

**Bioverkapselung lebender Bakterien
(*Escherichia coli*) mit poly(Silicat)
nach Transformation mit dem
Silicatein- α -Gen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sylvia Engel
geb. 12.08.1976 in Dahn

Mainz, 2012

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 2012

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

Müller W.E.G., Engel S., Wang X., Wolf S.E., Tremel W., Thakur N.L., Krasko A., Divekar M., Schröder H.C. (2008): Bioencapsulation of living bacteria (*Escherichia coli*) with poly(silicate) after transformation with silicatein- α gene. *Biomaterials* 29 (7), 771-779.

Für Nino

1	EINLEITUNG	1
1.1	Silizium- und Silicatchemie.....	1
1.2	Kieselsäuren und Silicate	1
1.3	Biosilica.....	3
1.4	Schwamm-Spiculae als Beispiel für Biosilica-Strukturen	4
1.5	Silicatein	5
1.6	Bioverkapselung	8
1.7	Biologie der Schwämme (Porifera).....	10
1.7.1	Porifera als Basis des Phylums Metazoa.....	18
1.7.2	<i>Suberites domuncula</i>	19
2	ZIELSETZUNG	20
3	MATERIAL	21
3.1	Chemikalien	21
3.2	Verbrauchsmaterialien und Laborzubehör.....	23
3.3	Geräte.....	24
3.4	Kits.....	26
3.5	Enzyme.....	26
3.6	Verwendete Bakterienstämme und Bakteriophagen.....	26
3.7	Schwämme	26
3.8	Genomische DNA-Bank (<i>Suberites domuncula</i>).....	27
3.9	Vektoren	27
3.10	Primer.....	27
3.10.1	Vektorspezifische Primer.....	27
3.10.2	Genspezifische Primer für Silicatein- α aus <i>Suberites domuncula</i>	27
3.11	Antikörper	27
3.12	Bakterienkulturmedien	28
4	METHODEN	29
4.1	Hälterung der Schwämme.....	29
4.2	Bakterienkultur	29
4.2.1	Kultivierung von Bakterien.....	29
4.2.2	Kryokonservierung von Bakterien	30
4.2.3	Bestimmung der Zellzahl.....	30
4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. <i>polymerase chain reaction</i>)	30
4.3.1	Standard-PCR.....	30
4.3.2	Primerdesign: Synthese sequenzspezifischer Primer	33
4.3.3	Isolation des Gens für Silicatein- α aus einer cDNA-Bibliothek mittels PCR	34
4.3.4	PCR mit Vektorprimern (<i>checking-PCR</i>).....	35
4.3.5	Subklonierung mittels PCR	36
4.4	Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	37
4.4.1	Aufreinigung von PCR-Produkten	37
4.4.2	Extraktion aus Agarosegelen.....	37
4.4.3	Aufreinigung von Plasmid-DNA	37
4.4.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren	38

4.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese.....	38
4.5.1	Agarosegelelektrophorese von DNA	38
4.5.2	Detektion aufgetrennter DNA mittels Ethidiumbromid bzw. SYBR TM green und halbquantitative Konzentrationsbestimmung	39
4.6	Herstellung des Expressionskonstruktes (<i>E. coli pQE-30-plus-silicatein</i> / <i>E. coli pQE-30-minus-silicatein</i>) durch Klonierung der Ziel-DNA-Sequenz in einen Expressionsvektor	40
4.6.1	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen (Restriktionsverdau).....	41
4.6.2	Ligation von DNA	42
4.7	Transformation.....	44
4.7.1	Transformationsansatz.....	44
4.8	Expression von Silicatein in <i>E. coli</i>	45
4.8.1	Konstruktion des Expressionsklons.....	45
4.8.2	Heterologe Expression von Silicatein- α in <i>E. coli</i>	46
4.9	Immuncytochemische Färbung von Zellen	47
4.10	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	49
4.11	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
4.11.1	Herstellung von Proteinextrakt aus <i>E. coli</i> -Zellen	50
4.11.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	50
4.11.3	Durchführung der SDS-PAGE	50
4.11.4	Färben der SDS-Gele mit Coomassie-Blau	52
4.12	<i>Western Blotting</i>	52
4.13	Nachweis der Biosilicatbildung durch <i>E. coli</i>	53
4.13.1	Färbung von Bakterienzellen mit Rhodamin 123.....	53
4.13.2	Nachweis freier Kieselsäure mittels Aquaquant [®] Silicat (Kieselsäure)-Test.....	55
4.14	Wachstumsstudien.....	56
4.15	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von <i>E. coli</i>	56
4.16	Untersuchung der Einwirkung verschiedener Stressoren auf <i>E. coli</i> -Zellen nach Expression und Inkubation mit Natriumsilicat mittels <i>Fast Micromethod</i> (DNA- Strangbruch Assay)	57
4.16.1	Testprinzip der <i>Fast Micromethod</i>	58
4.16.2	Vorbereitung der Bakterienzellen	59
4.16.3	Einwirkung verschiedener Stressoren auf die Bakterienzellen nach Expression von Silicatein und Inkubation mit Natriumsilicat	59
4.16.3.1	UVB-Bestrahlung der Bakterienzellen	60
4.16.3.2	Mechanische Beanspruchung der Silicathülle durch Schütteln/Mixen	62
4.16.3.3	Bakterielles Wachstum während mechanischer Beanspruchung anhand DNA-Messung.....	62
4.16.3.4	Behandlung der Zellen mit Ultraschall.....	63
4.16.4	<i>Fast Micromethod</i>	63
4.16.5	Auswertung der <i>Fast Micromethod</i>	63
5	ERGEBNISSE	65
5.1	Expression von Silicatein in <i>E. coli</i> in Abhängigkeit von Natriumsilicat	65
5.1.1	<i>Western Blot</i>	65
5.1.2	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	67
5.2	Biosilicabildung durch <i>E. coli</i> nach Transformation mit dem Silicatein- α -Gen.....	69

5.2.1	Färbung mit Rhodamin 123.....	69
5.2.2	Nachweis freier Kieselsäure mittels Aquaquant® Silicat (Kieselsäure)-Test.....	70
5.3	Wachstumsstudien.....	72
5.4	REM-Analyse.....	73
5.5	Einwirkung verschiedener Stressoren auf die Bakterienzellen nach Expression von Silicatein und Inkubation mit Natriumsilicat.....	75
5.5.1	UVB-Bestrahlung der Bakterienzellen.....	75
5.5.2	Mechanische Beanspruchung der Silicathülle durch Schütteln/Mixen.....	76
5.5.3	Untersuchung des bakteriellen Wachstums während mechanischer Beanspruchung anhand DNA-Fluoreszenz-Messung.....	77
5.5.4	Behandlung der Zellen mit Ultraschall.....	78
6	DISKUSSION.....	80
6.1	Expression von Silicatein durch <i>E. coli</i> in Abhängigkeit von Natriumsilicat.....	80
6.2	Biosilicabildung durch <i>E. coli</i> nach Transformation mit dem Silicatein- α -Gen.....	81
6.3	Wachstumsstudien.....	83
6.4	REM-Analyse.....	84
6.5	Mechanismus der Silicateinreaktion.....	84
6.6	Einwirkung verschiedener Stressoren auf die Bakterienzellen nach Expression von Silicatein und Inkubation mit Natriumsilicat.....	90
6.7	Ausblick.....	93
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	95
7.1	Abkürzungen.....	95
7.2	Abkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide.....	100
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	101
9	TABELLENVERZEICHNIS.....	102
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	103

X ZUSAMMENFASSUNG

Die Bioverkapselung ist eine faszinierende Methode, um biologische Materialien einschließlich Zellen in Siliziumdioxid, Metalloxiden oder hybriden Sol-Gel-Polymeren zu immobilisieren. Bisher wurde nur die Sol-Gel-Vorläufertechnologie genutzt, um Bakterien- oder Hefezellen in Siliziumdioxid zu immobilisieren. Hierfür wurden verschiedene Reagenzien als wässrige Vorläufer getestet, um poly(Silicate) auf Biomolekülen (Bhatia et al., 2000) oder Zellen (Liu und Chen 1999; Coradin und Livage, 2007) zu bilden. Einer der erfolgreichsten bisherigen Methoden verwendet eine Mischung aus Silicaten und kolloidalem Silica. Diese initialen Vorläufer werden durch die Zugabe von Salzsäure neutralisiert, was die Gelbildung fortschreiten lässt und die Verkapselung von Bakterien in einem Silica-Netzwerk zur Folge hat (Nassif et al., 2003). Mit der Entdeckung von Silicatein, einem Enzym, das aus Demospongien isoliert wurde und die Bildung von poly(Silicat) katalysiert, wurde es möglich, poly(Silicat) unter physiologischen Bedingungen zu synthetisieren. Silicatein wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt und ist in der Lage, bei Raumtemperatur, neutralem pH-Wert und in wässrigen Puffersystemen aus Siliziumalkoxiden poly(Silicat) zu bilden (Krasko et al., 2000; Müller et al., 2007b; Zhou et al., 1999). *In vivo* katalysiert Silicatein die Synthese der Silicathülle der Schwamm-Spiculae (Skelettelemente; Müller et al., 2005b; Müller et al., 2007a; Müller et al., 2007b; Schröder et al., 2007a). Dieses Biosilica wurde in Form von Silica-Nanosphären mit Durchmessern zwischen 100 nm und 250 nm organisiert vorgefunden (Pisera 2003; Tahir et al., 2005). Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Escherichia coli* erfolgreich mit dem Silicatein-Gen transformiert werden kann. Das Level der Proteinexpression kann in Anwesenheit von Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) effizient erhöht werden, indem man die Bakterienzellen gleichzeitig mit Kieselsäure inkubiert. Dieser Effekt konnte sowohl auf Ebene der Synthese des rekombinanten Proteins durch Western Blot als auch durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Das heterolog produzierte Silicatein besitzt enzymatische Aktivität und kann die Polymerisation von Kieselsäure katalysieren. Dies konnte sowohl durch Färbung mit Rhodamin123, als auch durch Reaktion der nicht polymerisierten, freien Kieselsäure mit dem β -Silicomolybdat-Farbsystem (Silicomolybdänblau) nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass nur die silicateinexprimierenden Bakterien während

des Wachstums in Anwesenheit von Kieselsäure eine viskose Hülle um Zelle herum bilden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Silicatein- α aus *Suberites domuncula* nach Transformation in *E. coli* an die Zelloberfläche dieser Zellen transportiert wurde und dort seine enzymatische Funktion beibehält. Die Silicathülle wurde mittels Raster-Elektronenmikroskopie (REM) analysiert. Die Bakterien, die Silicatein exprimierten und poly(Silicat) an ihrer Oberfläche synthetisierten, zeigten die gleichen Wachstumsraten wie die Bakterien, die das Gen nicht enthielten. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die silicateinvermittelte Verkapselung von Bakterien mit poly(Silicat) die Bandbreite der Anwendung von Bakterien für die Produktion von rekombinanten Proteinen verbessern, erweitern und optimieren könnte.

