Haddock, S. H. D. (2006).**
Luminous marine organisms in *Photoproteins in Bioanalysis*,
S.Daunert & S. Deo, eds. *Wiley-VCH*. New York, p. 25 - 47.
- Hanahan, D. (1983).**
Studies of the transformation of *Escherichia coli* with Plasmids.
J. Mol. Biol. **4**:557 - 580.
- Harrison, F.W. & Cowden, R.R. (1976).**
Aspects of sponge biology
Academic Press, NY, USA.
- Harvey, E. N. (1952).**
Bioluminescence.
Academic Press, New York. 649 pp.
- Harvey, E. N. (1957).**
A history of luminescence from the earliest times until 1900. vol **44**.
The American Philosophical Society, Philadelphia.
- Hastings, J.W. (1983).**
Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems. *J. Mol. Evol.* **19**, 309 - 321.
- Hastings, J. W. (1995).**
Photochem. Photobiol. **62**, 599 - 600.
- Hastings, J. W. & Wood, K. V. (2001).**
Luciferases did not all evolve from precursors having similar enzymatic properties.
pp.199 - 210, In, *Photobiology* (D. Valenzano and T. Coohill, eds.) Valdenmar Publ. Co.,
Overland Park, KS
- Helling, R. B.; Goodman, H. M. und Boyer, H. W. (1974).**
Analysis of R. EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by
agarose gelelectrophoresis.
J. Virol. **5**:1235 - 1244.

- Henikoff, S. & Henikoff, J.G. (1992).**
Amino acid substitution matrices from protein blocks.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **89** (22), 10915 - 10919
- Herbst, R., Schäfer, U. und Seckler, R. (1997).**
Equilibrium intermediates in the reversible unfolding of firefly luciferase (*Photinus pyralis*).
J. Biol. Chem. **272**: 7099 - 7105
- Herbst, R.; Gast, K. Und Seckler, R. (1998).**
Folding of Firefly (*Photinus pyralis*) Luciferase: Aggregation and Reactivation of Unfolding Intermediates.
Biochemistry. **37**, 6586 - 6597
- Herring, P. J. (ed), (1978).**
Bioluminescence in action,
Academic Press, Oxford
- Herring, P. J. (1987).**
Systematic distribution of bioluminescence in living organisms.
J Biolumin Chemilumin. 1 May;**1**(3):147 - 63.
- Herring, P. J. (2000).**
Species abundance, sexuell encounter and bioluminescent signalling in the deep sea.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. **355**:1273 - 1276.
- Hosseinkhani*, S.**
http://www.modares.ac.ir/sci/saman_h/Pages/Bioluminescence%20.htm
- Igamberdiev, A. U.; Bykova Natalia, V. und Gardestrçm, P. (1997).**
Involvement of cyanide-resistant and rotenone-insensitive pathways of mitochondrial electron transport during oxidation of glycine in higher plants.
FEBS Lett. **412**, 265 - 269.
- Illarionov, B. A.; Bondar, V. S.; Illarionova, V. A. und Vysotski, E. S. (1995).**
Sequence of the cDNA encoding the Ca(2+)-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima*.
Gene. Feb 14;**153**(2):273 - 4.
- Inouye, S.; Noguchi, M.; Sakaki, Y.; Takagi, Y.; Miyata, T.; Iwanaga, S.; Miyata, T. und Tsuji, F. I. (1985).**
Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin.
Proc Natl Acad Sci U S A. May; **82**(10):3154 - 8.
- Inouye, S. & Tsuji, F. I. (1993).**
Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein.
FEBS Lett. **315**:343 - 346.
- Ishigami, T. ; Fujita, T.; Simbula, G.; Columbano, A.; Kikuchi, K.; Ishigami, A.; Shimosawa, T.; Arakawa, Y.; Maruyama, N. (2001).**
Regulatory effects of senescence marker protein 30 on the proliferation of hepatocytes.
Pathol Int. **51**: p. 491 - 7.
- Jacobs, F. (1974).**
Nature's Light: The Story of Bioluminescence.
William Morrow and Company, New York.
- Jones, W. C. (1957).**
The Contractility and Healing Behaviour of Pieces of *Leucosotenia complicata*.
Journal of Cell Science, jcs.biologists.org; *Q. J. Microsc. Sci.* **98**, 203 - 217.

