

**Morphologischer und biochemischer Aufbau von  
Silikatnadeln der Hexactinelliden am Beispiel von  
*Monorhaphis chuni***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Klaus Kropf  
geb. in Mainz

Mainz, 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 28.07.2009

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.0 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Silizium und Silikate .....	7
1.2 Silizium in Lösung .....	8
1.3 Siliziumverteilung auf der Erde.....	9
1.4 Biomineralisation.....	9
1.5 Silikat in biologischen Organismen .....	9
1.5.1 Protista .....	10
1.5.2 Diatomeen .....	13
1.5.3 Höhere Pflanzen.....	15
1.5.4 Schwämme.....	16
1.6 Nadelbildung .....	20
1.7 Nadelaufbau und Form .....	21
1.8 Optische Eigenschaften von Megaskleren der Hexactinelliden.....	22
1.9 Mechanische Eigenschaften von Megaskleren und Skeletten der Hexactinelliden .....	23
<b>2.0 Zielsetzung</b> .....	<b>25</b>
<b>3.0 Material</b> .....	<b>26</b>
3.1 Chemikalien .....	26
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	28
3.3 Geräte .....	28
3.4 Enzyme und Antikörper .....	29
3.5 Kits .....	30
3.6 Primer .....	30
3.7 Verwendeter Bakterienstamm.....	31
3.7.1 Bakterienkulturmedium.....	31
3.8 Computerprogramme und Internetdienste .....	31
3.9 Schwämme und Schwammnadeln .....	32
3.9.1 <i>Monorhaphis chuni</i> (Porifera, Hexactinellida, Amphidiscophora) .....	32
3.9.2 <i>Crateromorpha meyeri</i> (Porifera, Hexactinellida, Lyssacinosida) .....	32
<b>4.0 Methoden</b> .....	<b>33</b>
4.1 Demineralisation der Nadeln durch Flusssäure für die Lichtmikroskopie .....	33

4.1.1 Auflösung bei gleichzeitiger Färbung mit Coomassie Brilliant Blau .....	34
4.1.2 Auflösung bei anschließender Färbung mit Sirius Red F3BA .....	34
4.2 Auflösung des Silikates für biochemische Analysen der Nadelkomponenten .	36
4.2.1 Aufkonzentrierung mittels Microcon Centrifugal Filter Devices.....	37
4.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	38
4.3.1 Gelherstellung für SDS-PAGE.....	39
4.3.2 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie.....	40
4.3.3 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit <i>Sypro Ruby Protein Gel Stain</i> ..	41
4.4 Zweidimensionale SDS-PAGE .....	41
4.4.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung.....	42
4.4.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE.....	42
4.5 Western Blot.....	43
4.5.1 Entwicklung mit dem NBT/X-Phosphat System.....	45
4.6 Erythrocyten-Agglutinationsfaktor in Schwammnadeln .....	45
4.7 Deglykolisierung der Nadelproteine .....	46
4.8 Rasterelektronenmikroskopie.....	47
4.9 Elektronenmikrosonde .....	48
4.10 RNA-Isolation.....	48
4.10.1 Isolation der Gesamt-RNA.....	49
4.10.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA.....	50
4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	50
4.11.1 Standard-PCR .....	52
4.11.2 Checking-PCR / Kolonie-PCR .....	53
4.11.3 <i>Reverse transcription</i> PCR (RT-PCR) .....	54
4.12 Agarose-Gelelektrophorese .....	54
4.12.1 Elektrophorese von DNA .....	54
4.12.2 Agarose-Gelherstellung.....	55
4.12.3 DNA-Färbung im Agarosegelen.....	55
4.12.4 Elektrophorese von RNA .....	56
4.13 DNA-Aufreinigung .....	57
4.13.1 DNA Extraktion aus Agarosegelen .....	57
4.13.2 Plasmidaufreinigung.....	57
4.14 Restriktionsverdau .....	58
4.15 Ligation und Klonierung .....	59

4.15.1 T/A Ligation .....	59
4.15.2 Transformation .....	60
4.15.3 Blau-Weiß-Selektion der transformierten Bakterien.....	61
4.16 Sequenzierung.....	62
4.16.1 Herstellung des Sequenziergels .....	62
4.16.2 Sequenzierreaktion.....	63
4.16.3 Sequenzier-Elektrophorese .....	64
<b>5.0 Ergebnisse.....</b>	<b>65</b>
5.1 Morphologie der Silikatnadeln von <i>Monorhaphis chuni</i> .....	65
5.1.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der lamellaren Zone der Pfahlnadel .....	67
5.2 Analyse der Verteilung anorganischer Komponenten im Querschnitt der Pfahlnadel von <i>Monorhaphis chuni</i> .....	69
5.3 Äussere organische Komponenten der Silikatnadeln.....	71
5.4 Analyse von organischen Bestandteilen innerhalb der Nadeln .....	72
5.4.1 Comitalia von <i>Monorhaphis chuni</i> .....	73
5.4.2 Tauactine von <i>Monorhaphis chuni</i> .....	75
5.4.3 Diactine von <i>Crateromorpha meyeri</i> .....	77
5.5 Färbung von Nadelproteine mit Sirius Rot F3BA.....	78
5.6 Analyse von organischen Komponenten der lamellaren Schicht der Pfahlnadel von <i>Monorhaphis chuni</i> .....	80
5.7 Biochemische Analyse der Nadelproteine von <i>Monorhaphis chuni</i> .....	82
5.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	82
5.7.2 Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen Silicatein.....	85
5.7.3 Erythrozytenagglutinationsassay der Nadelkomponenten.....	86
5.7.4 Deglycosylierung der Nadelproteine.....	87
5.8 Molekularbiologische Identifizierung von Silicatein in Hexantinelliden .....	88
5.8.1 Isolierung der gesamt RNA von <i>Crateromorpha meyeri</i> und cDNA Synthese .....	89
5.8.2 PCR-Screening.....	89
5.8.3 Sequenzierung und Sequenzanalyse .....	90
5.8.5 Analyse der Aminosäuresequenz SILCA_CRAME.....	91
<b>6.0 Diskussion.....</b>	<b>98</b>
6.1 Morphologie der Pfahlnadel und Comitalia von <i>M. chuni</i> .....	99

---

6.2 Verteilung der anorganischen Nadelkomponenten .....	100
6.3 Anordnung und Struktur des organischen Materials der Nadeln.....	102
6.3.1 Äußere organische Hüllstruktur .....	102
6.3.2 Organisches Material innerhalb der Nadeln .....	103
6.4 Analyse der Nadelproteine bei Pfahlnadeln von <i>Monorhaphis chuni</i> .....	107
6.4.1 Zweidimensionale-SDS-Gelelektrophorese und Westernblot der Gesamtnadel .....	107
6.4.2 Analyse der organischen Bestandteile der lamellaren Zone.....	109
6.4.3 Agglutinationsassay und Deglycolysierung .....	110
6.5 Molekularbiologischer Nachweis von Silicatein in Hexactinelliden.....	110
6.6 Ausblick.....	112
<b>7.0 Zusammenfassung.....</b>	<b>114</b>
<b>8.0 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>9.0 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>127</b>
<b>10.0 Anhang.....</b>	<b>131</b>
10.1 Danksagung.....	131
10.2 Publikationen.....	131
10.3 Lebenslauf .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
10.4 Eidesstattliche Erklärung.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## 1.0 Einleitung

### 1.1 Silizium und Silikate

Silizium ist eines der am häufigsten vorkommende Element der Erde; der Erdmantel und die Erdkruste bestehen fast ausschließlich aus Silikaten. Im Gegensatz zu Kohlenstoff bevorzugt Silizium anstelle der C-C und C-H die Si-O Bindung. Silizium kommt nicht elementar, sondern nur in gebundener Form, als Salze vom Anhydrid  $\text{SiO}_2$  abgeleiteter Kieselsäuren der Formel  $m\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  vor.

Das Siliziumatom ist in Silikaten meist tetraedrisch von vier Sauerstoffatomen umgeben, wobei zwischen den Silizium- und den Sauerstoffatomen starke kovalente Bindungskräfte herrschen. Seltener treten die Koordinationszahlen 6 (oktaedrische Umgebung) wie z. B. bei Stishovit auf.

Bei der tetraedrischen Anordnung können die negativen Ladungen der 4 Sauerstoffatome nicht durch die positiven Ladungen des Siliziumatoms ausgeglichen werden. Um einen Ladungsausgleich zu erreichen gibt es verschiedene Möglichkeiten Verbindungen mit Kationen einzugehen oder ein Aneinanderfügen mehrerer Tetraeder.

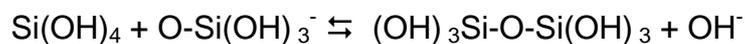
Durch das Verknüpfen der Tetraeder untereinander über ihre Sauerstoffecken kommen verschiedene Strukturen zustande. Sie reichen ausgehend vom einzelnen  $\text{SiO}_4^{4-}$  Ion bis hin zu ausgedehnten dreidimensionalen Polymeren. Die Silikatminerale werden aufgrund der Art ihrer Tetraederverknüpfungen in 6 Unterklassen eingeteilt: die Ketten- und Bandsilikate, die Schichtsilikate, die Inselsilikate, die Gerüstsilikate, die Gruppensilikate und die Ringsilikate. In der Natur kommen als Minerale hauptsächlich Quarz, Glimmer, Tonminerale, Amphibole, Pyroxene, Granat und Olivin vor.

Der größte Teil des biogenen Silikates stammt von den silikatverstoffwechselnden einzelligen Diatomeen (Kieselalgen) und den vielzelligen Schwämmen und besteht aus hydratisiertem, nichtkristallinem Opal.

## 1.2 Silizium in Lösung

Die lösliche Form von Siliziumverbindungen ist größtenteils die monomere Orthokieselsäure ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ) mit einem  $\text{pK}_a$  von 9,8 (Iler, 1979) bzw. deren Abkömmlinge. Sie ist bei  $25^\circ\text{C}$  und Konzentrationen unter 100 ppm stabil. Eine Erhöhung der Kieselsäurekonzentration auf 100-200 ppm führt zu Autopolykondensationsreaktionen und der Bildung von Dimeren, die später über Trimere zu Oligomeren anwachsen (Perry *et al.*, 2000).

Beim ersten Schritt, der Bildung der Dimere erfolgt ein nukleophiler Angriff von einem geladenen Sauerstoffatom an ein anderes Siliziumatom, was zu der Bildung einer Si-O-Si Siloxanbindung führt:



Die Polykondensation von Silizium ist stark pH-abhängig. Die Geschwindigkeit der Polykondensation erfolgt am langsamsten bei pH 2 und steigt um 2 Größenordnungen zwischen pH 3 und 5 und nochmals um 2 Größenordnungen zwischen pH 6 und 9. Die Form des Produktes der Polykondensation ist ebenfalls pH-abhängig. Es können lineare Formen, verzweigte Formen oder Netzwerke entstehen. Bei einem pH-Wert unter 7 besteht nur eine geringe elektrostatische Abstoßung zwischen den Siliziumpartikeln, so dass sich Bindungen zwischen den einzelnen Partikeln ausbilden und zu einer fibrillären Aggregation führen. Ist der pH-Wert höher als 7, limitieren elektrostatische Kräfte diesen fibrillären Aggregationsprozess. Die einzelnen primären Partikel vergrößern sich dabei und reduzieren sich gleichzeitig in ihrer Anzahl. Es bilden sich wenige, dafür aber größere Polymere und es entsteht durch die sogenannte Ostwald-Reifung ein stabiler Sol (Coradin, 2003).

Anstelle des Begriffes Polykondensation wird für die Kondensationsreaktion der Kieselsäure, die zu größeren Aggregaten führt, auch oftmals der Begriff Polymerisation verwendet.

### 1.3 Siliziumverteilung auf der Erde

Die natürlichen Konzentrationen in den Weltmeeren sind nicht nur geographisch und jahreszeitenbedingt unterschiedlich. Besonders variieren sie sich auch in verschiedenen Wassertiefen. Als Beispiel wurden in einer Studie von Floch *et al.* die Konzentrationen von  $\text{Si(OH)}_4$  im Nordatlantik (Porcupine Abyssal Plain) gemessen (Floch, 1998). Sie reichten von  $0,27 \mu\text{M}$  in 20 m über  $5 \mu\text{M}$  in 500 m bis hin zu  $43 \mu\text{M}$  in 4000 m Tiefe.

Im Durchschnitt ist die Oberflächenkonzentration von  $\text{Si(OH)}_4$  in den Weltmeeren ist kleiner als  $2 \mu\text{M}$ , mit Ausnahme der Antarktis, wo die Konzentration im Winter bis zu  $100 \mu\text{M}$  betragen kann. Mit zunehmender Tiefe steigt die Kieselsäurekonzentration und erreicht in der Tiefsee Konzentrationen von  $10$  bis  $40 \mu\text{M}$  im Nordatlantik,  $100$  bis  $160 \mu\text{M}$  in der Antarktis und  $140$  bis  $180 \mu\text{M}$  im Nordpazifik (Treguer, 1995).

In Flüssen liegt die Durchschnittskonzentration bei  $150 \mu\text{M}$  und im Erdboden bei  $0,1$  bis  $0,6 \text{ mM}$  (Epstein, 1994).

### 1.4 Biomineralisation

Viele Organismen sind in der Lage, anorganische, biogene Materialien zu bilden. Den Vorgang der Bildung von mineralischen Produkten durch Lebewesen nennt man Biomineralisation. Die wichtigsten Biomineralien bestehen aus Kalziumcarbonat, Kalziumphosphat, Kalziumoxalat, Eisenoxid und Silikat (siehe Abb.1).

### 1.5 Silikat in biologischen Organismen

Biosilifikation, die Bildung von amorphem, hydratisiertem Silikat, kommt in mehreren Organismen vor (Simpson and Volcani, 1981). Einige Protozoen, höhere Pflanzen und Tiere, sind fähig, Silikat zu komplexen und definierten Strukturen zu polymerisieren. Als Biopolymer liegt Silikat hier immer als hydratisierter, nichtkristalliner Opal vor ( $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ).

In Vertebraten ist Silizium ein Bestandteil bestimmter Mucopolysaccharide und Polyuronide (z.B. in Hyaluronsäure oder Chondroitin-4-sulfate) und ist wahrscheinlich

auch kovalent an diese gebunden (Schwarz, 1973). Es scheint bei Vertebraten eine Rolle in der Knochenbildung zu spielen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist aber noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass bei der Knochenbildung die Funktion von Silizium in der Kollagensynthese oder dessen Stabilisierung liegt (Hott *et al*, 1993).

Mineral	Formel	Beispiele von Funktion und Vorkommen
Kalziumkarbonat	$\text{CaCO}_3$	Muscheln, Seeigel
Kalziumphosphat	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	Endoskelett bei Vertebraten Ca-Speicher
Kalziumoxalat	$\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Ca-Speicher bei Pflanzen
Eisenoxide	$\text{Fe}_3\text{O}_4$ , $5 \text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	Magnetorezeption Fe-Speicher
Silikate	$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Exoskelett bei Algen, Skelett bei Schwämmen

Abb. 1: Übersicht einiger biogener Mineralien und deren Funktionen bzw. deren Vorkommen.

## 1.5.1 Protista

### 1.5.1.1 Radiolarien

Radiolarien sind einzellige heterotrophe Protozoen, die Teil des marinen Planktons sind. Ernst Haeckel klassifizierte 1887 erstmals die Radiolarien in vier Gruppen: die Acantharia, die Spumerallia, die Nassellaria und die Phaeodaria. Diese Klassifizierung wurde später überarbeitet und heutzutage ist die Bezeichnung „Radiolarien“ eine inoffizielle taxonomische Beschreibung von Mitgliedern der Klassen Polycystinea (Spumellaria und Nassellaria) und Phaeodaria (Zettler, 1997). Radiolarien besitzen ein komplexes Endoskelett aus Silikat, das meist eine radiale Symmetrie aufweist. Die zentrale Kapsel ist von einer Membran umschlossen und enthält den Zellkern, Mitochondrien, den Golgi Apparat, Vakuolen und Reservestoffe. Die Calymma, der äußere Teil der Radiolarien, enthält Mitochondrien,



### 1.5.1.2 Choanoflagellaten

Die zu den Protozoen gehörenden Choanoflagellaten findet man sowohl im Süß- wie auch im Salzwasser. Sie besitzen einen runden bis eiförmigen Zellkörper mit einem Flagellum und einem Kragen aus 30 bis 40 Mikrovilli. Choanoflagellaten sind den Choanozyten (Kragengeißelkammern) der Schwämme sehr ähnlich und wahrscheinlich eine der nächsten Verwandten dieser Tiere (King Carroll, 2001; Steenkamp, *et al.*, 2006). Der Zellkörper von vielen Choanoflagellaten ist von einer extrazellulären Matrix, dem Periplaten umgeben, welcher sich in Struktur und Zusammensetzung bei verschiedenen Arten unterscheidet. Der Periplast wird deswegen auch von Taxonomen zur Klassifizierung verwendet. Die Choanoflagellaten werden anhand ihres Periplasten in drei Familien gegliedert: die Codosigidae, die Salpingoecidae und die Acanthoecidae (Adl, 2005). Die Codosigidae scheinen, unter dem Lichtmikroskop betrachtet, keinen Periplasten zu besitzen. Elektronenmikroskopisch hingegen kann man eine dünne Umhüllung erkennen. Die Zellen der Salpingocidae sind von einer sogenannten Theca umgeben, die aus Zellulose oder anderen Polysacchariden besteht.

Die Zellen von Arten der Familie der Acanthoecidae, die dritte Familie der Choanoflagellaten, befinden sich in einem Gehäuse aus Siliziumdioxid. Dieses Gehäuse kann eine korbähnliche Form haben (Lorica) oder aus miteinander verflochtenen Siliziumstäbchen bestehen (Costae). Das Flagellum der Choanoflagellaten dient hauptsächlich der Nahrungsaufnahme. Ein schlagendes Flagellum bewirkt aber, dass sich der Choanoflagellat im Wasser fortbewegt und somit die Nahrungsaufnahme erschwert wird. Um dies zu verhindern sind bei einigen Arten die meist organischen Umhüllungen für die Anheftung an den Untergrund verantwortlich, sodass ein Fortbewegen beim Flagellumschlag verhindert wird. Andere Arten bilden Kolonien, bei denen sich die verschiedenen Fortbewegungsrichtungen neutralisieren.

Die Gehäuse aus Siliziumdioxid können die Bewegung der Zelle beim Flagellumschlag unterdrücken, indem sie in ihrer korbähnlichen Form als Schleppnetz dienen. Gleichzeitig helfen sie dabei, die Zelle im Wasser suspendiert zu halten und ermöglichen es den Choanoflagellaten einen neuen Lebensraum, das offene Wasser zu erschliessen (Leadbeater, 2001).

### 1.5.1.3 Silicoflagellaten

Silicoflagellaten sind eine kleine Gruppe von kaum untersuchten einzelligen marinen Algen. Es sind photoautotrophe als auch heterotrophe Arten vorhanden, welche ein Endoskelett aus biogenem Silikat besitzen. Das Skelett ist dem der Radiolarien ähnlich, aber im allgemeinen weniger komplex. Silicoflagellaten besitzen zwei Flagellen, eine kürzere, kaum sichtbare und eine längere, mit der sie sich durchs Wasser bewegen. Etwa 1-2% der Silikatkomponenten im marinen Sediment stammen von Silicoflagellatenskeletten.

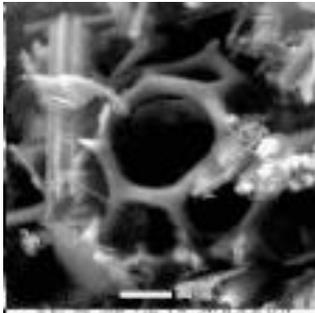


Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Silicoflagellaten (*Distephanus speculum*). Bild verändert nach <http://www.ucmp.berkeley.edu/tertiary/mio/montmicro.html> Messbalken: 5  $\mu\text{m}$

### 1.5.2 Diatomeen

Diatomeen (Chrysophyta, Bacillariophyta) sind die artenreichste Gruppe der eukaryotischen Algen. Man findet sie in jeglicher aquatischer Umgebung, in Süß- und Salzwasser, sowie auch im Erdboden. Sie messen meist zwischen 20 und 200  $\mu\text{m}$  in Diameter oder Länge, können aber auch eine Größe von bis zu 2 mm erreichen und vereinzelt oder in Kolonien organisiert vorliegen. Diatomeen gehören zu den wichtigsten aquatischen Primärproduzenten und bilden die Hauptmasse des Phytoplanktons der Ozeane. Die Primärproduktion wird auf 200 - 400 g Biomasse/Kubikmeter/Jahr geschätzt. Sie bilden eine wichtige Nahrungsquelle für viele andere Organismen.

Die Zellen der Diatomeen sind von einer einzigartigen Zellwand aus Siliziumdioxid und organischen Molekülen umgeben, genannt Frustule. Sie besteht aus zwei Teilen, die sich wie bei Petrischalen überlappen und von zwei, ebenfalls aus Siliziumdioxid bestehenden Gürtelbändern umschlossen sind. Den größeren Teil nennt man

Epitheka und den unteren, kleineren Teil Hypotheka. Der kleinere Teil wird bei der Zellteilung immer ersetzt. Somit wird ein Teil der Nachkommenschaft bei der asexuellen Vermehrung immer kleiner, bis dann die Produktion von Gameten und eine sexuelle Vermehrung folgt.

Die Frustules besitzen regelmäßig angelegte Poren oder Schlitze im Größenbereich von 10 bis 1000 nm und sind von Art zu Art unterschiedlich. Diese Öffnungen in den Frustules erlauben einen Stoffaustausch (Gasaustausch, Nährstoffe) zwischen der Algenzelle und ihrer Umgebung. Anhand der Zellwand werden die Diatomeen in zwei Klassen eingeteilt: die Centrobacillariophyceae, welche eine radiale Symmetrie aufweisen, und die Pennatibacillariophyceae, welche eine bilaterale Symmetrie besitzen. Diatomeen können in großen Mengen auftreten. Ihre Frustules bildeten im Laufe der Geschichte Sedimente (Kieselgur), bei denen ein Kubikzentimeter etwa 4,6 Millionen Schalen enthält. Diese Sedimente werden kommerziell als Bestandteile von z.B. Farben oder Filtern genutzt, liefern aber auch wissenschaftlich wertvolle Hinweise auf die herrschenden Umweltbedingungen in den jeweiligen Zeitaltern. Die ältesten Fossilien reichen bis in die Kreidezeit vor 135 Millionen Jahren zurück.

Die Diatomeen gehören neben den Schwämmen zu den intensivst untersuchten Organismen im Bezug auf den Mechanismus der Polykondensation, den Metabolismus und den Transport von Silizium. Die Orthokieselsäure wird mit Hilfe von membrangebundenen Kieselsäuretransportern in der Zelle angereichert. Fünf verschiedene Gene für „*silicic acid transporter (SIC)*“ wurden von *Cylindrotheca fusiformis* isoliert. Diese stehen für integrale Membranproteine mit 10 membranspannenden Domänen und einer langen hydrophilen karboxyterminalen Region. Diese neue Klasse von Transportern ist bisher einzigartig und zeigt keine Homologien zu Arten außerhalb der Diatomeen. Dennoch ist es möglich, sie funktional durch eine Überexpression in *Xenopus laevis* Oozyten zu charakterisieren (Hildebrand, 1998). Die fünf Transporter besitzen spezielle Funktionen bei der Silikataufnahme. Es wird angenommen, dass die Zelle durch die Kontrolle der Anzahl und der Lokalisation dieser Transporter ihre Siliziumaufnahme steuern kann (Hildebrand, 2003).

Die Bildung der neuen Zellwand findet in speziellen membrangebundenen Vesikeln statt, den „*silica deposition vesicles*“ (SDV). Innerhalb dieser Vesikel befinden sich Proteine, welche die Polymerisation von Silizium steuern und als Matrix für die Biosilifizierung dienen. Zwei Silikat assoziierte organische Komponenten wurden

gefunden. Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, die Sillafine und langkettige Polyamide (LCPA). Sillafine sind hoch modifizierte Proteine, die einen hohen Anteil an Hydroxyaminosäuren (Serin, Threonin, Hydroxyproline) besitzen. Sillafin-1 und LCPA beschleunigen die Silikatpolymerisation aus Kieselsäure in vitro (Kröger, 2000). Es wurden in *Cylindrotheca fusiformis* mehrere Sillafine gefunden, natSil1A, natSil1B und natSil2, wobei natSil2 alleine keine schnellere Silikatbildung bewirkt, sondern wahrscheinlich regulatorische Funktionen besitzt. Kombinationen aus natSil2 und natSil1 bzw. LCPA führten bei dem gebildeten Silikat zu einer Diatomeen charakteristischen Porengröße zwischen 100 und 1000nm (Poulsen, 2003). In *Thalassiosira pseudonana* sind sogar fünf Sillafine (tpSil1H, tpSil-1L, tpSil-2H, tpSil-2L, und tpSil-3) identifiziert worden. Diese Sillafine zeigen keine Sequenzhomologie zu denen von *C. fusiformis*, besitzen aber Ähnlichkeiten in Aminosäurezusammensetzung und posttranslationalen Modifikationen. LCPA dagegen liegen in fünf untersuchten Arten stark konserviert vor und unterscheiden sich nur in der Kettenlänge und dem Methylierungsgrad (Sumper, 2002).

### 1.5.3 Höhere Pflanzen

Die Konzentration von Silizium in höheren Pflanzen reicht von 0,1 bis 10% des Trockengewichtes und übersteigt dadurch sogar die Konzentration einiger Makroelemente (Epstein, 1999). Die Fähigkeit der Pflanzen, Silizium zu akkumulieren, variiert von Art zu Art. Pflanzen der Familien Poaceae, Equisetaceae und Cyperaceae akkumulieren Silizium in größeren Mengen (über 4%) ihres Trockengewichtes. Die Cucurbitales, Urticales und Commelinaceae besitzen 2-4% Siliziumgehalt, währenddessen andere Arten eine geringere Akkumulation zeigen (Hodson, 2005).

Die aufgenommene lösliche Form des Siliziums als  $\text{Si(OH)}_4$  oder  $\text{Si(OH}_3\text{)O}^-$  polymerisiert kontrolliert in definierten Bereichen der Pflanze. So zeigen bestimmte Teile von Pflanzen starke Konzentrationsunterschiede. Bei Reis variiert der Gehalt an Silikat innerhalb der Pflanze enorm. Er reicht von 0,5 g/kg in geschältem Reis bis hin zu 350 g/kg an den Verbindungsstellen des Getreidekorns mit der Blattspindel (Van Hoest, 2006). Allerdings ist der Mechanismus der Siliziumpolymerisation in Pflanzen kaum bekannt. Man weiß, dass nach der Aufnahme Phytolithen oder Silikatkörper

gebildet werden, welche die Zellwand oder das Lumen bestimmter Zellen ausfüllen (Prychid, 2004).

Silizium erleichtert in höheren Pflanzen biotische und abiotische Stresssituationen. Von der Pflanze werden durch Zugabe von Silizium vermehrt antifungale Substanzen gebildet (Rodrigues et al., 2003) und silifizierte Strukturen in der Pflanze können den Hitzestress reduzieren (Wang et al., 2005). Deswegen wird Silizium in künstlichen Düngemitteln verwendet, auch wenn an den zugrundeliegendem Schutzmechanismen noch geforscht wird.

#### **1.5.4 Schwämme**

Der Tierstamm der Schwämme (Porifera) gehört zu den Parazoa (Gewebslosen) und repräsentiert die ältesten rezenten Vielzeller (Metazoa) des Tierreiches. Nach paläontologischen, morphologischen und embryologischen Studien wird das Alter auf 550 Millionen Jahre geschätzt (Westheide und Rieger, 1996). Molekularbiologische Untersuchungen lassen sogar auf ein Alter von 800 Millionen Jahren schließen (Müller, 1998).

Durch das Fehlen von „echtem Gewebe“, Organen, Nervensystemen und Gonaden konnten die Schwämme lange keiner taxonomischen Klasse zugeordnet werden. Erst 1896 gelang dies Ernst Haeckel anhand von ontologischen und histologischen Daten. Von den etwa 15000 heute lebenden Arten sind bisher nur etwa 8000 beschrieben worden (Hooper und van Soest, 2002). Die Mehrheit der Schwämme siedelt im marinen Benthos, nur wenige Arten sind im Süßwasser zu finden (Westheide und Rieger, 1996). Sie besitzen eine sessile Lebensweise und kommen sowohl im lichtdurchfluteten Flachwasser, als auch in lichtarmen Zonen wie Höhlen, und in Meerestiefen von bis zu 6000 m vor (Göthel, 1997). Die meisten Schwämme leben auf Hartböden, einige besiedeln aber auch Weichböden, Molluskenschalen oder Pflanzen. Ihre Größe ist je nach Art sehr variabel und reicht von wenigen Millimetern bis zu mehreren Metern.

Fast alle Schwämme sind Strudler, die durch das Filtrieren von großen Mengen an Wasser (bis zu 1000 l/Tag (Thuron, 1997) je nach Filtrieraktivität und Größe des Schwammes) Nahrung in Form von Pico-Nanoplankton, Bakterien und koloidal gelösten Macromolekülen aufnehmen. Durch den koordinierten Geißelschlag von

Choanocyten (Kragengeißelzellen) wird das Wasser durch viele kleine einführende Poren (Ostien) in ein komplexes, den Schwammkörper durchziehendes Kanalsystem eingestrudelt und dann durch ausführende Kanäle, meist zentral in einer großen ausführenden Pore (Osculum), abgegeben. Dabei werden neben der Nahrungsaufnahme die Zellen mit Sauerstoff versorgt und Stoffwechselendprodukte ausgeschleust. Je nach Anordnung des Kanalsystems und des Gastralraumes können drei morphologische Bautypen unterschieden werden: der Ascon-Typ, der Sycon-Typ und der Leukon-Typ. Der Ascon-Typ ist die einfachste Bauform, bei der der schlauchförmige Körper nur einen zentralen Hohlraum aufweist, der einer überdimensionalen Geißelkammer gleicht. Bei dem Sycon-Typ gehen sogenannte Radialtuben, mit Choanocyten ausgekleidete, becherförmige Taschen, von einem zentralen Hohlraum, der keine Choanocyten besitzt, aus. Dadurch wird eine Oberflächenvergrößerung erreicht, sodass Schwämme des Sycon-Typs eine größere Bauform als die des Ascon-Typs aufweisen können (2 – 10 mm). Alle größeren Schwämme gehören zum Leukon-Typ. Hier geht von einem Hohlraum ein verzweigtes Kanalsystem aus, von dem wiederum zahlreiche mit Choanocyten ausgekleidete Geißelkammern abzweigen.

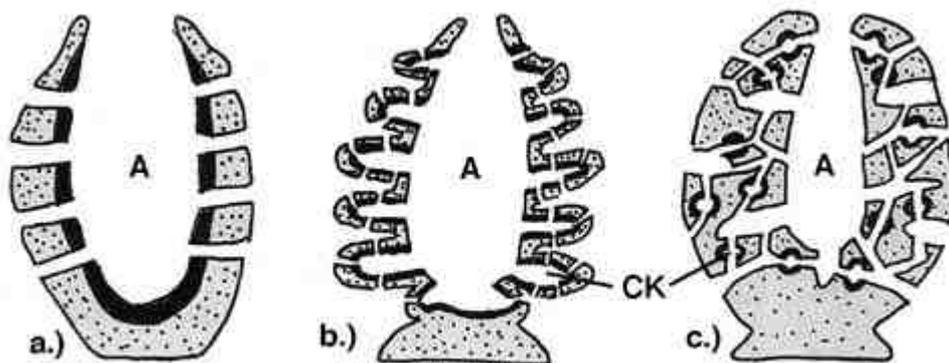


Abb. 4: Die Grundbaupläne der Schwämme: a.) Ascon-Typ, b.) Sycon-Typ, c.) Leukon-Typ. Die dicken schwarzen Linien markieren das Choanosom. Vom Ascon-Typ bis zum Leukon-Typ vergrößert sich die Oberfläche des Choanosoms welches zu einer effektiveren Nahrungsaufnahme führt. A= Atrium, CK= Choanocytenkammer (verändert nach Gruner, 1980).

Die meisten Schwämme bilden ein hartes Skelett, bestehend aus vielen, einzelnen oder verbundenen Nadeln, den Spicules. Die Form der Spicules und deren Vorkommen im Schwamm sind artspezifisch und lassen Taxonomen die Schwämme

in drei Gruppen einteilen: die Calcerea (Kalkschwämme), die Demospongiae (Hornkieselschwämme) und die Hexactinellida (Glasschwämme).

Die Calcerea zeichnen sich durch ein Skelett aus Calciumcarbonat aus (Kruse *et al.*, 1997) und sind die einzige Gruppe, in der alle drei Bauformen (Ascon-, Sycon- und Leucon-Typ), vorkommen. Die Demospongiae und die Hexactinellida haben ausschließlich die Bauform des Leucon-Typs und besitzen größtenteils Spicules aus Siliziumdioxid (mit Ausnahme einiger Demospongiae, die ein Skelett aus Kollagen ausbilden, wie z.B. *Spongia officinalis*).

Die Spicules der Hexactinellida unterscheiden sich von denen der Demospongiae im äußeren Aussehen darin, dass sie immer drei oder sechsachsig gestaltete Spicules aufweisen, im Gegensatz zu den einachsigen oder vierachsigen der Demospongiae. Außerdem haben die Hexactinelliden im Querschnitt ein quadratisches Axialfilament, die Demospongiae dagegen ein drei- bzw. sechseckiges.

#### **1.5.4.1 Die Hexactinellida (Glasschwämme)**

Die Glasschwämme leben hauptsächlich in der Tiefsee unterhalb von 500 m und sind in allen Weltmeeren zu finden. Es sind nur vier Orte bekannt, an denen sie in flachem Wasser vorkommen: die Antarktis, südliches Neu Seeland, Unterwasserhöhlen im Mittelmeer und die Küstengewässer des Nordpazifiks.

Hexactinellida unterscheiden sich von anderen Tieren (und auch anderen Schwämmen) durch ihren großteils (ca 75% vom Weichkörper) synzytialen Aufbau (trabecular synzytium), der aus der Fusion früher Embryonalzellen hervorgeht. In einem einzigen verästelten, den Schwamm durchziehenden zytoplasmatischen Bereich, enthält das Synzytium Tausende von Zellkernen. Es beinhaltet die dermalen und atrialen Membranen und trennt das lebende „Gewebe“, die Geißeln der Choanozyten ausgenommen, von dem Wasserstrom durch den Schwamm (Leys, 2007). Dieses Syzytium erlaubt nicht nur die schnelle Verteilung von Nährstoffen, sondern auch die Weiterleitung von elektrischen Signalen (Leys, 2007).

Wie auch in anderen Schwammgruppen wird bis heute die Taxonomie der Glasschwämme anhand deren Spicules und Skelette durchgeführt, wodurch die Hexactinellida in zwei Unterklassen eingeteilt werden: die Amphidiscophora und die Hexasterophora (Schulze, 1886). Die Amphidiscophora unterscheiden sich

gegenüber den Hexasterophora im Vorhandensein bestimmter Mikrosklerin, der sogenannten Amphidiscen in den Amphidiscophora bzw. der Hexastern in den Hexasterophora. Diese beiden Nadeltypen besitzen unterschiedliche charakteristische Formen.

Die Unterklasse Amphidiscophora besteht aus einer rezenten Ordnung mit drei Familien: den Monorhaphididae mit Tauaktinen als typische Nadelform, den Hyalonematidae mit Diaktinen und den Pheronematidae mit Pentaktinen. Die Klassifizierung der Hexasterophora mit ihren fünf Ordnungen, den Hexactinosida (Schrammen, 1903), den Aulocalycoida (Tabaschnik und Reiswig, 2000), den Fieldingidae (Tabaschnik und Jannussen, 2004), den Lychniscosida (Schrammen, 1903) und den Lyssacinosida (Zittel, 1877) werden durch neue Erkenntnisse auf Familien- und Ordnungsebene zur Zeit immer wieder neu eingeteilt (Leys, 2007).

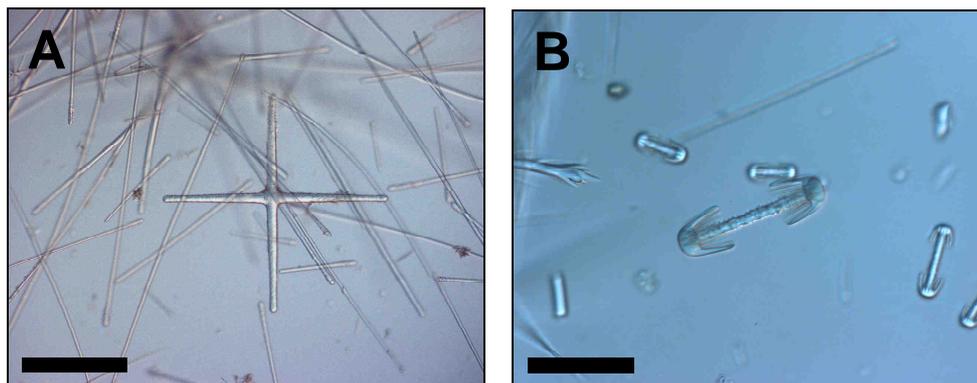


Abb. 5: Bilder von Nadeln der Hexactinelliden. Bild A zeigt Nadeln von *Crateromorpha meyeri*. In Bild B ist ein Nadeltyp der Amphidiscen von *Monorhaphis chuni* zu sehen, der ein taxonomisches Erkennungsmerkmal der Amphidiscophora darstellt. Messbalken A: 200  $\mu$ m; B: 50  $\mu$ m.