XII SUMMARY

Bioencapsulation is a fascinating way to immobilize biological materials, including cells in silica, metal-oxides or hybrid sol-gel polymers. Until now only the sol-gel precursor technology was utilized to immobilize bacteria or yeast cells in silica. For this purpose different reagents were tested as aqueous precursors to create poly(silicate) on biomolecules (Bhatia et al., 2000) or cells (Liu and Chen, 1999; Coradin and Livage, 2007). One of the most successful methods so far is using a mixture of silicates and colloidal silica. These initial precursors are neutralized by the addition of hydrochloric acid to continue the progress of gelation, which results in the encapsulation of bacteria in a silica-network (Nassif et al., 2003). With the discovery of silicatein, an enzyme isolated from demosponges which catalyzes the formation of poly(silicate), it became possible to synthesize poly(silicate) under physiological (ambient) conditions. Silicatein was produced recombinant in *E. coli* and it is able to create poly(silica) from silicon alkoxides at room temperature, neutral pH and in aqueous buffer systems (Krasko et al., 2000; Müller et al., 2007b; Zhou et al., 1999). *In vivo* silicatein catalyzes the synthesis of the silica shell in sponge spiculae (skeletal elements; Müller et al., 2005b; Müller et al., 2007a; Müller et al., 2007b; Schröder et al., 2007a). This biosilica was found to be organized in nanospheres of diameters between 100 nm and 250 nm (Pisera 2003; Tahir et al., 2005). With this work we show that *Escherichia coli* can be successfully transformed with the silicatein gene. The level of its protein expression in the presence of isopropyl β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) can be efficiently increased by co-incubation of the bacteria with silicic acid. This effect could be demonstrated on the level of recombinant protein synthesis by Western Blot as well as by immunostaining analysis. The heterologously produced silicatein is enzymatically active and can catalyze the polymerization of silicic acid, as confirmed by staining with Rhodamine 123 and by reaction of non polymerized, free silicic acid with the β -silicomolybdate color-system (silicomolybdenum-blue). Electron microscopic analysis revealed, that only the bacteria that express silicatein form a viscous layer around them when growing in the presence of silicic acid. It was also demonstrated, that silicatein- α from *S. domuncula* after transformation in *E. coli* is transported to the cell surface and maintained its enzymatic activity. The silica shell was analyzed by scanning electron microscopy (SEM). The silicatein expressing bacteria which synthesized poly(silicate)

on their surface showed the same growth kinetics as the bacteria lacking this gene. It is concluded, that silicatein mediated encapsulation of bacteria with silica might improve, extend and optimize the range of application of bacteria for the production of recombinant proteins.

1 EINLEITUNG

1.1 Silizium- und Silicatchemie

Silizium stellt nach Sauerstoff das zweithäufigste Element der Erdkruste dar (28%) und kommt in unzähligen verschiedenen Komponenten vor. Siliziumkomponenten sind wirtschaftlich von großer Bedeutung (Müller et al., 2007c). Technische Anwendung finden sie z.B. als Glas, Porzellan, Emaille, Tonprodukte, Zement und Wasserglas. Als Silizium (Si) werden auch Siliziumverbindungen, deren spezifische Zusammensetzung unbekannt ist bezeichnet (Perry 2003). Silizium besitzt eine sehr hohe Affinität zu Sauerstoff und existiert nicht in elementarer Form, sondern nur in gebundener Form als Salze von Kieselsäuren der Formel $m\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$.

Siliziumdioxid (Summenformel SiO_2) ist eine Sammelbezeichnung für Modifikationen der Oxide des Siliziums. Es handelt sich um Feststoffe mit einem hohen Schmelzpunkt, die in der Natur sowohl in kristallinen als auch in amorphen Formen vorkommen. In all diesen Erscheinungsformen ist jedes Siliziumatom tetraedrisch von vier Sauerstoffatomen umgeben. Kristallin ist Siliziumdioxid (SiO_2) in verschiedenen Modifikationen vorhanden (z.B. Quarz), amorph kommt es z.B. in den Mineralien Achat und Opal vor. Quarzglas entsteht durch Schmelzen von Quarz. Auch die Skelettelemente der einzelligen Diatomeen und vielzelligen Schwämme bestehen aus amorphem (nichtkristallinem) Siliziumdioxid. Die technische Anwendung von Siliziumdioxid ist vielseitig und erstreckt sich über den Zusatz in Farben, Lacken und Kunststoffen, in pharmazeutischen und kosmetische Produkten, in Lebensmittelprozessen und Zahnpasta, als Füllstoff für Kunststoffe und Gummi, als Quarzglas in der Optik (Linsen, Prismen), über die Betonherstellung bis hin zur Lebensmittelindustrie. Siliziumdioxid spielt auch in der Halbleitertechnik eine wichtige Rolle.

1.2 Kieselsäuren und Silicate

Die Sauerstoffsäuren des Siliziums bezeichnet man als Kieselsäuren. In der Natur kommt die monomere Orthokieselsäure in Gewässern sowie in tierischen Körperflüssigkeiten und Pflanzensäften vor. Sie stellt die einfachste, wasserlösliche Form des Anhydrids der Kieselsäure dar. Silizium besitzt auch in Kieselsäure und Silicaten die Oxidationszahl 4. Das tetraedrisch gebildete $[\text{SiO}_2]^{4-}$ -Ion neigt zur Polymerisierung zu SiO_4 -Untereinheiten, indem sich zwei Siliziumatome über ein

Sauerstoffatom miteinander verbinden. Durch Abspaltung von Wasser (Kondensation) von der Orthokieselsäure wird Orthokieselsäure (Pyrokieselsäure, $\text{H}_6\text{Si}_2\text{O}_7$) gebildet. Weitere Kondensation führt über die amorphe, unstrukturierte Polykieselsäure zu Metakieselsäure $[(\text{H}_2\text{SiO}_3)]_n$.

Die Salze der Orthokieselsäure (Orthosilicate) mit der Struktur Me_2SiO_4 (Alkalisilicate) enthalten einzelne $[\text{SiO}_4]^{4-}$ -Anionen. Die wasserlöslichen Alkalisilicate, die durch Schmelzen von Quarz mit Natriumcarbonat (Na_2CO_3), Lauge oder Kaliumcarbonat (K_2CO_3) gebildet werden, enthalten neben $[\text{SiO}_4]^{4-}$ -Anionen auch $[\text{Si}_2\text{O}_7]^{6-}$ und $[\text{Si}_3\text{O}_{10}]^{8-}$ sowie noch größere Anionen. Diese werden auch Wasserglaslösungen genannt (in Wasser gelöstes Alkalisilicat). Bei niedriger Temperatur gibt es die Möglichkeit der Bildung von Silicat mittels Sol-Gel-Prozess (Brinker und Scherrer 1990, Hench und West 1990), auch Hydrolyse-Kondensations-Reaktion genannt. Es handelt sich um die Hydrolyse und Polymerisation anorganischer Monomere, üblicherweise Metall-Alkoxide wie Tetraethylorthosilicat (TEOS) oder Tetramethylorthosilicat (TMOS) (Liu und Chen, 1999). Säuert man eine solche Wasserglaslösung an, kondensieren die Säuremoleküle miteinander, die aus den $[\text{SiO}_4]^{4-}$ - und $[\text{Si}_2\text{O}_7]^{6-}$ -Gruppen (oder größer) durch Protonenaufnahme gebildet wurden und bilden Polykieselsäuren (Sol-Gel-Prozess). Dies führt dazu, dass die Lösung gelartig wird. Die Hydrolyse des Alkoxids in Anwesenheit von Wasser führt zu Bildung von Silanolbindungen ($-\text{Si}-\text{OH}$), die sich weiter zu $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ Bindungen polymerisieren und ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Die zuerst entstandenen Polymere bestehen aus Ketten oder Netzwerken, beim Fortschreiten der Kondensation werden dreidimensionale Strukturen gebildet, die auf der Hauptkomponente SiO_2 basieren.

Bei einer Konzentration von 1-2 mM und bei neutralem pH-Wert geht Orthokieselsäure $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ mehrere Polykondensationsreaktionen ein, die schließlich zur Bildung von Siloxanen führen (Mann, 2001). Hierbei gibt es zwei mögliche Reaktionswege: entweder reagieren zwei nicht ionisierte Kieselsäuremoleküle miteinander, wobei Wasser freigegeben wird und der pH-Wert des Systems unverändert bleibt, oder es reagieren ein ionisiertes und ein nicht ionisiertes Molekül miteinander, was die Freisetzung eines Hydroxylions (OH^-) zur Folge hat, das den pH-Wert in einem nicht-gepufferten System erhöht (Schröder et al., 2008). Die Kondensationsreaktion basiert auf einer nukleophilen Substitutionsreaktion (Typ $\text{S}_{\text{N}}2$), was zu einer intermediären Bildung einer pentakoordinierten Siliziumspezies

führt (Perry, 2003). Der Kondensationsprozess beginnt mit der Bildung von Dimeren, welche bevorzugt mit Monomeren zu Trimeren sowie höheren Oligomeren reagieren. Letztere neigen zur Ringbildung aus drei bis sechs Si-Atomen. Die Bildung von Oligomeren lässt die Si-Atome elektrophiler werden (Anstieg der Dichte von ionisierten Silanolgruppen), wodurch sich weitere Kieselsäuremonomere anlagern können. Der Ostwald-Reifeprozess führt dann zum Wachstum größerer, weniger löslicher Partikel, indem Kieselsäure von kleineren, besser löslichen Partikeln abgegeben wird. (Perry 2003, Perry et al., 2000). Der Zusammenschluss (Aggregation) von Silica-Partikeln in Lösung verläuft als fraktaler Wachstumsprozess (Knoblich et al., 2001). Die Partikelgröße, Porenstruktur sowie die Kinetik des Prozesses der Silicabildung kann durch Zusatzstoffe beeinflusst werden (Iler, 1979). Der Kondensationsprozess wird bei der Anwesenheit von Metallionen (Allen et al., 1970) oder kationischen Polyelektrolyten (Iler 1971) gefördert, indem diese die negative Ladung der Silicapartikel bei pH 7 herabsetzen. Polyamine wie z.B. Polylysin fördern den Aggregationsprozess, indem sie Kieselsäuremonomere und Kieselsäureoligomere auf ihre Aminogruppen adsorbieren (Mizutani et al., 1998; T. Coradin et al., 2001). Das gebildete polymere Silica besteht aus einem kovalent verbundenen Netzwerk von tetraedrisch koordinierten und zufällig angeordneten Siloxanzentren (Mann, 2001). Die Anzahl der freien Silanolgruppen sowie das Ausmaß an Hydratation sind variabel.