- Justis, C. S. & Taylor, D. H. (1976).**
Extraocular photoreception and compass orientation in larval bullfrogs, *Rana catesbeiana*.
Copeia 1, 98 - 105.
- Kane, D. B. (2005).**
Sea creatures use structural tools that make engineers envious.
Science updated 10:56 p.m. ET July 7, 2005; <http://www.msnbc.msn.com/id/8498621/>
- Kato, S.; Oba, Y.; Ojika, M. und Inouye, S. (2004).**
Identification of the biosynthetic units of Cypridina Luciferin in Cypridina (*Vargula*)
hilgendorffii by LC/ESI-TOF-MS.
In: *Tetrahedron* 60(50); 11427 - 11434;
- Kästner, A. (1993).**
Lehrbuch der speziellen Zoologie. Band I: Wirbellose Tiere,
in Gruner, H.E. (ed.): 1. Teil: Einführung Protozoa, Placozoa, Porifera,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, 251 - 297
- Kilian, E. F. (1967).**
Ortsveränderungen von Süßwasserschwämmen unter dem Einfluß von Licht.
Verh. Dtsch. Zool. Ges. 31 (Suppl.), 395 - 401.
- Kishimoto, A.; Nishiyama, K.; Nakanishi, H.; Uratsuji, Y.; Nomura, H.; Takeyama, Y. und Nishizuka Y. (1985).**
Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine
3':5'-monophosphate-dependent protein kinase.
J. Biol. Chem. 260:12492 - 12499
- Klein, A.H. (1965).**
Bioluminescence.
Lippincot, Philadelphia.
- Kondo, Y.; Inai, Y.; Sato, Y.; Handa, S.; Kubo, S.; Shimokado, K.; Goto, S.; Nishikimi, M.; Maruyama, N. und Ishigami, A. (2006).**
Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid
biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Apr 11;103(15):5723 - 8. Epub 2006 Apr 3.
- Kozak, M (1987).**
An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.
Nucleic Acids Res. 15 (20): 8125 - 48.
- Kozak, M. (1991).**
Structural features in eucaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation.
J. Biol. Chem. 266:19867 - 19870
- Kreil, G. (1984).**
Occurrence, detection, and biosynthesis of carboxy-terminal amides
Methods Enzymol. 106:218 - 223
- Kruse, M.; Müller, I. M. und Müller, W. E. G. (1997).**
Early evolution of metazoan serine/threonine and tyrosine kinases: identification of
selected kinases in marine sponges.
Mol. Biol. Evol. 14:1326 - 1334.
- Kruse, M.; Steffen, R.; Batel, R.; Müller, I. M. und Müller, W. E. G. (1999).**
Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase
during auto- and allograft response in marine sponges.
J. Cell. Sci. 112:4305 - 4313.

Kyhse-Andersen, J. (1984).

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J. Biochem-Biophys. Methods **10**: 203 - 209

Laemmli, U. (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 Christen, R. (1992).

An analysis of partial 28S ribosomal RNA sequences suggests early radiation of sponges,

Biosystems **28** (1-3), 139 - 151

Landschulz, W. H.; Johnson, P. F. und McKnight, S. L. (1988).

The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins.

Science **240**:1759 - 1764

LePennec, G.; Perović, S.; Ammar, M. S. A.; Grebenjuk, V. A.; Steffen, R. und Müller, W.E.G. (2003).

Cultivation of primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*: Morphogenetic potential of silicon and iron.

J. Biotechnol. **100**, 93 - 108.

Leys, S. P. & G. O. Mackie. (1997).

Electrical recording from a glass sponge.

Nature **387**:29 - 31.

Leys, S. P. & Degnan, B. M. (2001).

Cytological basis of photoresponsive behavior in a sponge larva.

Biol. Bull. **201**, 323 - 338.

Leys, S. P.; Cronin, T. W.; Degnan, B. M. und Marshall J. N. (2002).

Spectral sensitivity in a sponge larva.

J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. Apr;**188**(3):199 - 202.

Epub 2002 Mar 15.

Li, N.; Raghe, K.; Lawler, G.; Sturgis, J.; Rajwa, B.; Melendez, J. A. und Robinson, J. P. (2003).

Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen.

J. Biol. Chem. **278**, 8516 - 8525.

Lieberkühn, N. (1859).

Neue Beiträge zur Anatomie der Spongien.

Arch. Anat. Physiol. **1859**, 353 - 358, 515 - 529.

Lindermayr, C. (2002).

Molekulare, physiologische und biochemische Charakterisierung der Genfamilie für 4-Cumarat:Coenzym A Ligase aus Sojabohne (*Glycine max*).

Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Linne, U.; Schäfer, A.; Stubbs, M. T. und Marahiel, M. A. (2007).

Aminoacyl-coenzyme A synthesis catalyzed by adenylation domains.

FEBS Lett. **581**: 905 - 910.

Lohmann, D. (2000).

Leuchten um zu leben. Das Phänomen Biolumineszenz.

Copyright (c) 1998 - 2009 scinexx; Springer Verlag, Heidelberg - MMCD interactive in science, Düsseldorf

***Louch, C.**

Hi-Tech Sponges.
<http://www.ptmsc.org/science/topicspages/sponges.html>

Macherey-Nagel (2006).

Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins.
User manual: Protino® Ni-IDA 1000 packed coulms

Mackie, G. O. (1979).

Is there a conduction system in sponges?
In: Lévi, C. and N. Boury-Esnault (Eds.). Biologie des Spongiaires.
Editions du C.N.R.S. Paris. pp. 145 - 152.