#### 1.5.4.2 Monorhaphididae

Die Familie der Monorhaphididae (Hexactinellida, Amphidiscophora) wurde 1927 von Ijima aufgestellt. Zuvor wurde *Monorhaphis* von Schulze (1904) mit *Semperella* der Familie Semperellidae zugeordnet. Die Familie ist im Indo-Westpazifik verbreitet und kommt in Tiefen von 516 bis 1920 m vor (Hooper und van Soest, 2002). Sie unterscheidet sich von anderen Amphidiscophora hauptsächlich durch das überwiegende Vorkommen von Triactinen unter den Megasklerin, sogenannten

Tauactinen, im choasomalen Schwammkörper. Ausserdem besitzt die Familie der Monorhaphidae eine einzige große Pfahlnadel zur Verankerung des Schwammkörpers im schlammigen Untergrund.

Durch seine großen Nadeln ist Monorhaphis besonders gut für die Untersuchungen des Aufbaus der Silikatnadeln geeignet.

## 1.6 Nadelbildung

Bei *Tethya aurantium* wurde gezeigt, dass dort der Prozess der Silikatpolykondensation enzymatisch katalysiert wird (Shimizu *et al.*, 1998, Cha *et al.*, 1999). Das hierfür verantwortliche Enzym wurde erstmals von der Arbeitsgruppe Morse beschrieben (Cha *et al.*, 1999) und als Silicatein (*Silica protein*) bezeichnet. Später wurde es auch in anderen Demospongiae, unter anderem *Suberites domuncula* (Krasko *et al.*, 2000) und *Lubomirskia baikaliensis* (Kaluzhnaya *et al.*, 2007), nachgewiesen. In marinen Demospongiae, wie z.B. *Suberites domuncula*, wurden zwei Isoformen, Silicatein  $\alpha$  und Silicatein  $\beta$  identifiziert, währenddessen in dem Süßwasserschwamm *Lubomirskia baikaliensis* mehr als fünf Isoformen gefunden wurden (Müller *et al.*, 2007).

Die Aminosäuresequenz von Silicatein zeigt hohe Ähnlichkeiten mit der von Cathepsin L (Cha *et al.*, 1999; Krasko *et al.*, 2000), wobei sie sich in einer Aminosäure im aktiven Zentrum unterscheiden. Die katalytische Triade in Cathepsin L besteht aus Cystein, Histidin und Asparagin, wohingegen bei den Silicateinen Serin anstelle von Cystein vorkommt. Silicatein bildet zum großen Teil das Axialfilament der Spicules und ist auch an der Außenseite zu finden, wo es für das lamellare Dickenwachstum verantwortlich ist (Müller *et al.*, 2006).

Der Beginn der Nadelbildung in *Suberites domuncula* erfolgt intrazellulär in bestimmten Kompartimenten von spezialisierten Zellen (Skleroplasten). Beim Erreichen einer bestimmten Größe werden die Spicules dann in den extrazellulären Raum abgegeben, wo das weitere Wachstum erfolgt. Durch ein appositionales Wachstum (Schröder *et al.*, 2007) erhalten die Spicules einen lamellaren Aufbau, der bei dickeren Nadeln der Hexactinelliden aus über 400 konzentrischen Ringen bestehen kann.

## 1.7 Nadelaufbau und Form

Spicules werden generell anhand ihrer Größe, Form und Funktion in Mega- und Mikroskieren eingeteilt. Megaskieren haben typischerweise eine Größe zwischen 0,2 und 30 mm und besitzen eine Gerüstfunktion. Die größte beschriebene Struktur aus biogenem Opal auf der Erde mit bis zu 1 cm Durchmesser und 3 m Länge (Schulze, 1904) ist die Pfahlnadel von *Monorhaphis chuni*, mit der sich der Schwamm im schlammigen Boden verankert. Mikroskieren haben meist einen geringeren Durchmesser als 0,1 mm mit noch unbekannter Funktion, wobei die Unterscheidung zwischen Mega- und Mikroskieren bei einigen Spiculae wegen der teils überlappenden Größen eine subjektive Einordnung darstellt. Je nach Art können zwischen zwei und 12 unterschiedliche Nadeltypen vorkommen und entweder vereinzelt im Schwammkörper vorliegen und/ oder rigide Skelettkonstruktionen aus physikalisch verbundenen Spiculae bilden. Ein weiteres Unterscheidungs- und Benennungskriterium ist die Anzahl und die Stellung der Achsen. Bei einachsigen Spiculae spricht man von Monaxonen, bei zweiachsigen von Diaxonen, bei einstrahligen von Monactinen, zweistrahligen von Diactinen.

Die Dichte von Schwammnadeln beträgt  $2,03 - 2,13 \text{ g/cm}^2$  und ist dem von Opal ( $\text{SiO}_2 \times 1,5 \text{ H}_2\text{O}$ ) mit  $2,09 \text{ g/cm}^2$  sehr ähnlich. Die durchschnittliche chemische Zusammensetzung besteht aus 85,2%  $\text{SiO}_2$ , 12,3% Wasser und 2,5% anderer Elemente (hauptsächlich S, Al, K, Ca, Na) (Sandford, 2003).

Schwammnadeln aus Silikat besitzen generell einen lamellaren Aufbau, der durch das appositionelle Wachstum entsteht. Der Axialkanal ist zwischen 2 und 4  $\mu\text{m}$  groß, aber nicht proportional zu der Nadeldicke. Der anfängliche, zentral das Axialfilament umfassende Ring wird als Axialzylinder bezeichnet, die sekundären äußeren Lamellen als periphere, lamellare Zone. Die Anzahl der Lamellen bestimmt die Dicke der Nadel. Meist haben die Lamellen eine Dicke von 3 bis 7  $\mu\text{m}$ .

## 1.8 Optische Eigenschaften von Megaskleren der Hexactinelliden

Die größeren Schwammnadeln der Hexactinelliden haben erstaunliche optische Eigenschaften, die oftmals mit künstlichen Lichtleitern (Glassfaser) verglichen werden. Nadeln von *Rosella racovitzae* (Cattaneo-Vietti, 1996), *Euplectella aspergillum* (Aizenberg *et al.*, 2003) und *Hyalonema Sieboldi* (Müller *et al.*, 2005) wurden in verschiedenen Studien auf ihre optischen Leitfähigkeiten untersucht. Sie ähneln kommerziellen optischen Leitern der Telekommunikation in gleichen Dimensionen, gleichem Material und gleichem Brechungsindex. In der Mitte ist der Brechungsindex sowohl bei den natürlichen Nadeln als auch dem künstlichen Lichtleiter sehr hoch, während er außen in der Hülle niedrig ist. Somit können beide, in Abhängigkeit des Brechungsindex der Umgebung, als Multimodefaser oder als Singlemodefaser fungieren (Aizenberg, 2003).

Die natürliche Nadel hat im Vergleich zu der künstlichen Faser die Vorteile, dass sie eine höhere mechanische Stabilität besitzt und bei niedrigen Temperaturen hergestellt wird. Diese Eigenschaften sind für die kommerzielle Nutzung und Produktion von optischen Leitern interessant und können helfen, diese nach dem Vorbild der Natur zu verbessern.

In *Rosella* erhöhen kreuzartige Strukturen am Ende der Nadeln die Lichtaufnahme bei verschiedenen Einstrahlwinkeln (Cattaneo-Vietti, 1996) und wirken wie ein Lichtsammelsystem. Bei den Basalnadeln von *Hyalonema* wurde die Lichtweiterleitung genauer untersucht und dabei eine Filtereigenschaft entdeckt, wobei die Nadeln Wellenlängen unter 615 nm und über 1310 nm herauschneiden (Müller *et al.*, 2005). Sie wirken somit wie ein kombinierter Hoch- und Tiefpassfilter. Die biologische Relevanz der Lichtleiteigenschaften der Nadeln für die Schwämme ist noch nicht geklärt. In *Rosella racovitzae* befinden sich Diatomeen in naher Umgebung der Nadeln, die eventuell durch diese mit Licht versorgt werden. Die meisten Hexactinelliden wie zum Beispiel auch *Hyalonema* oder *Euplectella* leben aber in Meerestiefen, in denen kein Licht für endosymbiontische Algen zur Verfügung steht und somit diese Nutzung der Lichtleitfähigkeiten ausgeschlossen ist. In dieser Umgebung spielen vor allem Bio- und Chemielumineszenz eine Rolle. Bestimmte Schwammlarven reagieren auf Licht der Wellenlängen zwischen 440 und 600 nm (Leys *et al.*, 2002) und könnten mit Hilfe der lichtleitenden Nadeln angelockt werden. In dem Demosponge *Suberites domuncula* wurde ein, den Insektenluciferasen

ähnliches Gen identifiziert, was auf ein photorezeptives System in Schwämmen hindeuten könnte. Inwiefern die Lichtleiteigenschaften der Nadeln von dem Schwamm oder dessen Symbionten genutzt werden, oder ob sie nur ein sekundärer Effekt der mechanisch belastbaren Nadelstruktur sind, wird zurzeit erforscht.

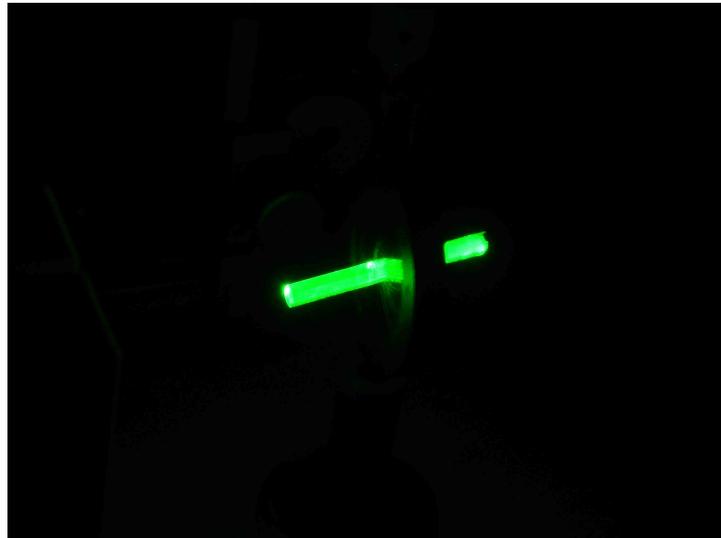


Abb. 6: Ein Teil der Pfahlnadel von *M. chuni* bei Laserbestrahlung.

### 1.9 Mechanische Eigenschaften von Megaskleren und Skeletten der Hexactinelliden

Neben ihren optischen Eigenschaften besitzen die Pfahlnadeln der Hexactinelliden auch außergewöhnliche mechanische Eigenschaften, die der eines aus purem Silikat bestehenden Glasstabes gleichen Diameters bei weitem übertreffen. Sie sind elastischer, so dass es möglich ist, längere Schwammnadeln soweit zu biegen, dass sie, ohne zu brechen, einen Kreis formen und danach wieder automatisch in ihre alte, gerade Form zurückkehren.

Anhand von 3-Punkt Biegeversuchen an Nadeln von *Monorhaphis chuni* kann man drei Hauptunterschiede im Vergleich zu Biegeversuchen an puren Glasstäben feststellen (Levi *et al.*, 1989): (1) der Glasstab besitzt eine höhere Rigidität; (2) bei der Schwammnadel ist der maximale Stress weitaus größer; (3) der Belastungsanstieg des Glasstabes ist annähernd linear, wohingegen der Belastungsanstieg der Nadel geringfügige Unregelmäßigkeiten im ansteigenden

Bereich und starke im abnehmenden Bereich durch das Brechen der Silikatschichten aufweist.

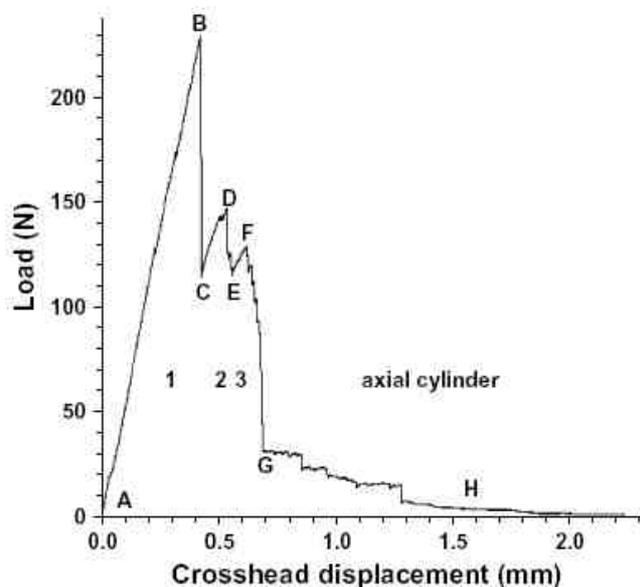


Abb. 7: Ergebnis eines 3-Punkt Biegeversuch der Pfahnadel von *M. chuni*. 3 verschiedene Bruchereignisse (1-3) von mehreren Lamellen sind markiert. A-B zeigt den linearen Anstieg bis zum ersten Bruchpunkt B (elastische Antwort) und den darauf folgenden Ausschlag nach C. Zwei weitere Brüche ereignen sich (C-D-E und E-F-G) bevor der Axialzylinder bricht (verändert nach Müller *et al.*, 2007).

Der spezielle lamellare Aufbau der Schwammnadeln ist hauptverantwortlich für ihre mechanischen Eigenschaften. Durch Biegungen hervorgerufene Brüche werden beim Erreichen der nächsten Lamelle gestoppt und setzen sich dann bei höherer Belastung an einer anderen Stelle der nächsten Lamelle fort. Dadurch erreichen Nadeln eine 6 bis 7-fache Energieumwandlung im Vergleich zu kompakten Glasstäben, bevor sie zerbrechen (Mayer *et al.*, 2005).

Die Stabilität der Nadeln ist für den Schwamm von wichtiger Bedeutung, da sie dazu beiträgt, die morphologische Festigkeit des Körperbaus und des wasserführenden Systems zu gewährleisten, und/oder sich auf dem Untergrund zu verankern. Neben einzelnen Nadeln bilden einige Schwämme auch teilweise komplexe Skelettstrukturen aus vielen zusammenhängenden Nadeln, wie z.B. viele Hexactinelliden (*Aphrocallistes vastus*, *Euplectella aspergillum*) und eine Gruppe der Demospongiae, die Lithistida (Schmidt, 1870).

Das komplexe Silikatskelett von *Euplectella aspergillum* wurde von Weaver *et al.* auf seine mechanische Stabilität untersucht. Sechs hierarchische Ebenen wurden identifiziert, die zur Festigkeit des Skelettes beitragen (Weaver *et al.*, 2006). Diese reichen vom Nanometerbereich (Nadeln) bis hin zu Zentimetern (Skelettstruktur) und steigern jeweils die Rigidität des Skelettes.

## 2.0 Zielsetzung

Im Laufe ihrer Evolution haben viele biologische Organismen die Fähigkeit entwickelt, anorganisches Material zu synthetisieren. Dieses bewerkstelligen sie üblicherweise unter milden Reaktionsbedingungen wie physiologischem pH, Umgebungstemperatur und Umgebungsdruck. Von vielen Lebewesen (zum Beispiel Protozoen, Schwämme, höhere Pflanzen) gebildetes amorphes, hydratisiertes Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$ ) stellt weltweit gesehen den größten Teil des gebildeten anorganischen Materials dar (Simpson *et al.*, 1981). Diatomeen, Radiolarien und Schwämme sind dazu befähigt, dreidimensionale Strukturen aus hydratisiertem amorphen Silikat mit erstaunlicher Komplexität sowohl im Nano- (<100 nm), Micro- (0,1 – 100  $\mu\text{m}$ ), als auch im Makrobereich (>100  $\mu\text{m}$ ) herzustellen. Schon am Anfang des letzten Jahrhunderts wurden viele dieser Silikatformen beschrieben (Haeckel, 1896; Schulze, 1925), aber erst in den letzten 10 Jahren wurden bei Diatomeen und Schwämmen Proteine nachgewiesen, die für die Biosilifikation in den jeweiligen Organismen verantwortlich sind (Kröger *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1998). In Schwämmen der Familie der Demospongia handelt es sich hierbei um das Enzym Silicatein, das die Biosilifikation katalysiert und auch als Matrize dient. Die neuere Forschung der Biosilifikation in Schwämmen fokussierte sich auf einige wenige Modellorganismen der Demospongia (Hornkieselschwämme). In unserer Arbeitsgruppe konnten schon am Beispiel des marinen Schwammes *Suberites domuncula* weitere Fortschritte zur Aufklärung der Nadelbildung erreicht werden.

Die zweite Familie der silikatbildenden Schwämme, die Hexactinellida (Glasschwämme), wurde bisher biochemisch kaum untersucht. Die Hexactinellida können neben kleinen Nadeln unter 100  $\mu\text{m}$  Länge (Mikrosklern) bei der gleichen Schwammart auch Nadeln bis zu einer Länge von 3 m, die längste natürliche Silikatstruktur der Erde, bilden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Untersuchungen zur Morphologie, der chemischen Zusammensetzung, der Verteilung und Charakterisierung der beteiligten anorganischen und organischen Komponenten sowie ein molekularbiologischer Nachweis der Existenz von Silicatein in Hexactinelliden durchgeführt werden. Als Modellorganismen wurden die Schwämme *Monorhaphis chuni* (Amphidiscophora, Amphidiscosida, Monorhaphidae) und *Crateromorpha meyeri* (Hexasterophora, Lyssacinosa, Rossellidae, Rossellinae) gewählt.

### 3.0 Material

#### 3.1 Chemikalien

Alle Standard Laborchemikalien und Antibiotika wurden in p.a.-Qualität von den folgenden Herstellern bezogen:

Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma, Taufkirchen
Blockierungs-Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylpyrocarbonat	Sigma, Taufkirchen
dNTP-Mix	MB enzymes, Münster
Essigsäure, konz.	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Flüssiger Stickstoff	Linde, Wiesbaden
Flußsäure	Sigma, Taufkirchen
Formamid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
GelCode Färbereagenz Blau	Pierce, Bonn
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe

---

Kalziumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Sigma, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhypochlorid	Roth, Karlsruhe
Nitroblau-Terazoliumchlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
Poly-L-Lysin (MW: 70000-150000)	Sigma, Taufkirchen
Protein Längenstandard SDS-PAGE	BioRad, München
RNAse away	MolecularBioProducts, San Diego
Roti-Quant Bradford Reagenz	Roth, Karlsruhe
Salpetersäure, konz.	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure, konz.	Roth, Karlsruhe
Sequagel XR	National Diagnostics, Atlanta
Sequagel complete	National Diagnostics, Atlanta
Sypro Ruby Protein Gel Stain	Sigma, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
TRizol Reagenz	Gibco, Eggenstein
Tween 20 (Poly(oxyethylen) <sub>20</sub> sorbitan- manalaurat	Roth, Karlsruhe
X-Phosphat	Sigma, Taufkirchen

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch Servapor 50 mm	Serva, Heidelberg
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
ELISA-Platten 96 well	Abgene, Hamburg
Falcon-Reaktionsgefäße	Becton und Dickinson, NJ, USA
Filterpapier	Pharmacia, Freiburg
Latexhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Mörser und Pistill, Porzellan	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schüll, Dassel
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm M	American National Can, Greenwich, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
PCR-Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml	Abgene, Hamburg
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
PVDF Membrane Hybond	Amersham, Freiburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Whatman 3MM Papier	Whatman, über Fisher, Frankfurt

### 3.3 Geräte

DNA-Sequenzierer Licor 4200	Licor über MWG Boitec, Ebersberg
Elektrophoresekammer	BioRad, München
Feinpipetten (100-1000 µl; 20-200 µl; 2-20 µl; 0,5-10 µl; 0,5-2 µl)	Gilson, Frankreich
Fluoreszenzmikroskop AH3	Olympus, Planegg
Geldokumentationssystem	UVP, Cambridge, GB
Geldokumentationssystem Gel Doc	BioRad, München
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Biofuge fresco	Kendro, Hanau

Laminar Flow	Slee, Mainz
Magnetrührer Ikamag RCT MR 2002	IKA Labortechnik, Staufen
Mini-Protean II Proteingelsystem	BioRad, München
PA-Gelelektrophoreseeinheit Protean Mini	BioRad, München
PH-Meter pH 330 Set 2	WTW, Weilheim
Powersupply für Gelelektrophorese	BioRad, München
Schüttelinkubator Certomat H	Braun, Melsungen
Semi-dry Blotting Apparatur TransBlot SD	BioRad, München
Spectrophotometer Amart Spec 3000	BioRad, München
Sterilisator	WTB Binder, Tuttlingen
Thermal Cycler „iCycler“	BioRad, München
Thermal Cycler “MyCycler”	BioRad, München
Ultraschall-Homogenisator	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Waage PT 120	Sartorius, Göttingen
Waage R6	Mettler-Spoerhase, Gießen
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge HF 120	Tomy Seiko, Tokyo, Japan

### 3.4 Enzyme und Antikörper

Taq-DNA-Polymerase, SAWADY	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
SuperScript III (Reverse Transkriptase)	Invitrogen, Karlsruhe
Restriktionsenzyme (EcoRI)	Sigma, Taufkirchen
Anti-Rabbit-IgG-Alkalische Phosphatase (Ziege)	Sigma, Taufkirchen
Polyklonaler Anti-Silicatein Antikörper (Rabbit)	AG Prof. W.E.G. Müller, Universität Mainz

### 3.5 Kits

High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
NucleoSpin Plasmid DNA purification	Machery und Nagel, Düren
Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-GTP	Amersham, Freiburg
SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe
NucleoSpin Extract II	Machery und Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid	Machery und Nagel, Düren
pCR II TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Sequagel Complete	National Diagnostics, Atlanta, USA

### 3.6 Primer

Vektorspezifische Primer:

M13(-20):	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'	$T_m = 59^\circ\text{C}$
SP6:	5' TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C 3'	$T_m = 60^\circ\text{C}$
SP6 800:	5' CTA TTT AGG TGA CAC TAT AG 3'	$T_m = 51^\circ\text{C}$
T3:	5' CGG AAT TAA CCC TCA CTA AAG 3'	$T_m = 60^\circ\text{C}$
T7:	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'	$T_m = 64^\circ\text{C}$

Genspezifische Primer:

Sd_silic_rev1	CCC AGC TGT TCT TGA GGA GCC AGT AAT	$T_m = 56^\circ\text{C}$
Sd_silic_for2	CTC AGT GAG CAG AAC GTT ATT GAC TGC TC	$T_m = 56^\circ\text{C}$

### 3.7 Verwendeter Bakterienstamm

TOP10

Invitrogen, Karlsruhe

Genotyp: F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  
 $\Phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *deoR* *araD139*  $\Delta$ (*araleu*)  
 7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*

#### 3.7.1 Bakterienkulturmedium

---

##### **LB-Medium**

---

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

---



---

##### **LB-Agar**

---

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

---



---

##### **Einfriermedium**

---

50	%	Glycerin (v/v)
50	%	LB-Medium (v/v)

---

### 3.8 Computerprogramme und Internetdienste

BLAST Protein und [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (Altschul *et al.*, 1997)

Nukleotidsequenzvergleiche

DNA-Star V 4.04

DNA-Star Inc

e-Seq V2.0 DNA Sequenzier und

Licor, über MWG Ebersberg

Analysesoftware

SMART

Simple Modular Architecture Research Tool

<http://smart.embl-heidelberg.de>

Spongebase Mainz

<http://spongebase.genoserv.de>

Vector NTI

Invitrogen

Proteinmodifikationen

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

### **3.9 Schwämme und Schwammnadeln**

#### **3.9.1 *Monorhaphis chuni* (Porifera, Hexactinellida, Amphidiscophora)**

Die verwendeten Nadeln wurden von dem Museum für Naturkunde in Berlin bereitgestellt. Sie wurden entweder getrocknet oder in Ethanol gelagert.

Weitere Nadeln stammten von einer chinesischen Expedition im West-Pazifik, Okinawa (Jinhe Li, 1981) und wurden in 900 m Tiefe gesammelt.

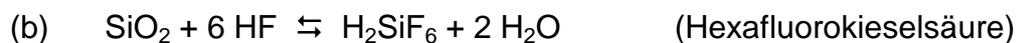
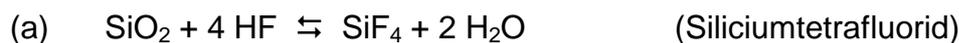
#### **3.9.2 *Crateromorpha meyeri* (Porifera, Hexactinellida, Lyssacinosida)**

Lebende Exemplare von *Crateromorpha meyeri* wurden in der Sagami Bucht, Japan gesammelt (Eckert und Janussen, 2005). Proben wurden direkt tiefgefroren und später in der Forschungsabteilung des Senckenberg Museums in Frankfurt gelagert.

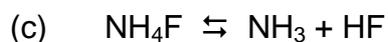
## 4.0 Methoden

### 4.1 Demineralisation der Nadeln durch Flusssäure für die Lichtmikroskopie

Um innerhalb von Schwammnadeln andere Bestandteile neben Silikat ( $\text{SiO}_2$ ) freizusetzen, wurde das Silikat mit Flusssäure (HF) aufgelöst. Damit wurden weitere Bestandteile der Nadel freigelegt. In wässriger Lösung ist die Flusssäure eine mittelstarke Säure mit einem pKs-Wert von 3,14. Sie ist die einzige Säure, die Siliziumdioxid aufzulösen vermag. Es entstehen bei der Reaktion mit Siliziumdioxid Fluorokomplexe wie gasförmiges Siliciumtetrafluorid (a) oder lösliche Hexafluorokieselsäure (b).



Zum Auflösen der Nadeln wurde mit Ammoniumfluorid gepufferte Flusssäure (Buffered Oxide Etch) benutzt. Ammoniumfluorid kontrolliert den pH-Wert und hält die HF-Konzentration konstant (c).



Es wurden, wenn nicht anders vermerkt, Objektträger (1,5 cm x 4 cm), wie auch Deckgläschen (1cm x 1,5 cm) aus Plastik hergestellt und verwendet. Die Spiculae wurden in Pufferlösung bzw. destilliertem Wasser auf den Objektträger platziert und mit dem Deckgläschen bedeckt. Zum Starten der Reaktion wurde am Rande des Deckgläschens ein Tropfen Flusssäurelösung hinzugefügt, welcher aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften von Flusssäure und der Kapillarkräfte schnell unter das Deckgläschen diffundierte. Der Lösevorgang wurde unter dem Mikroskop beobachtet und gegebenenfalls noch etwas HF-Lösung zugefügt. Zum Abstoppen

der Reaktion wurde mit Hilfe von Filterpapier überfällige Lösung abgesaugt und das Objekt mehrmals mit Puffer bzw. destilliertem Wasser gewaschen.

---

### ***Flusssäurelösung***

5 % HF (v/v)  
8 M NH<sub>4</sub>F

---

#### **4.1.1 Auflösung bei gleichzeitiger Färbung mit Coomassie Brilliant Blau**

Für die Färbung von freigesetzten Proteinen bei der Siliziumdioxidauflösung wurde Coomassie-Lösung (Coomassie Brilliant Blue G-250) verwendet. Coomassie bindet hauptsächlich an basische und aromatische Aminosäuren und färbt diese blau. Die Spiculae wurden in Coomassielösung auf den Objektträger gegeben und mit Flusssäure aufgelöst (siehe oben). Nach Auflösung und folgender Einwirkzeit von 10 min für das durch die HF-Lösung verdünnte Coomassie, wurde das Objekt bis zum Entfernen der ungebundenen Coomassielösung gewaschen.

---

### ***Coomassielösung***

0,1 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (w/v)  
20 % Methanol (v/v)  
10 % Essigsäure (V/v)

---

#### **4.1.2 Auflösung bei anschliessender Färbung mit Sirius Red F3BA**

Sirius Red F3BA ist ein gestrecktes Molekül mit sechs Sulfonsäuregruppen (-SO<sub>2</sub>OH) und einer Länge von 46 Å (Juncuaira *et al.*, 1979). Es wurde über viele Jahre zum Nachweis von Kollagen in Gewebeschnitten eingesetzt, wo sich die Sirius Red Moleküle parallel mit ihren Achsen an die Kollagenfasern anlagerten und so unter

dem Polarisationsmikroskop sichtbar wurden (Walsh, 1991). Sirius Red F3BA bindet aber nicht nur an Kollagen, sondern auch an andere basische Proteine. Die Sulfonsäuregruppen reagieren im saueren pH-Bereich mit basischen Aminosäuren der Proteine und färben diese rot.

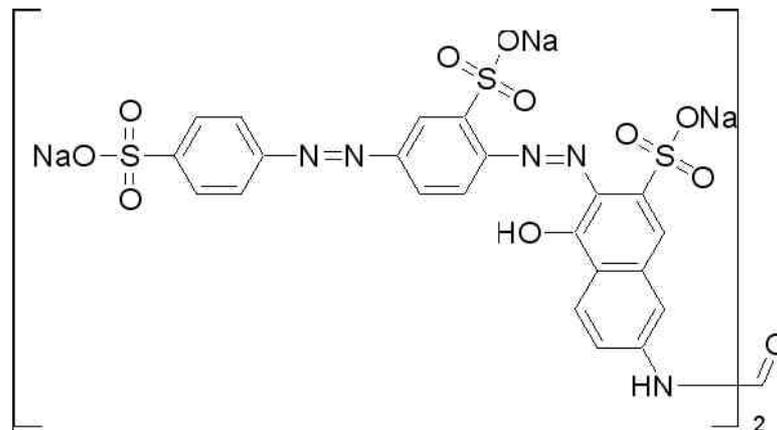


Abb. 8: Strukturformel von Sirius Rot F3BA mit seinen sechs Sulfonsäuregruppen

Die Schwammnadeln wurden nach der HF-Auflösung mit angesäuertem Wasser gewaschen und mit Sirius Red Lösung für 30 min versetzt. Ungebundener Farbstoff wurde durch Waschen mit angesäuertem Wasser entfernt.

---

### ***Sirius Rot F3BA-Lösung***

0,1 % Sirius Rot F3BA in Pikrinsäure (w/v)

---



---

### ***Angesäuertes Wasser***

0,5 % Essigsäure in H<sub>2</sub>O dest.

---

## 4.2 Auflösung des Silikates für biochemische Analysen der Nadelkomponenten

Größere Nadeln (über 5 mm Länge, z.B. Comitalia bei *M. chuni*) wurden aus dem Schwammkörper manuell entfernt und parallel zu den kleineren Nadeln (unter 5 mm Länge, z.B. Tauaktine) mit Säure von verbleibenden organischen Material gesäubert. Die lamellare Zone wurde mechanisch isoliert und analog zu ganzen Nadeln weiterverarbeitet.

Unter der Kühlung mit Eis wurden die Schwammstücke bzw. die größeren Nadeln in ein Gemisch aus vier Teilen  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konz. und einem Teil  $\text{HNO}_3$  konz. gegeben und unter gelegentlichem Umrühren für mindestens 3 Stunden inkubiert. Danach wurden die größeren Nadeln aus der Säure mit Hilfe einer Pinzette entfernt, wohingegen die kleineren Nadeln einmalig bei 2000 U/min für 5 min abzentrifugiert wurden. Es wurde dann zum Entfernen der Säure mit destilliertem Wasser gewaschen bis der pH-Wert des Überstandes über 6 lag. Zwischen den einzelnen Waschschrritten wurde nicht zentrifugiert, sondern etwa 20 min für die Sedimentation der kleineren Nadeln gewartet. Zum Trocknen der Nadeln folgte ein abschließender Waschschrritt mit Aceton. Danach wurden die Nadeln für 1 Stunde auf einer Petrischale ausgebreitet.

Die sauberen und getrockneten Nadeln wurden dann mit dem Puffer (ungefähres Volumenverhältnis Nadel-Puffer betrug 1 zu 4) in einen Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgrenze (*cutoff*) von 12000 Da gegeben. Dieser Dialyseschlauch wurde vorher in Puffer eingeweicht und mit einer Klammer an einem Ende verschlossen. Beim Befüllen des Schlauches wurde darauf geachtet, dass er keine Blasen enthielt und auch nicht zu prall gefüllt war, da das Volumen innerhalb des Schlauches bei den Dialyseschrritten stark zunimmt. Die Auflösung des Silikates erfolgte durch die Dialyse des Nadel-Puffergemisches gegen Flusssäurepuffer bei 4°C. Je nach Dicke der Nadeln und gewünschtem Lösestadium wurde die Auflösung von wenigen Stunden bis über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde der Dialyseschlauch mit den aufgelösten Nadeln in einem Eimer zur Entfernung des Flusssäurepuffers gegen 10 l Pufferlösung dialysiert. Alle 3 Stunden wurde der Dialysepuffer vier mal gewechselt.

Für die Aufkonzentrierung der Nadelsuspension wurde der Dialyseschlauch mit Polyethylenglycol (PEG 20000) mit einer Molekülmasse von 20000 g/mol bedeckt. Durch die hygroskopischen Eigenschaften von PEG wurde Flüssigkeit aus dem

Schlauch entfernt und die zurückgebliebenen Proteine aufkonzentriert.

#### **4.2.1 Aufkonzentrierung mittels Microcon Centrifugal Filter Devices**

Die nach der Dialyse zurückgebliebene Lösung musste wegen des geringen Proteingehaltes nochmals aufkonzentriert werden. Dies geschah mit Hilfe von Microcon Centrifugal Filter Devices, Zentrifugenröhrchen, die eine anisotropisch, hydrophile *Ultracel YM* Membran mit bestimmten Molekulargewichtsausschluss besitzen. Jeweils 500 µl der Lösung wurden auf diese Membran mit einem Molekularausschluss von 3000 Da gegeben und bei 4 °C für 45 min bei 14000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde für die weiteren Analyse verwendet. Die Proteinkonzentration des Durchflusses befand sich unterhalb der Detektionsgrenze.

##### **4.2.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Methode von Bradford (1976). Das Prinzip dieser Bestimmung beruht auf der Färbung von Proteinen durch Coomassie Brilliant Blau G-250. Der Farbstoff bindet hauptsächlich an basische Aminosäuren und ändert dabei seine Absorptionseigenschaften, die von seiner Ladung (anionisch, neutral, kationisch) abhängen. Sein Absorptionsmaximum verschiebt sich hierbei im anionischen Zustand von 465 nm nach 595 nm. Die Proteinkonzentration einer Probe kann hiernach durch eine Messung der Absorptionsänderung bei 595 nm im Vergleich zu bekannten Proteinstandards ermittelt werden.

Als Färbemittel wurde das vorgefertigte Reagenz Roti-Quant verwendet. Dort liegt Coomassie Brilliant-Blau G250 unter Zusatz von Ethanol und  $H_3PO_4$ , in  $H_2O$  gelöst, vor. Zunächst wurde eine Eichgrade mittels verschiedener BSA-Verdünnungen hergestellt. Hierbei wurde 1 ml von im Verhältnis 1 zu 5 mit  $H_2O$  verdünnte Roti-Quant Lösung mit jeweils 25 µl der definierten Standardverdünnungen bzw. mit Puffer als Blindprobe gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden in eine 96-well Platte (100 µl pro well) überführt und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Analog wurde mit den zu bestimmenden Lösungen verfahren. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

### 4.3 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt (Laemmli, 1970). Mit Hilfe eines gleichzeitig aufgetragenen standardisierten Proteinmarkers (Molekulargewichtsmarker) kann man verschiedenen Laufstrecken bestimmte Molekulargewichte zuordnen und so das Molekulargewicht der gesuchten Proteine bestimmen.

Aufgetrennte Proteine können auch auf eine Trägermembran transferiert und immobilisiert werden, um dann verschiedene Reaktionen wie z.B. immunologische Nachweisverfahren durchzuführen. Für die Elektrophorese von Proteinen bis 500 kDa verwendet man fast ausschließlich Polyacrylamidgele als Trennmatrix. Polyacrylamidgele, entstehend aus einer radikalischen Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid in einem TRIS-Puffer, wirken aufgrund ihrer Struktur wie Molekularsiebe, worin niedermolekulare Substanzen schneller und hochmolekulare langsamer wandern können. Je nach der Konzentration des Acrylamid/Bisacrylamid-Gemischs ist die Porengröße stark variabel, um die Proteine im gewünschten Größenbereich aufzutrennen.

Um die Eigenladung und die Tertiärstruktur der Proteine, und somit ihre Laufgeschwindigkeit bei der SDS-Gelelektrophorese, zu vereinheitlichen, wird Natriumlaurylsulfat (SDS, sodium dodecyl sulfate) und  $\beta$ -Mercaptoethanol verwendet. SDS lagert sich als anionisches Detergenz an viele Proteine in einem konstantem Gewichtsverhältnis von 1,4g SDS pro Gramm Protein, d.h. ein Molekül SDS pro zwei Aminosäurereste (Voet und Voet, 1994), an und zerstört die meisten nichtkovalenten Bindungen.  $\beta$ -Mercaptoethanol bewirkt eine reduktive Zerstörung von Disulfidbrücken und somit auch eine Trennung von eventuell vorhandenen gebundenen Proteinuntereinheiten. Die Laufgeschwindigkeit der so entstandenen stark negativen Komplexe (anionische Mizellen) im Polyacrylamidgel ist aufgrund des konstanten Ladung/Masse-Verhältnisses dem Logarithmus der relativen Molekülmasse proportional (Weber und Osborn, 1969). Anhand eines Proteinmarkers kann das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine bestimmt werden.