1.3 Biosilica

Der Begriff der Biomineralisation umschreibt die Bildung von anorganischen, mineralischen Produkten durch verschiedenste Organismen auf der Erde. Zu den wichtigsten Biomineralien zählen Calciumcarbonat, Calciumphosphat, Calciumoxalat, Eisenoxid und Silicat. Die Biosilifizierung, die biologische Bildung von glasähnlichem, amorphem und hydratisiertem Silica findet unter Temperaturen und Drücken der jeweiligen Umgebung der Organismen und durch biosynthetische Mechanismen statt, die zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Silizium ist essentiell für viele biologische Funktionen in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen. Viele Lebewesen der Erde, darunter Diatomeen, Schwämme, Mollusken und höhere Pflanzen, produzieren im Laufe ihres Lebens gewaltige Mengen an polymerisiertem Silicat in Form von biogenem Siliziumdioxid (SiO_2). Der jährliche Umsatz von Silizium zum Aufbau von Silicatskeletten alleine durch marine

silicabildende Organismen beträgt ca. 6,7 Gigatonnen (Nelson et al., 1995). Biogenes Silica, auch Biosilica genannt, kann in unzähligen Strukturen vorkommen, welche meist speziesspezifisch sind und zur Klassifizierung herangezogen werden können. Die Biosilifikation ist interessant für die Biotechnologie, weil man sich mit der Natur als Modell neue Entwicklungen von Fabrikationsprozessen erhofft (Schröder et al., 2009). Eine Aufklärung dieser molekularen Mechanismen könnte zur Entwicklung neuer Modelle und Synthesewege für hochleistungsfähige Materialien auf der Grundlage von Silikon unter niedrigem Druck sowie Temperatur beitragen. Siliziumbasierte Polymere stellen wichtige Stoffe in der Nanobiotechnologie dar. Die herkömmliche technologische Herstellung dieser Komponenten erfordert strenge Bedingungen wie hohe Temperaturen und extreme pH-Werte (Tolbert et al. 1997). Bestimmte ein- und mehrzellige Organismen wie z.B. Diatomeen, Schwämme und höhere Pflanzen synthetisieren ihr Silicatskelett unter ambienten niedrigen Temperaturen und Druck sowie neutralen pH-Bedingungen (Müller et al., 2007a). Die Bildung dieser Silicatgerüste verläuft mit großer Präzision und in großer Anzahl, was sie sehr interessant für die Herstellung neuer Biosilicate (oder auch Hybrid-Nanobiomaterialien) mit einzigartigen elektrischen, optischen und katalytischen Eigenschaften macht.

1.4 Schwamm-Spiculae als Beispiel für Biosilica-Strukturen

Schwämme entwickelten sich vor der kambrischen Explosion, vor mehr als 580 Millionen Jahren. Sie sind die ältesten rezenten Vertreter der Metazoa, die Silica als Biomaterial zur Herstellung ihres anorganischen Skeletts verwenden (Müller 1997 und 1998). Zu erwähnen ist, dass nur zwei Klassen von Schwämmen (Demospongiae und Hexactinellida) ein Skelett aus hydratisiertem, amorphem Silicat besitzen, während die später entwickelte Klasse der Calcarea Spiculae aus Calciumcarbonat aufweisen (Simpson 1984). Das von Schwämmen und anderen Organismen produzierte Biosilica besteht aus glasartigem, amorphem Silica. Kristallines Silica (Quarz) wurde bisher nicht gefunden. Beim Meeresschwamm *Tethya aurantium* (Demospongiae) z.B. beträgt der Anteil der Silicatnadeln 75% des Trockengewichts (Shimizu et al., 1998). Schwammbiosilica besitzt einen hohen Wasseranteil von 6-13% (Arndt 1930; Schwab et al., 2003). Neben Sauerstoff und Silizium enthalten Spiculae zusätzlich weitere Elemente, vor allem Aluminium, Calcium, Chlorid, Kupfer, Eisen, Kalium, Natrium, Schwefel und Zink (Sandford 2003;

Uriz et al., 2003 a; Uriz et al., 2003 b). Hierdurch können Eigenschaften wie z.B. der Brechungsindex, beeinflusst werden (Aizenberg et al., 2004). Der Silicagehalt von Schwämmen kann bis zu 75% und mehr von der Trockenmasse betragen (Shimizu et al., 1998). Schwamm-Spiculae können in Megaskleren/Makroskleren (z.B. Oxeas) und kleinere Mikroskleren (z.B. Spheraster) unterteilt werden (Uriz 2006; Schröder et al., 2008). Bei *Suberites domuncula* können die Spiculae bis zu 450 µm lang sein und Durchmesser von 5-7 µm aufweisen. Im Zentrum der Silicatnadeln befindet sich ein Axialkanal (0,3-1,6 µm breit), der ein organisches, proteinöses Axialfilament enthält (Schröder et al., 2008). Das Silica wird in konzentrischen Schichten um das Axialfilament angeordnet, welche 0,3–1 µm dick sein können (Uriz et al., 2000 und 2003a). Besonders markant sind diese bei den Hexactinellida ausgebildet. Biosilica in Spiculae besitzt eine Nanopartikel-Struktur mit einem Durchmesser von 70 nm (Weaver et al., 2003 I und II) bis zu 100-200 µm (Schröder et al., 2007b). Die Bildung der Schwamm-Spiculae ist ein relativ zügiger Prozess, er dauert z.B. beim Süßwasserschwamm *Ephydatia fluviatilis* nur 40 Stunden (Weissenfels et al., 1977; Weissenfels 1977 und 1989).

Das 3D-Primmorphen-Kultursystem von Schwämmen (Custodio et al., 1998) hat sich als sehr gut geeignetes Modell zum Studium der Spiculaebildung erwiesen (Müller et al., 2005a). Primmorphe sind Zellaggregate, die aus einzelnen Schwammzellen in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen von marinen und Süßwasserschwämmen gebildet werden. Sie enthalten totipotente Archaeozyten, die bei Anwesenheit von exogenem Silicat zu spiculaebildenden Zellen, den Sklerozyten, umgewandelt werden (Müller et al., 2004b). Eine Vielzahl von Genen, die in die Biosilicabildung und Spiculogenese involviert sind, werden in Primmorphen bei Anwesenheit von Silizium hochreguliert, wie z.B. die Gene für Silicatein (Krasko et al., 2000), Silicase (Schröder et al., 2003), Galectin (Müller et al., 2007d), Kollagen (Krasko et al., 2000; Schröder et al., 2000) und Noggin (ein morphogenetisches Protein). Die optimale Konzentration von Silizium für die Bildung von Spiculae in Primmorphen von *Suberites domuncula* beträgt 60 µM (Krasko et al., 2000).

1.5 Silicatein

Den Durchbruch im Verständnis der molekularen Mechanismen der Spiculaebildung in Schwämmen brachte die Entdeckung des Enzyms, das bei diesem Prozess die wichtigste Rolle spielt. In Glasschwämmen (Hexactinellida) findet man Silica

hauptsächlich in nadelähnlichen Spiculae, welche sowohl Stützfunktion als auch Schutzfunktion vor Fraßfeinden ausüben. Das Axialfilament der Spiculae besteht hauptsächlich aus einem mit den Cathepsinen verwandten Enzym, das Silicatein genannt wird (Shimizu et al., 1998; Cha, et al., 1999, Müller et al., 2007a). Verschiedene Studien (Weaver et al., 2003, sowie Krasko et al., 2000, Schröder et al., 2006, Müller et al., 2007d, Kröger et al., 2004 und Kaluzhnaya et al., 2005b) unter Verwendung von biokatalytisch aktivem rekombinantem Silicatein konnten zeigen, dass die Bildung von Silica in Schwämmen ein enzymatischer Prozess ist. Hier besteht ein Unterschied zu den Diatomeen, deren Biosilicabildung kein enzymatischer Prozess ist, sondern durch Polyamine (Kröger et al., 2000) und/oder polykationische Peptide (Silaffine) vermittelt wird (Kröger et al., 1999; Kröger et al., 2000; Schröder et al., 2008). Sowohl natives, aus Axialfilamenten isoliertes Silicatein, als auch das rekombinante Protein sind in der Lage, in Lösung Silica aus löslichen Silizium-Alkoxid-Vorläufern zu bilden (Shimizu et al., 1998; Cha et al., 1999; Krasko et al., 2000; Tahir et al., 2004).

Die erste Silicatein cDNA (komplementäre DNA, mittels des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert) wurde aus dem marinen Demospongium *Tethya aurantium* kloniert. Es wurden drei Isoformen, Silicatein- α , Silicatein- β und Silicatein- γ charakterisiert (Cha et al., 1999; Shimizu et al., 1999). Kurz danach wurden die Gene bzw. cDNAs, die für die Silicateine α und β aus *Suberites domuncula* codieren (Krasko et al., 2000; Müller et al., 2006b; Schröder et al., 2004a; Krasko et al., 2002; Schröder et al., 2004b; Müller et al., 2003b), anderen marinen Schwämmen (*Petrosia ficiformis*, Pozzolini et al., 2004) und aus Süßwasserschwämmen (Funayama et al., 2005; Kaluzhnaya et al., 2005a; Wiens et al., 2006) kloniert. Neben der Silicatein cDNA aus dem ubiquitären Süßwasserschwamm *Ephydatia fluviatilis* (Funayama et al., 2005) wurden die Gene bzw. die cDNA codierend für vier Isoformen von Silicatein aus dem endemischen Süßwasserschwamm *Lubomirskia baicalensis* identifiziert und charakterisiert (Kaluzhnaya et al., 2005a; Wiens et al., 2006, Müller et al., 2007b). Die Silicateine sind mit der Cathepsinfamilie der Proteasen verwandt (Shimizu et al., 1998; Krasko et al., 2000; Müller et al., 2003b). Der markanteste Unterschied zwischen den beiden Enzymgruppen ist die Anwesenheit eines Serinrestes im katalytischen Zentrum der Silicateine (Shimizu et al., 1998; Krasko et al., 2000), während bei den Cathepsinen ein Cysteinrest vorhanden ist (Krasko et al., 1997). Der Serinrest im Silicatein scheint

essentiell für dessen katalytischen Mechanismus zu sein. Neben den drei Aminosäuren Serin (Ser), Histidin (His) und Asparagin (Asn), die das katalytische Zentrum des Silicateins bilden, ist ein Serincluster vorhanden (Avnir und Kaufman 1987; Nassif et al. 2003), welcher sich auf der Oberfläche des Silicateinmoleküls befindet und als Template für die Biosilifizierung (Perry 2003) zu agieren scheint. Markante Stellen innerhalb der Silicatein-Sequenz sind die katalytische Triade (Silicatein- α : Ser aa₁₃₈, His aa₂₇₇ und Asn aa₂₉₇) und der Serincluster (aa₂₆₇ bis aa₂₇₄) (Shimizu et al., 1998; Krasko et al., 2000).