Mallefet, J. (1999).

Physiology of bioluminescence in echinoderms.
In Echinoderm Research 1998 (ed. M. D. Candia Carnevali and F. Bonasoro), pp. 93 - 102.
Rotterdam, Balkema.

Marshall R. D. (1972).

Glycoproteins.
Annu. Rev. Biochem. **41**:673 - 702

May, J. J.; Kessler, N.; Marahiel, M. A. und Stubbs, M. T. (2002).

Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases.
Proc Natl Acad Sci U S A. Sep 17; **99**(19):12120 - 5. Epub 2002 Sep 9.

Mayer, G. (2005).

Rigid biological systems as models for synthetic composites.
Science **310**, 1144 - 1147.

McDonell, M. W. & Studier, M. N. (1977).

Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.
J. Mol. Biol. **1**:119 - 146.

McElroy, W. D.; DeLuca, M. und Travis, J. (1967).

Molecular uniformity in biological catalyses. The enzymes concerned with firefly luciferin, amino acid, and fatty acid utilization are compared.
Science. Jul 14; **157**(785):150 - 60. Review.

McElroy, W. D. & DeLuca, M. (1978).

Chemistry of firefly bioluminescence.
In: Bioluminescence in Action, pp. 109 - 127, Herring P. (ed.), Academic Press, New York.

McNair, G. T. (1923).

Motor reactions of the fresh-water sponge *Ephydatia fluviatilis*.
Biol. Bull. **44**, 153 - 166.

Meighen, E. A. (1994).

Genetics of bacterial bioluminescence.
Annu. Rev. Genet. **28**:117 - 139.

Meyer-Rochow, V. B. (1990).

The New Zealand Glowworm.
Waitomo Cave Museum Soc, Waitomo, New Zealand

Meyer-Rochow, V. B. (2003).

Special: Bio- und Chemilumineszenz;
Biospektrum, 3.00, 6. Jahrgang; 2003

- Michel, P.; Torkkeli, T.; Karp, M. und Oker-Blom, C. (2001).**
Expression and purification of polyhistidine-tagged firefly Luciferase in insect cells – a potential alternative for process scale-up.
J. Biotechnol. **85**, 49 - 56.
- Morse, D.; Milos, P. M.; Roux, E. und Hastings, J. W. (1989).**
Circadian regulation of bioluminescence in *Gonyaulax* involves translational control.
Proc Natl Acad Sci U S A. Jan; **86**(1):172 - 6.
- Morse, D. & Mittag, M. (2000).**
Dinoflagellate luciferin-binding protein.
Methods Enzymol.; **305**:258 - 76.
- Muffet, T. (1634).**
Insectorum sive Minimorum Animalium Theatrum.
London.
- Müller, W. E. G. (1995).**
Molecular Phylogeny of Metazoa (animals): monophyletic origin.
Naturwissenschaften. **7**:321 - 329.
- Müller, W. E.G. & Schröder, H. C. (1997).**
Bioaktive Substanzen aus Schwämmen: Gene weisen den Weg bei der Suche nach neuen Arzneimitteln.
Biologie in unserer Zeit, Band 27, 6:389 - 398.
- Müller, W. E. G. (1998).**
Origin of Metazoa: Sponges as Living Fossils.
Naturwissenschaften. **85**:11 - 25.
- Müller, W. E. G. (2001a).**
Review: How was metazoan treshold crossed? The hypothetical Urmetazoa.
Com. Biochem. and Physiol. Part A. **129**:433 - 460.
- Müller, W. E. G., Schröder, H. C.; Skorokhod, A.; Bünz, C.; Müller, I. M. und Grebenjuk, V. A. (2001b).**
Contribution of sponge genes to unravel the genome of the hypothetical ancestor of Metazoa (Urmetazoa).
Gene. **276**, 161 - 173.
- Müller, W. E. G.; Wiens, M.; Adell, T.; Gamulin, V.; Schröder, H. C. und Müller, I. M. (2004).**
Bauplan of Urmetazoa: Basis for Genetic Complexity of Metazoa.
Internat. Review of Cytology. **235**:53 - 92.
- Müller, W. E. G.; Rothenberger, M.; Boreiko, A.; Tremel, W.; Reiber, A. und Schröder, H. C. (2005).**
Formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*.
Cell Tissue Res. **321**, 285 - 297.
- Müller, W. E. G.; Wendt, K.; Geppert, C.; Wiens, M.; Reiber, A. und Schröder, H.C. (2006).**
Novel photoreception system in sponges? Unique transmission properties of the stalk spicules from the hexactinellid *Hyalonema sieboldi*.
Biosensors and Bioelectronics **21**: 1149 - 1155
- Müller, W. E. G.; Li, J.; Schröder, H. C.; Qiao, L. und Wang, X. H. (2007a).**
The unique skeleton of siliceous sponges (Porifera; Hexactinellida and Demospongiae) that evolved first from the Urmetazoa during the Proterozoic: a review.
Biogeosciences **4**, 219 - 232.