Hauptsächlich wird die diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt, wobei vor dem eigentlichen Trenngel noch ein niederprozentiges Sammelgel mit niedrigerem pH-

Wert und niedrigerer Salzkonzentration für eine Fokussierung (*stacking*) und somit schärferer Proteinbanden sorgt.

#### 4.3.1 Gelherstellung für SDS-PAGE

Für die Acrylamidgelherstellung (Maße: 7,0cm x 8,0cm x 0,75mm) und den folgenden vertikalen Elektrophoreselauf wurde das Mini-Protean II System von Biorad eingesetzt. Nach dem Anlegen der Abstandshalter (0,5mm) wurden die vorher gereinigten Glassplatten in der Gießvorrichtung befestigt und zunächst das Trenngel (üblicherweise 10%) gegossen. Die Polymerisation der Gellösung wurde durch die Zugabe von Ammoniumperoxidisulfat gestartet und durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) beschleunigt. Das Trenngel wurde dann, um eine gerade Grenzschicht zu erreichen und die Polymerisation unter dem Ausschluss von Sauerstoff zu gewährleisten, mit Isopropanol überschichtet. Nach 30minütiger Polymerisationsdauer wurde das Isopropanol entfernt, der Teflonkamm zum Aussparen der Geltaschen eingefügt und das Sammelgel (6%) gegossen. Das nach ebenfalls 30 Minuten auspolymerisierte Gel wurde nun in die Gelkammer gestellt und die Apparatur mit Laufpuffer bis oberhalb der Geltaschen gefüllt. Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden diese mit reduzierendem Ladepuffer (5:1) gemischt und für 10 min auf dem Heizblock bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Der vorgefärbte Proteinmarker konnte sofort aufgetragen werden. Für die ersten 15 min wurde eine Spannung von 100 Volt angelegt, die dann nach Eintritt der Proben in das Trenngel für 30 min auf 200 Volt erhöht wurde.

---

##### **Sammelgel (6%)**

2,0	ml	Acrylamidlösung (30%)
5,3	ml	H <sub>2</sub> O
2,5	ml	1 M Tris/HCl, pH 6,8
0,1	ml	10%SDS
0,01	ml	TEMED
0,1	ml	10% APS

---

---

**Trenngel (10%)**

3,3	ml	Acrylamidlösung (30%)
4,0	ml	H <sub>2</sub> O
2,5	ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
0,1	ml	10%SDS
0,01	ml	TEMED
0,1	ml	10% APS

---

---

**SDS-Probenpuffer (5x)**

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

---

---

**SDS-Laufpuffer**

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

---

**4.3.2 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie**

Die Proteinlokalisierung nach der elektrophoretischen Auftrennung im Gel erfolgte durch Färbung mit *Gel Code Blue Stain Reagent* von Pierce (Rockford, IL, USA). Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1 bis 2 µg Protein. Hierbei werden die kolloidalen Eigenschaften von Coomassie G-250 zum Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen genutzt. Eine Entfärbung ist nicht nötig, da der Farbstoff nicht mit der Gelmatrix reagiert. Die separierten Proteine wurden durch in der Färbelösung enthaltenes Methanol und Essigsäure im Gel präzipitiert und durch unspezifische Anlagerung von Coomassie Brilliantblau G-250 angefärbt.

Das Gel wurde zwei mal 15 min auf dem Schüttler mit destilliertem Wasser gewaschen und dann 60 min mit *Gel Code Blue* inkubiert. Um optimale Ergebnisse

zu erreichen, wurde das Gel für eine Stunde in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit einer Kamera im Durchlicht fotografiert.

#### 4.3.3 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit *Sypro Ruby Protein Gel Stain*

Zum Visualisieren geringer Proteinbanden auf dem SDS-Gel nach der Elektrophorese wurde Sypro Ruby Protein Gel Stain von Molecular Probes verwendet. Dieser fluoreszierende Farbstoff besitzt eine deutlich höhere Sensitivität als die Coomassie-Färbung und färbt Proteine im Bereich ab 0,25 ng. Er bindet an basische Aminosäuren und an das Polypeptid Rückrad und macht auch schwierig zu färbende Proteine wie Glycoproteine, Phosphorproteine, Lipoproteine und fibrilläre Proteine sichtbar. Im Gegensatz zu herkömmlichen Silberfärbungen ist Sypro Ruby ähnlich empfindlich, erreicht aber einen wesentlich größeren dynamischen Bereich. Das Gel wurde 30 min in Fixierlösung inkubiert, anschließend über Nacht mit Sypro Ruby gefärbt und 60 min gewaschen. Für die Färbung wurden lichtundurchlässige Schalen verwendet.

Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe eines UV-Illuminators.

<i>Fixierlösung</i>			<i>Waschlösung</i>		
40	%	Methanol (v/v)	10	%	Methanol (v/v)
10	%	Essigsäure (v/v)	6	%	Essigsäure (v/v)

#### 4.4 Zweidimensionale SDS-PAGE

Die Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) trennt komplexe Proteingemische in zwei aufeinanderfolgenden Schritten auf. Im ersten Schritt, der ersten Dimension, werden die Proteine aufgrund ihrer Ladung durch isoelektrische Fokussierung separiert, im zweiten Schritt folgt eine SDS-PAGE in senkrechter Richtung, bei der die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

#### 4.4.1 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Bei der isoelektrischen Fokussierung wurden Gelstreifen mit immobilisierten Gelstreifen (IPG) verwendet. Der pH-Bereich der Streifen lag zwischen pH 3 und pH 10 bei 7 cm Länge. Die 20 µg Protein enthaltende Probe wurde mit Rehydratisierungspuffer gemischt und in die Mitte einer Quellkammer pipettiert. Bei dem Auflegen der Gelstreifen wurde besonders darauf geachtet, dass sich ein luftblasenfreier Flüssigkeitsfilm unter dem Gel ausbilden konnte. Anschließend wurde der Streifen mit Paraffinöl überschichtet und 16 Stunden in der Rehydratisierungskassette inkubiert.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte bei konstanten 20°C nach dem in Tabelle 1 angegebenen Konditionen.

Konditionen der isoelektrischen Fokussierung (Tabelle 1):

Start Voltage	End Voltage	Volt-Hours	Ramp
0	4000	8-10000 V-hr	Rapid

---

#### ***Rehydratisierungspuffer***

8 M Harnstoff  
0,2 % IPG-Puffer (v/v)  
0,06 M DTT  
0,001 % Bromphenolblau (w/v)

---

#### 4.4.2 Zweite Dimension: SDS-PAGE

Um eine optimale Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension zu gewährleisten, musste der IPG-Streifen in einem zweistufigen Äquilibrationsschritt mit einem SDS-haltigen Puffer gesättigt werden. Der erste Äquilibrationsschritt enthielt zur Reduzierung der Disulfidbindungen 2% DTT, die Reoxidation wurde im zweiten Puffer unter Verwendung vom Iodacetamid verhindert.

Der Gelstreifen wurde in ein verschließbares Kunststoffröhrchen überführt und mit Äquilibriumspuffer für 15 min und folgenden 20 min in Alkylierungspuffer geschwenkt. Nach der Äquilibrium wurde der Gelstreifen mit Gelelektrophoresepuffer abgespült und auf einem Polyacrylamidgel (10%) mit angewärmter Agaroselösung (1,0% (w/v) in Elektrophoresepuffer) fixiert. Als Molekulargewichtsmarker diente der *2-D SDS range marker* von Biorad. Die Elektrophorese verlief bei 22°C und 100 V für 15 min mit anschließender Erhöhung auf 200 V. Sie wurde beendet, sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Die Färbung des Gels erfolgte mittels Coomassie nach 4.3.2.

---

#### ***Reduzierungspuffer***

2	%	DTT (w/v)
6	M	Harnstoff
2	%	SDS (w/v)
30	%	Glycerol (v/v)
50	mM	Tris/HCl pH 8,8

---

---

#### ***Alkylierungspuffer***

2,5	%	Iodacetamid (w/v)
6	M	Harnstoff
2	%	SDS (w/v)
30	%	Glycerol (v/v)
50	mM	Tris/HCl pH 8,8

---

### **4.5 Western Blot**

Der Western Blot dient zur Identifizierung bestimmter Makromoleküle nach der Auftrennung aus Elektrophoresegelen (Towbin *et al.*, 1979). Werden die Proteine mittels Antikörper nachgewiesen, wird die Methode auch Immunoblotting genannt. Da Immunglobuline wegen ihrer Größe meist nur sehr langsam oder auch gar nicht in das Gel eindringen können, werden die Proteine beim Westernblot auf eine Membran transferiert und dort immobilisiert. Die Immunreaktivität der Proteine bleibt hierbei

erhalten, und sie können mit Antikörpern nachgewiesen werden. Die verwendeten Membranen bestehen aus PVDF, Nylon oder Nitrozellulose und binden die Proteine meist mithilfe hydrophober Wechselwirkungen. Im sogenannten *Semi dry blotting* mit „Sandwich“-Aufbau (Westermeier *et al.*, 1989) werden die Proteine in einem elektrischen Feld von dem Gel auf die Membran transferiert und dort immobilisiert. Die Membran besitzt nach Abschluss der Elektrophorese dieselben Proteinbanden wie das Gel.

Die hydrophobe Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran (Roth-PVDF Transfer Membran) und 16 Filterpapiere wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Membran wurde dann eine Minute lang in Methanol aktiviert und 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Auf 8 in Transferpuffer getränkte Filterpapiere wurde das herausgenommene Gel gelegt, worauf die Membran und dann weitere 8 in Transferpuffer getränkte Filterpapiere platziert wurden. Dieser so entstandene Blotstapel wurde mit der Membran unterhalb des Gels auf die mit Transferpuffer benetzte Anode des Semi-Dry-Blotters gelegt. Nach Ausrollen von Luftblasen wurde die obere Kathode angeschlossen. Der Proteintransfer lief für eine Stunde bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$ .

Die Membran wurde daraufhin zum Blockieren der freien Bindungsstellen über Nacht in 5%iger Blockierungsreagenz (in TBST) bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 2 mal 5 minütigem Waschen mit TBST erfolgte die Immunodetektion für 1,5 Stunden durch den spezifischen primären Antikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 in TBST und  $20 \mu\text{l}$  Blockierungsreagenz pro ml Antikörperlösung auf einem Schüttler. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 5 mal 5 min mit TBST gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Primärantikörper dienen enzymgekoppelte, gegen den Primärantikörper gerichtete sekundäre Antikörper. Die Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:3000 in TBST mit  $20 \mu\text{l/ml}$  Blockierungsreagenzlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Nach anschließenden Waschschritten für 3 mal 5 min in TBST und 2 mal 5 min in TBS wurde der Sekundärantikörper mit dem jeweiligen Nachweissystem sichtbar gemacht.

#### 4.5.1 Entwicklung mit dem NBT/X-Phosphat System

Das Prinzip des NTB/X-Phosphat Systems beruht darauf, dass die alkalische Phosphatase die hydrolytische Spaltung von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (X-Phosphat, BCIP) zu Indoxyl katalysiert. Indoxyl tautomerisiert unter der Bildung eines Ketons, im alkalischen Medium erfolgt dann eine Dimerisierung zum Indigo, wobei Protonen freigesetzt werden. Durch diese Protonen wird Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zu Diformazan reduziert. Das blaue Indigo und das purpurfarbene Diformazan bilden einen gut sichtbaren Niederschlag. Die Nachweisgrenze dieses Systems liegt bei 100 pg Protein.

Die Membran wurde für 5 min in P3 äquilibriert und mit dem Substratmix (NBT/X-Phosphat) für die, an den sekundären Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde beobachtet und bei Entstehung gut sichtbarer Banden durch Waschen in destilliertem Wasser nach etwa 10 min abgestoppt.

<b>Transferpuffer</b>			<b>Blockierungsreagenz</b>		
25	mM	Tris	5	%	Blockierungsreagenz in TBS
192	mM	Glycin			
20	%	Methanol (v/v)			
<b>TBS</b>			<b>TBST</b>		
10	mM	Tris/HCl, pH 8,0	0,05	%	Tween 20 in TBS (v/v)
150	mM	NaCl			

#### 4.6 Erythrocyten-Agglutinationsfaktor in Schwammnadeln

Ein etwa 1 cm langes und im Durchmesser 3mm breites Stück der Basalnadel von *M.chuni* wurde mittels Mörser und Pistill in 500 µl Extraktionspuffer für 10 min zerkleinert, bis eine weitgehend pulverige Konsistenz erreicht wurde. Nach einer Inkubation von 30 min bei 4°C wurde das Gemisch, um die Nadelbruchstücke zu

entfernen, bei 2000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach der Proteinkonzentrationsmessung wurde bis zur weiteren Verwendung die Lösung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Vollblut vom Pferd wurde mit PBS verdünnt und bei 1000 x g für 5 min zur Isolierung der Erythrozyten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet erneut mit PBS gewaschen, bis der Überstand nach der Zentrifugation farblos blieb. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Erythrozytenpellet mit gleichem Volumen an PBS 1:1 verdünnt und bei 4°C aufbewahrt.

25 µl der Erythrozytenlösung wurden mit 25 µl des Nadelextraktes gemischt und in 96-well Platten mit konischem Boden gegeben. Als Kontrolle dienten verschiedene Konzentrationen von Concanavalin A anstelle des Nadelextraktes. Die Mischungen wurden für jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur ruhen gelassen und anschließend ausgewertet. Erfolgte keine Agglutination, sammelten sich alle Erythrozyten am tiefsten Punkt des konischen Bodens und es entstand ein kompakter roter Punkt. Bei erfolgreicher Agglutination der Erythrozyten hingegen bildete sich ein großflächiger zusammenhängender Bodensatz.

#### 4.7 Deglykolisierung der Nadelproteine

Der totale Proteinextrakt aus Schwammnadeln (*Basalia*) von *M. chuni* wurde unter Verwendung des *Enzymatic CarboRelease*<sup>TM</sup> Kit von QAbio deglycolysiert. Mittels in dem Kit enthaltenden Enzymen werden alle N-gebundenen und viele O-gebundenen Oligosaccharide von Glycoproteinen entfernt. PNGase F entfernt Asparagin-gebundene Oligosaccharide, Serin-/Threonin-gebundene, Gal-(b1-3)-GalNAc-(a1) und alle Sialinsäure substituierten Gal-(b1-3)-GalNAc-(a1) werden durch die Kombination aus Sialidase und O-Glycosidase entfernt. Zwei weitere Enzyme helfen bei der Beseitigung von größeren O-gebundenen Strukturen, die  $\beta$ -Galactosidase und die Hexosaminidase.

35 µl des Proteinextraktes wurden mit 10 µl Reaktionspuffer und 2,5 µl Denaturierungslösung gemischt und entsprechend den Angaben des Herstellers in einem kochenden Wasserbad für 5 min erhitzt. Nach anschließender Abkühlung auf Eis wurden 2,5 µl Triton-X und jeweils 1 µl der fünf Enzyme dazugegeben und bei

37°C für 3 Stunden inkubiert. Der deglycolysierte Nadelextrakt wurde auf Eis gekühlt und unmittelbar für die Überprüfung mittels SDS-PAGE verwendet.

---

### **Enzymmix**

- PNGase F (*Chryseobacterium meningosepticum*)
  - O-Glycosidase (*Streptococcus pneumoniae*)
  - Sialidase (*Arthrobacter ureafaciens*)
  - $\beta$ -Galactosidase (*Streptococcus pneumoniae*)
  - Glucosaminidase (*Streptococcus pneumoniae*)
- 

## **4.8 Rasterelektronenmikroskopie**

Die elektromikroskopischen Aufnahmen von Schwammnadeln wurden durch Rasterelektronenmikroskopie (REM, SEM (*Scanning Electron Microscope*)) gewonnen. Bei der Technik des REM wird ein Elektronenstrahl erzeugt und auf einen Punkt an der Oberfläche des Objektes fokussiert. Als Elektronenquelle kann eine beheizte Kathode (Glühkathode, warme Feldemission) oder eine Wolframkristallspitze in einem starken elektrischen Feld (kalte Feldemission) dienen. Die von dem fokussiertem Punkt gestreuten Elektronen werden von einem Detektor registriert und die Signalstärke ausgewertet. Ein Rastergenerator ermöglicht das Abtasten der gesamten Oberfläche des Objektes durch den Elektronenstrahl („rastern“ oder „*scanning*“), welches schließlich zu einem Bild der gesamten zu untersuchenden Probe führt. Das Anlegen eines stärkeren elektrischen Feldes über der Bildröhre im Vergleich zu dem elektrischen Feld im Mikroskop führt zu dem gewünschten Vergrößerungseffekt.

Die Proben wurden entweder mit einer 5  $\mu\text{m}$  dicken Goldschicht bedampft oder ohne Bedampfung nach Trocknung mikroskopiert.

#### 4.9 Elektronenmikrosonde

Die Mikrosonde ist eine Kombination aus Lichtmikroskop, Rasterelektronenmikroskop und Röntgenspektralanalysator. Ein, mittels einem elektronischen Linsensystems auf wenige  $\mu\text{m}$  gebündelter Elektronenstrahl regt die Elemente zur Aussendung von Röntgenstrahlung an. Die für jedes Element charakteristische Strahlung bzw. Energie wird mittels Halbleiterdetektoren analysiert. Die Probe lässt sich unter dem Elektronenstrahl bewegen, sodass sie Punkt für Punkt analysiert werden kann.

Für die Analyse wurde ein 150  $\mu\text{m}$  dicker Querschnitt der Pfalnadel von *M. chuni* verwendet. Die Untersuchung wurde im Geologischen Institut der Universität Mainz unter Verwendung eines JOEL 8900RL *Superprobe device* mit angeschlossenem MICROSPEC *wavelength dispersive system* durchgeführt.

#### 4.10 RNA-Isolation

RNA ist im Gegensatz zu DNA extrem empfindlich gegenüber einem enzymatischen Angriff von RNA-degradierenden Enzymen (RNAsen) und so müssen Maßnahmen ergriffen werden, um die Integrität der isolierten RNA zu gewährleisten und Kontaminationen mit RNAsen vorzubeugen.

RNAsen können sich im Wasser, in Chemikalien, auf der Haut und auf sämtlichen Oberflächen befinden. Oberflächen, Glas-, Plastik- und Metallgeräte wurden zum Entfernen bzw. zum Zerstören des Enzyms vor Gebrauch mit kommerziell erwerblichen RNase-inaktivierenden Lösungen (*RNAse Away*, Roth, Karlsruhe) gut gereinigt. Alle verwendeten Lösungen und destilliertes Wasser zum Abspülen der Geräte nach Reinigung mit *RNAse Away* wurden mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. DEPC inaktiviert RNAsen durch Aminoalkylierung vor allem an Tyrosin- und Histidinresten, welches die Zerstörung der Enzymstruktur zur Folge hat (Leonard *et al.*, 1970). Durch das Autoklavieren der Lösungen für eine Stunde wurde das überschüssige DEPC inaktiviert.

#### 4.10.1 Isolation der Gesamt-RNA

RNA kann unter Verwendung des TRIzol Reagenzes (GibcoBRL, Karlsruhe) aus Zellen und Geweben isoliert werden. TRIzol ist eine gebrauchsfertige Lösung, die auf dem Verfahren der RNA-Präparation von Chomczynski und Sacchi (1987) beruht. Während der Homogenisation des Gewebes und Lyse der Zellen garantiert TRIzol mit flüssigem Phenol und dem chaotropen Salz Guanodinisothiocyanat die Integrität der RNA. Nach Zugabe von Chloroform und Zentrifugation bilden sich drei Phasen, eine obere klare wässrige Phase, eine intermediäre weißgefärbte Phase, sowie eine rotgefärbte untere organische Phase. Die RNA befindet sich exklusiv in der oberen wässrigen Phase und kann unter Verwendung von Isopropanol ausgefällt und gereinigt werden.

Etwa 0,5 g von bei  $-80^{\circ}\text{C}$  lagernden Gewebe wurde in flüssigen Stickstoff gegeben und mit Aluminiumfolie mehrfach umwickelt. Durch Hämmern wurde das Gewebe aufgrund der vielen Nadeln zunächst grob zerkleinert und dann mit Mörser und Pistill unter Zugabe von flüssigem Stickstoff und ein paar Tropfen TRIzol-Reagenz homogenisiert. Das entstandene feine Gewebepulver wurde in 10 ml vorgekühltem TRIzol-Reagenz gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Mischung wurde dann zum Abtrennen aller unlöslichen Bestandteile, wie der Nadelstücke, für 10 min bei  $10\ 000 \times g$  zentrifugiert. Jeweils 200  $\mu\text{l}$  Chloroform wurden zu 550  $\mu\text{l}$  des Überstandes gegeben und für 15 sec auf dem Vortexer geschüttelt. Nach einer Inkubation von 3 min bei Raumtemperatur wurde die Probe für 15 min bei  $10\ 000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die obere wässrige, die RNA enthaltene Phase, wurde in ein neues, RNAse freies Reaktionsgefäß überführt, mit 0,8 Teilen Isopropanol versetzt und nach mehrmaligen Invertieren der Lösung für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausgefallte RNA wurde dann durch Zentrifugation bei  $10\ 000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min pelletiert, der Überstand verworfen und mit 1 ml von 75 %-igem eiskaltem Ethanol gewaschen. Zum Entfernen des Ethanols wurde die RNA erneut bei  $7\ 500 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Dann wurde die RNA bei Raumtemperatur für 5 min getrocknet und das Pellet in 50  $\mu\text{l}$  DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

#### 4.10.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden mittels Absorbtionsspektrometrie und denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese ermittelt. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ist die Extinktion einer lichtabsorbierenden Substanz mit konstantem, molarem Extinktionskoeffizienten

$E$  bei konstanter Schichtdicke  $d$  und Wellenlänge  $\lambda$  proportional zu ihrer Konzentration  $c$ . RNA besitzt zwei charakteristische Absorbtionsmaxima, eines bei 260 nm und ein weiteres bei 280 nm.

Die Konzentration der RNA lässt sich unter Verwendung einer Quarzküvette aus der Absorbtion bei 260 nm berechnen. Bei einer Pfadlänge von 1 cm entspricht eine Extinktion von 1 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  in Tris-Puffer (10 mM, pH 7,5).

Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm lässt eine ungefähre Aussage über die Reinheit der isolierten RNA zu. Bei reiner RNA liegt das Verhältnis zwischen  $A_{260}/A_{280}$  bei 1,9-2,3 in Tris-Puffer (10 mM, pH 7,8). Proteinverunreinigungen verschlechtern das Absorptionsverhältnis.

#### 4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich, ausgehend von selbst sehr geringen Mengen an DNA, spezifische Nukleinsäuresequenzen enzymatisch zu amplifizieren, sofern deren flankierenden Regionen bekannt sind (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.* 1986). Die PCR besitzt eine enorm hohe Sensitivität, da ihre Durchführung theoretisch nur ein Matrizenmolekül benötigt. Dadurch wird es ermöglicht, die gesuchte Sequenz aus einem komplexen DNA-Gemisch zu selektionieren und in hohen Konzentrationen für weitere Arbeitsschritte (z.B. Subklonierung) zur Verfügung zu stellen.

Für die Durchführung einer PCR benötigt man die zu amplifizierende DNA-Matrize, eine hitzeresistente DNA-Polymerase, eine Lösung der vier Desoxynukleotide (dATG, dGTP, dCTP, dTTP), die den neuen Strang bilden, eine  $\text{MgCl}_2$ -haltige Pufferlösung und zwei einzelsträngige PCR-Primer. Die Technik beruht darauf, dass sich die sequenzspezifischen PCR-Primer, Oligonukleotide mit einer Länge von

üblicherweise 18 bis 24 Basen, jeweils an einen Strang der denaturierten DNA-Doppelhelix der gesuchten Nukleinsäure komplementär binden und mit ihren zueinandergerichteten 3'-Enden als Initiationsstelle für die DNA-Neusynthese durch die DNA-Polymerase dienen. PCR-Primer werden üblicherweise als Vorwärts- und Rückwärtsprimer bezeichnet, je nachdem, ob die Synthese am 3'-Bereich oder am 5'- Bereich gestartet wird. Die thermostabile Polymerase (z.B. isoliert aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, Taq-Polymerase) katalysiert die darauffolgende bei in etwa 72°C ablaufende Reaktion, bei der aus den vier dazugegebenen Desoxynukleotiden ein neuer DNA-Strang synthetisiert wird. Der gesamte Reaktionsverlauf der PCR besteht aus drei Schritten:

- (1) eine reversible Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Matrize durch Erhitzen auf 94 bis 94°C,
- (2) die Hybridisierung (Annealing) der Oligonukleotidprimer an ihren komplementären, die Zielsequenz flankierenden Bereich durch Inkubation für eine bis mehrere Minuten bei 50 bis 60°C, abhängig von der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Primer,
- (3) der Elongation, bei der die DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C für eine oder mehrere Minuten den neuen komplementären DNA-Strang synthetisiert.

Beim stetigen Wiederholen dieses beschriebenen Reaktionszyklus wird eine große Menge der durch die Primer flankierenden Bereiches amplifiziert. Durch jeden Zyklus erhöht sich die Anzahl der Kopien exponentiell. Nach dem ersten Zyklus bilden sich DNA-Stränge von undefinierter Länge, an die wiederum im zweiten Zyklus nach der Denaturierung die Primer hybridisieren und eine neue doppelsträngige Kopie der gesuchten Nukleotidsequenz entsteht. Dieses PCR-Produkt dient dann wieder in den darauffolgenden Zyklen als Matrize, so dass sich nach jedem weiteren Reaktionszyklus die Menge an Reaktionsprodukten verdoppelt, was schließlich zu einer exponentiellen Vermehrung des durch die Primer flankierten Fragments führt (nach  $n$  Zyklen liegen  $2^n$  Kopien vor).

### 4.11.1 Standard-PCR

Für die Standard-PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten und späteren Identifizierung wurden hitzestabile Polymerasen aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet, bei der die Polymeraseaktivität bei etwa 1000 Nukleotiden pro Minute liegt. Die weiteren Komponenten sind im Standard-Pipettierschema aufgeführt.

---

#### **Standard-PCR Reaktionsansatz**

5	µl	10x Puffer mit MgCl <sub>2</sub>
1,5	10 mM	dNTPs
1,5	10 pM	Primer for
1,5	10 pM	Primer rev
x	µl	DNA-Template
1-3	U	Taq-Polymerase
x	µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> ad 50 µl

---



---

#### **Standard-PCR Bedingungen**

1 Zyklus	95 °C	für 5 min (initiale Denaturierung)
35 Zyklen	95 °C	für 30 sec
	T <sub>m</sub>	für 30 sec
	72 °C	für 1-2min/1kb
1 Zyklus	72 °C	für 10 min
	4 °C	~

---

Um die Reaktionsbedingungen zu optimieren, müssen bei der PCR die Hybridisierungstemperatur (T<sub>m</sub>) der Primer, die Amplifikationszeit und die Zyklenzahl

variiert werden. Die Amplifikationszeit hängt von der erwarteten Fragmentlänge und der verwendeten Polymerase ab. Verschiedene Polymerasen besitzen eine unterschiedliche Prozessivität und unterschiedliche Fehlerhäufigkeiten. Die bei Routine-Reaktionen, wie der Checking PCR, eingesetzte Taq-Polymerase hat eine Syntheseleistung von 1000 Basen pro Minute, allerdings eine Fehlerhäufigkeit von  $10^{-5}$  je eingebauter Base. Somit würden bei einer PCR mit 30 Zyklen und einer Fragmentlänge von 1000 bp 25% aller Produkte mindestens eine Mutation aufweisen (Mülhardt, 2003). Thermostabile DNA-Polymerasen mit ausgeprägter 3'-5'-Exonukleaseaktivität (*proof-reading*-Polymerasen) besitzen eine deutlich geringere Fehlerquote von  $10^{-6}$  Fehlern je eingebauter Base, welches auf nur 3% mutierter Produkte nach 30 Zyklen resultiert (Cline *et al.*, 1996). Allerdings liegt die Geschwindigkeit (Prozessivität) dieser Polymerasen bei 2 min für 1000 Basen, wodurch die Elongationszeit verlängert werden muss. Die Taq-Polymerase bietet einen bemerkenswerten Vorteil, indem sie an die 3'-Enden des PCR-Fragments ein einzelnes überhängendes Adenin-Nukleotid anfügt (Clark, 1988). Diese Eigenschaft kann man sich bei späteren Ligationen in spezielle Vektoren zunutze machen.

#### 4.11.2 Checking-PCR / Kolonie-PCR

Die Checking-PCR ist eine Standard-PCR zur schnellen Überprüfung eines Inserts in einem Plasmid und dessen erfolgreiche Insertion. Nach der Ligation und Transformation wurden vor dem Ansetzen von Übernachtskulturen bestimmte Bakterienkolonien mit sterilen Pipettenspitzen von dem Selektionsnährböden gepickt und in 20 µl LB-Medium überführt. Nach 1 Stunde auf dem Schüttler bei 37°C wurde jeweils 1 µl der Bakterienkultur als Matrize für die anschließende PCR benutzt. Es wurden jeweils ein vektorspezifischer Primer und ein passender genspezifischer Primer verwendet, eine PCR mit 1/3 des Reaktionsvolumens der Standard-PCR durchgeführt und die resultierenden Produkte auf einem Agarosegel visualisiert. An der Länge des PCR-Fragmentes kann man inserttragende Klone identifizieren und die Ausrichtung des Inserts überprüfen.

### 4.11.3 Reverse transcription PCR (RT-PCR)

Bei der *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) wird eine RNA-Matrize mittels einer Transkriptase in eine ihr komplementäre einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte unter Verwendung des „SuperScript™ *First-Strand Synthesis System for RT-PCR*“ von Invitrogen.

Der RNA/Primer-Mix wurde bei 65°C denaturiert, nach Abkühlung auf Eis 9 µl des Reaktionsansatzes ohne Enzym dazugegeben und bei 42°C für 2 min inkubiert. Die reverse Transcription erfolgte nach Zugabe von 1 µl *SuperScript III* und erneute Inkubation bei 42°C für 50 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzen für 10 min auf 70°C beendet (Inaktivierung der Enzyme). Auf RNase H Zugabe wurde zum Schutze der entstandenen sscDNA verzichtet. Die sscDNA wurde bei –80°C gelagert und zur Amplifizierung der Zielsequenz mittels Standard-PCR verwendet.

## 4.12 Agarose-Gelelektrophorese

### 4.12.1 Elektrophorese von DNA

Mittels der Gelelektrophorese ist es möglich, Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe aufzutrennen und durch anschließendes Färben nachzuweisen. Nukleinsäuremoleküle wandern aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen in einem elektrischen Feld zur Anode. Als poröse Matrix dient hier Agarose, die die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren entsprechend ihrer physikalischen Eigenschaften und Nettoladung beeinflusst. Die Geschwindigkeit ist reziprok proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes (Helling *et al.*, 1974; McDonell und Studier, 1977) und hängt auch von der Form der Moleküle, der Ionenstärke des Laufpuffers, der Stärke des elektrischen Feldes sowie der Art des Trenngels ab. Moleküle von 0,5 bis 10 kb werden üblicherweise mit einem einprozentigem Agarosegel aufgetrennt, für kleinere DNA-Fragmente von 50 Basen bis 2 kb verwendet man zur optimalen Auftrennung zweiprozentige Gele.

### 4.12.2 Agarose-Gelherstellung

Pulverförmige Agarose (1 % (w/v)) wurde mit der entsprechenden Menge an TBE-Puffer (1-fach) versetzt und zum Lösen aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wurde die klare Lösung in eine horizontale Gelform gefüllt und an einem Ende ein kammförmiger Taschenformer eingesetzt. Nach der weiteren Abkühlung und der Bildung eines opaleszenten Gels, wurde der Taschenformer entfernt und das Gel in eine Elektrophoresekammer mit TBE als Laufpuffer eingesetzt. Die aufzutrennenden Proben wurden neben einem Standard aus definierten DNA-Fragmenten mit 6-fach Probepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die angelegte Spannung betrug 10 V/cm Gel. Anhand der Bromphenolblau-Front des Ladepuffers konnte man die Migration im Gel beobachten und da die Bromphenolblau-Front der Geschwindigkeit eines Nukleinsäurefragmentes von 500 bp entspricht, bei Erreichen von etwa 2/3 der Gellänge, die Elektrophorese abbrechen.

---

#### **1 x TBE-Laufpuffer**

10,78	g/l	Tris HC
0,089	M	Borsäure
0,74	g/l	EDTA

---



---

#### **6 x Probenpuffer**

40	%	Saccharose (w/v)
1	Kristall	Bromphenolblau

---

### 4.12.3 DNA-Färbung im Agarosegelen

Die durch die Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäurefragmente können durch Färbungen wie z.B. durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid diffundiert in das Agarosegel und interkaliert dort aufgrund seiner planaren Struktur die Basenpaare doppelsträngiger DNA. Durch die anschließende Anregung des Ethidiumbromids durch Licht mit einer Wellenlänge von  $\lambda=302$  nm, fluoreszieren die Banden bei  $\lambda=590$  nm im blauviolettten Licht (Crawford und Waring, 1967). Die Intensität der Fluoreszenz ist hierbei proportional zu der Menge an aufgetragener DNA.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min in eine Lösung aus Ethidiumbromid gelegt (2 mg/l in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) und anschließend mit einem Geldokumentationssystem betrachtet und dokumentiert.

#### 4.12.4 Elektrophorese von RNA

Die Elektrophorese von RNA fand unter denaturierenden Bedingungen statt, da die RNA stark zur Bildung von intramolekularen Sekundärstrukturen wie z.B. Schleifen (*loops*) oder Haarnadeln (*hairpins*) neigt. Des Weiteren besitzt sie im Gegensatz zu der DNA einen niedrigeren pKa-Wert und unterliegt sehr leicht einem alkalischen Abbau. Anstelle von TBE wird somit MOPS als Puffer verwendet, da die Puffersubstanz 3[N-morpholino]-Propansulfonsäure bei pH 7 für RNA am besten geeignet ist. Die RNA-Proben müssen vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Formaldehyd und Formamid enthaltenden Ladepuffer denaturiert werden.

Alle verwendeten Geräte und Materialien waren vor Gebrauch zur Entfernung von RNAsen sterilisiert oder mit *RNAse Away* gereinigt worden. Die verwendeten Lösungen wurden mit DEPC behandelt und autoklaviert. Für die Gelherstellung wurden 0,75 g steriler Agarose in 42,5 ml DEPC-behandeltem Wasser aufgekocht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 60°C wurden 5 ml 10-fach MOPS-Puffer und 2,5 ml deionisiertes Formaldehyd (37% (v/v)) zugesetzt und die Lösung in eine horizontale Gelform gefüllt. 3 µg von total-RNA der zu analysierenden Proben wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf 15 µl aufgefüllt und mit 5 µl RNA-Ladepuffer für 10 min bei 65°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und durch die Anlegung einer Spannung von 10 V/cm Gel die Elektrophorese gestartet.

---

**RNA-Ladepuffer**

---

45,5 %	Formamid (v/v)
15 %	Formaldehyd (v/v)
10 %	MOPS (v/v)
10 %	Glycerol (v/v)
0,1 %	Bromphenolblau (w/v)

---

---

**50 x MOPS**

---

0,2 M	MOPS
0,05 M	Natriumacetat
0,01 M	EDTA

---

## 4.13 DNA-Aufreinigung

### 4.13.1 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Durch PCR erzeugte und auf Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente wurden grundsätzlich zum Entfernen von ungebrauchten dNTPs und Primern, sowie ungewollten PCR-Produkten aufgereinigt. Das gewünschte Fragment wurde nach der Anfärbung mit Ethidiumbromid mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „NukleoSpin Extract II PCR Kit“ nach Herstellerangaben aufgereinigt. Hierbei wurde das ausgeschnittene Gelstück mit 300 µl Bindepuffer pro 100 mg Gel versetzt und für 10 min auf 60°C zum Schmelzen der Agarose erwärmt. Die Flüssigkeit wurde dann über eine Glasfaser-Fleece-Säule gegeben, wobei die Nukleinsäuren nach Abzentrifugieren des Bindepuffers am Fleece hafteten und mit ethanolhaltigen Waschpuffern gereinigt werden konnten. Die Nukleinsäuren wurden dann mit einem Elutionspuffer von dem Fleece gelöst und bei -20°C gelagert.