Die phylogenetische Analyse von Silicatein- und Cathepsin L-Sequenzen aus Meerwasserschwämmen sowie Süßwasserschwämmen hat gezeigt, dass die Silicateinsequenzen aus einem gemeinsamen Vorläufer der Cathepsin L-Sequenz entstanden sind (Schröder et al., 2006). Rekombinantes Schwammsilicatein katalysiert *in vitro* die Hydrolyse und Polykondensation verschiedener Silikon-Alkoxide wie z.B. Tetraethylorthosilicat (TEOS) und Methyl- bzw. Phenyl-triethoxysilan, um Silicat und die entsprechenden Silsesquioxane (Silikone) bei neutralem pH und niedrigem Druck in wässrigen Puffersystemen zu erhalten (Cha et al., 1999, Shimizu et al., 1998).

Silicateine werden als Proenzyme synthetisiert, die dann mehrere Prozessierungsschritte durchlaufen, um zum reifen, aktiven Protein zu werden (Müller et al., 2005b; Müller et al., 2003b). Möglicherweise ist Silicatein als Proenzym enzymatisch inaktiv, wie das verwandte Cathepsin-Proenzym (Mort 2002). Peptide und Proteine, die an der Ablagerung von Silicatein beteiligt sind, untergehen sowohl in Schwämmen als auch in Diatomeen extreme Veränderungen durch posttranslationale Prozesse, die für die Funktion dieser Moleküle essentiell sind. Speziell Silicatein erfährt mindestens fünf Phosphorylierungen, da fünf Silicatein-Phospho-Isoformen vorkommen. Eine weitere posttranslationale Modifikation ist die Dehydroxylierung von Tyrosin, resultierend in einem Phenylalaninrest auf der Oberfläche des Moleküls. Die posttranslationale Modifikationen bei Silicatein unterscheiden sich von denen der Cathepsine, die keine Filamente bilden und deren einzige Modifizierung die Glycosylierung und Bildung von Disulfidbrücken sind (Mort 2002). Silicateinmonomere lagern sich zu Oligomeren und langen Proteinfilamenten zusammen. Silicatein findet man nicht nur in den Axialfilamenten der Schwamm-Spiculae, sondern auch auf deren Oberfläche (Müller et al., 2006a). Es wurden

bereits weitere Proteine identifiziert, die mit Silicatein assoziiert sind (Müller et al., 2007d).

1.6 Bioverkapselung

Unter Verkapselung versteht man den Prozess, mittels kontrollierten chemischen Reaktionen Kapseln herzustellen (Muralidhar et al., 2001). Die Immobilisierung bzw. Verkapselung von empfindlichen Inhaltsstoffen dient neben dem Einschluss zu deren Schutz oder gezielter Freisetzung (Zeit, Ort) vornehmlich dazu, mikroskopisch kleine Partikel, wie z.B. (Bio-)Katalysatoren in eine technisch handhabbare, makroskopische Form zu überführen. Die Immobilisierung bzw. Verkapselung erfolgt in linsenförmige oder kugelförmige Partikel, wobei verschiedene Verkapselungsmaterialien und –technologien zum Einsatz kommen. Zumeist erfolgt die Verkapselung in Hydrogelen auf Basis natürlicher (z.B. Alginat, Pektinat) oder synthetischer Polymere (z.B. Polyvinylalkohol, Polyurethan).

Unter Bioverkapselung versteht man die Verkapselung von biologischen Systemen wie z.B. Enzymen oder sogar Zellen. Auf dem Gebiet der Wirkstofffreisetzung (*drug delivery*) wurden viele neue Erkenntnisse über Verkapselung gewonnen, allerdings ist nur wenig bezüglich der Verkapselung von Prokaryoten bekannt. Die Bioverkapselung gewinnt immer stärkeres Interesse in der Biotechnologie (Peppas et al., 2000). Sie ermöglicht auf sehr interessante Weise, biologische Materialien in Silicaten, Metalloxiden oder in Hydrogelen zu immobilisieren. Die Verkapselung lebender Zellen beinhaltet die Immobilisierung von bioaktivem Material in Gelkügelchen oder Kapseln (Muealidhar et al., 2001).

Die Verkapselungstechnik wird weitgehend in der Biomedizin angewendet. Einige der Produkte wie z.B. Hydrogele haben sich als gewebekompatibel herausgestellt, da sie der extrazellulären Matrix vieler Gewebearten ähneln (Drury et al., 2003). Neben der Anwendung als (Schutz)-Gerüste in der Gewebekonstruktion (*tissue-engineering*), als umweltsensitive Hydrogele oder zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung können bioverkapselte Moleküle auch als Biosensoren eingesetzt werden. Biosensoren nutzen biologische Systeme wie z.B. Antikörper, Enzyme oder Mikroorganismen zur Erkennung der zu bestimmenden Substanzen.

Bei der Bioverkapselung mit Siliziumdioxid muss die Gelbildung von Silicat oder Silicat-Alkoxiden genau kontrolliert werden, um die Bildung von monolithischen Gelen oder mikrometrischen Pulvern zu verhindern (Prouzet et al., 2006). Die

Bioverkapselung mittels poly(Silicat) wurde bisher auf zwei Arten durchgeführt: Zum einen mittels Hydrolyse und Kondensationsreaktionen von Metalloxiden (Brinker et al., 1990), und zum anderen durch das Zunutzemachen der Fähigkeit wasserhaltiger Metallsalze zur Gelbildung (Iler, 1979). Die auf Alkoxiden basierende Sol-Gel-Chemie von Silizium macht sich Alkohol zunutze, der als zusätzliches Solvenz zusätzlich zu Wasser benötigt wird, um die Löslichkeit der Ausgangssubstanz zu ermöglichen. Allerdings stellt Alkohol für die meisten biologischen Verkapselungen ein Problem dar, da er sich nachteilig auf das Zellwachstum auswirkt. Avnir und Kaufmann (Avnir et al., 1987) konnten nachweisen, dass man den Einsatz von Alkoholen zur Gelbildung von Siliziumoxid vermeiden kann, indem stattdessen Alkoxid-Monomere eingesetzt werden. Zur Weiterführung dieser Entwicklung wurde versucht, Hefezellen in poly(Silicat) zu verkapseln, indem man eine Tetraethoxysilanlösung (TEOS) verwendete (Carturan et al., 1989). Um die Überlebensrate der so fixierten Zellen zu erhöhen, wurden mehrere organische Zusätze in das Silicagel eingebettet (Nassif et al., 2003). Des Weiteren wurden auch weniger widerstandsfähige Zellen, z.B. von *Escherichia coli* (Premkumar et al., 2001) und Sporen von *Bacillus sphaericus* verwendet (Matys et al., 2004). Um die Verwendung von Alkohol auch in kleineren Mengen zu vermeiden und somit eine geeignete Zellkompatibilität zu erreichen wurde versucht, wasserlösliche Vorläufer wie z.B. Silicate und/oder kolloidales Siliziumoxid einzusetzen, um Poly(Silicate) auf Biomolekülen (Bhatia et al., 2000) oder Zellen (Liu et al., 1999, Coradin et al., 2007) zu bilden. Am erfolgreichsten war die Anwendung einer Mischung aus Silicaten und kolloidalem Silizium als initiale Vorläufer. Sie werden durch Zugabe von Salzsäure (HCl) neutralisiert, woraufhin die Gelbildung voranschreitet und in einer Verkapselung der Bakterien in einem Netzwerk aus Silica endet (Nassif et al., 2003). Mit der Entdeckung von dem Enzym Silicatein, das nachweislich die Polymerisierung bzw. Polykondensation des Siliziumalkoxids TEOS (Tetraethylorthosilicat, auch Tetraethoxysilan) zu poly(Silicat) katalysiert (Cha et al., 1999; Krasko et al., 2000; Müller et al., 2007a) ergab sich eine neue Möglichkeit der Anwendung von Silizium in der Biotechnologie. *In vivo* synthetisiertes Biosilicat aus Schwämmen existiert in deren *Spiculae* in Form von Silizium-Nanosphären mit Durchmessern zwischen 100-250 nm (Pisera 2003; Tahir et al., 2005). Viele kommerzielle Bioprozesse sind auf immobilisierte Katalysatoren angewiesen, wie z.B. die Produktion von Peptiden und Aminosäuren. Gleiches gilt für die RNA-, DNA- und Protein-Biochip-Technologie (Gill und Ballesteros, 2000).

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass Silicatein mit Hilfe einer Histidin-markierten, chelatisierenden Ankergruppe erfolgreich auf so genannte selbstorganisierende (*self-assembled*) Polymerschichten immobilisiert werden konnte, ohne dass es seine enzymatische Aktivität verlor (Tahir et al., 2004).