- Müller, W. E. G.; Eckert, C.; Kropf, K.; Wang, X. H.; Schloßmacher, U.; Seckert, C.; Wolf, S. E.; Tremel, W. und Schröder, H. C. (2007b).**
Formation of the giant spicules of the deep sea hexactinellid *Monorhaphis chuni* (Schulze 1904): electron microscopical and biochemical studies.
Cell & Tissue Res. **329**, 363 - 378.
- Müller, W. E. G.; Jochum, K.; Stoll, B. und Wang, X. H. (2008).**
Formation of giant spicule from quartz glass by the deep sea sponge *Monorhaphis*.
Chem. Mater. **20**, 4703 - 4711.
- Müller, W. E. G.; Kasueske, M.; Wang, X.; Schröder, H. C. ; Wang, Y.; Pisignano, D. und Wiens, M. (2009).**
Luciferase a light source for the silica-based optical waveguides (spicules) in the demosponge *Suberites domuncula*.
Cell Mol Life Sci. Feb;**66**(3):537 - 52.
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A.; Scharf, S. J.; Saiki, R. K.; Horn, G. T. und Ehrlich, H. A. (1986).**
Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **51**:263 - 273.
- Murata, T. & Yamaguchi, M. (1997).**
Molecular cloning of the cDNA coding for regucalcin and its mRNA expression in mouse liver: the expression is stimulated by calcium administration.
Mol Cell Biochem. Aug;**173**(1-2):127 - 33.
- Nakamura, H.; Kishi, Y.; Shimomura, O., Morse, D. Und Hastings, J. W. (1989).**
Structure of dinoflagellate luciferin and its enzymatic and nonenzymatic air-oxidation product.
J. Am. Chem. Soc., **111**,7607 - 7611
- Nakamura, M. et al. (2004).**
Synthesis of *Latia* Luciferin benzoate analogues and their bioluminescent activity.
In: *Tetrahedron Letters* **45**(10), 2203 - 2205
- Nakamura, M.; Maki, S.; Amano, Y.; Ohkita, Y.; Niwa, K.; Hirano, T.; Ohmiya, Y. und Niwa, H. (2005).**
Firefly luciferase exhibits bimodal action depending on the luciferin chirality.
Biochem Biophys Res Commun. Jun 3;**331**(2):471 - 5.
- Nakatsu, T.; Ichiyama, S.; Hiratake, J.; Saldanha, A.; Kobashi, N.; Sakata, K. und Kato, H. (2006).**
Structural basis for the spectral difference in Luciferase bioluminescence.
Nature **440**, 372 - 376.
- Nicholas, K. B. & Nicholas, H. B. Jr. (1997).**
GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignment.
<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
- Nickel, M. (2004).**
Kinetics and rhythm of body contractions in the sponge *Tethya wilhelma*.
The Journal of Experimental Biology **207**: 4515 - 4524.
- Oba, Y.; Ojika, M. und Inouye, S. (2003).**
Firefly luciferase is a bifunctional enzyme: ATP-dependent monooxygenase and a long chain fatty acyl-CoA synthetase.
FEBS Lett. **540**, 251 - 254.
- Oba, Y.; Sato, M.; Ojika, M. und Inouye, S. (2005).**
Enzymatic and genetic characterization of firefly Luciferase and *Drosophila* CG6178 as a fatty acyl-CoA synthetase.
Biosci. Biotechnol. Biochem. **69**, 819 - 828.

- Ohmiya, Y.; Kojima, S.; Nakamura, M. und Niwa, H. (2005).**
Bioluminescence in the limpet-like snail, *Latia neritoides*.
Bull. Chem. Soc. Japan **78**: 1197 - 1205.
- Pavans de Ceccatty, M. (1974a).**
Coordination in sponges. The foundations of integration.
Am. Zool. **14**, 895 - 903.
- Pavans de Ceccatty, M. (1974b).**
The origin of the integrative systems: a change in view derived from research on coelenterates and sponge.
Perspec. Biol. Med. **17**, 379 - 390.
- Pavans de Ceccatty, M. (1979).**
Cell correlations and integrations in sponges.
Biol. Spong. **291**, 123 - 135.
- Pahler, S.; Blumbach B.; Müller I. und Müller W. (1998).**
A putative multiadhasive 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
- Pcons Referenz: Marchler-Bauer, A. et al (2002).**
CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure.
Nucleic Acids Res **30**(1), 281 - 283.
- Perović, S.; Prokic, I.; Krasko, A.; Müller, I.M. und Müller,W. E. G. (1999).**
Origin of neuronal-like receptors in Metazoa: cloning of a metabotropic glutamate/GABA-like receptor from the marine sponge *Geodia cydonium*.
Cell & Tissue Res. **296**, 395 - 404.
- Pfeifer, K.; Haasemann, M.; Gamulin, V.; Bretting, H.; Fahrenholz, F. & 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
- Pieribone, V. & Gruber, D. F. (2005).**
Aglow in the Dark: The Revolutionary Science of Biofluorescence.
Edition: illustrated; Veröffentlicht von *Harvard University Press*,
ISBN 0674019210, 9780674019218; 263 Seiten
- Pinna, L. A. (1990).**
Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation?
Biochim. Biophys. Acta **1054**(3):267 - 84
- Rees, J.-F.; De Wergifosse, B.; Noiset, O.; Dubuisson, M.; Janssens, B. und Thompson, E. M. (1998).**
The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools.
J. of Experim. Biol. **201**:1211 - 1221.
- Reichert, 2007.**
http://www.biozentrum.unibas.ch/lectures/unprotected/ws_0607/10316-01/10316-01.pdf
- Reiswig, H. M. (1971).**
In situ pumping activities of tropical Demospongiae.
Mar. Biol. **9**: 38 - 50