### 4.13.2 Plasmidaufreinigung

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus einer gesättigten Bakterienkultur wurde das „NukleoSpin Extract Plasmid Kit“ nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei müssen zuerst die Zellwände und Membranen der Bakterien unter Verwendung eines Natriumdodecylsulfat / NaOH haltigen Puffers aufgelöst werden. Freigesetzte bakterielle RNA wird durch zugegebene RNAse H verdaut. Denaturierte Proteine,

chromosomale DNA, Zelltrümmer und SDS werden durch die spätere Zugabe des Bindepuffers präzipitiert und durch Zentrifugation entfernt. Die kürzere Plasmid-DNA verbleibt in Lösung und bindet an das Glasfaser-Fleece der Filtrationsgefäße. Dort kann sie, bevor sie mit einem Tris-Elutionspuffer eluiert wird, durch kurze Wasch- und Zentrifugationsschritte gereinigt werden. Das aufgereinigte Plasmid wurde entweder direkt weiter verwendet oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.14 Restriktionsverdau

Wie auch die Checking-PCR ist der Restriktionsverdau eine Möglichkeit, inserttragende Plasmide nach der Ligation zu identifizieren. Gegenüber der Checking-PCR ist der Restriktionsverdau eine zuverlässigere Methode, um ein Insert und dessen Ausrichtung zu überprüfen. Spezifische Basenabfolgen werden durch jeweilige Restriktionsenzyme erkannt und das DNA-Molekül an dieser Stelle „zerschnitten“. Solche Erkennungsstellen sind meist durch palindromische Sequenzbereiche gekennzeichnet (Smith und Wilcox, 1970), an denen Phosphordiesterbindungen zwischen zwei Nukleotiden zerstört werden. Vektoren besitzen für unterschiedliche Restriktionsenzyme meist mehrere dieser Schnittstellen. Unter Verwendung von Enzymen, deren Schnittstellen die Klonierungsstelle (MCS) des Vektors umfassen, kann man erkennen, ob eine Ligation erfolgreich war. Die Ausrichtung kann man unter Verwendung eines vektorspezifischen und eines zielsequenzspezifischen Enzyms später auf dem Agarosegel an der Größe der entstandenen Fragmente schlussfolgern.

Die zu schneidende aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit den je nach Vektor unterschiedlichen Enzymen (z.B. Eco RI bei TOPO-TA Vektor) und Enzympuffer für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und, um die Enzyme zu deaktivieren, für 20 min auf  $80^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Direkt anschließend wurden die Proben auf einem Agarosegel aufgetragen und überprüft.

---

**Restriktionsansatz**

6	µl	Zu analysierende DNA
1,5	µl	10 x Enzympuffer
1	µl	Restriktionsenzym 1
1	µl	Restriktionsenzym 2
4,5	µl.	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

---

**4.15 Ligation und Klonierung****4.15.1 T/A Ligation**

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung eines DNA-Fragmentes mit einem linearisierten Vektormolekül. Spezielle, aus T4-Phagen gewonnene Enzyme, sogenannte Ligasen, sind in der Lage, zwei DNA-Stücke unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3' OH-Gruppe des einen Stranges und der 5' Phosphatgruppe des anderen zu verbinden. Die in der vorrausgehenden PCR verwendete Taq-Polymerase hat die Eigenschaft, am 3'-Ende des DNA-Stranges ein einzelnes Adenosin anzuhängen (Clark, 1988). Bei der T/A-Ligation nutzt man diese Eigenschaft aus und verwendet Vektoren, die ein einzelnes komplementäres Thymin an den jeweiligen Enden enthalten. Die Ligation bei solchen kohäsiven Enden ist wesentlich effizienter als die Ligation glatter Enden (*blunt ends*), allerdings kann die Orientierung des Fragmentes im Vektor nicht vorhergesagt werden.

Zur Ligation wurde TOPO TA Cloning® von Invitrogen verwendet. Dies ist eine sehr schnelle Methode zur Ligation, bei der anstelle einer Ligase ein mit *Vaccinia* Topoisomerase I aktivierter Vektor zum Einsatz kommt. Die Topoisomerase bindet an spezielle Sequenzen des Vektors und schneidet diesen unter Ausbildung einer 3'-Phosphotyrosyl-Bindung. Durch die Verknüpfung des überhängenden 3' Adenosins des PCR Produktes mit dem Vektor, wird die Topoisomerase wieder freigesetzt.

Das aufgereinigte PCR Produkt wurde für 5 min mit dem Vektor bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend direkt weiter verwendet oder über Nacht bei -20°C gelagert.

---

**TOPO TA Cloning, Ligationsansatz**

4	µl	Aufgereinigtes PCR Produkt
1	µl	Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl <sub>2</sub> )
1	µl	TOPO TA-Vektor

---

**4.15.2 Transformation**

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von Fremd-DNA in kompetente Bakterien (Hanahan 1983; Cypionka 1999). Durch Replikation wird die eingeschleuste DNA vom Bakterium vervielfältigt. *In vivo* sind Bakterien in geringem Maße auch dazu fähig, Fremd-DNA aus der Umgebung aufzunehmen (Konjugation, Infektion). Um eine erfolgreiche Transformation durchzuführen, verwendet man allerdings sogenannte kompetente Zellen, die durch physikalische und chemische Behandlungen in der Lage sind, Plasmide leichter aufzunehmen.

**4.15.2.1 Transformationsansatz**

Für die Transformation wurden One Shot ® TOP10 Competent Cells (*E. coli*) von Invitrogen verwendet. 25 µl der kompetenten Zellen wurden von –80°C für 5 min auf Eis aufgetaut. 4 µl des Ligationsansatzes wurden hinzugefügt und auf Eis für 15 min inkubiert. In einem Wasserbad bei 42°C wurden die Zellen einem Hitzeschock unterzogen, der die Aufnahme der DNA zusätzlich erhöhte (Cohen et al., 1972). Nach der Abkühlung auf Eis für 3 min wurden 250 µl auf Raumtemperatur erwärmtes SOC Medium dazugegeben und eine Stunde bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Selektionsplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 4.15.3 Blau-Weiß-Selektion der transformierten Bakterien

Da nur ein geringer Anteil der Bakterien erfolgreich transformiert wird, ist es notwendig, erfolgreich transformierte Bakterien von den anderen zu unterscheiden. Zusätzlich zu einem Antibiotikaresistenzen trägt der TOPO-TA Vektor zusätzlich auch das Lac-Z Gen, welches ein Fragment der  $\beta$ -Galactosidase codiert und sich in der *Multiple Cloning Site* des Vektors befindet. Die  $\beta$ -Galactosidase katalysiert den Abbau von Lactose zu Galaktose und Glucose (Ullmann et al., 1967). In den Selektionsplatten ist X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), ein weiteres Substrat für die  $\beta$ -Galactosidase vorhanden, welches durch sie nach Induktion mit IPTG zu einem blauen Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo) umgesetzt wird. Wird nun in die MCS ein Fragment eingebaut, wird das Gen für Lac-Z zerstört und keine funktionsfähige  $\beta$ -Galactosidase gebildet (Insertionsinaktivierung). Somit wird X-Gal nicht zu dem blauen Farbstoff umgesetzt und die Bakterienkolonien bleiben weiß. Weiße Bakterienkolonien auf der Selektionsplatte mit X-Gal, IPTG und Antibiotika besitzen somit ein Plasmid mit einem Insert und können isoliert und vermehrt werden.

#### 4.15.3.1 Herstellung der Selektionsplatten

LB-Agar wurde autoklaviert und auf etwa 50°C abgekühlt, bevor Antibiotika, der Induktor IPTG und das Substrat X-Gal zugefügt wurden. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen (etwa 25 ml je Petrischale) und für 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Schalen wurden bis zum Gebrauch luftdicht verpackt und bei 4°C gelagert.

---

#### **Selektionsplatten C50/X-Gal/IPTG**

1,5	%	LB-Agar (w/v)
0,01	%	Canamycin (w/v)
0,5	mM	IPTG
0,02	%	X-Gal (v/v)

---

## 4.16 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient zur Bestimmung der Nukleotidreihenfolge einer Nukleinsäurekette. Das hier verwendete Verfahren nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) wird auch als Kettenabbruchmethode oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet. Die Methode besteht aus einer Sequenzier-PCR, einer anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung der entstandenen Sequenzierfragmente und deren Detektion und Auswertung. Die Sequenzierreaktion ähnelt einer normalen PCR. Allerdings werden neben herkömmlichen dNTPs auch Didesoxynukleotide (ddNTP) verwendet, die zu einem Abbruch der Kettenreaktion führen, da durch die fehlende 3'-Hydroxylgruppe keine weitere Verknüpfung der Kette erfolgen kann. Es handelt sich um 2',3'-Dideoxynukleotidanaloga der dNTPs. Im Gegensatz zu einer normalen PCR werden nicht sowohl Vorwärts- und Rückwärtsprimer verwendet, sondern nur jeweils einer. Dieser ist speziell zur späteren Detektion mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert (*gelabelte Primer*). Alternativ kann die Detektion auch Autoradiographie erfolgen. Nach genügend Zyklen der Sequenzierreaktion erhält man durch den Abbruch der Dideoxynukleotide ein Gemisch aus Nukleotidfragmenten, die sich in ihrer Länge jeweils nur um ein Nukleotid unterscheiden. Durch elektrophoretische Auftrennung kann deren Reihenfolge anhand der Laufweiten bestimmt werden. Vier unterschiedliche Reaktionsansätze mit jeweils eines der Dideoxynukleotide werden zu Identifizierung der Basen verwendet und nebeneinander auf das Gel aufgetragen. Durch die Laufweiten der Fragmente entsteht ein charakteristisches Leitermuster, an dem man die Basenabfolge ablesen kann. Es wurden automatisierte DNA-Sequenzierer (Licor 4200 und 4200L) verwendet, die bei der Elektrophorese der Sequenzierreaktionsprodukte mit einem Laser den an die Primer gebundenen Farbstoff (IR<sub>700</sub> bzw. IR<sub>800</sub>) anregen und das von ihm emittierte Licht mit Scannern detektieren. Die Daten wurden an einen Computer weitergegeben und dort ausgewertet.

### 4.16.1 Herstellung des Sequenziergels

Das Polyacrylamidgel (6%) wurde mit dem Zweikomponentensystem *Sequagel complete* hergestellt. 24 ml der ersten, harnstoff-, acrylamid- und

bisacrylamidenthaltende Lösung wurden mit 6 ml der zweiten, 5x TBE und TEMED-enthaltenden Lösung gemischt und mit 170 µl 10%-igem APS versetzt. Die Gelmischung wurde blasenfrei zwischen zwei vorher gereinigten Glasplatten (66 cm x 41 cm) die einem Abstand von 0,25 mm hatten, gegossen und am oberen Ende ein Vorkamm zur späteren Bildung der Geltaschen eingefügt. Für die Polymerisation der Matrix wurden mindestens zwei Stunden benötigt.

#### 4.16.2 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktion werden das zu sequenzierende Plasmid, markierte Primer, dNTPs, entsprechende ddNTPs und die Polymerase benötigt. In dem verwendeten Thermo Sequenase Kit waren alle Komponenten bis auf Primer und Plasmid bereits für jedes ddNTP vorgemischt. 4,5 µl der Primer-Plasmidlösung wurden jeweils zu 1,5 µl der vier verschiedenen ddNTP Ansätze in ein separates 200 µl Reaktionsgefäß gegeben. Nach kurzen Zentrifugieren zur Vermischung wurde das Temperaturprogramm gestartet. Im Gegensatz zu einer Standard PCR entstehen hier einzelsträngige, primermarkierte Produkte unterschiedlicher Länge.

---

#### **Primer-Plasmid Lösung**

5	µg	Plasmid
1	µl	Primer (2 mM) IR <sub>700</sub>
1	µl	Primer (2 mM) IR <sub>800</sub>
ad 20		H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>

---



---

#### **Sequenzierprogramm**

1 Zyklus	95°C	für 5 min (Initiale Denaturierung)
30-35 Zyklen	95°C	für 30 sec
	T m	für 30 sec
	72°C	für 30 sec
1 Zyklus	72°C	für 10 min
danach	4°C	~

---

Nach Beendigung der Reaktion wurde der Reaktionsansatz mit 3  $\mu$ l Sequenzierungsladepuffer versetzt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Dies ist notwendig, da sich aufgrund von intra- und intermolekularen Wechselwirkungen neben Schleifen auch Dimere sowie Polymere der Sequenzierfragmente bilden können und das Auslesen der Sequenzierbanden erschweren würde. Der Ladepuffer enthielt Formamid als denaturierendes Agens. Nach der Denaturierung wurden die Proben dunkelgestellt und auf Eis abgekühlt.

---

#### ***Sequenzierungsladepuffer***

95	%	Formamid (v/v)
0,1	%	Xylencyanol (v/v)
0,1	%	Bromphenolblau (w/v)
10	mM	EDTA

---

#### **4.16.3 Sequenzier-Elektrophorese**

Dem auspolymerisiertem Gel wurde der Vorkamm entnommen und die entstandene Tasche gründlich von Gelresten befreit. Das Gel wurde in die Sequenzapparatur eingesetzt und ein etwa 45 minütiger Vorlauf gestartet, bei dem das Gel auf 50 °C erwärmt und mit dem Laufpuffer (1x TBE) äquilibriert wurde. Vor dem eigentlichen Start der Elektrophorese wurde die Geltasche erneut gereinigt und ein auf 12 Sequenzierreaktionen ausgelegter Kamm (*48well shark-tooth comb*) vorsichtig bis an den Ansatz des Gels in die Tasche geschoben. 1,3  $\mu$ l der Proben wurden in der Reihenfolge G A T C auf das Gel pipettiert und die Elektrophorese gestartet. Nach einem acht stündigem Elektrophoreselauf wurden die erhaltenen Signale bzw. Banden durch ein Analyseprogramm und anschließender manueller Kontrolle in die jeweilige Sequenz übersetzt.

## 5.0 Ergebnisse

### 5.1 Morphologie der Silikatnadeln von *Monorhaphis chuni*

Zur grundlegenden Übersicht über die Morphologie der Pfahlnadel von *M. chuni*, wurde sie zunächst mikroskopisch untersucht.

Bereits 1904 beschrieb Schulze den lamellaren Aufbau der Nadeln von *Monorhaphis*, wobei er sein Hauptaugenmerk auf die große Pfahlnadel, die Basalia, richtete. Die Organisation und Anordnung der Silikatschichten in den Comitalia, die üblicherweise 50 mm lang werden, und der Pfahlnadel, die 3 m lang werden können, sind sehr ähnlich. Neben lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden zur Analyse der Morphologie der Nadeln zusätzlich moderne elektronenmikroskopische Methoden verwendet.

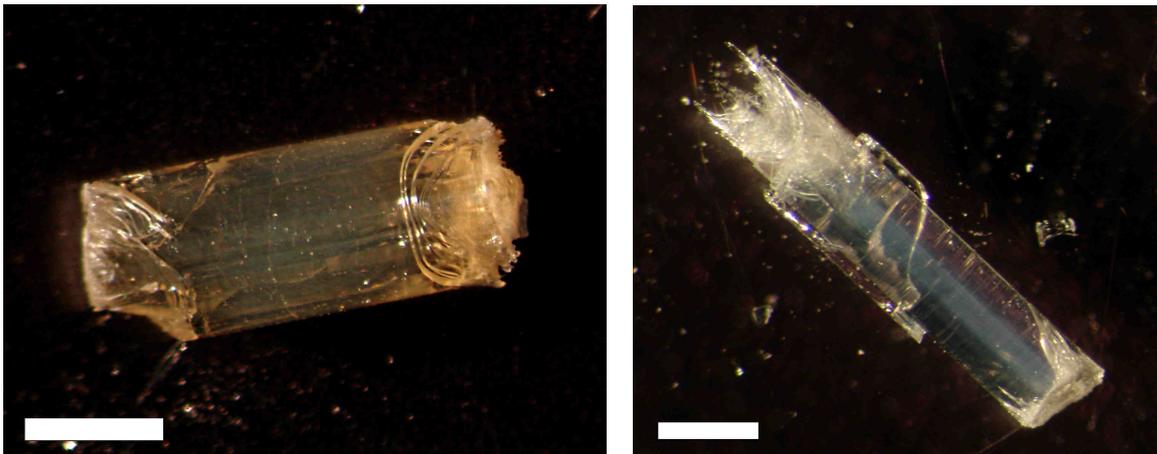


Abb. 9: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Bruchstücken der Pfahlnadel von *M. chuni*. An den Bruchstellen kann man den lamellaren Aufbau erkennen. Der zentrale Bereich der Nadel besitzt einen anderen Brechungsindex als der Rest der Nadel, was vermutlich auf die unterschiedliche Struktur oder Zusammensetzung des Axialzylinders zurückzuführen ist. Messbalken: 0,6 mm.

Bei Betrachtung von Bruchstellen der Comitalia und Pfahlnadel kann man zwischen 20-40  $\mu\text{m}$  dicken primären- und 3-10  $\mu\text{m}$  dicken sekundären-Silikatschichten unterscheiden. Bis zu 10 sekundäre Schichten bilden hierbei eine primäre Schicht. Unter dem Binokular unterscheidet sich bei Lichteinfall der innere Teil der Nadel von dem äußeren. Dies lässt auf eine abweichende Struktur oder Zusammensetzung des

in der Mitte befindlichen Axialzylinders gegenüber der äußeren lamellaren Zone schliessen.

In Querschnitten kann man die Nadel in drei Teile aufteilen (siehe Abb. 10): den Axialkanal (ak), den Axialzylinder (az) und die lamellare Zone (lz) (siehe Abb. 10). Der Axialkanal befindet sich im Zentrum der Nadel und enthält das Axialfilament (2-4  $\mu\text{m}$ ). Um den Axialkanal erstreckt sich der Axialzylinder, der aus elektronendichtem, homogenerem Silikat besteht (100-150  $\mu\text{m}$  im Durchmesser bei der Pfahlnadel von *M. chuni*). Danach folgt die lamellare Zone. Sie besteht, je nach Dicke der Nadel, aus 300 bis 500 regelmäßig konzentrisch angeordneten Lamellen mit 3-10  $\mu\text{m}$  Breite. Erst eine leichte Anätzung des Silikates führt dazu, eine vorher noch nicht beschriebene Ringstruktur im Axialzylinder sichtbar zu machen.

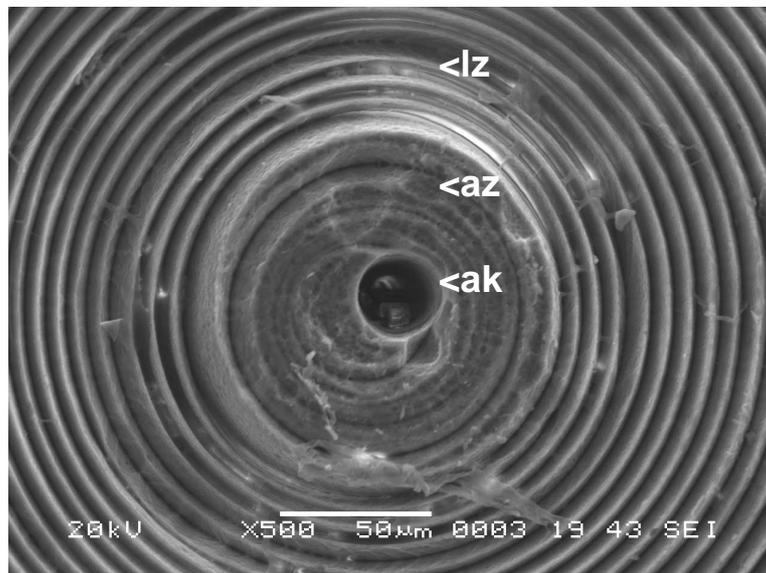


Abb. 10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines mit Flusssäure angeätzten Querschnitts der Pfahlnadel von *Monorhaphis chuni*. Lz= lamellare Zone; ak= Axialkanal; az= Axialzylinder.

Da der Grundaufbau, der Axialkanal, der Axialzylinder und die lamellare Zone, bei allen untersuchten Silikatnadeln der Schwämme gleich sind, erfolgt auch die Demineralisation in ähnlicher Weise. Die Auflösung der lamellaren Zone ist erheblich schneller als die des Axialzylinders. Die Struktur des Axialzylinders ist kompakt und die Auflösung des Silikates erfolgt von aussen und aus der Richtung des Axialkanals. Die einzelnen Schichten der lamellaren Zone hingegen werden gleichzeitig von aussen und innen aufgelöst (siehe Abb. 11).

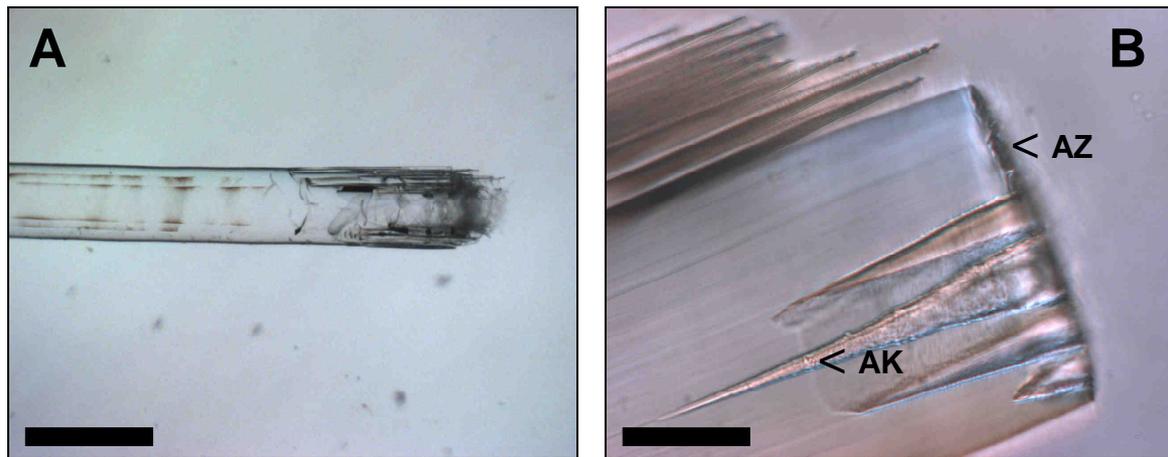


Abb. 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Comitalia von *M. chuni*. (A) Bruchstelle und (B) beginnende Demineralisation mit Flusssäure. Die lamellare Schicht wird schnell durch Flusssäure aufgelöst, im Gegensatz zu dem homogeneren Axialzylinder. AZ= Axialzylinder, AK= Axialkanal; Messbalken A: 0,8 mm; B: 50  $\mu$ m.

### 5.1.1 Elektronenmikroskopische Untersuchungen der lamellaren Zone der Pfahlnadel

Es ist bekannt, dass sich innerhalb von Nadeln organisches Material befindet (Croce *et al*, 2004). Es ist noch nicht bekannt, wo dieses Material, außer im Axialfilament, genau lokalisiert ist.

Um die Struktur der lamellaren Zone zu analysieren und die Lokalisation von organischem Material zu überprüfen, wurden Bruchstücke mit Flusssäure behandelt und unter dem Rasterelektronenmikroskop genauer untersucht. Die Anätzung dient dazu, mögliche Strukturen innerhalb der Silikatschichten freizulegen.

Um die lamellare Zone separat zu untersuchen, wurde sie mechanisch von dem Axialzylinder und dem Axialfilament isoliert.

Mit Hilfe des Binokulars kann man erkennen, dass nur noch ein Teil der lamellaren Zone vorhanden ist (siehe Abb. 11). Die primären Silikatschichten zeichnen sich am Rand ab. Im Gegensatz dazu ist es aufgrund der geringen Größe des Axialzylinders nicht möglich, diesen vollständig von der lamellaren Zone zu separieren.

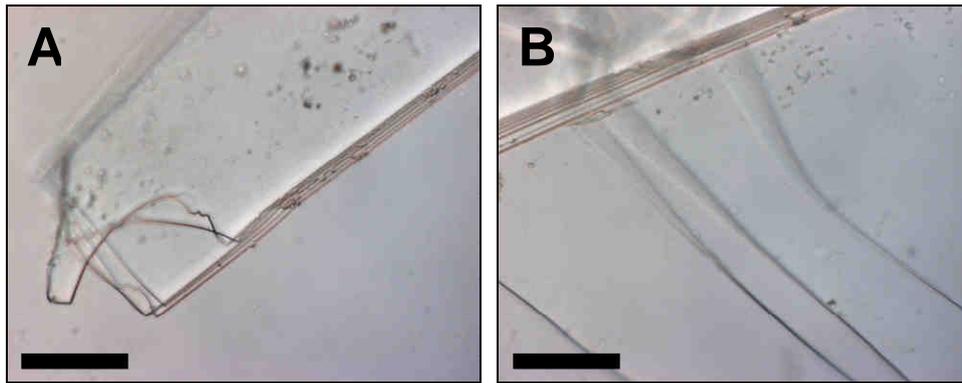


Abb. 12: Bruchstücke der lamellaren Zone einer Pfahlnadel von *M. chuni*. Bei mechanischer Belastung größerer Nadeln ist es möglich, Teile der lamellaren Zone von dem Axialzylinder zu trennen. Messbalken A: 500  $\mu\text{m}$ ; B: 300  $\mu\text{m}$ .

Bei teilweiser Auflösung des Silikates ist organisches Material innerhalb der lamellaren Zone zu erkennen. Es treten einzelne säulenartige Verbindungen zwischen den Resten der Silikatschichten zutage (siehe Abb. 13). Die Säulenstrukturen kommen in hoher Anzahl vor und befinden sich in dem vorher von Silikat ausgefülltem Raum sowie den Zwischenräumen der Lamellen. Sie besitzen eine Breite von etwa 150 nm und sind unregelmäßig verteilt. Der Abstand der Silikatschichten beträgt 6 bis 10  $\mu\text{m}$  und stimmt mit den Größen der unaufgelösten Schichten überein.

Organisches Material befindet sich, nach den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zu urteilen, nicht nur zwischen den Silikatschichten, sondern auch innerhalb des Silikates.

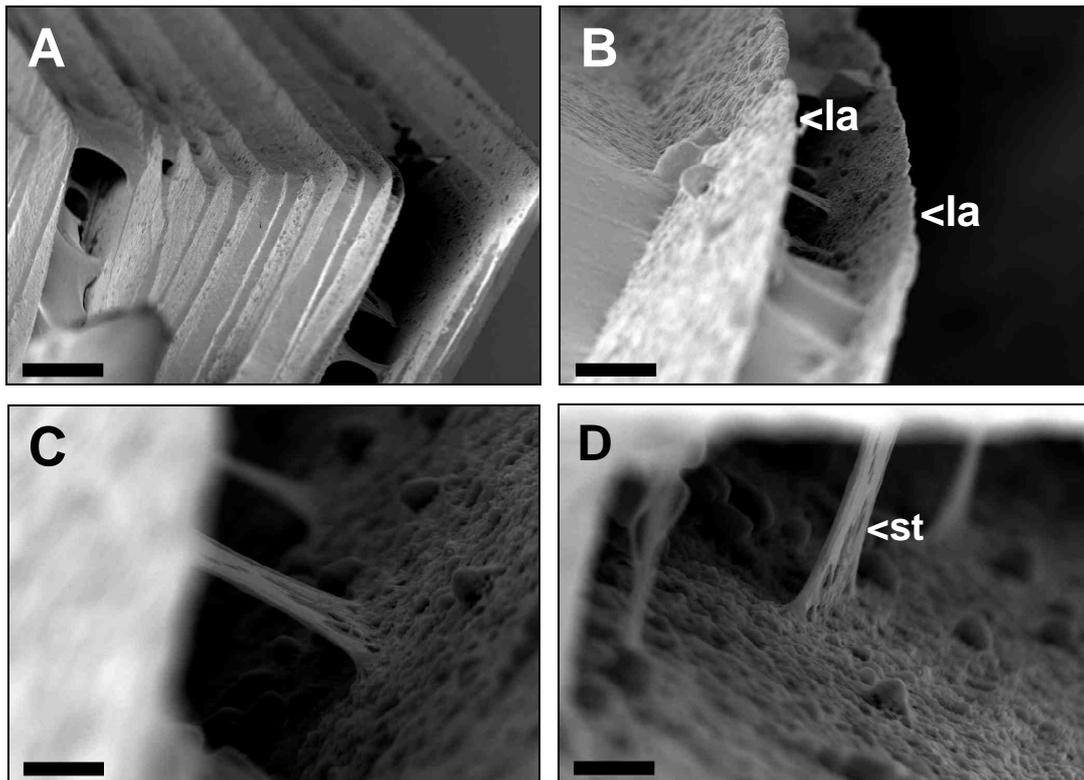


Abb. 13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der lamellaren Zone einer Pfahlnadel von *M. chuni*. Das Silikat ist fast vollständig durch Flusssäurebehandlung aufgelöst. Bild A zeigt eine Übersicht mehrerer Lamellen. Bild B, C und D zeigen höhere Vergrößerungen des Bereiches der aufgelösten Lamelle. la= Lamelle; st= Säulenstruktur. Messbalken A: 20  $\mu\text{m}$ ; B: 4  $\mu\text{m}$ ; C+D: 300 nm.

## 5.2 Analyse der Verteilung anorganischer Komponenten im Querschnitt der Pfahlnadel von *Monorhaphis chuni*

Die anorganischen Bestandteile von Schwammnadeln wurden bei einigen Arten schon untersucht, aber die Verteilung innerhalb der Nadel bei *M. chuni* ist noch unklar. Um die Verteilung der anorganischen Substanzen im Querschnitt der Nadel zu untersuchen, wurde ein Querschnitt der Pfahlnadel von *M. chuni* (150  $\mu\text{m}$  Dicke; 1,7mm Durchmesser) erst unter dem Rasterelektronenmikroskop aufgenommen und dann mit der Elektronenstrahl-Mikrosonde analysiert.

Die Elektronenstrahl-Mikrosonde ist im Prinzip ein Röntgenspektrometer. Ein mittels eines elektronischen Linsensystems auf wenige  $\mu\text{m}$  gebündelter Elektronenstrahl regt die Elemente zur Aussendung von Röntgenstrahlung an. Die für jedes Element charakteristische Strahlung wird mittels Halbleiterdetektoren analysiert. Die Probe

lässt sich unter dem Elektronenstrahl bewegen, so dass sie Punkt für Punkt analysiert werden kann.

Im zentralen Bereich der Nadel lag zu 85 bis 89 Gew.-%  $\text{SiO}_2$  vor, welches im Randbereich (200  $\mu\text{m}$ ) mit 84 bis 86 Gew.-% in geringerem Maße vorhanden war. Ebenfalls zeigte sich bei  $\text{Na}_2\text{O}$  und  $\text{K}_2\text{O}$  ein Konzentrationsunterschied zwischen dem zentralen und dem Randbereich (150  $\mu\text{m}$ ) der Nadel. Die Natriumoxidkonzentration reichte von 0,02 bis 0,05 Gew.-% im zentralen Bereich bis zu 0,42 bis 0,52 Gew.-% im Randbereich, die Kaliumoxidkonzentration von 0,8 bis 1,3 Gew.-% im zentralen und 0,28 bis 0,41 Gew.-% im Randbereich. Andere Elemente wie Fe, Ba, Al, Mg, Ca oder Sr lagen in einer Konzentration von unter 0,02 Gew.-% vor. Einige Elemente wie Kohlenstoff können mit dieser Methode nicht zuverlässig nachgewiesen werden und bilden die Differenz zu 100%.

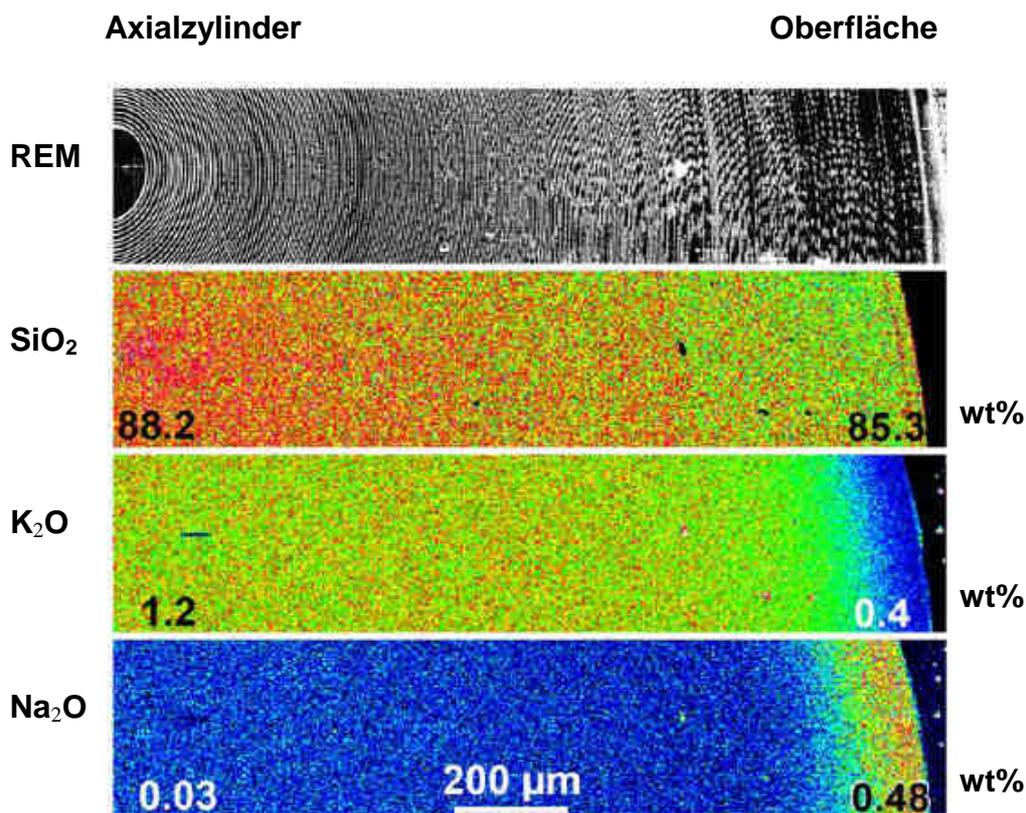
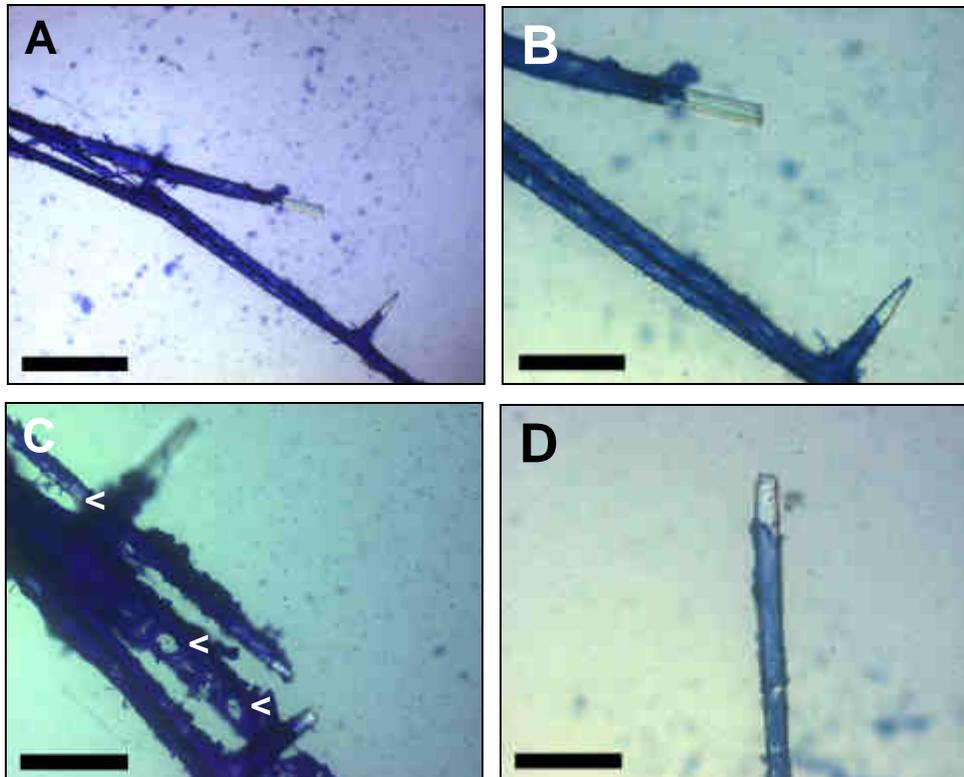


Abb. 14: Elektronen-Mikrosonde Analyse des Querschnitts der Pfahlnadel von *M. chuni*. Das oberste Bild zeigt eine REM-Aufnahme mit dem zentralen Teil der Nadel (Axialzylinder) am linken und dem äußeren Teil am rechten Bildrand. Die Bilderfolge von oben nach unten zeigt weitere Elektronen-Mikrosonde-Analysen für Siliziumdioxid, Natriumoxid und Kaliumoxid. Die Konzentrationen reichen von blau (niedrig) über grün und gelb zu rot. Werte für die zentrale- und Randposition sind jeweils links und rechts angegeben.

### 5.3 Äussere organische Komponenten der Silikatnadeln

Nadeln aus alkoholfixiertem Gewebe von *Monorhaphis chuni* wurden durch Ultraschallbehandlung vom Weichkörper getrennt und mit Coomassie Brilliant Blau-Lösung gefärbt, um mögliche verbleibende äussere Strukturen sichtbar zu machen. Man kann trotz der Reinigung mit Ultraschall noch einen Überzug aus organischem Material auf den Nadeln (hier Tauaktine) erkennen. In unregelmäßigen Abständen befinden sich ovale Löcher mit einem Durchmesser von ca. 10 µm (Abb. 12, C). Die Enden der ungebrochenen Nadeln sind frei von organischem Material (Abb. 12, B). Weitere elektronenmikroskopische Studien der Arbeitsgruppe W.E.G. Müller zeigten, dass es sich bei dieser Hülle um eine netzartige, fibrilläre Struktur handelt, die mit ihrem Bandenmuster elektronenmikroskopischen Bildern von Kollagen ähnlich sieht. Nach einer EDX (*energy dispersive X-ray spectroscopy*) Untersuchung der Nadeloberfläche konnten Kohlenstoff, Sauerstoff und Silizium Signale identifiziert werden (Müller *et al.*, 2007).