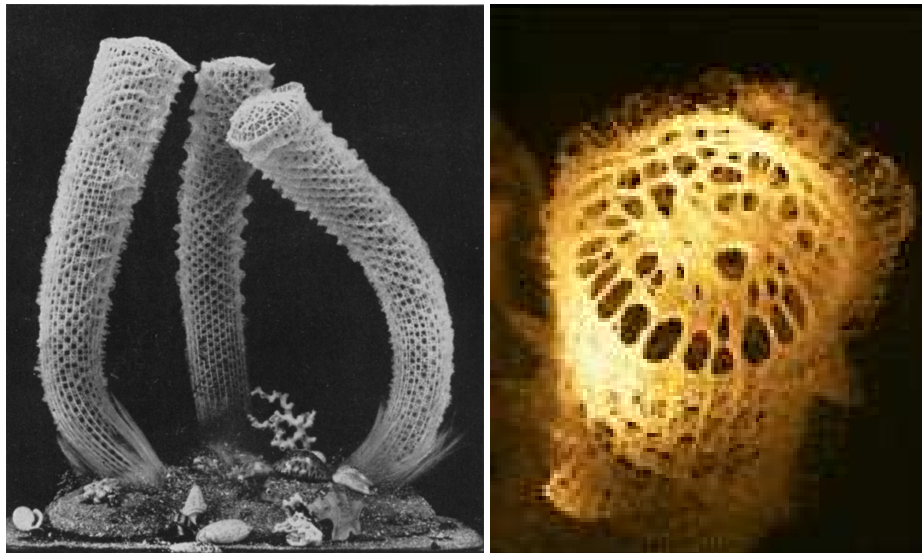
Im Vergleich zu organischen Polymeren zeigen anorganische Materialien eine verbesserte mechanische Belastbarkeit und ein nur geringes Aufquellen in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln, was vor dem Auslaugen der verkapselten Biomoleküle schützt (Guan et al., 2008). Die Silica-Matrix beschränkt die Bewegung der verkapselten Proteine und verhindert irreversible Strukturveränderungen. Dadurch können sowohl die Aktivität als auch die Stabilität des Proteins aufrechterhalten werden (Chen et al., 1998). Um eine mühsame Separation und Aufreinigung von Biomolekülen zu verhindern, ist es von großem Interesse, Zellen wie z.B. *E. coli* direkt als Ganzes zu verkapseln. Nachdem Caturan et al. zuerst die Immobilisierung von Hefesporen (*Saccharomyces cerevisiae*) in dünnen SiO₂-Schichten beschrieben hatten (Carturan et al., 1989), wurden Pflanzenzellen (Campostrini et al., 1996), Protozoen (Livage et al., 1996) und sogar Säugetierzellen (Pope et al., 1997) mit Hilfe der Sol-Gel-Technologie verkapselt. Die Vorteile der Verkapselung ganzer Zellen sind enorm: Die Aktivität der synthetisierten Proteine bleibt erhalten und deren Stabilität (z.B. bezüglich Temperatur, Schutz vor Proteasen und Nukleasen) wird erhöht, da die Sol-Gel-Matrix die Zellen schützt und die Lyse in Abwesenheit von Nährstoffen verhindert (Fennouh et al., 1999). Die verkapselten Zellen eignen sich besser für die Anwendung im Umweltschutz und in der Metallentsorgung, da sie eine verbesserte Vitalität im Vergleich zu nicht verkapselten Zellen aufweisen (Gadd und White, 1993). Die Verkapselung von Biomolekülen wie Proteinen und Nukleinsäuren sowie bioaktiven Substanzen wie Hormone, Pharmaka und Cytokine mit SiO₂ bzw. Siloxan mit Hilfe von Silicatein führt zur Modifikation und Verbesserung ihrer Eigenschaften, z.B. Resistenz gegen Proteasen/Nukleasen oder Temperaturstabilität. Des Weiteren kann die Menge verkapselter Wirkstoffe kontrolliert freigesetzt oder eine topische Wirkstoff-Freisetzung angestrebt werden.

1.7 Biologie der Schwämme (Porifera)

Schwämme (Porifera: lateinisch *porus* = Pore und *ferre* = tragen, nach R. E. Grant, 1836) leben ausschließlich im Wasser und gehören zur Gruppe der Metazoa. Paläontologische, morphologische sowie embryonale Studien weisen auf ein Alter

von ca. 580 Mio. Jahren (Westheide und Rieger 1996; Müller 2001) neuere molekularbiologische Untersuchungen sogar auf ein Alter von mehr als 800 Mio. Jahren hin (Willmer 1994; Müller 1995). Bisher wurden etwa 7000 rezente Arten beschrieben (Müller et al., 2003a). Nur etwa 150 davon leben im Süßwasser, alle anderen sind marin und sowohl im Seichtwasser als auch in den tiefsten Ozeangraben anzutreffen (Westheide und Rieger, 1996; Campbell, 1997). Das Phylum Porifera wird in drei Klassen unterteilt, die sich durch ihre Nadeltypen (Spiculae) unterscheiden:

Die Hexactinellida (Glasschwämme) repräsentieren das phylogenetisch älteste Taxon (Kozioł et al., 1997; Kruse et al., 1997 und 1999; Schütze et al., 1999). Evolviert zwischen zwei globalen Eiszeiten vor etwa 720-585 Milliarden Jahren, bilden sie mit ihren aus Silicat aufgebauten Spiculae die größten Biosilicastrukturen der Welt. Beispielsweise können die Riesenspiculae (Basalia) des Tiefsee-Glasschwamms *Monorhaphis chuni* bis zu 3 m lang werden und einen Durchmesser von 8,5 mm erreichen (Müller et al., 2007b). Vertreter dieser meist in der Tiefsee anzutreffenden Schwämme sind u.a. *Euplectella aspergillum* und der fossile Schwamm *Solactiniella plumata*. Hexactinelliden zeichnen sich durch ihre charakteristische syncytiale Organisation aus. Die Demospongien dagegen weisen eine zelluläre Organisation auf. Das Silicatskelett des hexactinelliden Schwammes *Euplectella aspergillum* (Gießkannenschwamm) zeigt eine hierarchisch geordnete Struktur (Aizenberg et al., 2004 und 2005; Weaver et al., 2000). Es sind mindestens sechs hierarchische Ebenen vom Nanometerbereich bis zum Zentimeterbereich identifiziert worden (Currey 2005). Die mechanischen Eigenschaften der Spiculae von *E. aspergillum* werden durch die dünnen organischen Zwischenschichten (5-10 nm) zwischen den dickeren konzentrischen Silicaschichten der Spiculae beeinflusst (Walter et al., 2007). Das am häufigsten vorkommende Protein auf der äußeren Oberfläche dieser Spiculae ist Collagen, welches einen großen Einfluss auf die physikochemischen bzw. mechanischen Eigenschaften dieses Kompositmaterials hat (Müller et al., 2007d). Einige physikochemischen Eigenschaften dieser Spiculae können auch durch ihren Natrium- und Kaliumgehalt beeinflusst werden (Müller et al., 2007d).



1a)

1b)

Abb. 1: Beispiele für Vertreter der Hexactinellida: *Euplectella aspergillum*:

1a) Schulze, 1887 (www.gutenberg.org/files/20417/20417h/images/image199a.jpg, 23. Januar 2010). **1b)** Foto: Prof. Dr. W.E.G: Müller.

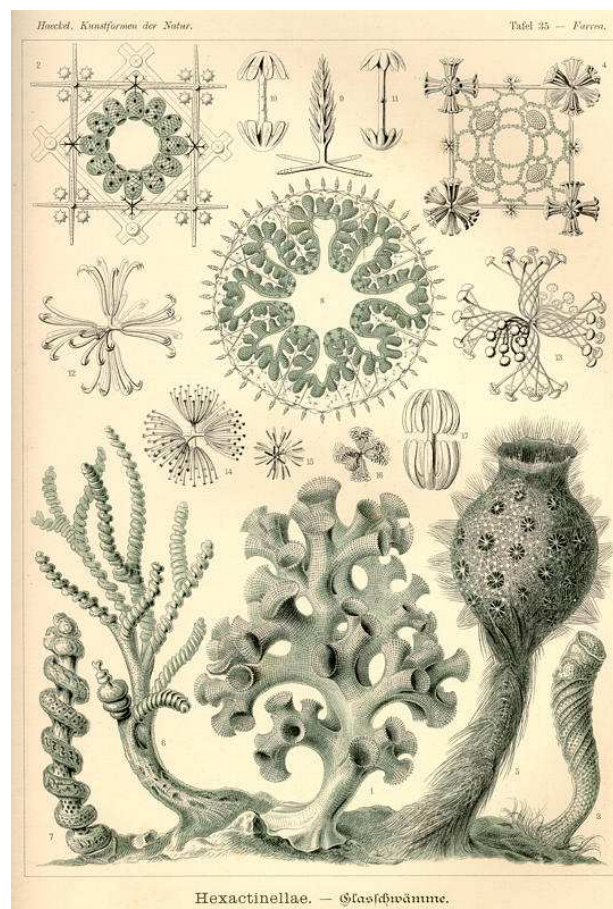


Abb. 2: Strukturen der Hexactinellida. (aus: Ernst Haeckel "Kunstformen der Natur", 1899-1904; unten rechts *Euplectella aspergillum*).

(<http://caliban.mpizkoeln.mpg.de/~stueber/haeckel/kunstformen/natur.html>, 21. März 2011).

Die Calcarea (Kalkschwämme) stellen die am nächsten mit den höheren Metazoa verwandte Klasse dar (Koziol et al., 1997; Kruse et al., 1997, 1999; Schütze et al., 1999). Kennzeichnend für diese recht kleine Gruppe, deren Vertreter häufig in marinem Flachwasser siedeln, sind distinkte Kalkspiculae. Beispiele für diese Klasse sind *Sycon ciliata* und *Leucosolenia botryoides*.



Abb. 3: Vertreter der Calcarea: *Sycon raphanus* (Foto: Prof. Dr. W.E.G. Müller).

Die Demospongiae (Hornschwämme) stellen mit ca. 80-90% aller Schwammarten die größte Klasse des Phylums Porifera dar (Westheide und Rieger, 1996) und sind wie die Glasschwämme durch Silicatspiculae gekennzeichnet. Vertreter dieser Gruppe sind z.B. *Suberites domuncula*, *Geodia cydonium* und *Haliclona oculata*.



Abb. 4: Vertreter der Demospongiae: *Geodia cydonium* (Foto: Prof. Dr. W.E.G. Müller).

Die gewebeartigen Zellschichten bei den Hexactinellida bilden zu etwa 75% ein multinukleäres Syncytium (Müller, 2001). Diese Gruppe wird daher häufig als *Symplesma* den *Cellularia* (Demospongiae und Calcarea) gegenübergestellt, die distinkte Zellen aufweisen (Westheide und Rieger, 1996). Der syncytiale Aufbau geht aus der Fusion früher Embryonalzellen hervor. Er beinhaltet die dermalen und atrialen Membranen und erlaubt die schnelle Nährstoffverteilung sowie die Weiterleitung elektrischer Signale im Schwammkörper (Leys und Mackie, 1997).

Schwämme unterscheiden sich sehr deutlich von allen übrigen Metazoen, da ihnen „echte“ Gewebe, Organe, Gonaden, Nervensysteme oder Blutgefäße fehlen (Westheide und Rieger, 1996). Allerdings sind ihre Zellen schon sowohl histologisch als auch physiologisch differenziert.

Alle Schwämme besitzen einen prinzipiell ähnlichen Aufbau. Der Schwammkörper ist von einer äußeren Epithelschicht (Pinacoderm) umgeben, die eine gelatinöse extrazelluläre Matrix aus Zellen verschiedener Morphologie und Funktion, das Mesohyl, umschließt. Neben Archaeocyten, der Stammform aller Schwammzellen, finden sich hier auch Zellen des Stützskeletts (Spongioblasten, Lophocyten und Skleroblasten) sowie kontraktile Collencyten und erregbare Neuroidzellen (Westheide und Rieger, 1996). Das Mesohyl enthält oftmals ein anorganisches Stützskelett aus Silicat oder Calciumcarbonat (Spiculae) und ist von einem hochorganisierten Kanalsystem durchzogen, das an den Wänden von einem Epithel ausgekleidet ist. Diese Epithelschichten setzen sich aus verschiedenen Pinacocyten zusammen: die Exopinacocyten bilden das äußere Exopinacoderm, die Basopinacocyten setzen sich zum Basopinacoderm zusammen, das dem Schwamm zur Anheftung an das Substrat dient. Die Endopinacocyten letztendlich bilden das Endopinacoderm, das die Kanäle auskleidet (Müller et al., 2004d). Im Inneren des Schwamms befindet sich das Choanoderm, das von den Kragengeißelzellen gebildet wird. Alle Zellen sind über ein sehr komplexes Zell-Zell-Adhäsionssystem miteinander verbunden (Schütze et al., 2001). In manchen Species stehen die Zellen zusätzlich durch so genannte *less complex junctions* miteinander in Verbindung (Simpson, 1984).