- Reitner, J. & Mehl, D. (1995).**
Early Paleozoic diversification of sponges: new data and evidences.
Geol. Paläontol. Mitt.; Innsbruck. **20**:335 - 347.
- Robison, B. H. & Young, R. E. (1981).**
Bioluminescence in pelagic octopods.
Pacific Science **35**: 39 - 44.
- Roth:** http://www.carlroth.ch/media/_de-ch/usage/L788.pdf
- Rychilk, W. & Rhodes, R. E. (1989).**
A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA.
Nucleic Acids Res. **21**:8543 - 8551.
- Rychilk, W. (1993).**
Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction, in PCR Protocols.
Meth. in Mol. Biol. **15**:31. B. A. White, B. A. (Ed.) Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- Rychilk, W. (1995).**
Priming efficiency in PCR.
Biotech. **18**(1):84 - 86; 88 - 90.
- Sachs, L. (1974).**
Angewandte Statistik.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- Saiki, R. K. (1989).**
PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification
(Erlich, H. A., ed.) S. 17, *Stockton Press*, New York
- Saitou, N. & Nei, M. (1987).**
The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.
Mol Biol Evol. Jul;**4**(4):406 - 25.
- Sala-Newby, G. B.; Thomson, C. M. und Campbell, A. K. (1996).**
Sequence and biochemical similarities between the luciferases of the glow-worm *Lampyrus noctiluca* and the firefly *Photinus pyralis*.
Biochem J. Feb 1;**313**(Pt 3):761 - 7.
- Sandford, F. (2003).**
Physical and chemical analysis of the siliceous skeleton in six sponges of two groups (Demospongiae and Hexactinellida).
Micr. Res. Techn. **62**, 336 - 355.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).**
Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.,
Cold Spring Harbor (N.Y.) *Laboratory Press*, Vol. 3.
- Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977).**
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **74**:5463 - 5467.
- Sarikaya, M.; Fong, H.; Sunderland, N.; Flinn, B. D.; Mayer, G.; Mescher, E. und Gaino, A. (2001).**
Biomimetic model of a sponge-spicular optical fiber-mechanical properties and structure.
J. Mater. Res. **16**:1420 - 1428.