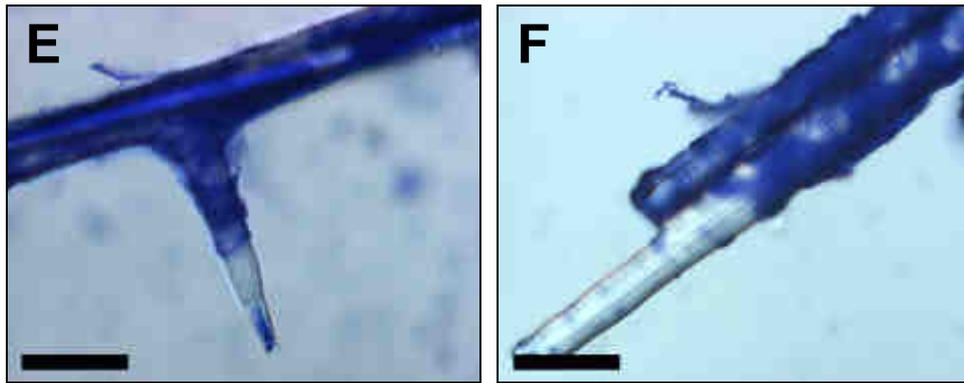


Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit Coomassie Brilliant Blau gefärbter Nadeln von *M. chuni*. A, B-D und E-F zeigen jeweils höhere Vergrößerungen. Zu erkennen ist eine stabile äußere Hülle aus organischem Material, die unregelmäßig verteilte ovale Löcher aufweist (Bild C, Pfeile). Die gesamte Nadel, mit Ausnahme der Spitzen (B,E) ist von dieser Hülle bedeckt. Messbalken A: 200  $\mu\text{m}$ ; B-D: 100  $\mu\text{m}$ ; E-F: 50  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4 Analyse von organischen Bestandteilen innerhalb der Nadeln

Nach Demineralisation der Nadeln von *S. domuncula* und *T. aurantium* wurde in bisherigen Arbeiten als zurückbleibendes organisches Material nur das Axialfilament mikroskopisch identifiziert. Um vor allem in der lamellaren Zone weitere Strukturen sichtbar zu machen, wurden verschiedene Stadien des Auflösungsprozesses der Nadeln von *M. chuni* und *C. meyeri* mikroskopisch untersucht.

Um nach Ultraschall- und Hypochloridbehandlung die widerstandsfähige äußere Hülle der Nadeln zu entfernen, wurden sie unter Verwendung eines Säuregemisches entfernt. Danach wurden die Nadeln mittels Flusssäurepuffer demineralisiert, um organisches Material innerhalb des Silikates freizusetzen (siehe Methoden). Die zurückbleibenden Strukturen wurden für weitere mikroskopische und biochemische Versuche verwendet.

### 5.4.1 Comitalia von *Monorhaphis chuni*

#### 5.4.1.1 Analyse der organischen Bestandteile der Comitalia

Nach teilweiser Auflösung der Comitalia von *M. chuni* kann man unter dem Mikroskop nicht nur, wie zu erwarten, das freigelegte Axialfilament, sondern auch noch weitere großflächig ausgebreitete Strukturen erkennen. In der Nadelmitte, dem Bereich des Axialfilaments, kann man einen etwa 6-10  $\mu\text{m}$  breiten, sich vom restlichen Teil der Nadel unterscheidenden Bereich, abgrenzen. Dieser besitzt eine feinkörnige Struktur im Gegensatz zu der filamentösen Struktur des restlichen Materials (siehe Abb. 13, A). Der restliche filamentöse Bereich hat im Durchschnitt eine Breite von 50 bis 100  $\mu\text{m}$ .

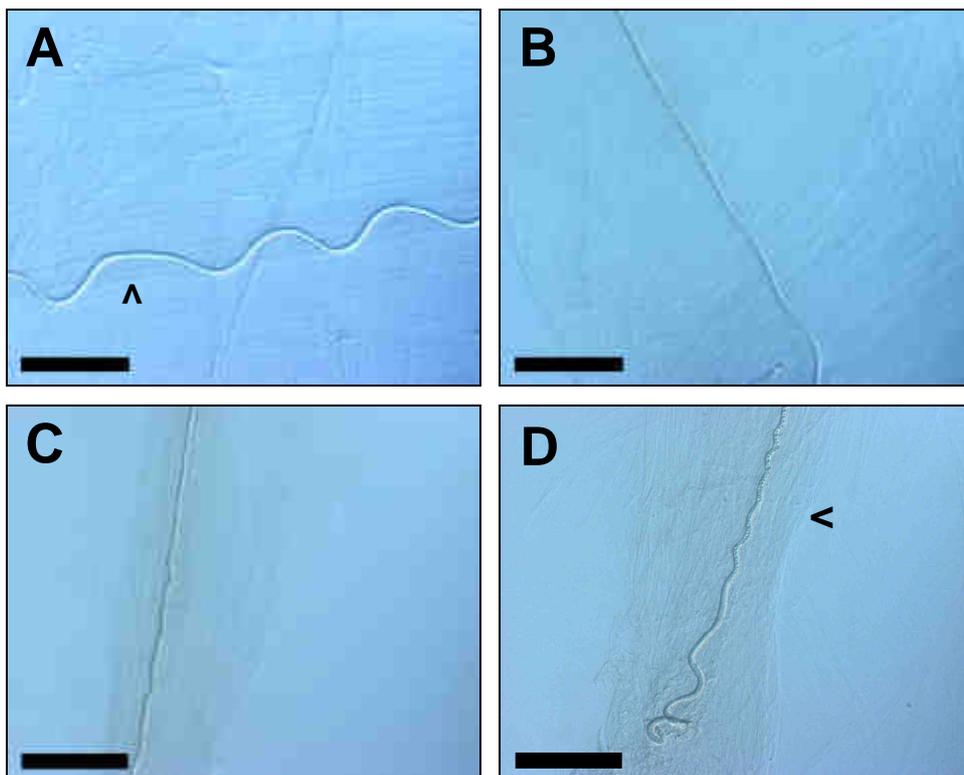
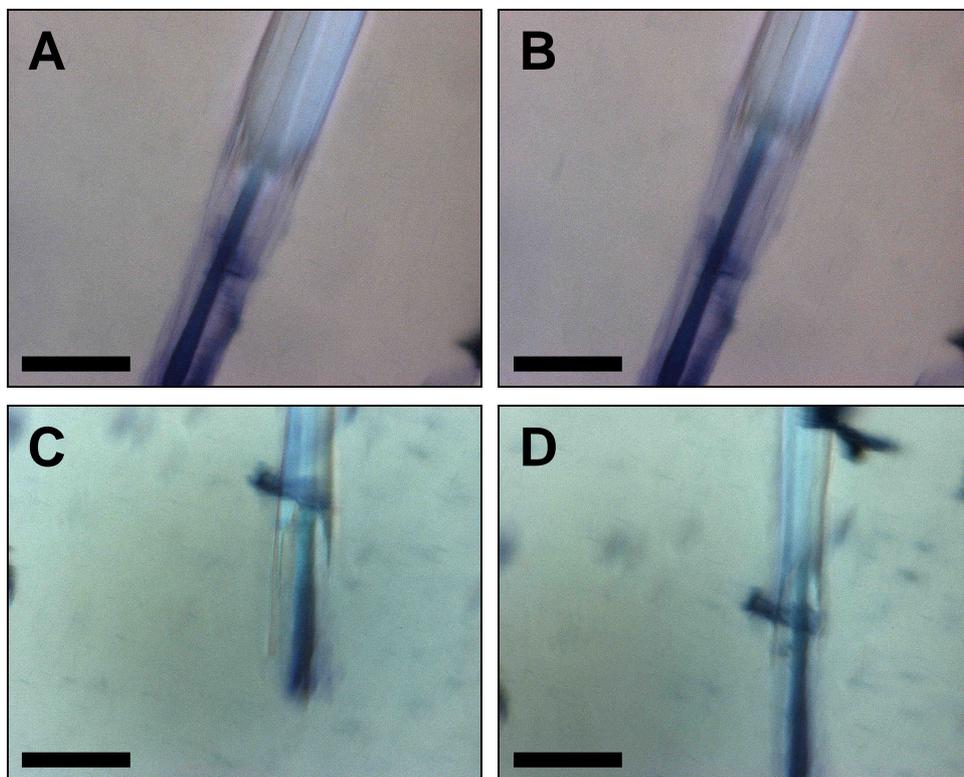


Abb. 16: Lichtmikroskopische Aufnahme einer ungefärbten Comitalia von *M.chuni* nach der Auflösung durch Flusssäure. Klar zu erkennen ist das Axialfilament mit einem Durchmesser von 4-5  $\mu\text{m}$  in der Mitte der Nadel. Um das Axialfilament herum befindet sich eine etwa 10  $\mu\text{m}$  breite Zone (Pfeil Bild A), die sich im Vergleich zu dem äußeren, eher filamentösen, netzartigen Bereich durch ihre körnige Struktur unterscheidet (Pfeil Bild D). Messbalken: 50  $\mu\text{m}$

#### 5.4.1.2 Analyse der organischen Bestandteile im Verlaufe des Auflösungsprozesses der Comitalia

Bei Auflösung der Comitalia von *M. chuni* und gleichzeitiger Färbung mit Coomassie Brilliant-Blau kann man aufgrund des relativ großen Durchmessers gegenüber den bisher untersuchten Nadeln der Demospongia angefärbte Strukturen gut beobachten. Das Axialfilament wird wie zu erwarten stark angefärbt. Des weiteren kann man blaue Bereiche in der gesamten Nadeldicke erkennen. Diese angefärbten Bereiche im Axialzylinder und der lamellaren Zone verschwinden bei zunehmender Flusssäurebehandlung und es bilden sich zusehends mehr Aggregate in der Lösung. Die Bilder in Abb 17 zeigen die Auflösung einer Comitalia mit 4 M Flusssäurepuffer (4M HF / NH<sub>4</sub>F). In den ersten Minuten der Auflösung kann man noch deutlich eine Struktur erkennen, die bei der Freisetzung aus dem Silikat durch Coomassie blau angefärbt wird (Bild A und B). Nach mehreren Minuten, abhängig von der Flusssäurekonzentration und der Nadeldicke, zerfällt diese Struktur und bildet ungebundene Aggregate in der Lösung. Es ist dann nur noch das Axialfilament bzw. der Axialzylinder zu erkennen (Bilder C-F).



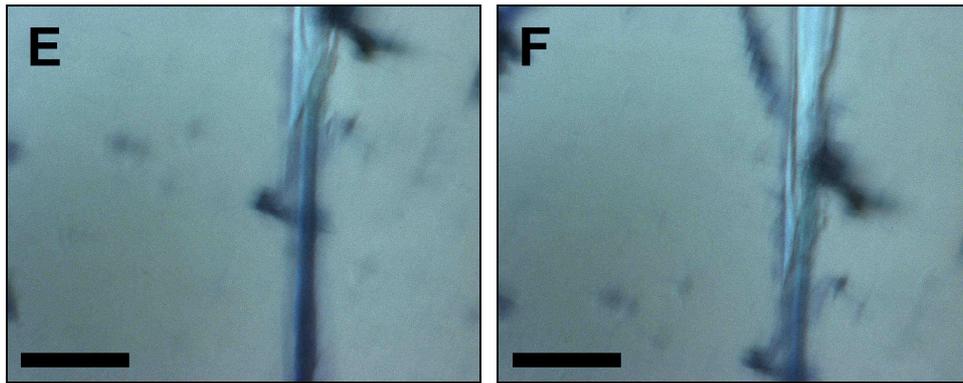


Abb. 17: Lichtmikroskopische Aufnahmen von schrittweiser Auflösung einer Comitalia von *M.chuni*, gefärbt mit Coomassie Brilliant Blau. In den Bildern A und B kann man noch die freigesetzte organische Struktur erkennen, die das Axialfilament umgibt. Bei längerer Flusssäurebehandlung zerfällt diese Struktur und bildet Aggregate in der Lösung (Bilder C bis F). Messbalken A + B: 100  $\mu\text{m}$ ; C-F: 200  $\mu\text{m}$ .

## 5.4.2 Tauactine von *Monorhaphis chuni*

### 5.4.2.1 Analyse der organischen Bestandteile der Comitalia

Neben dem relativ großen Nadeltyp der Comitalia (bis zu 6 cm lang) wurde zum Vergleich auch eine andere, kleinere Nadelform, die Tauactine, nach Reinigung durch das Schwefelsäure-/ Salpetersäuregemisch mit Flusssäure ganz oder teilweise aufgelöst. Es sind die gleichen Strukturen wie bei der Auflösung der Comitalia zu beobachten mit Ausnahme des schmalen, körnigen Bereiches um das Axialfilament. Das zentrale Axialfilament ist von einem etwa 40  $\mu\text{m}$  breiten Bereich mit filamentöser Struktur umgeben, der in etwa dem Bereich des Axialzylinders entspricht. Die Bilder A und B zeigen eine halbaufgelöste Nadel, bei der noch Überreste der äußeren lamellaren Zone zu sehen ist. In Bild E und F ist diese äußere lamellare Zone bereits aufgelöst und nur noch der Axialzylinder und das Axialfilament sind zu sehen. Das Axialfilament ist von dem filamentösen Material, welches wahrscheinlich aus dem Axialzylinder stammt, umgeben.

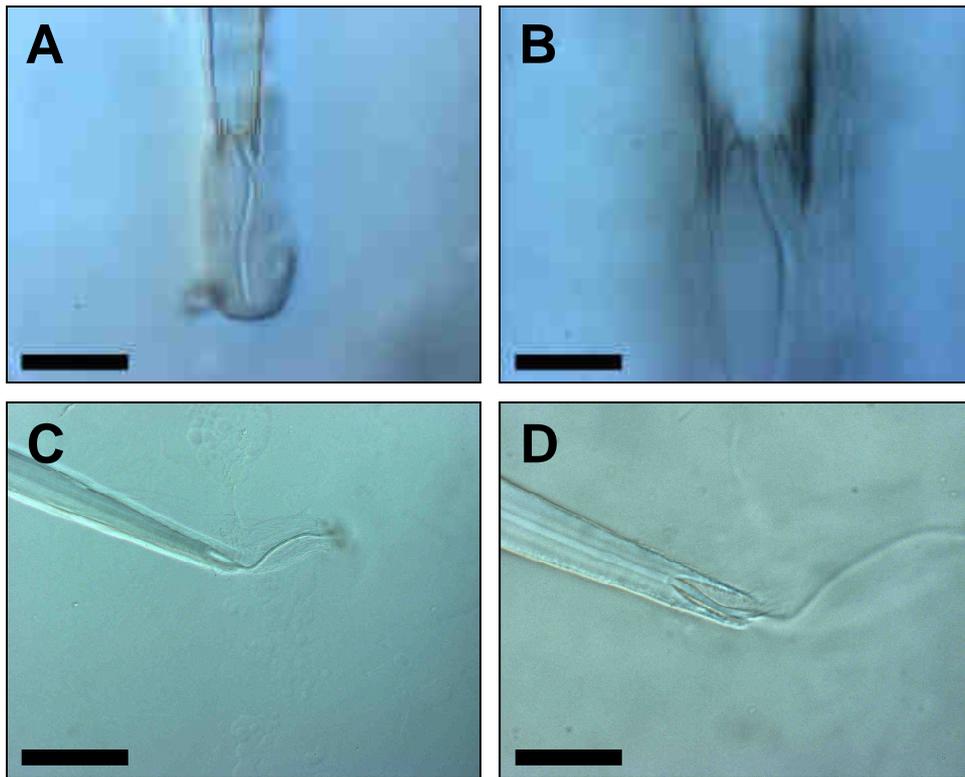


Abb. 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen ungefärbter, teilweise aufgelöster Tauactine von *M.chuni*. Das Axialfilament hebt sich deutlich von dem restlichen Material innerhalb der Nadel ab. In den Bildern A-D sind halbaufgelöste Nadeln zu sehen, bei denen die äußeren Schichten aus Silikat schon gelöst sind (A,B) oder nur noch die inneren bzw. der Zentralzylinder sichtbar ist (C,D). Messbalken A, C: 100  $\mu\text{m}$ ; B, D: 50  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.2.2 Analyse der organischen Bestandteile im Laufe des Auflösungsprozesses der Tauactine

Das durch die Silikatauflösung freigelegte Material lässt sich gut mit einer Standard Färbelösung für Proteine, dem Coomassie Brilliant Blau, anfärben. Coomassie bindet an das freigelegte Axialfilament und färbt dieses tiefblau. Bei der Auflösung des Silikates kann man die Entstehung von blauen Aggregaten erkennen. Diese stammen aller Wahrscheinlichkeit nach aus dem das Axialfilament umgebenden Silikat. Die Aggregate nehmen entsprechend der Anzahl der aufgelösten Nadeln zu. Die Bilder A bis F in Abb 18 zeigen die Auflösung einer Tauactine. Gut zu erkennen ist das Axialfilament und die entstandenen blau angefärbten Aggregate.

Der Auflösungsprozess der zwei verschiedenen Nadeltypen, der Comitalia und der Tauactine, findet in identischer Art und Weise statt.

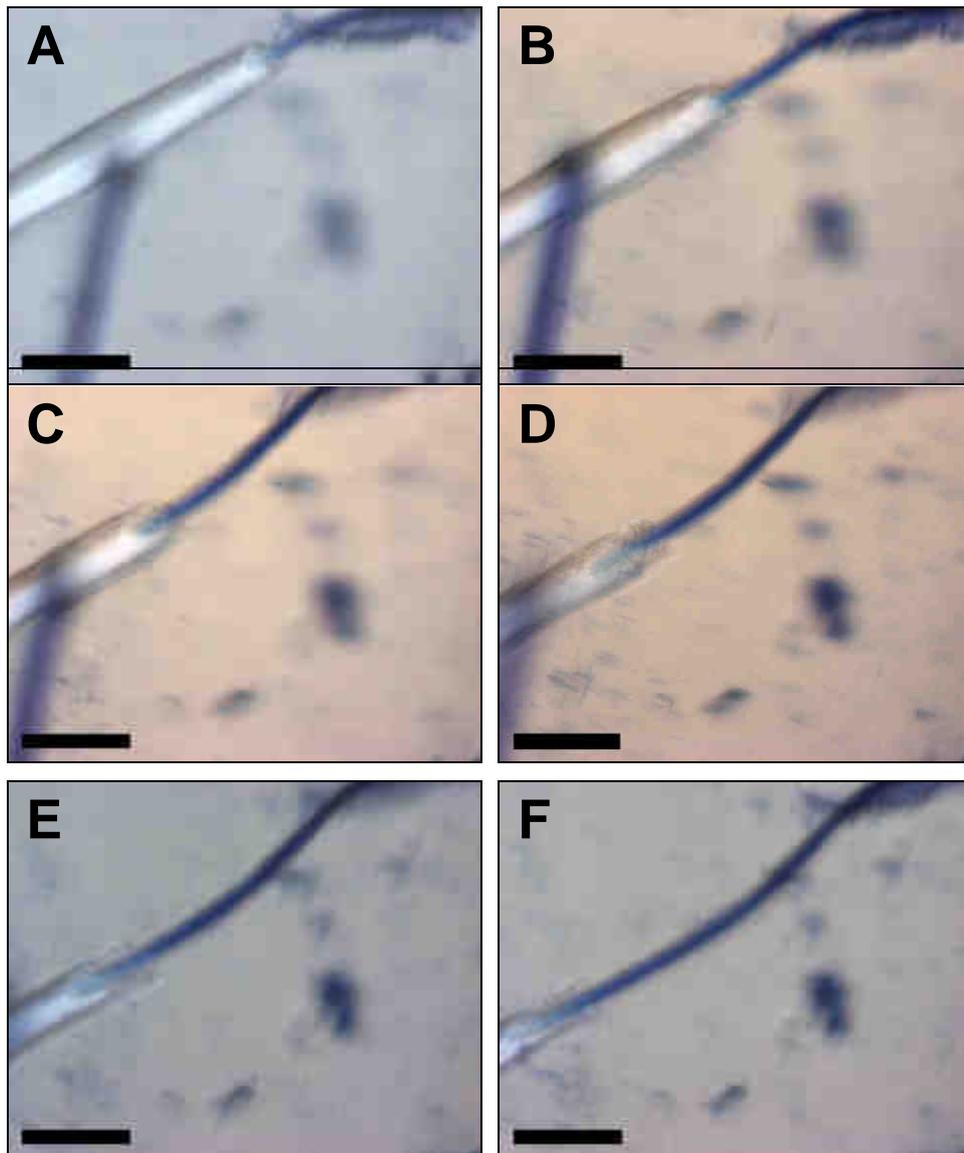


Abb. 19: Schrittweise Auflösung einer Tauactine mit gleichzeitiger Färbung mit Coomassie Brilliant Blau. Coomassie färbt beim Lösen des Silikates Proteinstrukturen, welche sich in oder zwischen den Silikatschichten der Nadel befinden. Sehr stark wird das Axialfilament gefärbt, es bilden sich vorher nicht vorhandene angefärbte Komplexe in der Lösung. Bilder A bis F zeigt die fortschreitende Auflösung einer Tauactine. Messbalken A-F: 50  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.3 Diactine von *Crateromorpha meyeri*

Neben Nadeln von *M. chuni* wurden zum Vergleich auch ein ausgesuchter Nadeltyp von *Crateromorpha meyeri* untersucht. Sie unterscheiden sich in ihrer Form von den glatten Nadeln von *M. chuni* dadurch, dass sie an den Enden leicht verdickt sind und

dort eine raue Oberfläche besitzen. Der Mittelteil dieser Nadeln hat eine glatte Oberfläche.

Nach Auflösung mit Flusssäure bleibt auch hier nach kompletter Demineralisation das Axialfilament zurück (Abb. 20, B). Im Auflösungsprozess treten im äußeren Bereich der Nadel blau gefärbte Strukturen auf, die nach kurzer Zeit in kleine Fragmente zerfallen. An den verdickten Spitzen mit rauher Oberfläche ist nach Auflösung erheblich mehr gefärbtes Material zu erkennen, als in dem glatten Mittelstück (Abb. 20, B). Dieses zerfällt bei längerer Flusssäurebehandlung ebenfalls. Das Auflösungsverhalten ist identisch mit dem der Nadeln von *M. chuni*.

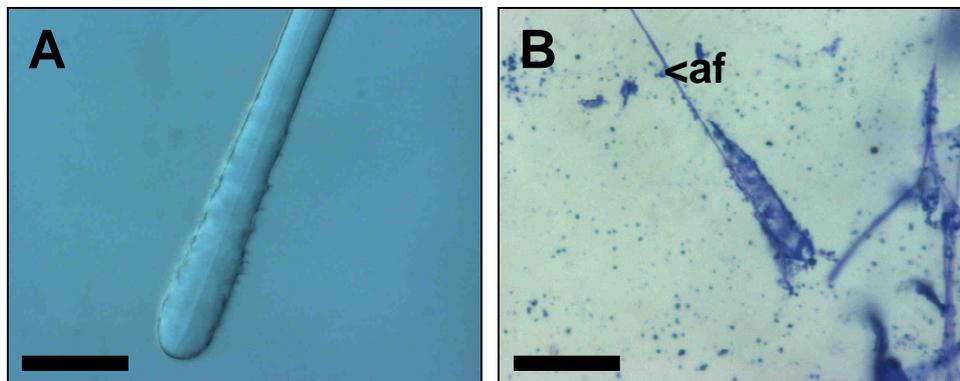


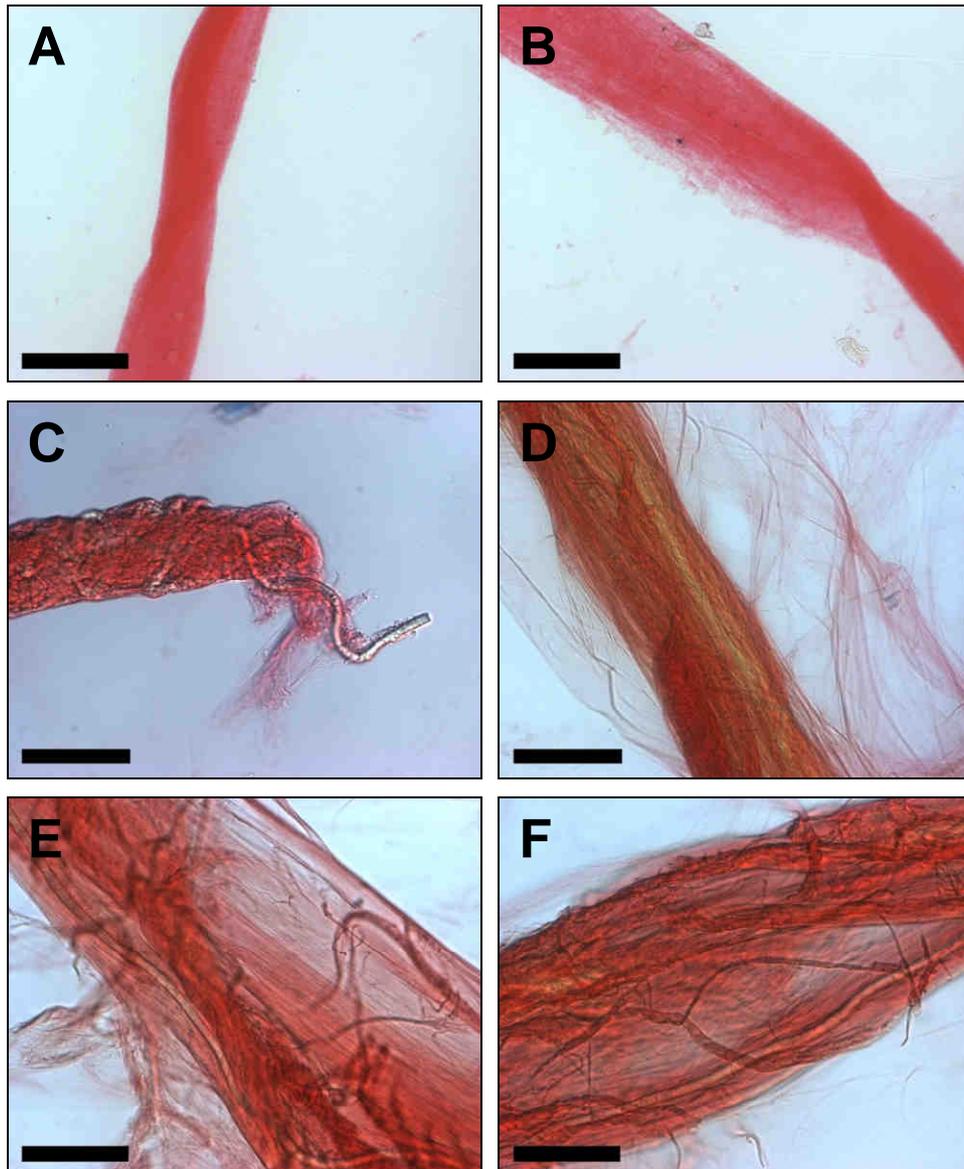
Abb. 20: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer Diactine von *C. meyeri*. Bild A zeigt das Ende der Nadel in nativer Form, Bild B zeigt sie nach Auflösung des Silikates und Färbung mit Coomassie Brilliant Blau. Af= Axialfilament; Messbalken A+B: 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.5 Färbung von Nadelproteine mit Sirius Rot F3BA

Die Färbung mit Coomassie Brilliant-Blau ist eine universelle Färbung und reagiert mit fast allen Proteinen. Um eine spezifischere Färbung der fibrillären Komponenten innerhalb der Nadel zu erreichen, wurde Sirius Rot F3BA verwendet.

Sirius Rot wurde früher oftmals für Kollagenfärbungen benutzt. Es färbt aber nicht nur Kollagen, sondern lagert sich auch an andere Proteine mit basischen Aminosäuren an (Schlammadinger *et al.*, 2005) und führt zu einer roten Färbung. Comitalia von *M. chuni* wurden mit Flusssäurepuffer komplett aufgelöst, gewaschen und mit Sirius Rot angefärbt.

Die Abbildung 21 zeigt die angefärbten Strukturen. Diese, parallel zu der Nadelachse gerichtete filamentöse Struktur, befindet sich im Bereich des aufgelösten Axialzylinders und ist bei der Comitalia durchschnittlich 100 µm breit. Das im Axialkanal liegende Axialfilament wird mit Sirius Rot nicht angefärbt (Abb. 19 Bild C). Ein Verdau mit Kollagenase von *Clostridium histolyticum* zeigte keinen Effekt.



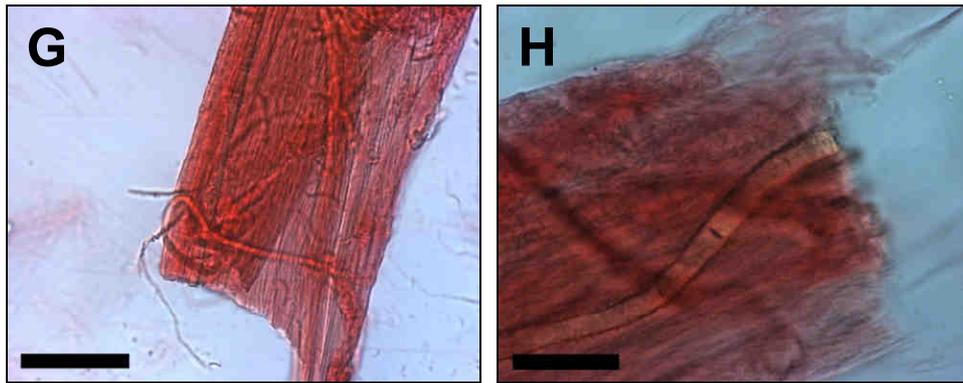


Abb. 21: Lichtmikroskopische Aufnahmen der aufgelösten Comitalia von *M. chuni* mit Sirius Red F3BA. Man kann bei höherer Vergrößerung (C-H) die parallel zur Nadelachse verlaufende faserigen Strukturen erkennen, die eine Breite von etwa 100  $\mu\text{m}$  aufweisen. Das Axialfilament wird mit dem Farbstoff nicht gefärbt (Bild C). Messbalken A-D: 100  $\mu\text{m}$ ; E-G: 50  $\mu\text{m}$ ; H: 20  $\mu\text{m}$ .

### 5.6 Analyse von organischen Komponenten der lamellaren Schicht der Pfahlnadel von *Monorhaphis chuni*

Um neben Silikat noch weitere Bestandteile der lamellaren Schicht zu untersuchen, wurden Bruchstücke der lamellaren Schicht von einer etwa 2 mm dicken Basalia mechanisch entfernt. Zur Kontrolle der vollständigen Entfernung des Axialzylinders wurden die Bruchstücke unter dem Binokular kontrolliert. Dort sind nur noch die äußeren Teile der Nadeln zu sehen, der Axialkanal fehlt vollständig. Der lamellare Aufbau dieser Schicht ist gut zu erkennen.

Die so isolierten Lamellen wurden unter dem Mikroskop bei Zugabe von Coomassie Brilliant-Blau-Lösung mit Flusssäure demineralisiert. Während der Auflösung des Silikates wird das freigesetzte organische Material durch die Coomassie-Lösung blau gefärbt und dadurch gut sichtbar.

Schon kurz nach Zugabe von Flusssäure und dem Beginn der Silikatauflösung kann man viele kleine, blau angefärbte Flocken in der Lösung unter dem Deckglas erkennen (Abb. 20, Bild A). Bei längerem Kontakt mit Flusssäure sieht man deutlich die Freisetzung von organischem Material aus der lamellaren Schicht. Diese Substanzen verklumpen kurzzeitig miteinander und bilden größere Aggregate. Diese Strukturen konnten mit Sirius Rot nicht gefärbt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

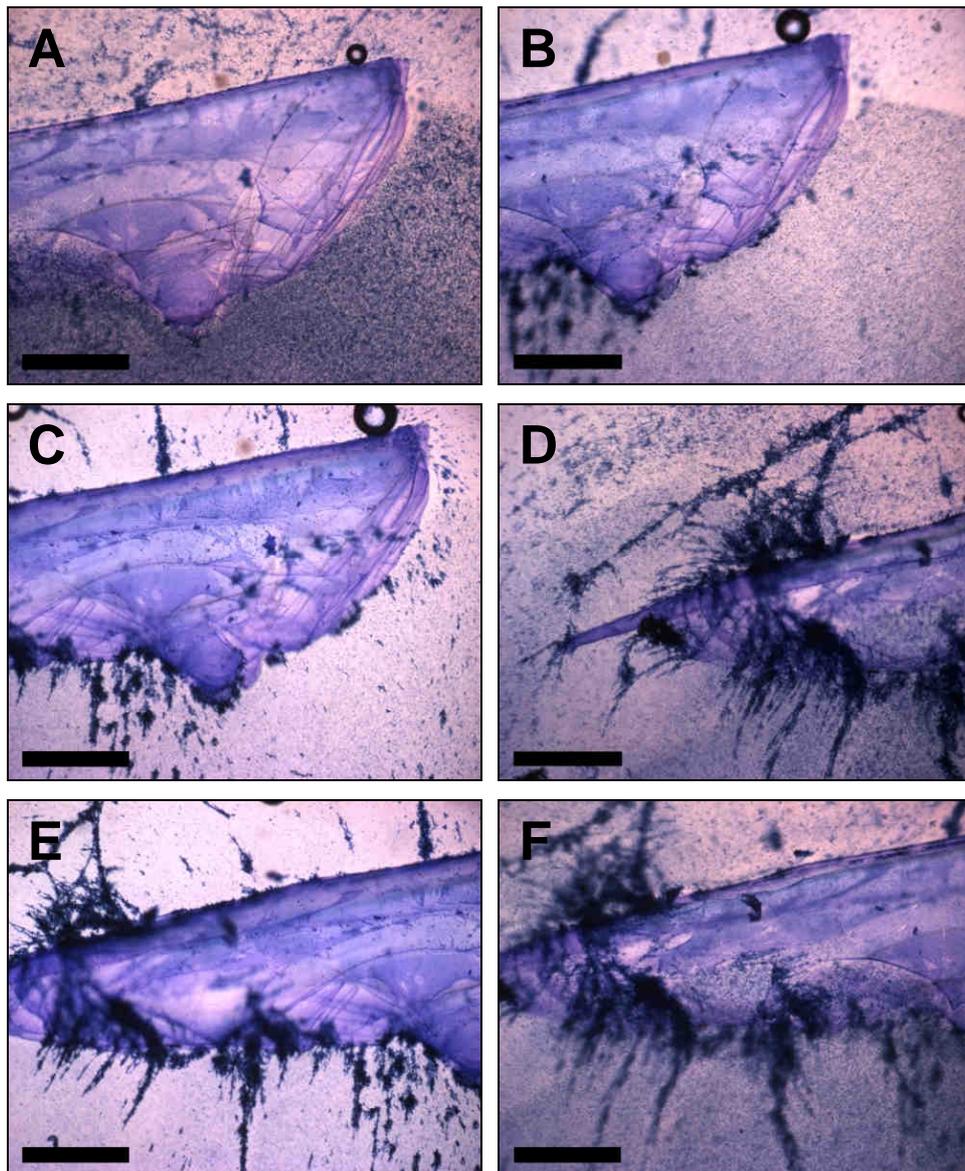


Abb. 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen der lamellaren Zone der Pfahlnadel von *M. chuni*, gefärbt mit Coomassie Brilliant-Blau im Verlauf des Auflösungsprozesses. Sofort nach Zugabe von Flusssäure tritt eine blaugefärbte Flockung auf (Bild A). Bei fortschreitender Silikatauflösung treten größere Komplexe auf, die Ketten bilden. Diese Ketten sind nicht stabil und zerfallen schnell bei längerem Kontakt mit Flusssäure. Messbalken A-F: 200  $\mu\text{m}$ .

Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man, nach Demineralisation der lamellaren Zone eine Netzstruktur der gefärbten Komplexe. Die Netzstruktur zerfällt bei Flusssäurekontakt innerhalb weniger Sekunden (siehe Abb. 23). An dieser Struktur bilden sich kleinere flockenartige Gebilde. Diese entstehen entweder durch die

Veränderung der Proteine der Netzstruktur, z.B. durch Denaturierung, oder durch die Bindung von, aus der Umgebung kommenden, vorher zerfallenen Komplexen.