Schwämme filtern als sessile Strudler die Nahrungspartikel aus einem Wasserstrom, den sie durch den Flagellenschlag der Choanocyten generieren. Das Wasser mit der partikulären, kolloidalen oder auch gelösten Nahrung gelangt durch viele mikroskopisch kleine Ostien in ein Kanal- und Geißelkammersystem und schließlich zu den Mikrovilli im basalen Kragenbereich. Die Verdauung findet nach Endocytose intrazellulär statt (Wehner und Gehring, 1995). Neben der Ernährung ist der Wasserdurchstrom auch für Atmung und Defäkation zuständig. Die Geschwindigkeit des Wasserdurchstroms ist durch die kontraktile Pinacocyten regulierbar, die den Kanaldurchmesser verändern können. Die Filtrierleistung von Schwämmen ist beachtlich, es wurden Durchflussraten von mehr als eine Tonne Wasser pro Tag und kg Schwamm berechnet (Müller et al., 2004a). Das filtrierte

Wasser verlässt den Schwamm über das Osculum, die zentrale Egestionsöffnung, wieder nach außen.

Anatomischer Aufbau eines Schwammes

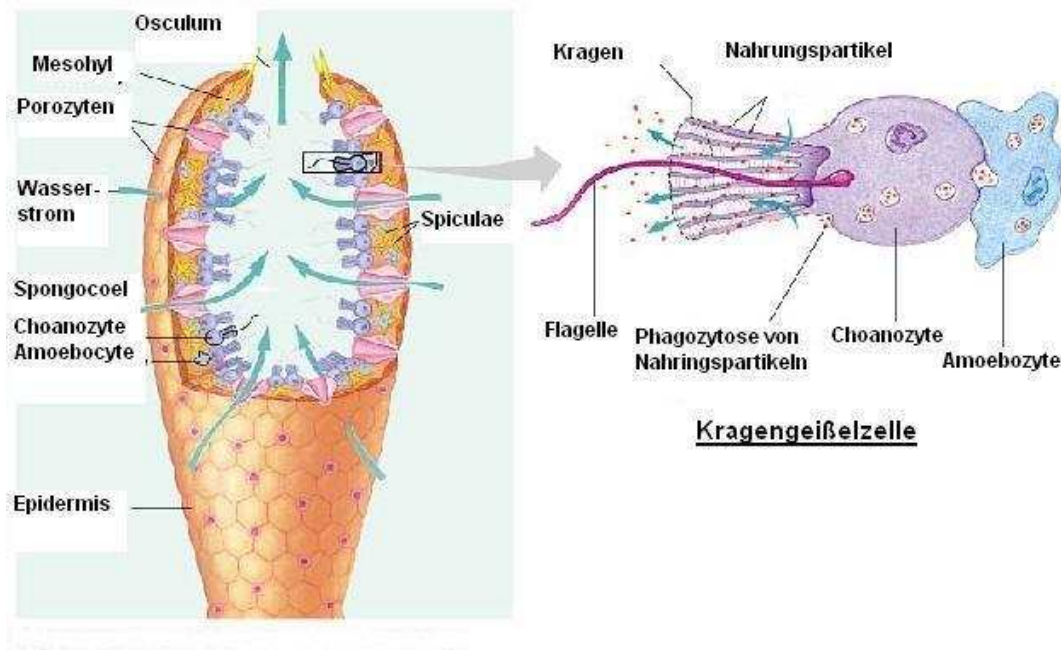


Abb. 5: Schwammanatomie (verändert nach: Campbell N. A: Biologie, 1997).

Je nach Art der Ausbildung und Komplexionsgrad des Kanalsystems unterscheidet man folgende drei Organisationstypen des Schwammkörpers.

Beim Ascon-Typ (griechisch: *ascos* = Schlauch) handelt es sich um den einfachsten Bauplan. Der Schwamm besteht aus einer großen, zentralen Kragengeißelkammer (Atrium) mit einem Osculum. Das Spongocoel ist nur von einem dünnen, einschichtigen, ungefalteten Choanoderm, bestehend aus Choanocyten, ausgekleidet. Die Außenseite wird von einem einschichtigen Pinacoderm gebildet. Der Wasserstrom führt durch die Ostien direkt zu den Choanozyten und verlässt den Schwammkörper wieder durch das Osculum. Schwämme dieses Typus können aus hydrodynamischen Gründen nur selten wenige Millimeter groß werden. Viele Schwammarten durchlaufen diese asconoide Form kurz nach Festheftung der Larve, nur wenige bleiben ihr Leben lang bei dieser Bauform, wie die beiden *Calcarea leucosolenia* und *Clathrina*.

Die Organisationsform des Sycon-Typs (griechisch: *sykon* = Feige) ist sowohl bei Arten der Demospongiae als auch der Calcarea zu finden, z.B. bei *Sycon raphanus*.

Als Weiterentwicklung der asconoiden Form werden Pinacoderm und Choanoderm zweidimensional gefaltet. Der Zentralraum ist hier radial ausgebuchtet, die dickeren Wände dieser Ausbuchtungen beherbergen die Choanocyten, die senkrecht zum Zentralraum und zu Radialtuben angeordnet sind. Diese Oberflächenvergrößerung des Choanoderms erhöht die Wirksamkeit des Wasserstromes im Vergleich zum Ascon-Typ. Dies war eine Voraussetzung für die Ermöglichung eines größeren Schwammkörpers, da beim Wachsen das Volumen schneller zunimmt als die Körperoberfläche. Vertreter dieses Bauplans werden selten größer als wenige Zentimeter.

Der Leucon-Typ (griechisch: *leucos* = weiß, alter Gattungsname weißer Schwämme) ist bei der Mehrheit der Porifera vorzufinden und stellt eine Weiterentwicklung des Sycon-Typs dar. Hier führen die Dermalporen im Außenepithel nicht immer direkt in die Geißelkammern, sondern in unter der Oberfläche liegende so genannte Subdermalräume, von welchen zahlreiche Kanal- und Kapillarnetze über die Geißelkammern in den Gastralraum münden. Somit wurde eine enorme Erhöhung der Anzahl der Kragengeißelzellen möglich, was zur Ausbildung mehrerer Oscula und einer Vergrößerung des Schwammkörpers von bis über einen Meter führen konnte.

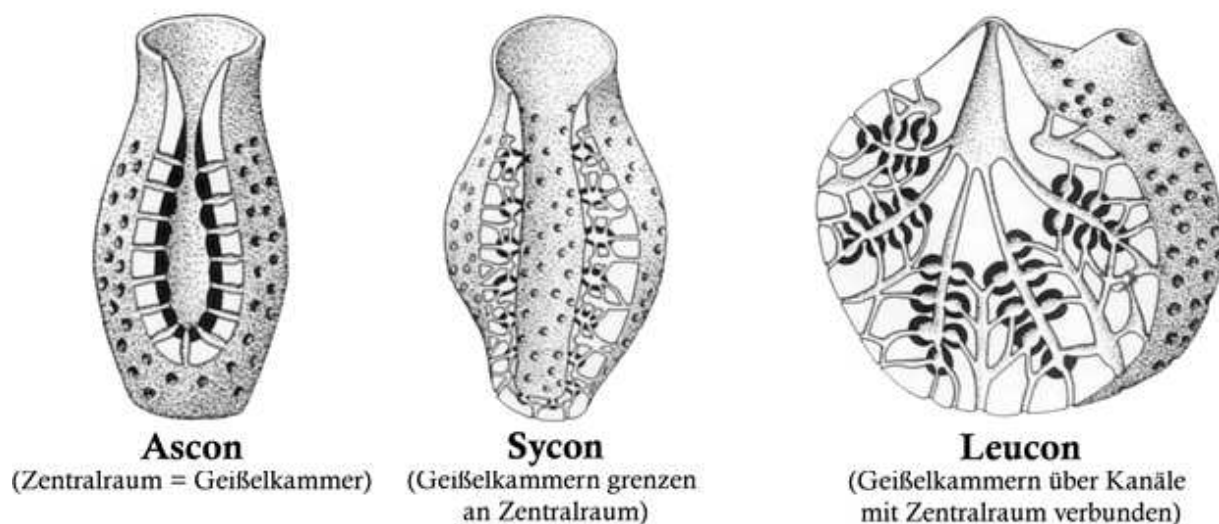


Abb. 6: Morphologische Baupläne von Schwämmen. Das Choanoderm ist durch eine dicke Linie markiert (verändert nach Wehner und Gehring, 1995).

Vertreter der Hexactinellida, wie z.B. *Euplectella aspergillum* (vgl. Abb. 1) erinnern vom Aufbau her an den Sycon-Typ und sind aus einem Syncytium des Choanoderms aufgebaut (Reiswig, 1979).

Porifera können sowohl getrenntgeschlechtlich als auch hermaphroditisch sein, wobei die Fortpflanzung in der Regel sexuell verläuft. Aus großen Archaeocyten entwickeln sich meist die Oocyten und aus Choanocyten gehen Spermatozoen hervor (Storch und Welsch, 1996). Nachdem entweder beide Gameten oder nur die Spermatozoen ins Außenmedium gelangt sind, können sie von benachbarten Schwämmen mit dem Wasserstrom aufgenommen werden. Die Befruchtung findet entweder im Wasser oder aber peripher im Schwammkörper statt. In letzterem läuft dann die Embryonalentwicklung ab. Die bewimperten Larven gelangen über das Osculum ins Freie. Nur ein kleiner Teil der Larven setzt sich dann auf hartem Substrat fest, indem kollagenartige Abscheidungen gebildet werden (Westheide und Rieger, 1996). Die Reifung der Larven zu adulten Schwämmen findet nach der Gastrulation und Auskleidung des Spongocoels durch Choanocyten statt (Campbell, 1997). Asexuelle Fortpflanzung findet durch Fragmentierung und Abschnürung statt. Des Weiteren kommt es zur Bildung kapselförmiger Gemmulae. Diese besitzen eine dicke Sponginaußenschicht, die mit Gemmosklenen verstärkt ist. Gemmulae dienen einerseits der Verbreitung und stellen andererseits hauptsächlich eine Überlebensform als Reaktion auf sich verschlechternde Umweltbedingungen dar (Westheide und Rieger, 1996).