- Schäcke, H.; Rinkevich, B.; Gamulin, V.; Müller, I. M. und Müller, W. E. G. (1994).**
Immunoglobulin-like domain is present in the extracellular part of the receptor tyrosine kinase from the marine sponge *Geodia cydonium*.
J. Mol. Recog. **7**:27 - 276.
- Schmidt, O. (1866).**
Zweites Supplement der Spongien des Adriatischen Meeres enthaltend die Vergleichung der Adriatischen und Britischen Spongiengattungen.
Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann.
- Schröder, J. (1989).**
Protein sequence homology between plant 4-coumarate:CoA ligase and firefly luciferase.
Nucleic Acids Res. **17**, 460.
- Schröder, H. C.; Krasko, A.; Gundacker, D.; Leys, S. P.; Müller, I. M. und Müller, W. E. G. (2003a).**
Molecular and functional analysis of the (6-4) photolyase from the hexactinellid *Aphrocallistes vastus*.
Biochim. Biophys. Acta **1651**, 41 - 49
- Schröder, H. C.; Ushijima, H.; Krasko, A.; Gamulin, V.; Schütze, J.; Müller, I. M. und Müller, W. E. G. (2003b).**
Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa: The tachylectin family.
J. Biol. Chem. **278**, 32810 - 32817.
- Schröder, H. C.; Perović-Ottstadt, S.; Rothenberger, M.; Wiens, M.; Schwertner, H.; Batel, R.; Korzhev, M.; Müller, I. M. und Müller, W. E. G. (2004).**
Silica transport in the demosponge *Suberites domuncula*: fluorescence emission analysis using the PDMPO probe and cloning of a potential transporter.
Biochem. J. **381**, 665 - 673.
- Schröder, H. C.; Natalio, F.; Shukoor, I.; Tremel, W.; Schloßmacher, U.; Wang, X. H. und Müller, W.E.G. (2007).**
Apposition of silica lamellae during growth of spicules in the demosponge *Suberites domuncula*: biological/biochemical studies and chemical/biomimetical confirmation.
J. Struct. Biol. **159**, 325 - 334.
- Schultz, W.; Liu, L.; Cegielski, M. und Hastings, J. W. (2005).**
Crystal structure of a pH-regulated luciferase catalyzing the bioluminescent oxidation of an open tetrapyrrole.
Proc Natl Acad Sci USA **102**:1378 - 1383.
- Seliger, H. H. & McElroy, W. D. (1960).**
Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence.
Arch Biochem Biophys. May; **88**:136 - 41
- Seliger, H. H. & McElroy, W. D. (1962).**
Chemiluminescence of firefly luciferin without enzyme.
Science. Nov 9; **138**:683 - 5.
- Seliger, H. H. & McElroy, W. D. (1965).**
Light: Physical and Biological Action
Academic P., U.S.; 417 S.
- Selzer, P. M., Marhöfer, R. & Rohwer, A. (2004).**
Angewandte Bioinformatik.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- Shapiro, A. L.; Viñuela, E. und Maizel, J. V. Jr. (1967).**
Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **28**, 815 - 820.
- Shimokawa, N. & Yamaguchi, M. (1993).**
Expression of hepatic calcium-binding protein regucalcin mRNA is mediated through Ca^{2+} /calmodulin in rat liver.
FEBS Lett. Jan 18;**316**(1):79 - 84.
- Shimokawa, N.; Isogai, M. und Yamaguchi, M. (1995a).**
Specific species and tissue differences for the gene expression of calcium-binding protein regucalcin.
Mol Cell Biochem. Feb 9;**143**(1):67 - 71.
- Shimokawa, N.; Matsuda, Y. und Yamaguchi, M. (1995b).**
Genomic cloning and chromosomal assignment of rat regucalcin gene.
Mol Cell Biochem. Oct 18;**151**(2):157 - 63.
- Shimomura, O.; Johnson, F. H. und Saiga, Y. (1962).**
Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*.
In: *J Cell Comp Physiol.* **59**; 223 - 39
- Shimomura, O.; Johnson, F. H. und Kohama, Y. (1972).**
Reactions involved in bioluminescence systems of limpet (*Latia neritoides*) and luminous bacteria.
PNAS **69**: 2086 - 2089
- Shimomura, O.; Johnson, F. H. und Morise, H. (1974).**
Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin.
In: *Biochemistry* **13**(16); 3278 - 3286; *Biochemistry.* 1974 Jul 30;**13**(16):3278 - 86.
- Shimomura, O. (2006).**
Bioluminescence: Chemical Principles and Methods.
Edition: illustrated Veröffentlicht von World Scientific, 2006; ISBN 9812568018, 9789812568014; 470 Seiten
- Shockey, J. M.; Fulda, M. S. und Browse, J. A. (2003).**
Arabidopsis contains a large superfamily of acyl-activating enzymes. Phylogenetic and biochemical analysis reveals a new class of acyl-Coenzyme A synthetases.
Plant Physiol. **132**(2): 1065 - 76
- Simpson, T. L. (1984).**
The Cell Biology of Sponges.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York.
- Sivinski, J. (1981).**
Arthropods attracted to luminous fungi.
Psyche **88** (3-4): 383 - 390
- Smith, R. C. & Baker, K. S. (1981).**
Optical Properties of the Clearest Natural Waters (200-800 nm).
Applied Optics, Vol. **20** (177).
- Stark, W. S.; Schilly, D.; Christianson, J. S.; Bone, R. A. und Landrum, J. T. (1990).**
Drosophila, β -carotene, zeaxanthin and lutein mediate the formation of all major photopigments in R1-6, R7 and R8.
J. Comp. Physiol. A **166**, 429 - 436.