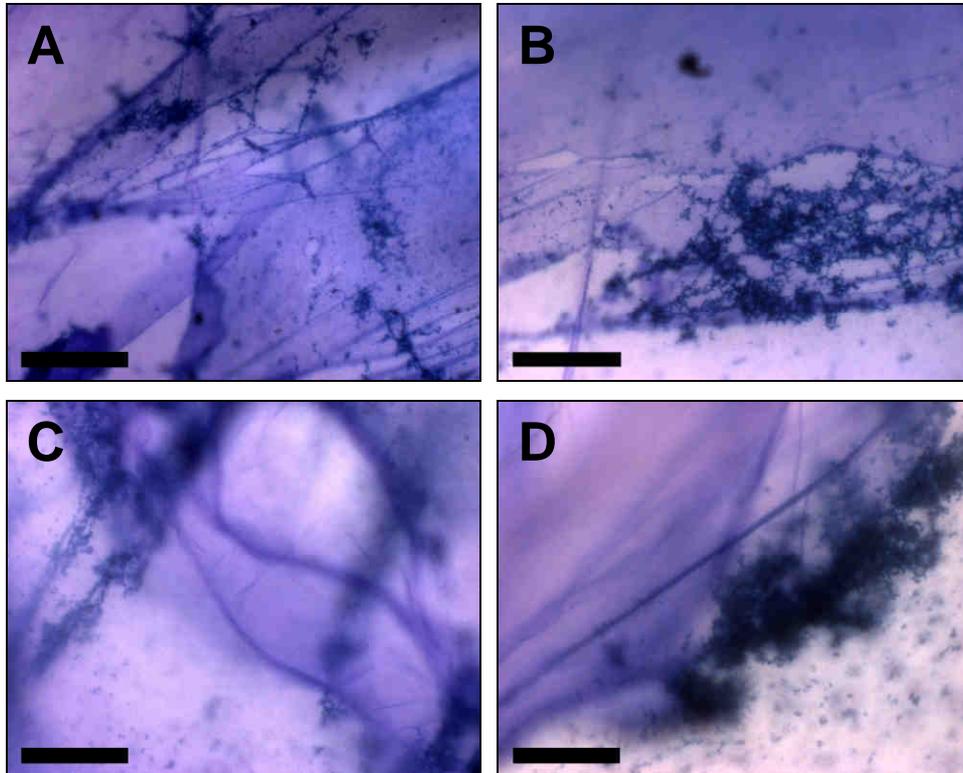


Abb. 23: Höhere lichtmikroskopische Vergrößerung von freigesetzten, mit Coomassie Brilliant-Blau-Lösung gefärbten Komplexen aus der lamellaren Zone der Pfahlnadel von *M. chuni*. Die Struktur besitzt einen netzartigen Aufbau, der bei Kontakt mit Flusssäure innerhalb weniger Sekunden zerfällt. Es kommt zu einer Bildung von kleineren, flockenartigen Gebilden an der Netzstruktur. Messbalken A+B: 100  $\mu\text{m}$ ; C+D: 50  $\mu\text{m}$ .

## 5.7 Biochemische Analyse der Nadelproteine von *Monorhaphis chuni*

### 5.7.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der in den Nadeln (Pfahlnadel) vorkommenden Proteine wurde das Silikat mit Flusssäure vollständig aufgelöst. Das gesamte freigelegte organische Material wurde für weitere Untersuchungen verwendet. Die Charakterisierung der Proteine erfolgte mittels eindimensionaler- und zweidimensionaler-Gelelektrophorese.

Die Proteinmatrix der Nadel zeigte sich in Pufferlösungen ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol und SDS unlöslich, konnte aber unter Verwendung des standard Ladepuffers mit SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol sowie zusätzlicher Erwärmung teilweise gelöst werden. In der eindimensionalen SDS-PAGE des kompletten Extraktes der Basalia von *M. chuni* sind nach der Färbung mit „Sypro Ruby Protein Gel Stain“ mehrere Polypeptide zu erkennen (Abb. 24). Die Molekulargewichte betragen 17, 24, 27, 30 und 36 kDa. Außerdem sind zwischen 60 und 75 kDa noch feine Banden zu erkennen. Die stärkste Bande war bei einem Molekulargewicht von 36 kDa zu finden.

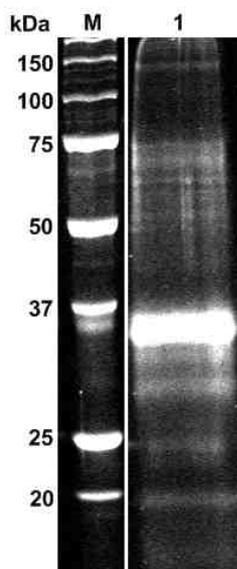


Abb. 24: SDS-PAGE des Nadelextraktes der Pfahlnadel von *M. chuni*, gefärbt mit Sypro Ruby Protein Gel Stain. Banden sind bei dem Molekulargewichten von 17, 24, 27, 30 und 36 kDa zu erkennen. Zwischen 60 und 75 kDa treten noch weitere Banden auf.

### 5.7.1.1 Zweidimensionale SDS-PAGE

Um die Nadelproteine genauer zu analysieren und ein differenziertes Proteinmuster zu erstellen wurde eine zweidimensionale-SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Aufgrund der Färbeversuche mit Sirius Rot sind basische Proteine zu erwarten.

Nach der Zweidimensionalen-SDS-Gelelektrophorese sind Proteine in der Höhe von 27, 30 kDa und im Bereich von 70 kDa zu erkennen. Der hochmolekulare Anteil der Proteine besitzt ein Molekulargewicht von 60 bis 75 kDa und trennte sich in der 2-D Gelelektrophorese in saure und basischere Polypeptide auf. Der isoelektrische Punkt des sauren Anteils liegt zwischen 4,2 und 4,7, der isoelektrische Punkt des basischeren zwischen 6,8 und 7,3. Zusätzlich sind zwischen 5,9 und 6,3 weitere Proteine in sehr geringer Konzentration zu erkennen. Die bei der Verwendung von

eindimensionaler-Gelelektrophorese entstehenden einzelnen Banden bei 27 kDa und 30 kDa trennen sich ebenfalls nach ihrem isoelektrischen Punkt in verschiedene Isoelektrische Formen auf. Die isoelektrischen Punkte der 5 Proteine des 27 kDa Proteins liegen bei 5,6, 5,8, 6,0, 6,2 und 6,6. Das Protein bei 30 kDa zeigt eine ähnliche Verteilung der isoelektrischen Punkte, liegt aber in einer sehr geringen Konzentration vor. Erkennbare isoelektrische Punkte liegen auch hier bei 5,8, 6,2 und 6,6.

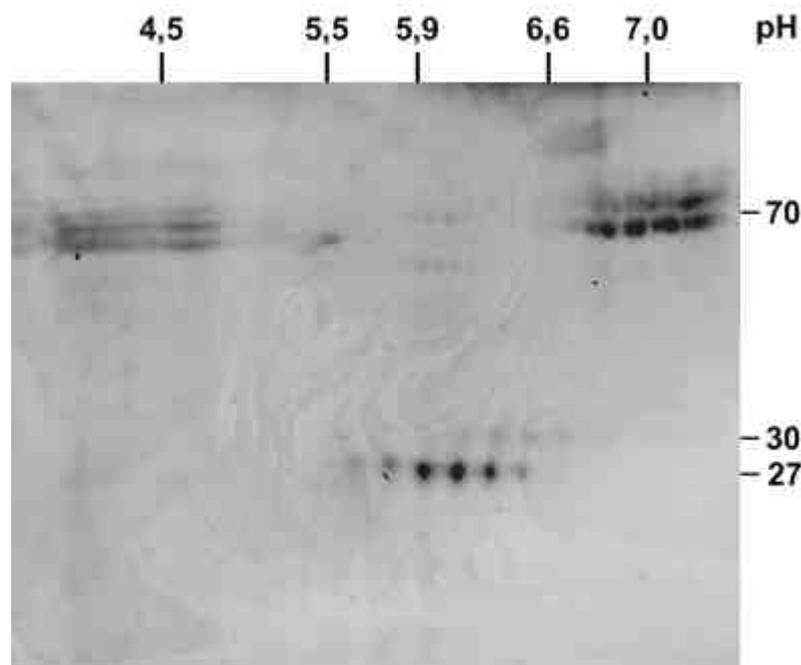


Abb. 25: 2-D Gelelektrophorese der Pfahlnadel von *M. chuni*, gefärbt mit Coomassie Brilliant-Blau. Es sind zwei Proteingruppierungen, eine mit dem Molekulargewicht von 27 und 30 kDa und eine andere von 60 bis 75 kDa, zu erkennen. Die isoelektrische Fokussierung trennt die 60-75 kDa Polypeptide in drei Gruppierungen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten auf. Ebenfalls kann man bei den 27 und 30 kDa Banden auch unterschiedliche Isoformen erkennen.

Um zu überprüfen, ob die schon beobachteten strukturellen Unterschiede der lamellaren Zone und des Axialzylinders sich auch in deren Proteinzusammensetzung widerspiegeln, wurde die lamellare Zone separat analysiert.

Bei den großen Pfahlnadeln von *M. chuni* ist es möglich, Teile der lamellaren Zone mechanisch von dem inneren Teil, dem Axialzylinder und dem Axialfilament, abzutrennen. Der Axialzylinder ist allerdings auch hier zu klein, so dass man ihn nicht von Resten der lamellaren Zone isolieren kann.

Von der abgetrennten lamellaren Zone wurde durch Demineralisierung mit Flusssäure analog zu ganzen Nadeln ein Extrakt hergestellt und durch zweidimensionale-SDS-Gelelektrophorese analysiert. Im Gegensatz zu kompletten Nadeln ist hier nur das 27 kDa Protein zu erkennen.

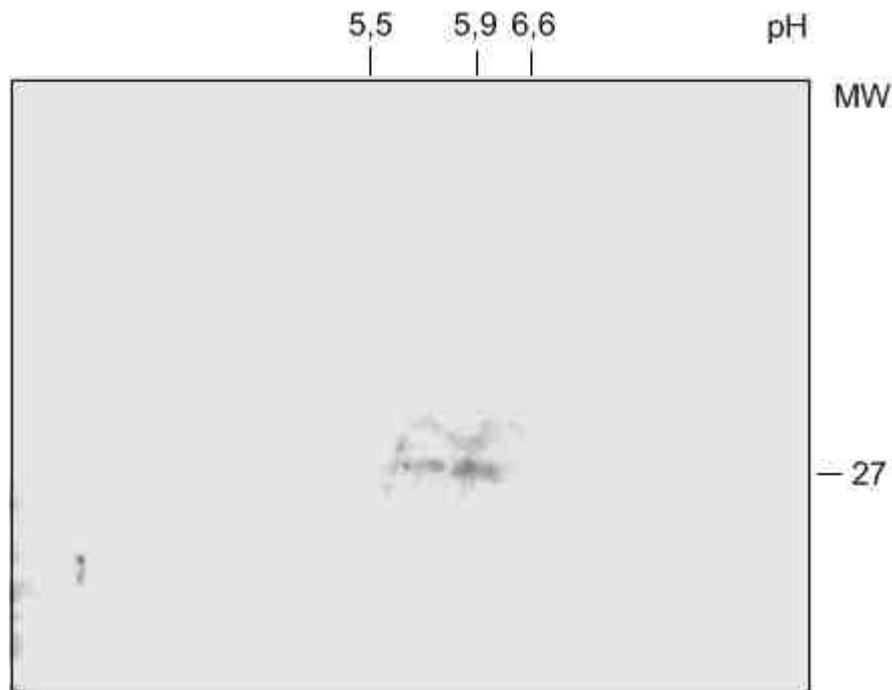


Abb. 26: 2-D Gelelektrophorese der lamellaren Zone von *M. Chuni*. Es ist in der lamellaren Zone nur das 27 kDa Protein zu erkennen. Die Proteinspots in den Bereichen von 30 und 70 kDa fehlen.

### 5.7.2 Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen Silicatein

Ein wichtiges Protein in Nadeln der Demospongia ist das Enzym Silicatein. Es spielt eine wichtige Rolle bei der enzymatischen Nadelbildung (Shimizu K. et al., 1998; Cha J. N., 1999). Es war bislang nicht bekannt, ob dieses Enzym auch in der Familie der Hexactinelliden vorhanden ist.

Mit polyklonalen Antikörpern gegen Silicatein  $\alpha$  von *S. domuncula* wurde nach der zweidimensionalen-SDS-Gelelektrophorese der Nadelproteine aus *M. chuni* ein Westernblot durchgeführt und die Proteine auf eine Reaktion mit polyklonalen Antikörpern gegen Silicatein von *S. domuncula* getestet. Bei der Bande mit einem Molekulargewicht von 27 kDa ist eine deutliche Reaktion mit dem Antikörper zu

erkennen. Die Färbung ist bei dem isoelektrischen Punkt von 6,0 am stärksten und reicht von 5,6 bis 6,6. Im Vergleich der Antikörperreaktion mit dem Coomassie gefärbten 2-D Gel erkennt man eine Übereinstimmung in der Auftrennung der isoelektrischen Punkte des 27 kDa Proteins. Die höhermolekularen Proteine bei 60 bis 75 kDa, die auf dem 2-D Gel zu erkennen waren, zeigen keine Bindung mit dem Antikörper und somit keine Färbung.

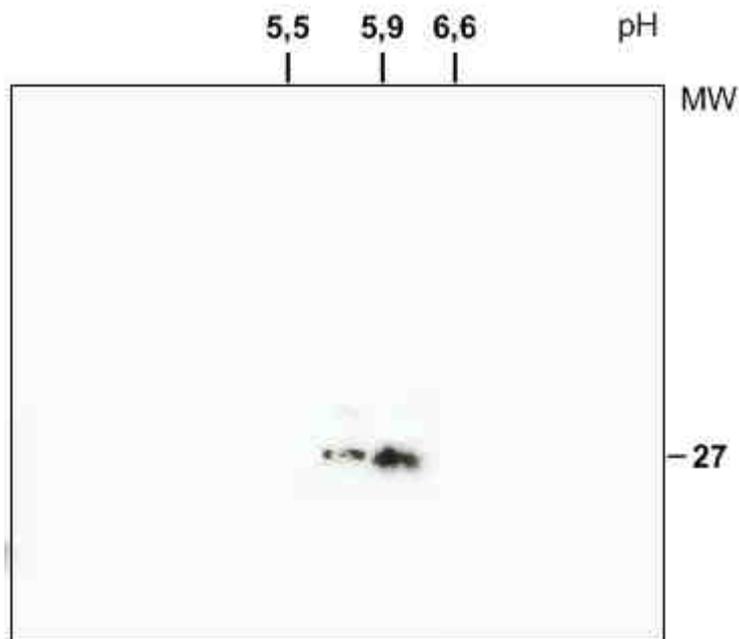


Abb. 27: Westernblotanalyse in Kombination mit 2-D Gelelektrophorese des Extraktes der Pfahlnadel von *M. chuni*. Es wurden polyklonale Antikörper gegen Silicatein alpha von *S. domuncula* verwendet. Bei einem Molekulargewicht von 27 kDa ist eine deutliche Färbereaktion zu erkennen. Die isoelektrischen Punkte stimmen mit denen des mit Coomassie-lösung gefärbten Geles überein. Höhermolekulare Banden bei 60 bis 75 kDa zeigen keine Reaktion und werden nicht gefärbt.

### 5.7.3 Erythrozytenagglutinationsassay der Nadelkomponenten

Neben Silicatein ist in Nadeln des zu der Klasse der Demospongiae gehörenden Schwammes *S. domuncula* auch ein Lectin, das Galectin-2, nachgewiesen worden (Schröder *et al.*, 2006) welches bei der Biosynthese von Silikat von Bedeutung ist.

Um erste Hinweise auf Galectin oder ein lectinähnliches Molekül innerhalb der Nadeln von Hexactinelliden zu erhalten, wurde mit Hilfe von Erythrozyten ein Agglutinationsassay durchgeführt.

Gereinigte Nadeln von *M. chuni* wurden mit Mörser und Pistill zerkleinert und in Puffer aufgenommen. Nadelbruchstücke wurden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand für den Assay verwendet. Die Probe wurde mit aus Pferdeblut gewonnenen Erythrozyten vermischt und in 96-well Platten mit konischem Boden gefüllt. Nach einer Stunde Inkubation sammelten sich bei Proben ohne Agglutinationsfaktor die Erythrozyten am untersten Punkt der Platte und bildeten einen dunklen Punkt. Bei Anwesenheit eines Agglutinationsfaktors bildete sich hingegen ein einheitlicher Bodenbelag. Als Positivkontrolle wurde Concanavalin A verwendet. Bei dem Einsatz hoher Probenkonzentrationen von *M. chuni* zeigte sich eine deutliche Agglutination der Erythrozyten, was auf das Vorhandensein eines Agglutinationsfaktors wie Lektin innerhalb der Nadeln deutet.

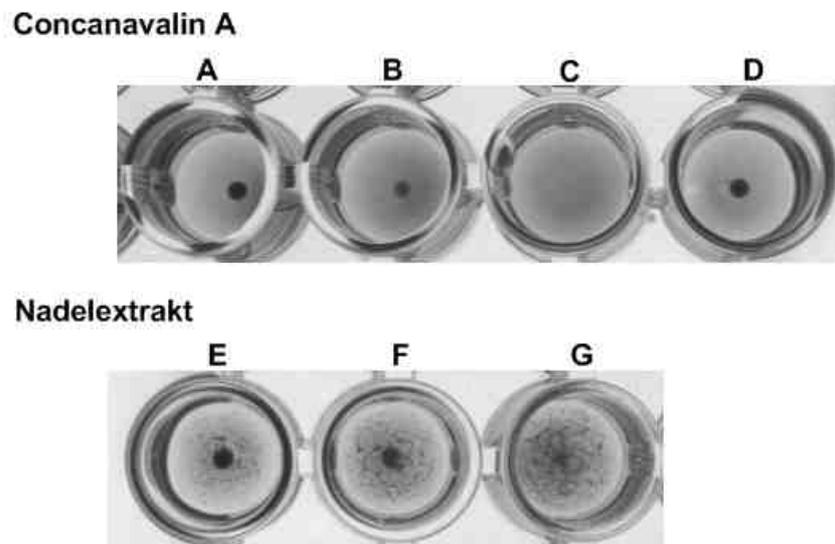


Abb. 28: Erythrozytenagglutinationsassay von dem Lektin Concanavalin A und Nadelextrakt von *M. chuni*. A bis C zeigen verschiedene Konzentrationen von Concanavalin A (A: 0,4  $\mu\text{g/ml}$ ; B: 0,8  $\mu\text{g/ml}$ ; C: 1,6  $\mu\text{g/ml}$ ), D die Negativkontrolle mit PBS anstelle von Lektin und E bis G Nadelextrakt von *M. chuni* (E: 10  $\mu\text{g/ml}$ ; F: 30  $\mu\text{g/ml}$ ; G: 50  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### 5.7.4 Deglycosylierung der Nadelproteine

Aufgrund der Existenz eines Agglutinationsfaktors innerhalb der Schwammnadeln liegt die Vermutung nahe, dass dort Glykoproteine vorhanden sind. Fast alle extrazellulären Proteine liegen glycosyliert vor. Unter milden Bedingungen

gewonnener Extrakt von aufgelösten Nadeln wurde deswegen durch enzymatische Deglykosylierung auf glykosylierte Proteine überprüft.

Es zeigte sich eine Veränderung der Bande bei 36 kDa, die nach Deglycolysierung eine Größe von 30 kDa aufwies. Abb. 29 zeigt die Probe vor (A) und nach (B) der Deglykosylierung.

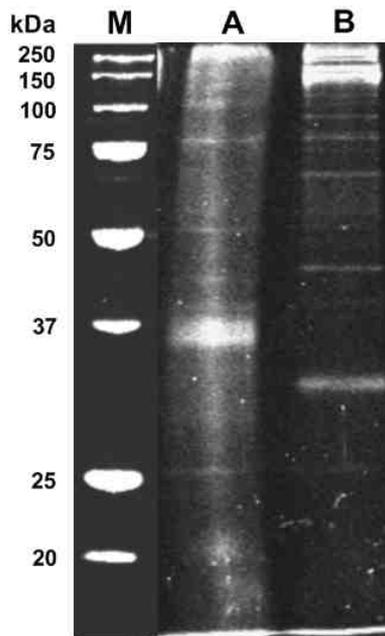


Abb. 29: SDS-PAGE der Nadelproteine von *M. chuni* (A) vor und (B) nach Deglycosilierung (Molekulargewichtsmarker (M)). Die Färbung der Proteine erfolgte mit Sypro Ruby Protein Stain. Die höchste Konzentration besitzt ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 36 kDa vor (A), und 30 kDa nach (B) Deglycosilierung

## 5.8 Molekularbiologische Identifizierung von Silicatein in Hexactinelliden

Silicatein wurde in der Familie der Hexactinelliden bisher noch nicht nachgewiesen. In der Familie der Demospongia wurde bei einigen Arten Silicatein schon erfolgreich identifiziert. Es war aber noch nicht bekannt, ob es auch in Hexactinelliden vorkommt.

Aufgrund der hier durchgeführten mikroskopischen und biochemischen Untersuchungen liegt die Vermutung nahe, dass Silicatein auch bei den Hexactinelliden vorhanden ist.

Um Silicatein molekularbiologisch in Hexactinelliden nachzuweisen, wurde aus Gewebematerial von *Crateromorpha meyeri* die gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR-Screening analysiert.

### 5.8.1 Isolierung der gesamt RNA von *Crateromorpha meyeri* und cDNA

#### Synthese

Aus Gewebeproben von *C. meyeri* wurde die gesamt RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Reinheit und die Qualität der RNA wurde mit einer denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese ermittelt (siehe Abb. 30). Sie war leicht degradiert, aber für folgende PCR-Analysen in ausreichender Qualität. Es war keine sichtbare Bakterien-RNA vorhanden, welche bei der RNA-Isolation von vielen Demospongia auftritt. Die Konzentration wurde spectrometrisch (Konzentration [ng/μl] =  $E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$ ) bestimmt und betrug 540 μg/ml. Anschliessend wurde die gesamt RNA in cDNA umgeschrieben. Die Umschreibung in cDNA erfolgte mit Oligo(dT)<sub>20</sub> Primern.

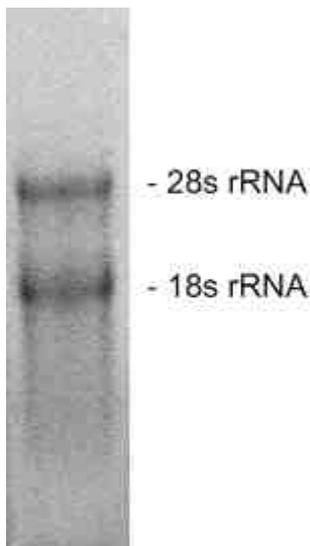


Abb. 30: Agarosegel der isolierten *C. meyeri* gesamt RNA

### 5.8.2 PCR-Screening

Die hergestellte cDNA wurde für die Amplifikation mittels PCR verwendet. Für die Amplifikation silicateinähnlicher Sequenzen wurden verschiedene Primer und Reaktionsbedingungen getestet.

Als Primer wurden genspezifische, anhand des konservierten Bereichs von bekannten Silicateinen erstellte, Oligonukleotide verwendet.

PCR Untersuchungen wurden mit Primern für Silicatein von *Geodia cydonium*, *Lubomirskia baikaliensis*, *S. domuncula* und *Tehya aurantium* durchgeführt. Das

Primerpaar für Silicatein  $\alpha$  von *S. domuncula* war am besten geeignet. Durch das Variieren der Reaktionsbedingungen und einer nachfolgenden *Nested-PCR* gelang es, Banden im Bereich der zu erwartenden Nukleotidlänge mit geeigneter Konzentration zu erhalten. Diese wurden aus dem Agarosegel extrahiert und sequenziert.

### 5.8.3 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Aus der gewonnenen cDNA wurde ein 549 bp langes Nucleotidfragment kloniert (*CMSILCA*, siehe Material und Methoden), das den Bereich umfasst, der zuvor für die Expression von *S. domuncula* Silicatein in *Escherichia coli* verwendet wurde (Müller *et al.*, 2003). Die prozentuale Basenzusammensetzung ist in Tab. 2 zu sehen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz besteht aus 183 Aminosäuren.

1	L T I G R I E F S G R E F A L Q G D C G	20
1	CTCACTATAGGGCGAATTGAATTTAGCGGCCGCGAATTCGCCCTTCAGGGAGATTGTGGT	60
21	A S Y A F A A I G S L E G M S S L A R G	40
61	GCCAGCTATGCCTTTGCTGCTATTGGATCTCTTGAGGGCATGTCTTCCCTAGCCAGAGGC	120
41	N L V R L S E Q N V I D C S V S Y G N H	60
121	AATCTGGTGCCTTGAGTGAACAGAATGTCATCGACTGCTCAGTGAGTTATGGAAACCAT	180
61	G C Q G G T I Y D A Y Q Y I L A N E G V	80
181	GGGTGTCAAGGAGGAACCATCTATGATGCATACCAGTACATTTTGGCCAATGAGGGAGTA	240
81	D T A N G Y P Y R G R Q Y S C S F D S R	100
241	GATACAGCTAATGGCTATCCTTATAGAGGAAGACAATATTCATGCAGCTTTGATTCGAGG	300
101	Y I G A E I S G S V E V K E G D E Y S L	120
301	TATATTGGTGCTGAGATCTCGGGGAGTGTGAAGTAAAAGAAGGAGATGAGTATAGTTTG	360
121	M A A V A N A G P V A V G V D A S S K A	140
361	ATGGCGGCAGTGGCTAATGCTGGACCTGTGGCAGTTGGTGTAGATGCTAGTAGCAAAGCC	420
141	F R Y Y S S G I Y N L P G C S S Y S L T	160
421	TTCAGGTACTATTCCCTCTGGCATTTACAACCTGCCAGGATGCTCCAGCTATTCCCTCACT	480
161	H A L L I I G Y S S S S S G D Y W L L K	180
481	CATGCACTCCTCATCATTGGCTATAGCTCTTCCTCAAGTGGAGATTACTGGCTCCTCAAG	540
181	N S W	
541	AACAGCTGG	

Abb. 31: Basen- und abgeleitete Aminosäuresequenz (*SILCA\_CRAME*) des Nukleotidfragments *CMSILCA*. Der offene Leserahmen (orf) wurde aus der Aminosäuresequenz abgeleitet.

<b>Nukleotid</b>	<b>Prozentuale Zusammensetzung</b>
A	24,5
T	27,5
C	21
G	27
A+T	52
G+C	48

Tab. 2: Prozentuelle Basenzusammensetzung des Nukleotidfragmentes *CM\_SILCA*.

### 5.8.5 Analyse der Aminosäuresequenz *SILCA\_CRAME*

Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde Mit Hilfe von Internetdiensten und Analyseprogrammen untersucht.

Das errechnete Molekulargewicht der abgeleiteten Aminosäuresequenz beträgt 19518 Da. Der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH-Wert von 4,79. Es sind 17 negativ geladene (Asparagin und Glutamin) und 11 positiv geladene (Arginin und Lysin) Aminosäurereste vorhanden. Die komplette Aminosäurezusammensetzung ist in Tab. 3 aufgelistet.

Aminosäure	Anzahl	Prozent
Ala (A)	18	9,8
Arg (R)	8	4,4
Asn (N)	8	4,4
Asp (D)	8	4,4
Cys (C)	5	2,7
Gln (Q)	5	2,7
Glu (E)	9	4,9
Gly (G)	23	12,6
His (H)	2	1,1
Ile (I)	11	6,0
Leu (L)	14	7,7
Lys (K)	3	1,6
Met (M)	2	1,1
Phe (F)	5	2,7
Pro (P)	3	1,6
Ser (S)	27	14,8
Thr (T)	4	2,2
Trp (W)	2	1,1
Tyr (Y)	16	8,7
Val (V)	10	5,5

Tab. 3: Aminosäurezusammensetzung von SILCA\_CRAME, abgeleitet von der Nukleotidsequenz *CM\_SILCA*.

### 5.8.5.1 Posttranslationale Modifikationen

Eine Analyse möglicher postrationaler Modifikationen ergab mehrere Angriffstellen für Phosphorylierungen. Es sind keine signifikanten Hinweise auf andere Modifikationen wie Glykosilierungen oder Sulfonierungen zu finden.

Mögliche Phosphorylierungsstellen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin sind in Tab. 4 aufgelistet. Der Wert des Analyseergebnisses reicht von 0 (keine Wahrscheinlichkeit) bis 1,0 (hohe Wahrscheinlichkeit).

Aminosäure	Position	Analyseergebnis
Serin	9	0,979
	56	0,926
	94	0,904
	109	0,870
	137	0,817
	170	0,973
	172	0,991
	Threonin	66
Tyrosin	23	0,574
	57	0,921
	101	0,625
	118	0,970
	143	0,518
	149	0,746
	176	0,810

Tab. 4: Mögliche Phosphorylierungsstellen der Aminosäuresequenz SILCA\_CRAME (Analyse nach <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>)

Kinasespezifische Phosphorylierungsstellen sind separat in Tab. 5 aufgeführt. Es sind zwei Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C (Konsensussequenz: [ST]-x-[RK] [S/T]; Woodget *et al.*, 1986) und drei der Kaseinkinase II (Konsensus: [ST]-x-(2)-[DE] [S/T ist die Phosphorylierungsstelle], Pinna *et al.*, 1990) vorhanden.

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ist ein wichtiger Mechanismus zur Steuerung der Enzymaktivität. Durch die Übertragung von Phosphat auf Serin- oder Threoningruppen steuert Proteinkinase C die Aktivität von Enzymen und besitzt eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion. Kaseinkinase II kommt nukleär in den Mitochondrien und im Zytoplasma vor. Sie ist eine multifunktionale Proteinkinase, die in vielen zellulären Prozessen wie Proliferation und Differenzierung beteiligt ist.

Enzym	Position	Sequenz
Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen	9-11 137-139	SGR SSK
Kaseinkinase II Phosphorylierungsstellen	9-12 66-69 172-175	SGRE TIYD SSGD

Tab. 5: Mögliche Kinase spezifische Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C und die Kaseinkinase II innerhalb der Proteinsequenz SILCA\_CRAME (Analyse nach <http://www.expasy.ch/tools/scanprosite>)

### 5.8.5.2 Sequenzvergleich zu bekannten Silicateinen

Die für Silicatein charakteristische katalytische Triade, bestehend aus Serin, Histidin und Asparagin ist auch in der Sequenz von *C. meyeri* zu finden. Die Positionen der Aminosäuren (Aminosäure 22, 161 und 181) stimmen exakt mit denen von bekannten Silicateinen der Demospongiae überein. Bei Cathepsinen ist das Serin der katalytischen Triade mit einem Cystein ausgetauscht. Dies ist auch bei den bisher identifizierten Cathepsinen in Hexactinelliden der Fall.

Zwischen den Aminosäuren 155 und 158 befindet sich das in Silicateinen übliche Serincluster, bei dem in *C. meyeri* 3 Serine vorkommen. Darüber hinaus existiert eine weitere Abfolge der Aminosäure Serin zwischen Position 169 und 173, die mit 5 Serinen bisher nur bei *C. meyeri* gefunden wurde (*C. meyeri* spezific cluster).

Das Hexactinellidensilicatein besitzt eine die Aminosäuren 16 bis 183 umspannende, *peptidase-C1 papain family cysteine protease domain* und eine von Aminosäure 159 bis 169 reichende *thiol-protease-His active site*.

### 5.8.5.3 Homologieanalyse

Bei der BLAST-Analyse zeigt Silicatein von *C. meyeri* auf Aminosäureebene die höchste Homologie mit Silicatein B von *Latrunculia oparinae* (accession no. ACH48002.1; E-Wert = 2-64) mit 76% identischen und 90% ähnlichen Aminosäuren. Die nächst besten Treffer der Suche sind Silicaein von *Halichondria okadai* (BAB86343.1; E-Wert = 5-56) und Silicatein  $\beta$  von *Tethya aurantium* (accession no.

AF098670\_1; E-Wert = 6-54). Die höchste Übereinstimmung mit einem Süßwasserschwamm zeigt Silicatein 2 von *Ephydatia fluviatilis* (acession no. CAJ44454.1; E-Wert = 1-45) mit 55% identischen und 76% ähnlichen Aminosäuren. Ein Aminosäuresequenzvergleich der Silicateine von *C. meyeri*, *S. domuncula*, *T. aurantium*, *L. baikaliensis* und einem Cathepsin des Hexactinelliden *Aphrocallistes vastus* lässt die starke Homologie der Silicateine und Cathepsine erkennen. Die Aminosäuren der katalytische Triade, die *peptidase-C1 papain family cytein protease domain*, die *thiol-protease-His* Signatur und das herkömmliche Serincluster der Silicateine sowie das *C. meyeri* spezifische Serincluster sind markiert.

```

SILCA_CRAME  LTIGRIEFSGREFALOGDCGASYAFAAIGSLEGMSSIARGNLVRLSEQNVIDCSVSYGNHG 61
SILCAa_SUBDO AVDWRTKGAVTAVKDOGDCGASYAFSAMGALECANALAKNAVSLSEQNIIDCSIPYGNHG 61
SILCAa_TETHY  TVDWRTKGAVTGIKSOGDCGASYAFSAMGALECINALATGKLTYLSEQNIIDCSVPYGNHG 61
SILCAa2_LUBA  SIDWRTKGAVTSVKNQOGDCGASYAFAATGTMECANALSNDKQVSLSEQNIIDCSVPYGNHG 61
CATL_APHRVAS  TVDWRSKGVVTPVKNOGCGSCWSFSATGSILEGQYAIKSGKLVSFSEQESVDCSTSLGNHG 61
[mature peptide]
-----
[papain-----]
+CT{Ser/Cys}
SILCA_CRAME  CCGGTIYDAYQYILANEGVDTANGYPYRGRQYSCSEDSRYIGAEISGSVEVKEGDEYSLMA 122
SILCAa_SUBDO  CHGGNMYDAFLYVIANEGVDQDSAPFVGRKQSSCNYNSKYKGTSMSGMVSIKSGSESDIQA 122
SILCAa_TETHY  CKGGNMYVAFLYVVANEGVDDGGSYPGRKQSSCTYQEQYRGASMSGSVQINSGSESDIEA 122
SILCAa2_LUBA  CSGGDTYTAIKYVVDNGGIDTESSYSERKQSSCQYNSKNSGASATGAVGIPYGSSESDIMA 122
CATL_APHRVAS  CCGGLMDYAFKYWETN-LAEKESDYTYTAKNGKCKYNAQLGVTKDSSFTDIPXENCDAIKE 121
-----
SILCA_CRAME  AVANAGPVAVGVDASSKAFRYYSSGIYNLPGCSSYSLTHALLIIGYSSSSSGDYWLLKNSW 183
SILCAa_SUBDO  AVSNVGPVSVAIDGANSAFRFYSGVYDSSRCSSSSLNHAMVVTGYGSYNGKKYWLAKNSW 183
SILCAa_TETHY  AVANVGPVAVAIDGESNAFRFYSGVYDSSRCSSSSLNHAMVITGYGISNNQEYWLAKNSW 183
SILCAa2_LUBA  AVATVGPVAVAVDANTNAFRFYQSGVYDSSTCSSTKLNHAMLVTGYGSYNGKDYWLKNSW 183
CATL_APHRVAS  AVANKGPIAVAMDASHTSFQMYHSGIYTPFLCKKIKLDHGVLVVGYGTDNGVDYWLKNSW 182
-----
[mature peptide]
-----
[==thiol==]-----[papain]
{##Ser#} +CT{His}{Ser} +CT{Asn}

```

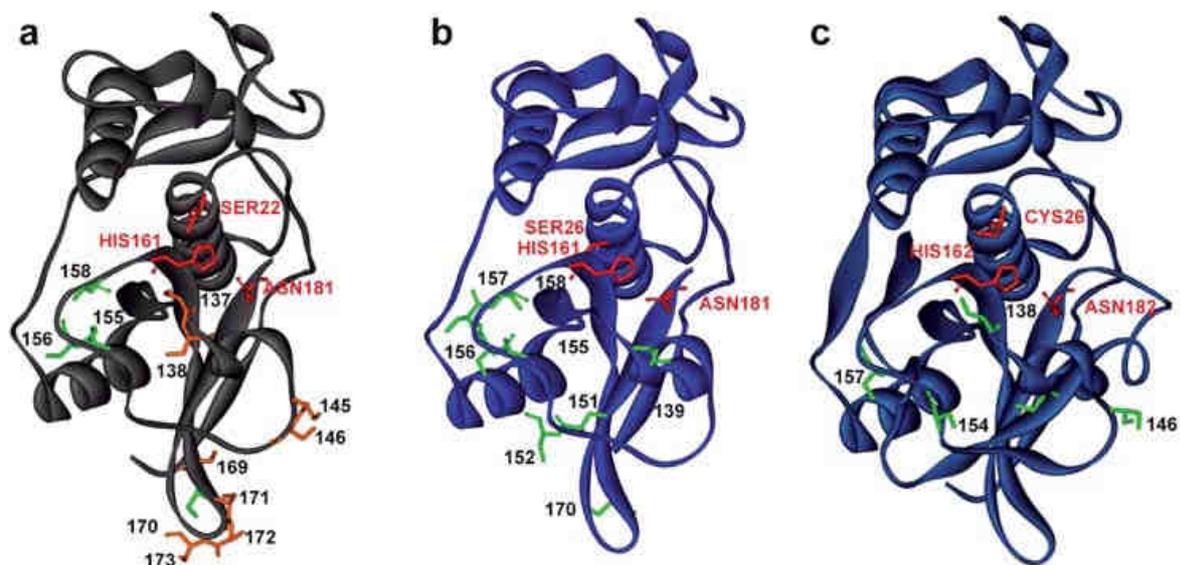
Abb. 32: Aminosäuresequenzvergleich der Silicateinsequenz von *C. meyeri* mit Silicatein a von *T. aurantium* (SILICAa\_TETHY, AAD23951), Silicatein a von *S. domuncula* (SILICAa\_SUBDO, AJ272013), Silicatein a2 von *L. baikaliensis* (SILICAa2\_LUBA, AJ968945) und Cathepsin von *Aphrocallistes vastus* (CATL\_APHRVAS, AJ968951). Die 3 Aminosäuren der katalytischen Triade (CT) sind markiert, sowie das reife Silicatein Protein (mature peptide) und die Domänen *peptidase-C1 papain family cystein protease domain* (papain) und *thiol-protease-His* Signatur (=thiol=). Das herkömmliche Serincluster wurde mit „##Ser#“ und das *C. meyeri* spezifische mit „Ser“ hervorgehoben.