Da Schwämme eine sessile Lebensweise besitzen, müssen sie sich besonders vor Fraßfeinden, toxischen Sekundärmetaboliten anderer mariner Lebewesen und Besiedelung durch Mikroorganismen wie beispielsweise Bakterien oder Algen schützen. Hierzu bedienen sie sich einerseits ihrer vielseitig gestalteten Spiculae, andererseits eines hochkomplexen Immunsystems sowie zahlreichen chemischen Verteidigungsmitteln. Schwämme leben oft in Assoziation mit Bakterien und Pilzen, die Sekundärmetabolite produzieren (Hiort et al., 2004). Von allen Metazoa enthalten die Schwämme die größte Anzahl und höchste Vielfalt an bioaktiven Substanzen (Müller et al., 2001). Diese Sekundärmetabolite können antimikrobielle (z.B. Polyketide), antivirale (z.B. Nucleosidanaloga) oder cytostatische (z.B. Avarol) Wirkung zeigen und stellen somit eine reichhaltige Ressource an bioaktiven Naturstoffen dar (Müller et al., 2004c). Einige dieser Sekundärmetabolite befinden sich bereits in medizinischer Anwendung wie Arabinofuranosylcytosin und Arabinofuranosyladenin, die sich hemmend auf Tumor- und Viruswachstum auswirken (Müller et al., 2004b).

1.7.1 Porifera als Basis des Phylums Metazoa

Bis vor kurzem noch stellte sich die Frage nach dem Ursprung der Metazoa als unlösbares Problem dar (Müller, 2001) und lange Zeit wurden die Schwämme als Parazoa („gewebelose Tiere“) den Metazoa („vielzellige Tiere“) gegenübergestellt. Die ältesten fossilen Funde von Schwämmen weisen darauf hin, dass die ersten Porifera vor 600-800 Mio. Jahren auftraten (Hirabayashi und Kasai, 1993), weshalb sie auch als „lebende Fossilien“ bezeichnet werden (Müller, 1998). Erst als sich moderne molekularbiologische Techniken etabliert hatten, konnte die Frage nach dem Ursprung der Metazoa neu untersucht werden. Eine Vielzahl molekularbiologischer Untersuchungen, vor allem die Isolation und Charakterisierung von Schwammgenen und cDNAs (vor allem aus *Suberites domuncula* und *Geodia cydonium*), die für informative Proteine codieren, erbrachte den Nachweis der Monophylie der Metazoa, deren evolutive Basis von den Porifera gebildet werden (Müller et al., 1994). Die Metazoa gehen alle auf einen gemeinsamen Vorfahren, den Urmetazoen zurück, der schon die Eigenschaften besessen haben muss, die für eine erfolgreiche Multizellularität Voraussetzung sind: Zelladhäsionsmoleküle mit intrazellulären Signal-transduktionskaskaden, gradientenformende Morphogene und Wachstumsfaktoren sowie ein funktionelles Immunsystem. Anhand solcher autapomorpher Merkmale der Metazoen wurde das Zurückgehen auf den gemeinsamen Urmetazoen nachgewiesen. Autapomorphe Merkmale der Porifera sind z.B. das transmembrane Zell-Matrix-Adhäsionsmolekül Integrin (Pancer et al., 1997), das extrazelluläre Matrix (ECM-) Adhäsionsprotein Fibronectin (Pahler et al., 1998), das Galectin (Wagner-Hühlsmann et al., 1996) und Lectin (Gundacker et al., 2001) die V-Domäne der Immunglobuline (Schäcke et al., 1994; Blumbach et al., 1999), die Rezeptor-Tyrosinkinasen (Schäcke et al., 1994), die Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen (Müller et al., 2001), das AIF-1 (*Allograft inflammatory factor*) die Glutathion-Peroxidase (Kruse et al., 1999) sowie die Oligoadenylat-Synthase (Wiens et al., 1999), die bisher nur aus Vertebraten bekannt war. Des Weiteren wird die Monophylie-Hypothese der Metazoa durch Untersuchungen an Komponenten des Rhesus-Systems (Seack et al., 1997) und Signaltransduktionsmolekülen wie der Ser/Thr-Kinase (Schütze et al., 1999), der PKC (Kruse et al., 1996), der p38 MAPK (Böhm et al., 2000) und heterotrimerer G-Proteine (Seack et al., 1997) unterstützt. Neue Studien haben ergeben, dass Schwämme vor allem im Vergleich zu einzelligen Eukaryoten unerwartet komplexe Genome aufweisen. Möglicherweise liegen die

Ursprünge der Komplexität der Genome nicht wie bisher vermutet bei den Urbilateria, sondern bei den Urmetazoa (Harcet et al., 2010).

1.7.2 *Suberites domuncula*

Die für diese Arbeit verwendete DNA stammt aus dem Meeresschwamm *Suberites domuncula* (Olivi, 1792). Dieser gehört der Klasse der Demospongiae, der Ordnung *Hadromerida* und der Familie *Suberitidae* an. Er wird auch „Häuschenschwamm“ genannt, da er meist auf Molluskenschalen lebt (z.B. von *Trunculariopsis trunculus*), die von dem Einsiedlerkrebs *Paguristes oculatus* bewohnt werden.



Abb. 7: Ein Exemplar von *Suberites domuncula* mit Einsiedlerkrebs (Foto: Prof. Dr. W.E.G. Müller).

2 ZIELSETZUNG

Die Bioverkapselung ist eine faszinierende Methode, biologische Materialien wie z.B. Zellen in Silica, Metalloxiden oder Hybrid-Sol-Gel-Polymeren zu immobilisieren. Bisher wurde nur die Sol-Gel-Vorläufer-Methode angewendet, um Bakterien- oder Hefezellen in Silica zu immobilisieren. Im Vergleich zu organischen Polymeren weisen anorganische Materialien verbesserte mechanische Stabilität und ein nur geringes Aufquellen in Flüssigkeiten auf. Dies verhindert ein Herausdiffundieren der Biomoleküle. Mit der Entdeckung des Enzyms Silicatein, das die Polymerisation/Polykondensation des Silikon-Alkoxides TEOS zu amorphem Silicat kondensiert (Cha et al., 1999; Krasko et al., 2000 und Müller et al., 2007d), wurde ein neuer Weg in der Anwendung von Silica in der Biotechnologie ermöglicht. Mit Hilfe von Silicatein es möglich, amorphes Silicat unter milden, physiologischen Bedingungen zu synthetisieren. Bisher waren hierfür sowohl hohe Drücke und Temperaturen als auch niedrige pH-Werte und der Zusatz verschiedener Chemikalien erforderlich. Zusätzlich entstand mit den bisherigen Methoden Alkohol als Nebenprodukt, der sich nachteilig auf lebende Zellen auswirkt. Um eine geeignete Zellkompatibilität zu erreichen, sollte die Anwesenheit von Alkohol auch in kleineren Mengen vermieden werden, was mit der hier angewandten Methode ermöglicht wird.

Mit dieser Arbeit sollten verschiedene Untersuchungen mit *E. coli*-Zellen durchgeführt werden, die zuvor mit dem Silicateingen aus dem Meeresschwamm *Suberites domuncula* transformiert worden waren. Es wurden unter anderem der Expressionslevel von Silicatein unter verschiedenen Bedingungen sowie die Aktivität und Lokalisation des von den Bakterien exprimierten Silicateins untersucht. Elektronenmikroskopische Aufnahmen sollten Hinweise auf die Aktivität des Silicateins *in vivo* geben. Um die Auswirkung von Silicatein und dessen Substrat auf das Wachstum der Bakterien untersuchen zu können, wurden Wachstumskurven erstellt. Zusätzlich wurden erste Versuche zur Reaktion von silicateinexprimierenden *E. coli*-Zellen auf Stressoren wie UV-Strahlung oder Ultraschall durchgeführt. Die silicateinvermittelte Verkapselung von Bakterienzellen mit Silica kann die Anwendungsbereiche von Bakterienzellen in der Produktion von rekombinanten Proteinen verbessern, erweitern und optimieren.

3 MATERIAL

3.1 Chemikalien

Acrylamid rotiphorese® Gel 30	ROTH, Karlsruhe
Agar	ROTH, Karlsruhe
Agarose	BIOZYM, Hess. Oldendorf
Albumin Fraktion V	ROTH, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	ROTH, Karlsruhe
Ampicillin	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Benzonase (Nuklease)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Blockingreagenz	ROCHE, Mannheim
Borsäure	ROTH, Karlsruhe
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	ROTH, Karlsruhe
Bromphenolblau	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
BugBuster™ Protein-Extraction-Reagent	NOVAGEN, Darmstadt
Casein, enzymatisch verdaut	ROTH, Karlsruhe
Carbenicillin	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindol)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Complete-Mini Proteinase-Inhibitor-Mix	ROCHE, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ROTH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
DNA-1kb-Leiter, GeneRuler™	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
DNA-Leiter, MassRuler™	MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot
dNTP-Mix	GENECRAFT, Lüdinghausen
D(+)-Glucose	ROTH, Karlsruhe
DC Precision Plus Protein Standard	BIO-RAD, München
Ethanol	ROTH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	ROTH, Karlsruhe
Essigsäure (Eisessig)	ROTH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Flüssigstickstoff	LINDE, Wiesbaden
Formamid	ROTH, Karlsruhe
Formaldehyd	ROTH, Karlsruhe
GelCode® <i>Blue stain reagent</i>	PIERCE, Bonn

Glycerol	ROTH, Karlsruhe
Glycin	APPLICHEM, Darmstadt
Glutaraldehyd	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Hefeextrakt	ROTH, Karlsruhe
Imidazol	ROTH, Karlsruhe
Isopropanol	ROTH, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	ROTH, Karlsruhe
Kaliumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	ROTH, Karlsruhe
Calciumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Kanamycin	ROTH, Karlsruhe
LB-Medium	ROTH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid x 7 H ₂ O	MERCK, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	ROTH, Karlsruhe
Maleinsäure	ROTH, Karlsruhe
Maltose	ROTH, Karlsruhe
B-Mercaptoethanol	ROTH, Karlsruhe
Methylenblau	ROTH, Karlsruhe
Methanol	MERCK, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	ROTH, Karlsruhe
Natriumacetat	ROTH, Karlsruhe
Natriumcitrat	ROTH, Karlsruhe
Natriumchlorid	ROTH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	ROTH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	ROTH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	ROTH, Karlsruhe
Natrium-Metasilicat-Nonahydrat	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Natriumphosphat	ROTH, Karlsruhe
4-Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT)	ROTH, Karlsruhe
N-Lauroylsarcosin	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Paraformaldehyd	ROTH, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
PicoGreen®	INVITROGEN, Karlsruhe
Precision Plus Protein® Standard DC Marker	BIO-RAD, Hercules, USA