- Storch, V. & Welsch, U. (1991).**
Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum.
20. neu bearbeitete Auflage. Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 458 S.
- Strehler, B. L. & McElroy, W. D. (1949).**
Purification of firefly luciferin.
J. Cell Physiol. **34**, 457 - 466.
- Strehler, B. L. (1955).**
Factors and biochemistry of bacterial luminescence.
In: *The Luminescence of Biological Systems*. pp. 209 - 255, Johnson, F.H. (ed.),
A.A.A.S. Press, Washington, D.C.
- Stuible, H. P.; Büttner, D.; Ehling, J.; Hahlbrock, K. und Kombrink, E. (2000).**
Mutational analysis of 4-coumarate: CoA ligase identifies functionally important amino acids
and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes.
FEBS Lett. **467**:117 - 122.
- Sundar, V. C.; Yablon, A. D.; Grazul, J. L.; Ilan, M. und Aizenberg, J. (2003).**
Fibre-optical features of a glass sponge.
Nature **424**:899
- Suzuki, N. & Goto, T. (1971).**
Firefly Bioluminescence II. Identification of 2-(6'-hydroxybenzothiazol-2'-yl)-4-
hydroxythiazole as a product in the bioluminescence of firefly lanterns and as a product in
the chemiluminescence of firefly luciferin in DMSO.
Tetrahedron Lett **12**: 2021 - 2024.
- Suzuki, H.; Kawarabayasi, Y.; Kondo, J.; Abe, T.; Nishikawa, K.; Kimura, S.; Hashimoto, T.
und Yamamoto, T. (1990).**
Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase.
J. Biol. Chem. **265**:8681 - 8685.
- Thakur, A. N.; Thakur, N. L.; Indap, M. M.; Pandit, R. A.; Datar, V. V. und Müller W. E. G.
(2005).**
Antiangiogenic, antimicrobial, and cytotoxic potential of sponge-associated bacteria.
Mar Biotechnol (NY). May-Jun;7(3):245 - 52. Epub 2005 Mar 24.
- Thein, S. L.; Lynch, J. R.; Weatherall, D. J. und Wallace, R. B. (1986).**
Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides.
Lancet. **1**:93.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. und Higgins, D. G. (1997).**
The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided
by quality analysis tools.
Nucleic Acids Research, **24**:4876 - 4882.
- Timmins, G. S.; Robb, F. J.; Wilmot, C. M.; Jackson, S. K. und Swartz, H. M. (2000).**
Firefly flashing is controlled by gating oxygen to light-emitting cells.
J. Exp. Biol. **204**: 2795 - 2801
- Toh H. (1991).**
Sequence analysis of firefly luciferase family reveals a conservative sequence motif.
Protein Seq. Data Anal. **4**:111 - 117
- 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

- Towler, D. A.; Gordon, J. I.; Adams, S. P. und Glaser, L. (1988).**
The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation.
Annu. Rev. Biochem. **57**:69 - 99
- Tsuji, F. I. (1985).**
ATP-dependent bioluminescence in the firefly squid, *Watasenia scintillans*.
Proc Natl Acad Sci U S A. Jul;**82**(14):4629 - 4632.
- Tsuji, F. I.; Ohmiya, Y.; Fagan, T. F.; Toh, H. und Inouye, S. (1995).**
Molecular evolution of the Ca²⁺-binding photoproteins of the Hydrozoa.
Photochem Photobiol **62**:657 - 661.
- Tyler, J. (2002).**
The Glow-worm.
Lakeside Printing Ltd., Sevenoaks, Kent: 76 Seiten
- Ugarova, N. N. & Brovko, L. Y. (2002).**
Protein structure and bioluminescent spectra for firefly bioluminescence.
Luminescence. Sep-Oct;**17**(5):321 - 30.
- Ugarova, N. N.; Maloshenok, L. G.; Uporov, I. V. und Koksharov, M. I. (2005).**
Bioluminescence spectra of native and mutant firefly luciferases as a function of pH.
Biochemistry (Moscow) **70**, 1262 - 1267.
- Uriz, M. J.; Turon, X. und Becerro, M. A. (2000).**
Silica deposition in Demospongiae: spiculogenesis in *Crambe crambe*.
Cell Tissue Res. **301**, 299 - 309.
- Viviani, V. R.; Uchida, A.; Suenaga, N.; Ryufuku, M. und Ohmiya, Y. (2001).**
Thr226 Is a Key Residue for Bioluminescence Spectra Determination in Beetle Luciferase.
Biochem. and Biophys. Research Com. **280**:1286 - 1291.
- Viviani, V. R. (2002).**
The origin, diversity, and structure function relationships of insect Luciferases.
CMLS. Cell. Mol. Life Sci. **59**:1833 - 1850. (REVIEW)
- *Viviani, V. R.**
The Biological and Biochemical Diversity of Terrestrial Bioluminescence;
<http://www.photobiology.info/develop/AdvModsBiolumViviani.asp>
- Viviani, V. R.; Arnoldi, F. G. C.; Neto, A. J. S.; Oehlmeyer, T. L.; Bechara, E. J. H. und Ohmiya, Y. (2008a).**
The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly Luciferases.
Photochem. Photobiol. Sci. **7**, 159 - 169.
- Viviani, V. R.; Neto, S. A. J.; Arnoldi, F. G. C.; Barbosa, J. A. R. G. und Ohmiya, Y. (2008b).** T
he influence of the loop between residues 223–235 in beetle luciferase bioluminescence
spectra: a solvent gate for the active site of pH-sensitive luciferases.
Photochem. Photobiol. **84**, 138 - 144.
- Vogel, S. (1977):**
Current induced flow through living sponges in nature.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **74** (5), 2069 - 2071
- Wagner-Hülsmann, C.; Bachinski, N.; Diehl-Seifert, B.; Blumbach, B.; Steffen R.; Pancer Z. und Müller W. E. G. (1996).**
A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge [*Geodia cydonium*] system.
Glycobiol. **6**:785 - 793

Wang, X. H.; Li, J.; Qiao, L.; Schröder, H. C.; Eckert, C.; Kropf, K.; Wang, Y. M.; Feng, Q. L. und Müller, W. E. G. (2007).