### 5.8.5.4 Vergleichendes 3-D Modelling

Entscheidend für die Funktion eines Enzyms ist, auch bei ähnlichen Nukleotidsequenzen, seine spätere 3-D Struktur.

Aus der vorhandenen Sequenz wurde unter Federführung von xx aus der Arbeitsgruppe Müller ein 3-D Modell erstellt. Als bestmögliche Vorlage wurde das menschliche Cathepsin K, komplexiert mit dem Inhibitor E-64 verwendet. Ein Modell von *S. domuncula* Silicatein diente als Vergleich.

Im Strukturalignment gab es im Vergleich zu der Kernregion von Cathepsin K keine Lücken in der Sekundärstruktur. Um die Funktionalität des Proteins zu gewährleisten, erlagen die Aminosäuren der katalytischen Triade einer räumlichen Einschränkung bei der Modellerstellung.



silicatein- $\alpha$  *C. meyeri* silicatein- $\alpha$  *S. domuncula* cathepsin K *H. sapiens*

Abb. 33: 3-D Modelle der Kernregionen von *C. meyeri* und *S. domuncula* Silicatein  $\alpha$  und das als Vorlage verwendete humane Cathepsin K. Die Aminosäuren der katalytischen Triade sind rot, die des gewöhnlichen Serinclusters grün. Das *C. meyeri* spezifische Serincluster und von *S. domuncula* abweichende Serine sind in orange gehalten.

Beim vorhergesagten Modell von *C. meyeri* Silicatein zeigen die Aminosäuren der katalytischen Triade wie auch in Silicatein  $\alpha$  von *S. domuncula* und humanen Cathepsin K in die Substratbindestelle (Ser 22; His 161; Asn 181). Zusätzlich ragen

noch bei *C. meyeri*, im Gegensatz zu *S. domuncula* zwei Serine (Ser 137,138) in das aktive Zentrum.

Das gewöhnliche Serincluster (Ser 155-158) in *C meyeri* und *S. domuncula* liegt nahe der exponierten Alphahelix. Das *C. meyeri* spezifische Serincluster (Ser 169-173) befindet sich, räumlich getrennt von dem gewöhnlichen Serincluster, am erweiterten  $\beta$ -Sheet und dem darauffolgenden Loop. Serin 169 bis 171 liegen im  $\beta$ -Sheet und Serin 172 und 172 sind Teile des Loops.

## 6.0 Diskussion

Die Silikatkonzentrationen im Meerwasser sind sehr gering und reichen von etwa 3  $\mu\text{M}$  an der Oberfläche bis hin zu 180  $\mu\text{M}$  in den Tiefen des Meeres (Maldonado *et al.*, 1999). Trotz dieser geringen Konzentrationen können Schwämme beachtlich große Strukturen aus amorphen Silikat bilden.

Beim Auftreten der ersten Schwämme vor etwa 500 Millionen Jahren wird angenommen, dass die Ozeane reicher an  $\text{CaCO}_3$  waren als, heute an  $\text{NaCl}$  (Holland, 1992). Dies hatte zur Folge, dass der pH-Wert in diesen Ozeanen über pH 9 stieg und somit die Konzentration an gelöstem Silikat weitaus höher war als heute. Der Vorteil, in dieser Umgebung Silikat zum Bau des Körperskelettes zu verwenden, könnte weiterhin darin liegen, dass diese im Meerwasser weitaus beständiger sind, als Strukturen aus Kalziumcarbonat. Die jetzigen geringeren Konzentrationen von gelöstem Silikat im Meerwasser stellen für die Schwämme bei der Bildung von Silikatnadeln und Skeletten kein Problem dar. Aus diesem Grund müssen sie über eine Möglichkeit verfügen, Silikat anzureichern. Bei dem marinen Schwamm *Suberites domuncula* wurde zum ersten Mal ein Transportsystem zur aktiven Aufnahme von Silikat in Schwämmen entdeckt (Schröder *et al.*, 2004).

Die häufig höheren Silikatkonzentrationen in der Tiefsee könnten die Bildung von größeren Silikatstrukturen wie die erstaunlich große Pfahlnadel von *Monorhaphis chuni* begünstigen. Diese kann bis zu 3 m lang und 1 cm dick werden und ermöglicht es dem Schwamm, seinen chaotischen Körper im schlammigen Untergrund zu verankern. Feste Substrate für die Verankerung von Schwämmen sind in der Tiefsee, dem Lebensraum von *M. chuni*, selten. Der Schwammkörper kann durch die Pfahlnadel auch höher gelegene Bereiche mit eventuell stärkerer Meeresströmung erreichen, was für die Nahrungsaufnahme vorteilhaft wäre.

Der Prozess der Biosilifikation bei Schwämmen wurde bisher nur an den Demospongia und dort zum großen Teil an der Spezies *S. domuncula* durchgeführt. Die Nadelbildung wird genetisch kontrolliert (Simpson, 1984), es werden meist viele verschiedene Nadeltypen unterschiedlicher Formen in einem Schwamm gebildet. In *S. domuncula* wurden, nach Erhöhung der Silikatkonzentration im umgebenden Meerwasser, Gene identifiziert, deren Transkriptionsraten daraufhin stark anstiegen (Krasko *et al.*, 2000). Zu diesen sogenannten „silica responsive genes“ zählen Kollagen, Silicatein und Myotrophin. Das Schlüsselenzym der Biosynthese von Silikat

in den Demospongia ist das Silicatein. Silicatein (Silicatein  $\alpha$ ) von *S. domuncula* ist ein aus 331 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem kalkuliertem Molekulargewicht von 36,3 kD (Krasko *et al.*, 2000). Es besitzt auf Nukleotidebene eine hohe Homologie mit Cathepsin L, einem Enzym vom Typ der Papain-Proteasen. Cathepsin L ist eine der aktivsten lysosomalen Cysteinproteasen im Hinblick auf seine Fähigkeiten, Azocasein (Barret und Kirschke, 1981), Elastin (Mason *et al.*, 1986) und Kollagen (Kirschke *et al.*, 1982) zu hydrolysieren.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf der Verteilung und Komposition der organischen Nadelbestandteile in den morphologischen Regionen der Nadel von Hexactinelliden, dem Axialzylinder und der lamellaren Zone, sowie deren biochemischer Zusammensetzung. Die größte biogene Silikatstruktur der Erde, die Pfahlnadel („*giant basal spicule*“), kleinere Diactine (Comitalia) und Tauactine von *Monorhaphis*, wurden für die Analysen verwendet. Von einem zweiten Glasschwamm, *Crateromorpha meyeri*, wurden Diactine und Gewebematerial untersucht.

### **6.1 Morphologie der Pfahlnadel und Comitalia von *M. chuni***

Der strukturelle Aufbau der Nadeln bei den Hexactinelliden wurde bereits 1904 weitgehend von Schulze und 1926 von Schmidt beschrieben. Sie entdeckten unter anderem die lamellare Organisation der vermutlich durch organisches Material voneinander getrennten Silikatschichten (Schmidt 1928). Diese lamellare Organisation ist laut Levi *et al.* (1989) ein Hauptgrund für die hohe Stabilität der Pfahlnadel von *M. chuni*. Das Wachstum der Nadel erfolgt in appositionalen Ablagerungen von konzentrischen Silikatschichten mit dem Axialfilament als Mittelpunkt sowohl in den Demospongia (Müller *et al.*, 2005) als auch in den Hexactinellida (Aizenberg *et al.*, 2005).

An Querschnitten der Pfahlnadel von *Monorhaphis* kann man unter dem Elektronenmikroskop deutlich drei Zonen unterscheiden: (1) den Axialkanal, (2) den Axialzylinder und (3) die lamellare Zone.

Der Axialkanal besitzt eine quadratische Symmetrie und beherbergt das Axialfilament. Er kann einen Durchmesser von bis zu 5  $\mu\text{m}$  erreichen. Schmidt (1926) und Schulze (1904) zeigten, dass bei fortschreitendem Wachstum der Nadel das

Axialfilament bzw. der Axialkanal dünner werden kann und sogar die Möglichkeit besteht, dass er ganz verschwindet und mit Silikat ausgefüllt wird. Bisherige Untersuchungen legen nahe, dass alle Nadeln der Hexactinelliden ein Axialfilament besitzen (Uriz, 2006) und an ihren Spitzen, wie im Falle von *M. chuni*, geöffnet sind (Schulze, 1904; Uriz *et al.*, 2003; Uriz, 2006).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen an der Pfahlnadel von *M. chuni* bestätigen den grundlegenden Aufbau der Nadeln und deren morphologische Zonen. Es wurde zusätzlich beobachtet, dass der Axialzylinder im Unterschied zur lamellaren Zone aus soliderem Silikat besteht, bei der Anätzung mit Flusssäure allerdings einen lamellaren Aufbau erkennen lässt (Müller *et al.*, 2007). Dies lässt auf einen ähnlichen Biosynthesemechanismus des Axialzylinders wie der lamellaren Zone schließen.

Der Durchmesser des Axialzylinders variiert zwischen unterschiedlichen Nadeln kaum und liegt bei etwa 100 bis 200 µm. Die lamellare Zone hingegen kann deutliche Unterschiede in ihrer Größe aufweisen (0,2 mm – 1 cm). Dies ist auf die Anzahl der 3 bis 10 µm dicken Silikatschichten zurückzuführen, die eine Anzahl von 50 bis 600 Schichten bei Nadeln von *M. chuni* erreichen können. Somit stellt die lamellare Zone den grundlegenden Wachstumsbereich der Nadel, dem von außen neue Silikatschichten hinzugefügt werden, dar. Die Dicke der Schichten nimmt vom Inneren der Nadel nach außen geringfügig zu. Der Mechanismus, der zu der Bildung dieser Schichten führt, ist noch unklar. Eine organische Matrix, die als Vorlage für die Silikatpolymerisation jeder Schicht dient, wird stark favorisiert.

## 6.2 Verteilung der anorganischen Nadelkomponenten

Die Elektron-Mikrosondenanalyse von 150 µm dünnen Querschnitten der Pfahlnadel von *Monorhaphis* ergab, dass neben SiO<sub>2</sub> (84-89 Gew.-%) die nächst häufigen anorganischen Bestandteile der Nadel Natrium und Kalium sind. Schon 1904 entdeckte Schulze, dass neben SiO<sub>2</sub> nur Kalium und Natrium als anorganischen Substanzen in der Nadel von *Monorhaphis* zu finden sind.

Zu beachten ist, dass laut den Daten der durchgeführten Elektronen-Mikrosondenanalyse bei der Verteilung von Kaliumoxid und Natriumoxid, die

Konzentrationen in der Mitte der Nadel stark von den Konzentrationen am Rande abweichen. Die Kaliumoxidkonzentration fällt am Rand der Nadel stark ab (von 1,2 zu 0,4 Gew.-%), wohingegen die Natriumoxidkonzentration am Rand stark zunimmt (von 0,03 auf 0,48 Gew.-%). Die hohen Konzentrationen von Natrium im Vergleich zu Kalium im Salzwasser könnten dazu führen, dass nach der anfänglichen Bildung von K-Silikat bei dem Kontakt mit dem äußeren Milieu ein Austausch zu Na-Silikat stattfindet. Da aber bei einer 1,7 mm dicken Nadel nur der äußere Rand diese Konzentrationsunterschiede aufweist, ist ein Austausch mit dem umgebenden Seewasser unwahrscheinlich. Weiter innen liegende Silikatlamellen der Nadel waren vermutlich schon in früheren Wachstumsstadien dem äußeren Milieu ausgesetzt. Somit hätte auch dort schon ein Austausch der Ionen stattfinden müssen. Iler (1979) und Perry (2003) zeigten, dass sich in der Gegenwart von kleinen Kationen, wie zum Beispiel  $\text{Na}^+$ , die Kondensation von Silikat im Vergleich zur Gegenwart größerer Kationen wie  $\text{K}^+$  beschleunigt. Dies könnte sich der Schwamm in der Wachstumszone, dem äußeren Teil der Nadel, zum Nutzen machen und somit die höheren Natriumkonzentrationen am Nadelrand erklären.

Es wird angenommen dass bei den Diatomeen der Silikattransport in die Zellen von einem  $\text{Na}^+$ -Gradienten angetrieben wird, der durch eine  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase aufrechterhalten wird (Sullivan, 1986). In Schwämmen wurde bei *S. domuncula* ein NBCSA-Kotransporter identifiziert (Müller *et al*, 2004), der wahrscheinlich bei der Silikataufnahme des Schwammes eine Rolle spielt und ebenfalls mit einem Kotransport von Natriumhydrogencarbonat einhergeht.

Durch das hohe Angebot an Natrium könnte bei der Kondensation von Silikat im Laufe des appositionellen Wachstums erst Na-Silikat gebildet werden, das dann vermutlich bei späteren Modifikationen zu K-Silikat umgewandelt wird.

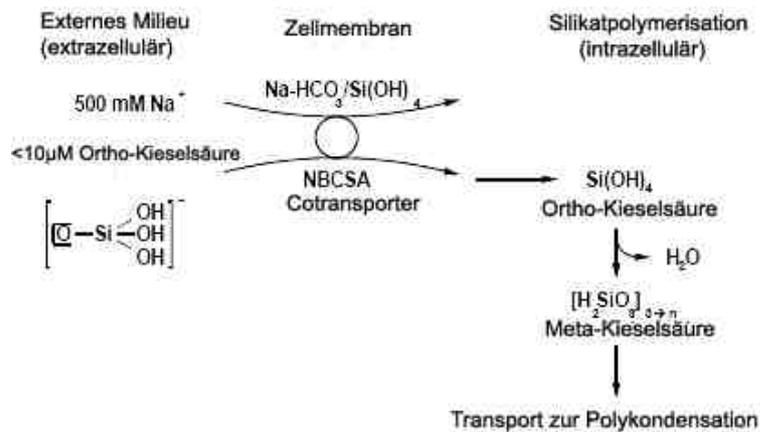


Abb. 34: Schema für den aktiven Silikattransport in die Schwammzelle von *S. domuncula*. Der NBCSA-Transporter ermöglicht eine Anreicherung von Silikat im Zytosol der Zelle. Das Silikat wird für die intrazelluläre Bildung von kleinen Nadeln verwendet oder zum Nadelwachstum in spezielle Kompartimente abgegeben (verändert nach Müller *et al.*, 2004).

### 6.3 Anordnung und Struktur des organischen Materials der Nadeln

Über die Anordnung von organischem Material innerhalb der Silikatnadeln war bis auf das Axialfilament kaum etwas bekannt.

Das Axialfilament besteht aus Silicateinen und spielt bei der Nadelbildung eine entscheidende Rolle. Es dient als Template und katalysiert auf seiner Oberfläche, wie erstmals bei dem Schwamm *Tethya aurantium* gezeigt wurde, die Polymerisation von Silikat (Cha *et al.*, 1999). Das Axialfilament bestimmt somit in nicht geringem Umfang die spätere Form der Nadel.

Es wird vermutet, dass sich zusätzlich zum Axialfilament zwischen den Silikatlamellen der Nadel organisches Material befindet. Die organischen Strukturen außerhalb und innerhalb der Nadeln von Hexactinelliden wurden in dieser Arbeit genauer untersucht.

#### 6.3.1 Äußere organische Hüllstruktur

Bereits Schulze (1904) beschrieb bei *Monorhaphis* eine, die Pfahlnadel umgebende, netzartige Hüllstruktur. Diese Hüllstrukturen sind auch bei den Tauactinen, kleine

Nadeln im Schwammkörper, zu finden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen und EDX-Analysen (*energy dispersive X-ray spectroscopy*) von Eckert *et al.* (2006) lassen darauf schließen, dass es sich wahrscheinlich um eine Hülle aus Kollagen oder Spongine handelt. Spongine ist ein kollagenähnliches Protein, das in Schwämmen Gerüstfasern ausbildet. Kollagen ist mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Bestandteil der extrazellulären Matrix, die im Nadelwachstum und der Formbildung in noch unbekannter Weise involviert ist. Sklerozyten und Exopinacozyten synthetisieren Kollagenpolypeptide (Weissenfels und Landschoff, 1977), die unter anderem auch bei der Nadelbildung als organisches Rahmenwerk dienen (Hartmann, 1969).

Diese Hülle könnte bei der Formbildung der Nadeln, bei der Fixierung der nadelbildenden Zellen (Sklerozyten) im Mesohyll oder/und bei der Anordnung der Nadeln untereinander eine Rolle spielen. Die ovalen Löcher sind dazu geeignet, eventuelle Spannungen der Hülle beim Dickenwachstum der Nadel zu kompensieren. Die Präsenz von Kollagen in Hexactinelliden, das bislang nur bei den Demospongia nachgewiesen wurde, konnte von der Arbeitsgruppe Müller durch das Screening der cDNA von *Aphrocallistes vastus* bestätigt werden (Müller, 2007). Dort wurde ein Transkript identifiziert, das eine starke Ähnlichkeit mit dem „*Collagen alpha 1 chain precursor*“ von *Hydra vulgaris* aufweist.

### 6.3.2 Organisches Material innerhalb der Nadeln

Um die organischen Bestandteile der Nadeln freizulegen wurden sie zuerst zur Entfernung der äußeren Proteinhülle mit Säure gereinigt und anschließend mit Flussäure demineralisiert. Durch das Färben mit Coomassie Brilliant Blau wurde bei der Auflösung des Silikates organisches Material innerhalb der Nadeln sichtbar.

Der Auflösungsprozess verschiedener Nadeltypen, der Pfahlnadel, Comitalia und Tauactine von *M. chuni* sowie der Diactine von *C. meyeri*, ist unter dem Lichtmikroskop betrachtet gleich. Die lamellare Zone wird schneller aufgelöst als der Axialzylinder. Die Auflösungsgeschwindigkeit von Silikat durch Flussäure hängt von der Silikatdichte, der chemischen Angriffsfläche und der organischen und anorganischen Zusammensetzung ab. Die Angriffsfläche für die Säure ist in der lamellaren Zone weitaus größer als beim Axialzylinder. Die Silikatdichte und die unterschiedlichen Komponenten des Axialzylinders spielen wahrscheinlich auch eine

Rolle wie schon bei ähnlichen Studien von Aizenberg *et al.* an *Euplectella aspergillum* vermutet wurde (Aizenberg *et al.*, 2004).

### 6.3.2.1 Organisches Material der Lamellare Zone

In der anfänglichen Phase der Silikatauflösung, der lamellaren Zone, werden Strukturen freigelegt, die mit Coomassie stark reagieren und daher gut angefärbt werden können. Diese Strukturen besitzen einen netzartigem Aufbau und zerfallen innerhalb weniger Minuten bei weiterem Kontakt mit Flusssäure. Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um Proteine handelt. Die daraus entstehenden unregelmäßigen Proteinaggregate verklumpen und lösen sich von der Nadel ab. Dies ist wahrscheinlich auf die Denaturierung durch die Flusssäure zurückzuführen.

Es könnte sich bei dem organischen Material um Proteinschichten zwischen den Silikatlamellen handeln (Aizenberg *et al.*, 2005). Elektronenmikroskopische Untersuchungen der lamellaren Zone zeigten aber zusätzlich, dass sich auch innerhalb der Silikatschichten Proteine in der Form von palisadenartigen Säulen befinden. Sie besitzen einen Durchmesser von 0,1 bis 0,2  $\mu\text{m}$  und eine Länge von 5 bis 10  $\mu\text{m}$ . Proteine befinden sich somit nicht nur zwischen den Silikatlamellen, sondern sind auch im Silikat selber. Bei der Auflösung des Silikates unter dem Lichtmikroskop kann nicht festgestellt werden, ob die gefärbten Strukturen aus den Zwischenräumen, aus dem Silikat selber, oder aus beiden gleichzeitig stammen.

### 6.3.2.2 Organisches Material des Axialzylinders

Bei der Auflösung des Axialzylinders wird eine weitere organische Struktur sichtbar, der sogenannte „*axial barrel*“, der sich neben Coomassie Brilliant Blau auch mit dem spezifischeren Farbstoff Sirius Rot F3BA anfärben lässt.

Sirius Rot wurde anfänglich als ein spezifischer Farbstoff gegen Kollagen beschrieben, der aufgrund seiner anionischen Natur mit den basischen Gruppen von Kollagen reagiert und sich so an diese in paralleler Ausrichtung anlagert (Junqueira

*et al.*, 1979; Taskiran *et al.*, 1999). Allerdings wurde in einigen Arbeiten gezeigt, dass Sirius Red auch an andere Proteine und Makromoleküle bindet.

Eine Studie von Piérard kommt zu dem Ergebnis, dass die Sirius Rot-Färbemethode für die Visualisierung der Organisation von Bindegewebe verwendbar ist, aber nicht für die molekulare Identifikation von fibrillaren Polymeren (Piérard, 1989). Wehrend zeigte zusätzlich, dass auch Granules von eosinophilen Granulozyten mit Sirius Rot spezifisch angefärbt werden können (Wehrend *et al.*, 2004). Nielsen untersuchte den Färbemechanismus von Sirius Rot genauer und kam zu dem Ergebnis, dass der Farbstoff nicht kollagenspezifisch ist und die Färbung stark von elektrostatischen Kräften beeinflusst wird. In seiner Arbeit wurden auch andere, basische Aminosäuren enthaltenden Proteine, angefärbt (Nielsen *et al.*, 1998).

Die Proteine aus dem Axialzylinder bleiben im Gegensatz zu den Proteinstrukturen in der lamellaren Zone auch bei anhaltendem Flusssäurekontakt stabil. Ihre Struktur ähnelt verdrehten Seilen mit gelegentlichen Abzweigungen. Eine komplexe Netzstruktur, wie in der lamellaren Zone, ist nicht zu erkennen. Aufgrund der Färbung mit Sirius Rot kann man davon ausgehen dass das Protein einen anderen Aufbau als die Substanzen der lamellaren Zone besitzt.

Das Axialfilament ist nur mit Coomassie Brilliant-Blau zu färben, nicht aber mit Sirius Rot. Es ist davon auszugehen, dass es ebenfalls einen anderen Aufbau wie die Strukturen des Axialzylinders besitzt.

Die entdeckte unterschiedliche Kompositzusammenstellung und die Struktur des Silikates dieser Bereiche gehen einher mit den Beobachtungen zur Stabilität der Nadel. Drei-Punkt-Biegeversuche (Müller *et al.*, 2007) der Pfahlnadel ergaben, dass sich der Axialzylinder und die lamellare Zone in ihrer Stabilität und Flexibilität unterscheiden. Dies kann dazu beitragen, die Stabilität der gesamten Nadel zu erhöhen.

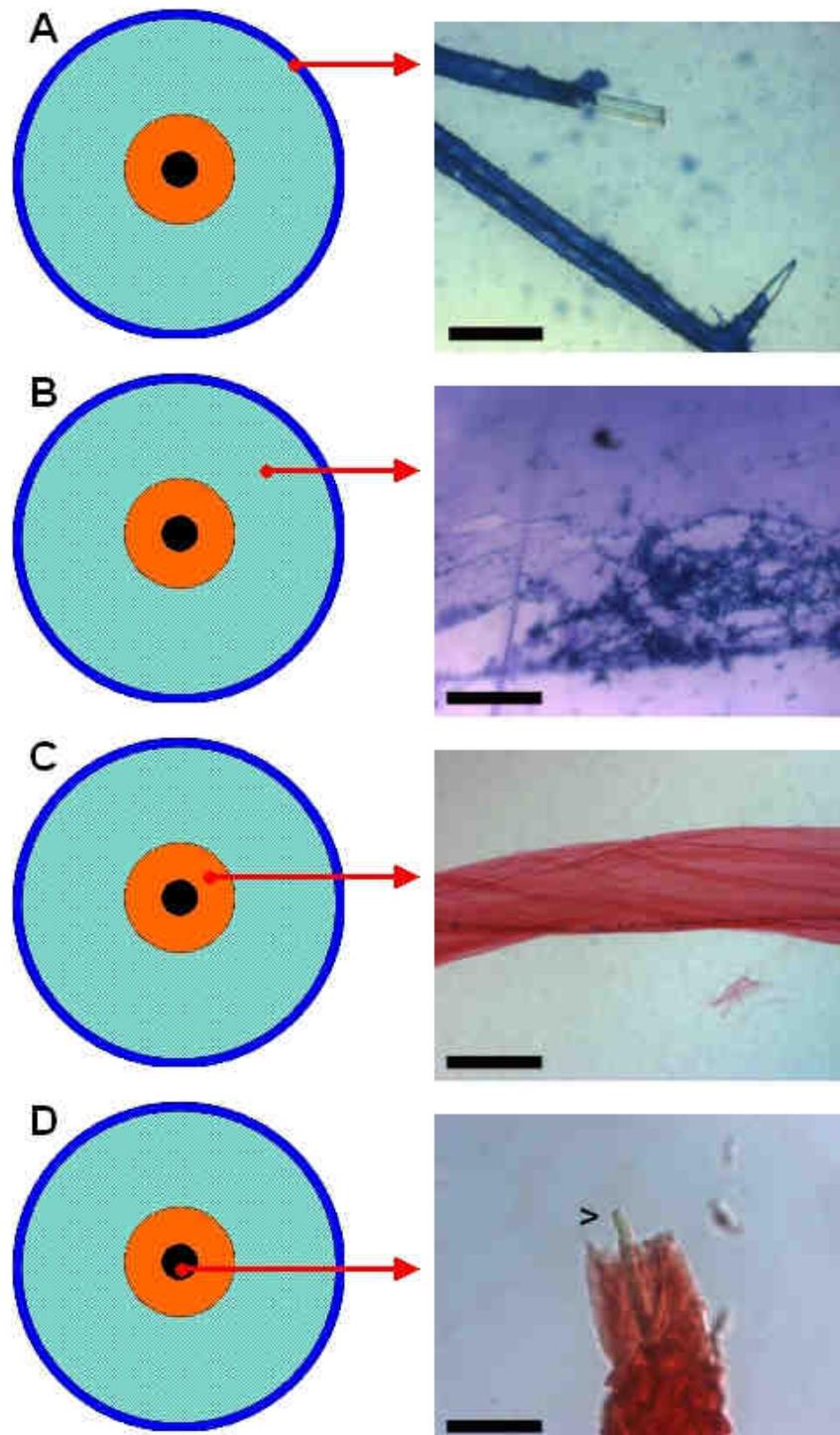


Abb. 35: Schema eines Nadelquerschnitts und entsprechende typische mikroskopische Bilder der verschiedenen Zonen nach Demineralisation mit Flusssäure. A (dunkelblauer Bereich) zeigt die organische Hülle der Nadeln und B die äußere lamellare Zone (gemusterter Bereich). In C wird der Axialzylinder (orange) dargestellt und in D (schwarz) schließlich das Axialfilament. Messbalken A: 100  $\mu\text{m}$ ; B-D: 50  $\mu\text{m}$ . Die Größenverhältnisse sind in dem Schema nicht berücksichtigt.

## 6.4 Analyse der Nadelproteine bei Pfahlnadeln von *Monorhaphis chuni*

Glasschwämme (Hexactinellida) sind bisher noch nicht auf ihre biochemische Zusammensetzung untersucht worden. Die bisherigen Untersuchungen der Nadelkomponenten erfolgten hauptsächlich an Schwämmen der Familie der Demospongia.

Für die Analyse der Nadelproteine in Hexactinelliden wurde die Pfahlnadel von *M. chuni* verwendet. Die SDS-Gelelektrophorese des Extraktes der aufgelösten Nadeln zeigte zwei Bereiche von Proteinen, einen hochmolekularen bei einem Molekulargewicht (MW) von 70 kDa und einen niedrigeren von 17 bis 36 kDa. Banden mit ähnlichen Molekulargewichten sind auch bei untersuchten Demospongia zu finden. Die Proteine Silicatein (25 kDa) und Galectin (35 kDa) wurden schon bei Nadeln von *S. domuncula* identifiziert. Nadelextrakte von *Geodia cydonium* zeigen zusätzlich eine Bande bei 70 kDa, die mit Antikörpern gegen Kollagen reagierte (Müller *et al.*, 2007).

Ob die in der Biosilifikation der Demospongia beteiligten Proteine wie Silicatein oder Galectin auch in Hexactinelliden zu finden sind, ist nachzuweisen.

### 6.4.1 Zweidimensionale-SDS-Gelelektrophorese und Westernblot der Gesamtnadel

Um ein genaueres Bild von dem Proteinmuster der Pfahlnadel zu erhalten, wurde eine zweidimensionale-SDS-Gelelektrophorese durchgeführt.

Es waren auf dem Gel nur Proteine bei 27 kDa, 30 kDa und im Bereich von 70 kDa zu erkennen. Trotz Aufkonzentrierung des Nadelextraktes waren die Konzentrationen der restlichen Proteinbanden der eindimensionalen Gelelektrophorese zu gering, um sie in der 2-D Gelelektrophorese sichtbar zu machen.

Das 27 kDa Protein von *M. chuni* besitzt 5 isoelektrische Formen mit isoelektrischen Punkten (pI) von 5,6 bis 6,6. Die gleichen isoelektrischen Punkte sind auch bei dem 30 kDa Protein zu erkennen. Es ist möglich, dass es sich bei dem 30 kDa Protein nicht, wie angenommen, um ein lectinähnliches Protein (siehe unten), sondern um eine modifizierte Form des 27 kDa Proteins handelt.

Silicatein von *S. domuncula* besitzt ebenfalls 5 Isoformen. Es hat ein Molekulargewicht von 25 kDa. Die isoelektrischen Punkte dieser Isoformen reichen von 4,3 bis 5,5 und sind vermutlich auf eine stufenweise Phosphorylation zurückzuführen (Müller *et al.*, 2005). Diese Modifikation könnte aufgrund des ähnlichen Musters und der Sequenzanalyse des *C. meyeri* Silicateins (siehe 6.5) auch auf das 27 kDa Protein von *M. chuni* zutreffen und ein gemeinsames Merkmal der Silicateine darstellen.

Eine Westernblot-Analyse mit Antikörpern gegen Silicatein  $\alpha$  von *S. domuncula* ergab eine positive Reaktion der 27 kDa Bande. Dies ist ein erster klarer Beleg dafür, dass auch in Hexactinelliden ein silicateinähnliches Protein vorkommt. Die Proteine im Bereich von 70 kDa reagierten nicht mit den Antikörpern gegen Silicatein. Somit ist die anfängliche Vermutung, es könnte sich wie bei *S. domuncula* um Polymere von Silicatein handeln, auszuschliessen. Es ist unwahrscheinlich, dass es sich um ein Abbauprodukt des 70 kDa Proteins handelt.

Bei dem Süßwasserschwamm *Lubomirskia baicaliensis* wurden 3 Isoformen der Silicateine mit unterschiedlichen Molekulargewichten identifiziert (Molekulargewichte von 23, 24 und 26 kDa), bei denen das größte glycolysiert vorliegt (Müller *et al.*, 2007). Die negative Reaktion der 30 kDa Bande im Westernblot schliesst aus, dass es sich bei *M. chuni* um eine glykolysierte Isoform der 27 kDa Bande ähnlich den Beobachtungen bei *L. baicaliensis* handelt.

Nachfolgende Studien der Arbeitsgruppe Müller zeigten eine Cathepsin L-Enzymaktivität in Extrakten der Pfahlnadel und eine Bindung des Inhibitors E-64 an die 27 kDa Bande bei der SDS-PAGE (Müller *et al.*, 2007).

Das gefundene Molekulargewicht, die posttranslationale Modifikationen, die Crossreaktivität mit dem Antikörper gegen Silicatein von *S. domuncula* und Studien der Proteaseaktivität erhärten den Hinweis auf ein silicateinähnliches Enzym in *Monorhaphis*.

Die 70 kDa-Proteine trennen sich nach zweidimensionaler-SDS-Gelelektrophorese in eine Gruppe mit isoelektrischen Punkten von 4,2 bis 4,7 und in eine Gruppe mit isoelektrischen Punkten von 6,8 bis 7,3 auf. Diese starke Modifikation durch geladene Gruppen wurde auch bei den sogenannten „*Silica-depositing proteins*“ der Diatomeen beschrieben (Perry, 2003). Sie erfolgt dort durch Phosphorylierung,

Glutamylierung und durch Modifikationen von Tyrosinen. Der Prozess der Biomineralisation in Diatomeen ist im Gegensatz zu Schwämmen nicht enzymatisch katalysiert. Trotzdem ist nicht auszuschliessen, dass sich bestimmte Eigenschaften und Proteine zur Verbesserung der Silikatpolykondensation in Diatomeen und Schwämmen parallel entwickelt haben.

Ehrlich *et al.* führten Untersuchungen an *Hyalonema sieboldii*, einem weiteren Hexactinelliden, durch. Kollagen ist laut ihren Aussagen der organische Hauptbestandteil in Nadeln von *Hyalonema sieboldii* (Ehrlich *et al.*, 2005). Biochemische Analysen fehlen aber bisher. In einer späteren Arbeit wurden die Nadeln von *Euplectella aspergillum*, *Aphrocallistes vastus* und *Farrea occa* untersucht und innerhalb der Nadeln als Matrix der Biosilifikation Chitin entdeckt (Ehrlich *et al.*, 2007).

Nach Demineralisation der Comitalia von *M. chuni* mit NaOH (nicht gezeigt) war aber im Gegensatz der Studien von Ehrlich bei *Hyalonema* keine sichtbare Struktur zu sehen. In *M. chuni* kann die Existenz von Chitin nicht bestätigt werden.

Ein Verdau der mit Sirius Rot gefärbten Strukturen des Axialzylinders mit Kollagenase (nicht gezeigt) ergab ebenfalls kein positives Ergebnis.

#### 6.4.2 Analyse der organischen Bestandteile der lamellaren Zone

Mikroskopische Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass sich die organischen Bestandteile der lamellaren Zone von denen des Axialzylinders unterscheiden. Die außergewöhnliche Größe der Pfahlnadel ermöglichte es, die lamellare Zone getrennt vom Axialzylinder und Axialfilament zu untersuchen.

In der lamellaren Zone ist bei der zweidimensionalen-SDS-PAGE nur das 27 kDa Protein (Silicatein) zu finden, die restlichen Proteine inklusive der 70 kDa Proteine fehlen. Dies lässt darauf schließen, dass diese sich nur im Axialzylinder befinden. Da das Axialfilament bei *S. domuncula* und *Tethya aurantium* aus Silicatein besteht, wird vermutet, dass das silicateinähnliche 27 kDa Protein aus der lamellaren Zone auch im Axialzylinder und somit in der gesamten Nadel vorkommt. Die stark modifizierten 70 kDa Proteine sind wahrscheinlich nicht essentiell für das spätere Dickenwachstum der Nadel oder werden in der lamellaren Zone abgebaut. Sie könnten eine Rolle bei der Bildung des homogen aufgebauten Axialzylinders spielen oder tragen zur

Stabilität der Nadel bei. Höchst wahrscheinlich handelt es sich hierbei um die fibrillare, mit Sirius Rot anzufärbende beobachtete Struktur des Axialzylinders.

### 6.4.3 Agglutinationsassay und Deglycolysierung

In *S. domuncula* wurde ein Galectin (Schröder *et al.*, 2006), das Galectin-2, entdeckt welches ein Molekulargewicht von 35 kDa aufweist. Es bildet Aggregate, an die Silicatein binden kann, was dazu führt, dass die enzymatische Bildung von Silikat durch Silicatein beschleunigt wird. Um einen Hinweis auf ein Lectin in den Nadeln von *M. chuni* zu gewinnen, wurde ein Agglutinationsassay durchgeführt.

Der Agglutinationsassay des Nadelextraktes von *M. chuni* führte zu einer Verklumpung der Erythrozyten, was auf die Existenz eines lectinähnliches Proteins hindeutet. Daraufhin wurde eine enzymatische Deglycolysierung und anschließende SDS-PAGE durchgeführt, um ein potentielles Lectin zu identifizieren.

Die Deglycolysierung ergab, dass das 36 kDa Protein glycolysiert vorliegt. Nach der enzymatischen Deglycolysierung besitzt es ein Molekulargewicht von 30 kDa.

Die Vergleiche des Molekulargewichtes, der Agglutinationsassay und die Glycolysierung legen die Vermutung nahe, dass es sich bei dem 30 kDa Protein in *M. chuni* ebenfalls um ein Lectin handeln könnte, das ähnliche Funktionen wie das Galectin-2 in *S. domuncula* besitzt. Ob und wie dieses Protein, im Vergleich zu *S. domuncula*, bei der Nadelbildung beteiligt ist, muss noch näher untersucht werden. Der Nachweis von Silicatein (siehe 6.5) und des lectinähnlichen Proteins in Hexactinelliden legen diese Vermutung nahe.

## 6.5 Molekularbiologischer Nachweis von Silicatein in Hexactinelliden

Silicatein wird in den Demospongia als das Schlüsselenzym im Prozess der Biosilifizierung angesehen. Es wird daher von vielen Autoren angenommen (Leys, 2007), dass das Silicatein, auch in den Hexactinelliden vorkommt, Hinweise darauf fehlten jedoch bisher. Einen starken Hinweis, dass ein silicateinähnliches Enzym auch bei Hexactinelliden vorhanden ist, lieferte die Reaktion des polyklonalen anti-Silicatein-Antikörpers bei der Westernblotanalyse der Nadelproteine von *M. chuni*

(siehe 6.4). Das Molekulargewicht des Proteins mit 27 kDa stimmt mit bekannten Silicateinen der Demospongia überein. Allerdings steht ein molekularbiologischer Nachweis von silicateinähnlichen Enzymen in Hexactinelliden noch aus.

Um die Existenz von Silicatein in Hexactinelliden molekulargenetische zu bestätigen, wurde Gewebematerial von *Crateromorpha meyeri* (Hexasterophora, Lyssacinosa, Rossellidae), für weitere Untersuchungen verwendet. Es wurde RNA isoliert und die umgeschriebene cDNA mittels PCR-Screening auf eine silicateinähnliche Sequenz überprüft. Es konnte ein Nukleotidfragment (CMSILCA) kloniert werden, das eine starke Homologie zu bekannten Silicateinen aufweist. Die abgeleitete Aminosäuresequenz umfasst das, nach früheren Vorhersagen (Müller *et al.*, 2003), reife Silicatein ohne Propeptide.

Das charakteristische Merkmal aller bekannten Silicateine, die katalytische Triade, bestehend aus Serin, Histidin und Asparagin, ist in der Nukleotidsequenz an identischen Positionen wie bei bekannten Silicateinen zu finden. Die Papain Protease Domäne und die „*thiol-protease-signature*“ (Christensen *et al.*, 1999) sind ebenfalls vorhanden. Es sind alle typischen Merkmale der bekannten Silicateine zu finden.

Der Sequenzvergleich mit anderen Silicateinen zeigt eine auffällige Verteilung von Serinresten. In den Silicateinen der Demospongia findet man auf der N-terminalen Seite des Histidins der katalytischen Triade ein Serincluster, das sogenannte „*conventional cluster*“ (Cha *et al.*, 1999). Bei dem Hexactinellidensilicatein gibt es noch ein zweites Serincluster am C-Terminus des Proteines, das sogenannte „*C. meyeri-specific cluster*“.

Es besteht die Möglichkeit der posttranslationalen Modifikation durch Phosphorylation an verschiedenen Stellen der Sequenz. Es sind zwei mögliche Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C und drei für die Kaseinkinase II vorhanden. Die Phosphorylierung ist ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle der Aktivität von Enzymen. Im Silicatein von *Lubomirskia baikaliensis* wurden 4 phosphorylierte Isoformen identifiziert (Müller *et al.*, 2007), in *S. domuncula* 5 phosphorylierte Isoformen (Müller *et al.*, 2005). Das Muster bei der zweidimensionalen-SDS-PAGE der bekannten Silicateine gleicht dem der 27 kDa Spots bei *M. chuni*. Eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes um 0,2 pH-Einheiten, wie es auch bei 4 Spots in *M. chuni* der Fall ist, ist in Übereinstimmung mit der Änderung des isoelektrischen Punktes anderer Phosphoproteine (Towbin *et al.*,

2001). Ob die Phosphorylierung in der Biosynthese von Silikat, wie bei Phosphatgruppen der Silaffine in Diatomeen beobachtet wurde, (Kröger *et al.*, 2002) eine Rolle spielt, muss noch untersucht werden.

Glycolysierungsstellen sind in dieser Sequenz im Gegensatz zu *L. baikaliensis* (Müller *et al.*, 2007) nicht zu finden, könnten aber ausserhalb der Kernregion vorhanden sein.

Das erstellte vergleichende 3-D Modell der Aminosäuresequenz mit humanen Cathepsin K als Vorlage zeigt grosse Übereinstimmungen mit Silicatein  $\alpha$  von *S. domuncula*. Auffällige Unterschiede beim *C. meyeri* Silicatein sind das *C. meyeri* spezifische Serincluster, das sich räumlich getrennt vom herkömmlichen Serincluster im erweiterten  $\beta$ -Sheet und dem darauffolgendem Loop befindet und zwei in das aktive Zentrum ragende Serine.

Es ist denkbar, dass die Serine des *C. meyeri* spezifischen Serinclusters zusätzlichen Modifikationen ausgesetzt sind. Die Funktionen der zwei in das aktive Zentrum ragenden Serine sind anhand des Modells nicht zu erklären.

Es ist zum ersten mal gelungen, Silicatein molekularbiologisch bei einem Hexactinelliden nachzuweisen. Da Silicatein bei den Demospongia eine Schlüsselrolle bei der Biosynthese von Silikat spielt, ist davon auszugehen, dass es die gleiche Funktion auch bei den Hexactinelliden ausübt.

## 6.6 Ausblick

Die Studien über den Aufbau und die Biosynthese von Silikatnadeln der Hexactinelliden stehen noch am Anfang. Die Hexactinelliden bilden weitaus größere und oft auch komplexere Skelette als die Demospongia. Der zugrundeliegende Syntheseweg ist bei den Hexactinelliden allerdings noch unbekannt. Inwiefern die organische Zusammensetzung der Nadeln und der Mechanismus der Biosilifikation bei beiden Schwammfamilien übereinstimmen oder sich unterscheiden kann zu weiteren Erkenntnisse über die enzymatischen Biosynthese von Silikat in Schwämmen führen.

Der strukturelle Aufbau von Hexactinellidennadeln und die Organisation des daraus aufgebauten Skelettes wurde bereits an verschiedenen Arten untersucht. Kenntnisse über den organischen Anteil der Nadeln fehlten aber bisher.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die verschiedenen Zonen der Nadel, der Axialzylinder und die lamellare Zone, eine unterschiedliche organische Zusammensetzung besitzen. In der lamellaren Zone konnte nur ein 27 kDa Protein identifiziert werden, welches eine netzartige Struktur ausbildet. Im Axialzylinder haben die Proteine eine filbrillare Struktur und es kommen zusätzlich Proteine im Bereich von 70 kDa vor. Diese unterschiedliche Zusammensetzung konnte bisher bei den Nadeln der Demospongia aufgrund ihrer geringen Größe nicht nachgewiesen werden. Genaue Untersuchungen sind deshalb nötig, um diesen Aufbau auch hier zu überprüfen.

Das Ziel weiterer Arbeiten sollte auch darin bestehen, verschiedene Nadeltypen eines Schwammes auf gemeinsame Bestandteile und Unterschiede zu überprüfen. Dies wurde bei *Geodia cydonium* schon begonnen (Müller *et al.*, 2007).

Ein nächster Schritt in der Aufklärung der Biosynthese der Schwammnadeln der Hexactinelliden wäre die Suche nach Silicatein in anderen Arten und die Expression des *C. meyeri* Silicateins inklusive dessen enzymatische Charakterisierung.

## 7.0 Zusammenfassung

Schwämme sind in der Lage, sehr komplexe Strukturen aus hydratisiertem amorphem Silikat, zu bilden, die von wenigen Mikrometern bis hin zu mehreren Metern Länge reichen können. Die Morphologie, die chemische Zusammensetzung sowie die Biosynthese dieser Strukturen wurden fast ausschließlich an Schwämmen der Familie *Demospongia* (Kieselschwämme) erforscht. Sowohl in marinen als auch in Süßwasserschwämmen wurde in den letzten 10 Jahren ein Protein, das Silicatein (genannt nach *silica proteins*) identifiziert, welches eine Schlüsselrolle bei der Polykondensation von Silikat unter physiologischen Bedingungen spielt. Es beschleunigt die Bildung von amorphem Silikat und dient als Matrize für die Biosilifikation.

Schon 1904 beschrieb Schulze den Aufbau von Silikatnadeln des Schwammes *Monorhaphis chuni*, eines Mitglieds der zweiten Familie von biosilifizierenden Schwämmen, den Hexactinelliden (Glasschwämmen). Weitergehende morphologische Untersuchungen und biochemische Analysen insbesondere mit modernen Methoden wurden an Hexactinelliden bisher kaum durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit bestand deshalb darin, Untersuchungen zur Morphologie, der chemischen Zusammensetzung, der Verteilung und Charakterisierung der beteiligten anorganischen und organischen Komponenten sowie einen molekularbiologischen Nachweis der Existenz von Silicatein in Hexactinelliden durchzuführen. Für diese Untersuchungen wurden zwei Spezies verwendet: *Monorhaphis chuni* und *Crateromorpha meyeri*.

Mittels Elektronen-Mikrosonden-Technik wurde an Querschnitten der Pfahlnadel von *M. chuni* die Verteilung der Elemente innerhalb der Nadel untersucht. Am äußeren Rand der Nadel (150 µm) traten im Vergleich zur Nadelmitte prägnante Unterschiede in der Konzentration von Kaliumoxid und Natriumoxid auf. Die Konzentrationen an Natriumoxid waren in diesem Bereich 16-fach höher, die von Kaliumoxid 3-fach niedriger. Diese Ergebnisse deuten auf das Vorhandensein eines ähnlichen Transportsystems zur Anreicherung von Silizium/Silikat bei der Nadelbildung hin, wie es bereits in *S. domuncula* bekannt ist.

Mit elektronen- und lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die organischen Substanzen der Silikatnadel nachgewiesen und deren Verteilung innerhalb dieser

Nadeln analysiert. Die verschiedenen Zonen der Nadeln (Diactine) bei *M. chuni*, die lamellare Zone und der Axialzylinder unterscheiden sich nicht nur wie bisher bekannt in ihrer Silikatstruktur, sondern auch in ihrer organischen Zusammensetzung. In der lamellaren Zone befindet sich, eine säurelabile organische Netzstruktur, sowie eine, die Silikatschichten durchspannende, säulenähnliche Struktur. Im Axialzylinder zeigt das organische Material eine leicht verzweigte fibrilläre Anordnung. Die fibrilläre Struktur lässt sich neben Coomassie Brilliant Blau auch mit dem selektiveren Farbstoff Sirius Rot sichtbar machen, wohingegen die Netzstruktur und das zentral gelegene Axialfilament nur mit Coomassie anfärben ist.

Mit biochemischen Verfahren wurden die organischen Komponenten der Nadeln detaillierter untersucht. Mehrere Proteine mit Molekulargewichten von 17, 24, 27, 30, 36 und 70 kDa wurden durch gelelektrophoretische Analysen von Material der Pfahlnadel identifiziert.

Die Analyse isolierter Anteile der lamellaren Zone zeigte ausschließlich ein 27 kDa Protein. Die restlichen Proteinbanden konnten hier nicht nachgewiesen werden.

Das 27 kDa Protein reagierte im Westernblot mit Antikörpern gegen Silicatein aus *S. domuncula*. Seine isoelektrischen Punkte (pI) lagen bei pH 5.6, 5.8, 6.0, 6.2 und 6.6. Silicatein  $\alpha$  von *S. domuncula* besitzt ein ähnliches Molekulargewicht von 25 kDa und liegt ebenfalls in 5 Isoformen mit dem pI von 5.5, 4.8, 4.6, 4.5 und 4.3 vor.

Ein weiteres Protein wurde näher charakterisiert. Ein positiver Agglutinationsassay wies ein lectinähnliches Molekül innerhalb der Nadeln nach, wie es aus *S. domuncula* bekannt ist. Nach einer Deglycolysierung der Proteine reduzierte sich das scheinbare Molekulargewicht der 36 kDa Bande auf 30 kDa.

Durch molekularbiologische Untersuchungen wurde erstmals in Hexactinelliden die Existenz von Silicatein nachgewiesen. Nach Isolierung der Gesamt-RNA von *Crateromorpha meyeri*, RT-PCR und Amplifizierung mit silicateinspezifischen Primern wurde eine 549 kbp Nukleotidsequenz gefunden, die auf Aminosäureebene starke Homologien (76% identische Aminosäuren) zu bekannten Silicateinen der Demospongia aufweist. Die Aminosäuren der katalytische Triade des Silicateins, essenziell für die enzymatische Katalyse des Enzyms, sind an den selben Positionen wie bei bekannten Silicateinen vorhanden.

## 8.0 Literaturverzeichnis

- Adl, S. M.; Simpson, A. G.; Farmer, M. A.; Andersen, R. A.; Anderson, O. R.; Barta, J. R.; Bowser, S. S.; Brugerolle, G.; Fensome, R. A.; Fredericq, S.; James, T. Y.; Karpov, S.; Kugrens, P.; Krug, J.; Lane, C. E.; Lewis, L. A.; Lodge, J.; Lynn, D. H.; Mann, D. G.; McCoirt, R. M.; Mendoza, L.; Moestrup, O.; Mozley-Standridge, S. E.; Nerad, T. A.; Shearer, C. A.; Smirnov, A. V.; Spiegel, F. W.; Taylor, M. F. (2005)** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005 Sep-Oct;52(5):399-451
- Aizenberg, J.; Sundar, V. C.; Yablon, A. D.; Weaver, J. C.; Chen, G. (2004)** Biological glass fibers: correlation between optical and structural properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3358–3363
- Aizenberg, J.; Weaver, J. C.; Thanawala, M.S.; Sundar, V.C.; Morse, D.E.; Fratzl, P. (2005)** Skeleton of *Euplectella* sp: structural hierarchy from the nanoscale to the macroscale. *Science* 309, 275–278
- Altschul S. F.; Gish W.; Miller W.; Myers E. W.; Lipman D. J. (1990)** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410
- Alwine, J. C.; Kemp, D. J.; Stark, G. R. (1977)** Method for detection of specific RNA's in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridisation with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350-5354
- Bairoch, A. (1992)** Prosite: A dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucl. Acids Res.* 20: 2013-2018
- Bachmair, A.; Finley, D.; Varshavsky, A. (1986)** In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234: 179-186
- Bergquist, P. R. (1978)** Sponges. London, Hutchinson & Co
- Boury-Esnault, N.; Rützler, K. (1997)** Thesaurus of sponge morphology. *Smith Contrib. Zool.* 596: 1-55
- Bradford, M. M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Cetkovic, H.; Grebenjuk, V. A.; Müller, W. E. G.; Gamulin, V. (2004)** Src proteins/src genes: from sponges to mammals. *Gene.* 342: 251-61

- Cha, J. N.; Shimizu, K.; Zhou, Y.; Christiansen, S. C.; Chmelka, B. F.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. (1999)** Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 361-365
- Cha, J. N.; Stucky, G. D.; Morse, D. E.; Deming, T. J. (2000)** Biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolymers. *Nature* 403: 289-292
- Chasteen, N. D.; Harrison, P. M. (1999)** Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J. Struct. Biol.* 126: 182-94
- Chomczynski P.; Sacchim N. (1987)** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*162:156-159
- Clark, J. M. (1988)** Novel non-templated nucleotide addition reactions catalysed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerises. *Nucl. Acids Res.:* 9677-9686
- Cline, J.; Braman, J.; Hogrefe, H. (1996).** PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 24:3546-3551
- Danscher, G. (1891)** Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry* 71: 1-16
- Eckert, C.; Schröder, H. C.; Brandt, D.; Perovic-Ottstadt, S.; Müller, W. E. G. (2006)** A histochemical and electron microscopic analysis of the spiculogenesis in the demosponge *Suberites domuncula*. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 1031–1040
- Eckert, C.; Janussen, D. (2005)** Die Glasschwämme der Sagami-Bucht und ihre Erforschung. *Natur und Museum (Frankfurt)* 135:105–116
- Ehrlich, H.; Worch, H. (2007)** Collagen, a high matrix in glass sponge flexible spicules of the meter-long *Hyalonema sieboldi*. In: Bäumlein, E. (Ed.), *Handbook of Biomineralization: Vol. 1. The Biology of Biominerals Structure Formation.* Wiley-VCH, Weinheim, pp. 23–41
- Epstein, E. (1994)** The anomaly of silicon in plant biology *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 91, pp. 11-17
- Epstein, E. (1999)** SILICON *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999. 50:641–64
- Göthel, H. (1997)** *Farbatlas Mittelmeerfauna.* Ulmer Verlag Stuttgart
- Haeckel, E. (1896)** *Systematische Phylogenie der Wirbellosen Tiere; Teil 2.* Georg Reimer, Berlin

- Hanahan, D. (1983)** Studies of the transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580
- Hartmann, W. D. (1969)** New genera and species of coralline sponges (*Porifera*) from Jamaica. Postilla (Yale University) 137: 1-39
- Helling, R.; Goodman, H.; Boyer, H. (1974).** Analysis of R. EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose gelelectrophoresis. J. Virol. 14:1235-1244
- Hildebrand, M.; Dahlin, K.; Volcani, B. E. (1998)** Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: sequences, expression analysis, and identification of homologs in other diatoms. Mol. Gen. Genet. 260: 480-486.
- Hildebrand, M.; Wetherbee R. (2003)** Components and control of silicification in diatoms. Prog Mol Subcell Biol. 2003;33:11-57
- Holland, H. D. (1992)** Chemistry and evolution of the Proterozoic ocean. In: Schopf, J., W.; Klein, C. (eds) The proterozoic biosphere. Cambridge University Press, Cambridge: 169-172
- Holleman; Wiberg. (1995)** Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 101. Auflage, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York
- Hooper, John N.A.; van Soest (2002)** Systema Porifera A Guide to the Classification of Sponges, Rob W.M. (Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers
- Hott, M.; de Pollak, C.; Modrowski, D.; Marie, P. J. (1993)** Short-term effects of organic silicon on trabecular bone in mature ovariectomized rats. Calcif. Tissue Int. 53: 174-179
- Iler, R. K. (1979)** The chemistry of Silica. Plenum Press, New York
- Junqueira, L. C. U.; Bignolas, G.; Brentani, R. R. (1979)** Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem. J. 11, 447-455
- Kaluzhnaya, O. V.; Belikov, S. I.; Schröder, H. C.; Rothenberger, M.; Zapf, S.; Kaandorp, J. A.; Borejko, A.; Müller, I. M.; Müller, W. E. G. (2005)** Dynamics of skeletal formation in the Lake Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis*. I. Biological and biochemical studies. Naturwissenschaften 92:128-133
- Kaluzhnaya, O. V.; Belikov, S. I.; Schröder, H. C.; Rothenberger, M.; Zapf, S.; Kaandorp, J. A.; Borejko, A.; Müller, I. M.; Müller, W. E. G. (2005)** Dynamics of

skeletal formation in the Lake Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis*. II. Molecular biological studies.

Naturwissenschaften 92:134–138

**Kennish, M. J. (1994)** Practical Handbook of marine science. CRC Press, Boca Raton

**King, N.; Carroll, S. B. (2001)** A receptor tyrosine kinase from choanoflagellates: Molecular insights into early animal evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 26:15032-15037

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

**Krasko, A.; Lorenz, B.; Batel, R.; Schroder, H., C.; Müller, I. M.; Müller, W. E. G. (2000)** Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. *Eur. J. Biochem.* 267: 4878-4887

**Kröger, N., Deutzmann, R., Sumper, M. (1999)** Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science* 286, 1129–1132

**Kruse, M.; Müller, I. M.; Müller, W. E. G (1997)** Early evolution of metazoan serine/threonine and tyrosine kinases: identification of selected kinases in marine sponges

**Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. (1993)** MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis. Version 1.0. Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA

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

**Leadbeater (2001)** Evolution of animals – choanoflagellates and sponges *Water and atmosphere* (2)

**Lee, J. J.; Leedale, G. F.; Bradbury, P. (2000)** An illustrated guide to the protozoa. Volume 1+2, 2nd Edition, Society of Protozoologists, Lawrence: 1-1432

**Leonard, N. J.; McDonald, J. J.; Reichmann, M. E. (1970)** Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic acid components. *Proc Natl Acad Sci USA* 67:93

**LePennec, G.; Perović, S.; Ammar, M. S. A.; Grebenjuk, V. A.; Steffen, R.; 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

- Levi, C.; Barton, J. L.; Guillemet, C.; Le Bras, E.; Lehuede, P. (1989)** A remarkably strong natural glassy rod: the anchoring spicule of the Monorhaphis sponge. *J. Mater. Sci. Lett.* 8, 337–339.
- Leys, S. P.; Mackie, G.O.; Reiswig, H. M. (2007)** The biology of glass sponges. *Adv. Mar. Biol.* 52, 1–145
- Mann, D. G. (1999)** The species concept in diatoms. *Physiological reviews* 18. *Phycologia* 38: 437-495
- Mann, S. (2001)** Biomineralization. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry, Oxford Chemistry Masters, Oxford, Great Britain
- Marshall, R. D. (1972)** Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 41: 673-702
- Mayer, G.; Trejo, R.; Lara-Curzio, E.; Rodriguez, M.; Tran, K.; Song, H.; Ma, W. H. (2005)** Lessons for new classes of inorganic/organic composites from the spicules and skeleton of the sea sponge *Euplectella aspergillum*. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 844, Y4.2.1–Y4.2.8
- Mayer, G. (2005)** Rigid biological systems as models for synthetic composites. *Science* 310, 1144–1147
- McDonell, M.; Studier, M. (1977).** Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J. Mol. Biol.* 110:119-146
- Mera, M. U.; Beveridge, T. J. (1993)** Mechanism of Silicate Binding to the Bacterial Cell Wall in *Bacillus subtilis* *Journal of bacteriology*, Apr. 1993, p. 1936-1945 Vol. 175, No. 7
- Müller, W. E. G.; Boreiko, A; Wang, X; Belikov, S. I.; Wiens, M.; Grebenjuk, V. A.; Schloßmacher, U.; Schröder, H. C. (2007a)** Silicateins, the major biosilica forming enzymes present in demosponges: protein analysis and phylogenetic relationship. *Gene* 395:62–71
- Müller W. E. G; Krasko, A.; Le Pennec, G.; Steffen, R.; Ammar, M. S. A.; Wiens, M.; Müller, I. M.; Schröder, H.C. (2003)** Molecular mechanism of spicule formation in the demosponge *Suberites domuncula*: silicatein - collagen - myotrophin. *Progr Mol Subcell Biol* 33:195–222
- Müller, W. E. G.; Kruse, M.; Koziol, C.; Müller, J. M.; Leys, S. P. (1998)** Evolution of early Metazoa: phylogenetic status of the Hexactinellida within the phylum of *Porifera* (sponges). *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 21: 141-156

- Müller, W. E. G.; Schloßmacher, U.; Eckert, C.; Krasko, A.; Boreiko, A.; Ushijima, H.; Wolf, S.E.; Tremel, W.; Schröder, H.C. (2007)** Analysis of the axial filament in spicules of the demosponge *Geodia cydonium*: different silicatein composition in microscleres (asters) and megascleres (oxeas and triaenes). *Eur J Cell Biol* 86:473–487
- Müller, W. E. G.; Li, J.; Schröder, H. C.; Qiao, L.; Wang, X. (2007)** 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.; Rothenberger, M.; Boreiko, A.; Tremel, W.; Reiber, A.; Schröder, H. C. (2005)** Formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. *Cell Tissue Res* 321:285–297
- Müller, W. E. G.; Schlossmacher, U.; Eckert, C.; Krasko, A.; Boreiko, A.; Ushijima, H.; Wolf, S. E.; Tremel, W.; Müller, I. M.; Schröder, H. C. (2007) **Analysis of the axial filament in spicules of the demosponge *Geodia cydonium*: different silicatein composition in microscleres (asters) and megascleres (oxeas and triaenes)** *Eur J Cell Biol*. Aug;86(8):473-87
- Müller, W. E. G.; Ugarkovic, D.; Gamulin, V.; Weiler, B. E.; Schröder, H. C.; (1990)** Intracellular signal transduction pathways in sponges. *Electron Microsc. Rev.* 3: 97-114
- Müller, W. E. G.; Wiens, M., Batel, R., Steffen, R., Schröder, H. C.; Borojevic, Radovan, Custodio, M. R. (1999)** Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. *Marine Ecology Progress Series*; Vol. 178: 205-219
- Müller, W. E. G.; Krasko, A.; Le Pennec, G.; Schröder, H. C. (2003)** Biochemistry and Cell Biology of Silica Formation in Sponges. *Microsc. Res. Tech.* 62: 368-377
- Mullis, K. B.; Faloona, F.; Scharf, S. J.; Saiki, R., K.; Horn, G: T.; Ehrlich H. A. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Qant. Biol.* 51: 263-273
- Nelson, D. M.; Tréguer, P.; Brezinski, M. A.; Leyneart, A.; Quéguiner, B. (1995)** Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Glob. Biochem. Cycles* 9: 359-372

- Nielsen L. F., Moe D., Kirkeby S., Garbarsch C. (1998)** Sirius red and acid fuchsin staining mechanics. *Biotech Histochem.* Mar;73(2):71-7
- Perry, C. C.; Keeling-Tucker, T. (2000)** Biosilicification: the role of the organic matrix in structure control. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5: 537-550
- Perry, C. C.; Belton, D.; Shafran, K. (2003)** Studies of Biosilicas; Structural Aspects, Chemical Principles, Model Studies and the Future. *Silicon Biomineralization*, W.E.G. Müller (Ed.), Springer Verlag Berlin Heidelberg
- Perovic, S.; Schroder, H. C.; Sudek, S.; Grebenjuk, V. A; Batel, R.; Stifanic, M.; Müller, I. M.; Müller, W. E. G.(2003)** Expression of one sponge Iroquois homeobox gene in primmorphs from *Suberites domuncula* during canal formation. *Evol. Dev.*5: 240-250
- Pfeifer, K.; Haasemann, M.; Gamulin, V.; Bretting, H.; Fahrenholz, F.; Müller, W. E. G. (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*. *Glycobiology* 3: 179-184
- Piérard G. E. (1989)** Sirius red polarization method is useful to visualize the organization of connective tissues but not the molecular composition of their fibrous polymers. *Jan*;9(1):68-71
- Pisera, A. (2003)** Some aspects of silica deposition in lithistid demosponge desmas. *Microsc. Res. Tech.* 62: 312-326. *Acad. Sci. USA* 101: 18228-18233
- Rao, K.; Porter, D. W.; Meighan, T.; Castranova, V. (2004)** The Sources of Inflammatory Mediators in the Lung after Silica Exposure. *Environmental Health Perspectives*, Vol.112, Number 17
- Reiswig, H. M. (2006)** Classification and phylogeny of Hexactinellida (Porifera). *Can. J. Zool.* 84, 195–204
- Saiki, R. K.; Scharf, S. J.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G.T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. (1985)** Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989)** *Molecular cloning: a laboratory manual* 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour N.Y. USA
- Sanger, F.; Nicklen, S.; 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, A.; Gaino, E. (2001)** Biomimetic model of a sponge-spicular optical fibermechanical properties and structure. *J. Mater. Res.* 16, 1420–1428
- Schrammen, A. (1924)** *Die Kieselpongien der oberen Kreide von Nordwestdeutschland. Monogr Geol Paleontol 2:1–159*
- Schröder, H. C.; Boreiko, A.; Korzhev, M.; Tahir, M. N.; Tremel, W.; Eckert, C.; Ushijima, H; Müller, I. M.; Müller, W. E. G. (2006)** Co-expression and functional interaction of silicatein with galectin: matrix-guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. *J Biol Chem* 281:12001–12009
- Schröder, H. C.; Krasko, A.; Le Pennec, G.; Adell, T.; Wiens, M.; Hassanein, H.; Müller I. M.; Müller, W. E. G. (2003)** Silicase, an enzyme which degrades biogenous amorphous silica: contribution to the metabolism of silica deposition in the demosponge *Suberites domuncula*. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*33: 249-268
- Schröder, H. C.; Natalio, F.; Shukoor, I.; Tremel, W.; Schloßmacher, U.; Wang, X.; 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
- Schröder, H. C.; Perović-Ottstadt, S.; Rothenberger, M.; Wiens, M.; Schwertner, H.; Batel, R.; Korzhev, M.; Müller, I. M.; 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.; Perovic-Ottstadt, S.; Wiens, M.; Batel, R.; Müller, I. M.; Müller, W. E. G. (2004)** Differentiation capacity of epithelial cells in the sponge *Suberites domuncula*. *Cell Tissue Research* 316: 217-280
- Schulze, F. E. (1887)** Report on the Hexactinellida collected by H.M.S. Challenger during the years 1873–76. In: Thomson CW, Murray J (eds) Report of the scientific results of the voyage of H.M.S. Challenger during the years 1873–76, vol LIII. Eyre & Spottiswoode, London
- Schulze, F. E. (1904)** Hexactinellida. *Wissenschaftliche Ergebnisse der Deutschen Tiefsee-Expedition*, vol 4. Fischer, Jena
- Schulze, P. (1925)** Zum morphologischen Feinbau der Kieselchwammnadeln. *Z Morphol Ökol Tiere* 4:615–625
- Schütze, J.; Reis-Custodio, M.; Efremova, S.; Müller, I. M.; Müller W. E. G. (1999)** Evolutionary relationship of Metazoa within the eukaryotes based on molecular

data from Porifera. *Proc. Royal Soc. London. B* 266: 63-73

**Schütze, J.; Skorokhod, A.; Muller, I. M.; Muller, W. E. G. (2001)** Molecular evolution of metazoan extracellular matrix: cloning and expression of structural proteins from the demosponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium*. *J. Molec. Evol.* 53:402-415

**Shimizu, K.; Cha, J.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. (1998)** Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6234-6238

**Simpson, T. L. (1984)** The cell biology of sponges. Springer, Berlin Heidelberg New York

**Steenkamp, E. T.; Wright, J.; Baldauf, S. L. (2006)** The Protistan Origins of Animals and Fungi. *Mol Biol Evol*, 2006 Jan; 23 (1): 93-106

**Sommer, H.; Kröner, A.; Hauzenberger, C.; Muhongo, S.; Wingate, M. T. D. (2003)** Metamorphic petrology and zircon geochronology of high-grade rocks from the central Mozambique Belt of Tanzania: crustal recycling of Archean and Palaeoproterozoic material during the Pan-African orogeny. *J Metamorphic Geol* 21:915–934

**Tabachnick, K. R. (2002)** Family Monorhaphididae Ijima, 1927. In: Hooper, N.A.V., Soest, R.W.M. (Eds.), *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. Kluwer Academic Publishers, New York, pp. 1264–1266

**Thamatrakoln, K.; Hildebrand, M. (2008)** Silicon uptake in diatoms revisited: a model for saturable and nonsaturable uptake kinetics and the role of silicon transporters. *Plant Physiol.* 2008 Mar; 146(3): 1397-407

**Towbin, H.; Ozbey, O.; Zingel, O. (2001)** An immunoblotting method for high-resolution isoelectric focusing of protein isoforms on immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* Jun;22(10):1887-93

**Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76:4350-4354

**Treguer, P.; Nelson, D. M.; Van Bennekom, A. J.; DeMaster, D. J.; Leynaert, A.; Queguiner, B. (1995)** The silica balance in the world ocean: A reestimate *Science*; Apr 21, 1995; 268, 5209; Academic Research Library pg. 375

**Turon, X.; Galera, J.; Uriz, M. J. (1997)** Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *J Exp Zool* 278:22-36

**Uriz, M. J.; Turon, X.; Becerro, M., A. (2000)** Silica deposition in Demosponges:

spiculogenesis in *Crambe crambe*. Cell Tissue Res. 301: 299-309

**Uriz, M. J.; CARBALLO, J. L. (2001)** Phylogenetic relationships of sponges with placochelae or related spicules (*Poecilosclerida*, *Guitarridae*) with a systematic revision. Zool. J. Linn. Soc 132: 41-428

**Uriz, M. J.; Turon, X.; Becerro, M., A. (2003)** Silica deposition in Demosponges. Prog. Mol. Subcell. Biol. 33: 163-193

**Uriz, M. J., Turon, X.; Becerro, M. A.; Agell, G. (2003)** Silicious Spicules and Skeleton Frameworks in Sponges: Origin, Diversity, Ultrastructural Patterns, and Biological Functions. Microsc. Res. Tech. 62: 279-299

**Voet D.; Voet J. G. (1994)** Biochemie. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo. 97

**Vrieling, E. G.; Gieskes, W. W. C.; Beelen, T. P. M. (1999)** Silicon Deposition In Diatoms: Control By The pH Inside The Silicon Deposition Vesicle. J. Phycology 35: 548- 559

**Weaver, J. C.; Aizenberg, J.; Fantner, G. E.; Kisailus, D.; Woesz, A.; Allen, P.; Fields, K., Porter, M. J.; Zok, F. W.; Hansma, P. K.; Fratzl, P.; Morse, D. E. (2007)** Hierarchical assembly of the siliceous skeletal lattice of the hexactinellid sponge *Euplectella aspergillum*. J. Struct. Biol. 158, 93–106

**Weaver, J. C.; Morse, D. E. (2003)** Molecular biology of demosponge axial filaments and their roles in biosilicification. Microsc. Res. Tech. 62: 356-367

**Weber, K.; Osborn, M. (1969)** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 : 4406-4412

**Wehrend A., Hetzel U., Huchzermeyer S., Klein C., Bostedt H. (2004)** Sirius red is able to selectively stain eosinophil granulocytes in bovine, ovine and equine cervical tissue. Anat Histol Embryol. Jun;33(3):180-2

**Weissenfels, N.; Landschoff, H. W. (1977)** Bau und Funktion des Süßwasserschwamms *Ephydatia fluviatilis* L. (Porifera). IV. Die Entwicklung der monaxialen SiO<sub>2</sub>-Nadeln in Sandwich-Kulturen. Zool. Jahrbuch Abt. Anat. 98: 355-371

**Westermeier, R.; Gronau, S.; Schickle, H. (1989)** Semidry-Blotting von Proteinen aus SDS-und IEF-Polyacrylamidgelen. Pharmacia, Freiburg, Sonderdruck SD 072

**Woesz, A.; Weaver, J. C.; Kazanci, M.; Dauphin, Y.; Aizenberg, J.; Morse, D. E.; Fratzl, P. (2006)** Micromechanical properties of biological silica in skeletons of deep sea sponges. J. Mater. Res. 21, 2068–2078

**Zettler, L. A.; Sogin, M.; Caron, D. A. (1997)** Phylogenetic relationships between the Acantharea and the Polycystinea: A molecular perspective on Haeckel's Radiolaria Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 94, pp. 11411–11416

## 9.0 Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungen, Akronyme und Summenformeln:

---

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cm	Zentimeter
<i>C. meyeri</i>	<i>Crateromorpha meyeri</i>
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
DNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Erdbeschleunigung (9,82 m/s <sup>2</sup> ) oder Gramm
<i>G. cydonium</i>	<i>Geodia cydonium</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HF	Flusssäure
H <sub>2</sub> O dest.	Destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
IR	Infrarot
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton

---

---

l	Liter
LB	Luria Bertani
log	logarithmisch
m	Meter
mA	Miliampere
M	Molar
<i>M. chuni</i>	<i>Monorhaphis chuni</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	Milimolar
MOPS	N-Morpholinopransulfonsäure
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MW	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NBCSA-Transporter	Natriumbikarbonat-Silicic-Acid-Transporter
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
NH <sub>4</sub> F	Ammoniumfluorid
Nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered Saline
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>

---

---

<i>S. domuncula</i>	<i>Suberites domuncula</i>
Sec	Sekunde
SSC	<i>Saline sodiumcitrate</i>
<i>T. aurantium</i>	<i>Tethya aurantium</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T <sub>m</sub>	Primer Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Poly(oxyethylen) <sub>20</sub> Sorbitanmonolaurat
U	Unit
ü. N.	Über Nacht
V	Volt
(v/v)	<i>Volume per volume</i>
(w/v)	Weight per volume

---

**Abkürzungscodes für Nukleotide:**

---

<b>Einbuchstabencode</b>	<b>Nukleotid</b>
A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin

---

**Abkürzungscodes für Aminosäuren:**

---

<b>Aminosäure</b>	<b>Einbuchstabencode</b>
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glytamat	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

---

## 10.0 Anhang

### 10.1 Danksagung

### 10.2 Publikationen

**Müller, W. E. G.; Wang, X.; Kropf, K.; Boreiko, A.; Schlossmacher, U.; Brandt, D. Schröder, H. C.; Wiens, M. (2008)** Silicatein expression in the hexactinellid *Crateromorpha meyeri*: the lead marker gene restricted to siliceous sponges. *Cell Tissue Res.* 2008 Aug;333(2):339-51

**Müller, W. E. G.; Boreiko, A.; Schlossmacher, U.; Wang, X.; Eckert, C.; Kropf, K.; Li, J.; Schröder, H. C. (2008)** Identification of a silicatein(-related) protease in the giant spicules of the deep-sea hexactinellid *Monorhaphis chuni*. *J Exp Biol.* 2008 Feb;211(Pt 3):300-9

**Müller, W. E. G.; Wang, X.; Kropf, K.; Ushijima, H.; Geurtsen, W., Eckert, C.; Tahir, M. N.; Tremel, W.; Boreiko, A.; Schlossmacher, U.; Li, J.; Schröder, H. C. (2008)** Bioorganic/inorganic hybrid composition of sponge spicules: matrix of the giant spicules and of the comitalia of the deep sea hexactinellid *Monorhaphis*. *J Struct Biol.* 2008 Feb;161(2):188-203. Epub 2007 Oct 26.

**Müller, W. E. G.; Eckert, C.; Kropf, K.; Wang, X.; Schlossmacher, U.; Seckert, C.; Wolf, S. E.; Tremel, W.; Schröder, H. C. (2007)** Formation of giant spicules in the deep-sea hexactinellid *Monorhaphis chuni* (Schulze 1904): electron-microscopic and biochemical studies. *Cell Tissue Res.* 2007 Aug;329(2):363-78