Structure and characteristics of giant spicules of the deep sea hexactinellid sponges of the genus *Monorhaphis* (Hexactinellida: Amphidiscosida: Monorhaphididae).
Acta Zoologica Sinica **53**, 557 - 569.

Wapstra, M & Soest, R. W. M. van (1987).

Sexual reproduction, larval morphology and behaviour in demosponges from the southwest of the Netherlands.

In: Vacelet J, Boury-Esnault N (eds) *Taxonomy of Porifera*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 281 - 307

Weimar, J. D.; DiRusso, C. C.; Delio, R. und Black, P. N. (2002).

Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids. Amino acid residues within the ATP/AMP signature motif of *Escherichia coli* FadD are required for enzyme activity and fatty acid transport.

J Biol Chem. Aug 16;**277**(33):29369 - 76. Epub 2002 May 28.

Weiss, P. (2001).

Soaking up Rays.

Science News **160**:77 - 79

Weissenfels, N. (1990).

Condensation rhythm of fresh-water sponges (Spongillidae, Porifera).

Eur. J. Cell Biol. **53**, 373 - 383.

Wesley, S. V.; Helliwell, C. A.; Smith, N. A.; Wang, M.; Rouse, D. T.; Liu, Q.; Gooding, P. S., Singh, S. P.; Abbott, D.; Stoutjesdijk, P. A. et al (2001).

Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants.

Plant J. **27**: 581 - 590

Westerlund-Karlsson, A.; Saviranta, P. und Karp, M. (2002).

Generation of thermostable monomeric Luciferases from *Photobacterium luminescens*.

Biochem. and Biophys. Research Com. **296**:1072 - 1076.

Westheide, W. & Rieger, R. (1996).

Spezielle Zoologie. Erster Teil: Einzeller und Wirbellose Tiere.

Gustav Fischer Verlag, Jena & Stuttgart & New York. 75 - 119

Whitehead, T. P.; Kricka, L. J.; Carter, T. J. und Thorpe, G. H. (1979).

Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory.

Clin Chem.;**25**:1531 - 46.

Widder, E. A.; Latz, M. F. ; Herring, P. J. und Case, J. F. (1984).

Far-red bioluminescence from two deep-sea fishes.

Science **225**: 512 - 514

Widder, E. A. (2001).

Marine Bioluminescence.

Bioscience-explained. **1**:1 - 9; www.bioscience-explained.org

Wiens, M.; Diehl-Seifert, B. und Müller, W. E. (2001).

Sponge Bcl-2 homologous protein (BHP2-GC) confers distinct stress resistance to human HEK-293 cells.

Cell Death Differ. Sep;**8**(9):887 - 98.

Wiens, M.; Mangoni, A.; D'Esposito, M.; Fattorusso, E.; Korchagina, N.; Schröder, H. C.; Grebenjuk, V. A.; Krasko, A.; Batel, R.; Müller, I. M. und Müller, W. E. (2003).

The molecular basis for the evolution of the metazoan bodyplan: extracellular matrix-mediated morphogenesis in marine demosponges.

J Mol Evol.;**57** Suppl **1**:S60 - 75.

- Wilkinson, C. R.; Garrone, R. und Vacelet, J., (1984).**
Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscope radioautography and *in situ* evidence.
Proc. R. Soc. Lond. B **220**: 519 - 528
- Willmer, P. (1994).**
Invertebrate relationships.
Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Wilson, T. & Hastings, J. W. (1998).**
Bioluminescence.
Annu Rev Cell Dev Biol.; **14**:197 - 230. Review.
- Wood, K. V. (1995).**
The chemical mechanism and evolutionary development of beetle bioluminescence.
Photochem. Photobiol. **62**, 662 - 673.
- Yamaguchi, M. (2000).**
The role of regucalcin in nuclear regulation of regenerating liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **276**, 1 - 6.
- Zako, T.; Deguchi, H.; Kitayama, A.; Ueda, H. Und Nagamune, T. (2000).**
Refolding of Firefly Luciferase Immobilized on Agarose Beads.
J. Biochem., Vol. 127, No. **3** 351 - 354
- 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
- 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
- Zimmer*, M.:** <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/shimomura.html>

Erklärung


Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Klonierung und Charakterisierung der Luziferase und des Luziferin regenerierenden Enzyms aus dem marinen Schwamm *Suberites domuncula*

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Mainz, 19.04.2009

(Ort, Datum)



Mandy Kasueske