Polyethylenglykol 10.000	ROTH, Karlsruhe
Poly-L-Lysin (MW 70000-150000)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Protein-Marker IV Prestained	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH, Erlangen
Rotiload 4 x denaturierender Ladepuffer	ROTH, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	ROTH, Karlsruhe
Roti-Quant R250	ROTH, Karlsruhe
Salzsäure konz.	ROTH, Karlsruhe
SDS-Elektrophoresepuffer	ROTH, Karlsruhe
SDS	ROTH, Karlsruhe
SOC-Medium	NOVAGEN, Darmstadt
Tetracyclin	ROTH, Karlsruhe
Toluidinblau	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Tris	ROTH, Karlsruhe
Triton X-100	ROTH, Karlsruhe
TRizol®	INVITROGEN, Karlsruhe
Trypton	ROTH, Karlsruhe
Tween®20	
(Poly(oxyethylen)n-sorbitan-monolaurat)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Urea	ROTH, Karlsruhe
Wasser für die Molekularbiologie	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
X-Phosphat	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen
Xylencyanol	ROTH, Karlsruhe

3.2 Verbrauchsmaterialien und Laborzubehör

Einwegspritzen	BRAUN, Melsungen
Einwegkanülen, steril	BRAUN, Melsungen
Falcon, Reaktionsgefäße	BECTON & DICKINSON, New Jersey, USA
PVDF Membran Immobilon P (0,45 µm)	MILLIPORE, Billerica, USA
Latexhandschuhe	TOP GLOVE, Duisburg
Microstripes 0,2 ml	DIANOVA, Hamburg
Microtiterplatten (96-well)	NUNC, Wiesbaden
Mörser und Pistill	ROTH, Karlsruhe

Nitrilhandschuhe	TOP GLOVE, Duisburg
Omnistripes 0,2 ml	DIANOVA, Hamburg
Parafilm M	AMERICAN NATIONAL CAN, Greenwich, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
PCR-Pipettenspitzen	BIOZYM, Hess. Oldendorf
Petrischalen	NUNC, Wiesbaden
Pinzetten	ROTH, Karlsruhe
Pipettenspitzen	ROTH, Karlsruhe
Plastikbeutel Plastibrand	BRAND, Wertheim
Reaktionsgefäße	BRAND, Wertheim
Scalpell steril, Cutfix	BRAUN, Tuttlingen
Sterilfilter 0,2 und 0,45 μ m	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Whatman 3MM-Papier	WHATMAN, über FISCHER, Frankfurt

3.3 Geräte

Absorbance Reader Sunrise	TECAN, Crailsheim
Agarose-Gelelektrophoreseeinheit	BIO-RAD, Hercules, USA
Biofuge pico / fresco	HERAEUS INSTRUMENTS, Osterode
Blottingkammer Trans-Blot SD	BIO-RAD, Hercules, USA
Brutschrank Typ BK 2/56	EHRET, Emmerdingen
Brutschrank	MEMMERT, Schwabach
Filter H2 für UV-Lampe Sol-500	DR. HÖHNLE GmbH, München
Gefrierschrank - 80°C	SNIJDERS SCIENTIFIC, Tilburg
Gefrierschrank -20°C	BOSCH, Gerlingen-Schillerhöhe
GS-525 Molecular Imager	BIO-RAD, Hercules, USA
Heizblock Thermostat 5320	EPPENDORF, Hamburg
Heizplatte MR 2002, MR 3001	HEIDOLPH, Schwabach
Sputteranlage Baltec MED020	BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein
Kochplatte	ROMMELSBACHER, Dinkelsbühl
Kühlschrank + 4°C	BOSCH, Gerlingen-Schillerhöhe
Leit-Tabs G3347	PLANO, Wetzlar
Lichtmikroskop AHBT3 mit AH3-RFC- Fluoreszenzlichtsystem	OLYMPUS, Hamburg

Magnetrührer Magnetomix	COLORA, Lorch
Mikroküvetten	ROTH, Karlsruhe
Mikroplattenreader Fluoroskan II	LABSYSTEMS, Helsinki, Finnland
Mikroliterpipetten (2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl)	GILSON, Bad Camberg
Minizentrifuge <i>capsule</i>	SEIKO, Neu-Isenburg
Agarosegelelektrophorese-Einheit	
Min-Sub Cell	BIO-RAD, Hercules, USA
pH-Meter pH 330	WTW, Weilheim
Photometer SmartSpec plus	BIO-RAD, Hercules, USA
Powersupply	BIO-RAD, Hercules, USA
Rasterelektronenmikroskop Gemini Leo 1530	ZEISS, Oberkochen
Rasterelektronenmikroskop Zeiss DSM 940	ZEISS, Oberkochen
Schnellkochtopf	WMF, Geislingen/Steige
Schüttelinkubator	BRAUN, Melsungen
Schüttelinkubator Certomat H-B	BRAUN, Melsungen
SDS-PAGE-Einheit	BIO-RAD, Hercules, USA
SEM-Stubs G031Z	PLANO, Wetzlar
Sonnenlichtssimulationslampe SOL-500	DR. HÖHNLE GmbH, München
Spectrophotometer SmartSpec™ 3000	BIO-RAD, Hercules, USA
Sterilbank Laminar-Flow 8580	KÖTTERMANN, Uetze-Hänigsen
Sterilisator WTB	BINDER, Tuttlingen
Stripfuge	ROTH, Karlsruhe
Thermal Cycler iCycler™	BIO-RAD, Hercules, USA
Thermocycler Primus 96 plus	MWG BIOTECH, Ebersberg
Thermomixer comfort	EPPENDORF, Hamburg
Thermostat 5320	EPPENDORF, Hamburg
Transilluminator/Geldokumentationssystem	UVP LIMITED, Cambridge, UK
Trockenschrank	HERAEUS, Hanau
Geldokumentationssystem	BIO-RAD, Hercules, USA
Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K	BECKMAN, München
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	STRATAGENE, Heidelberg
Vortexer	HEIDOLPH, Schwabach
Waage PT 120	SARTORIUS, Göttingen

Waage AB 104	METTLER, Gießen
Wasserbad mit Thermostat und Schüttler	KÖTTERMANN, Uetze-Hänigsen
Wippschüttler	E. BÜHLER, Tübingen
Wippschüttler	HEIDOLPH, Schwabach
Zentrifuge 5415c, 5804R,	EPPENDORF, Hamburg
Zentrifuge Sorvall RC 5B	DU PONT, Bad Nauheim

3.4 Kits

Silicat (Kieselsäure)-Test 1.14410.0001	MERCK, Darmstadt
High Pure Plasmid Isolation Kit	ROCHE, Mannheim
NucleoSpin [®] Extract 2 in 1: Purification of PCR products-Kit	MACHERY-NAGEL, Düren
pGEM [®] -T Vector Ligation Kit	PROMEGA, Madison, USA
Quiafilter Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Profinia Protein Purification System	BIO-RAD, Hercules, USA

3.5 Enzyme

Biotherm [™] DNA-Polymerase	GENECRAFT, Lüdinghausen
KOD XL DNA-Polymerase	NOVAGEN, Schwalbach
T4 DNA-Ligase	PROMEGA, Madison, USA
Bam HI (Restriktionsendonuklease)	ROCHE, Mannheim
Hind III (Restriktionsendonuklease)	ROCHE, Mannheim

3.6 Verwendete Bakterienstämme und Bakteriophagen

E. coli M15 [pREP4] , Genotyp: M15 mit pREP4 QIAGEN GmbH, Hilden

3.7 Schwämme

Die Exemplare des in dieser Arbeit untersuchten Schwamms *Suberites domuncula* wurden in der nördlichen Adria bei Rovinj (Kroatien) in einer Tiefe von 20-30 m gesammelt. Nach Überführung in die Aquarien der Arbeitsgruppe von Prof. W. E. G. Müller des Institutes für Physiologische Chemie wurden sie bei 16°C in belüftetem, künstlichem Seewasser gehalten.

3.8 Genomische DNA-Bank (*Suberites domuncula*)

Die hier verwendete cDNA-Bank war von Herrn Dr. Kruse aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. E. G. Müller am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie in den ZAP Express™-Vektor (Stratagene, Heidelberg) kloniert worden.

3.9 Vektoren

pBK-CMV-Vektor	STRATAGENE, La Jolla, USA
pQE-30	QIAGEN GmbH, Hilden

3.10 Primer

3.10.1 Vektorspezifische Primer

T3:	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'	T _m : 60,0°C
T7:	5'-GTA ATA CGA TCC ACT ATA GGG C-3'	T _m : 64°C
Typelll/IV:	5'-CGG ATA ACA ATT TCA CAC AG-3'	T _m : 65°C
pQErV:	3'-GTT CTG AGG TCA TTA CTG G-5'	T _m : 64°C

3.10.2 Genspezifische Primer für Silicatein- α aus *Suberites domuncula*

Forward-Primer:

5'-GGATCCGACTACCCTGAAGCTGTAGACTGGAGAAC-3' T_m: 106°C

Reverse-Primer:

5'-AAGCTTTTATAGGGTGGGATAAGATGCATCGGTAGC-3' T_m: 162°C

3.11 Antikörper

Anti-Silicatein-Antikörper (rabbit) PoAb-aSILIC
(AG Prof. W.E.G. Müller, Universität Mainz)

Cy3-konjugierter F(ab')₂ anti-rabbit IgG-Antikörper (goat)
(JACKSON IMMUNORESEARCH, Cambridgeshire, UK)

AP-konjugierter anti-rabbit IgG-Antikörper (goat)
(SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen)

3.12 Bakterienkulturmedien

LB-Medium

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

LB-Agar

10	g/l	Trypton
5	g/l	Hefeextrakt
5	g/l	NaCl
15	g/l	Agar
x	ml	NaOH (pH7)

Die Kulturmedien wurden in einem Liter Endvolumen *Aqua bidest.* angesetzt und autoklaviert. Den Medien konnten bei Bedarf verschiedene Antibiotika sowie Natrium-Metasilicat zugesetzt werden.

4 METHODEN

4.1 Hälterung der Schwämme

Die Meeresschwämme der Spezies *Suberites domuncula* (Demospongiae, Hadromerida) wurden in der nördlichen Adria bei Rovinj (Kroatien) gesammelt und in einer mit Meerwasser gefüllten Kühlbox nach Mainz transportiert. Dort wurden sie in ein Aquarium überführt und in artifiziellem Seewasser (hergestellt aus dem Meeressalz "Tropic Marin", Dr. Biener GmbH, Wartenberg) bei 16 °C gehalten. Zweimal pro Woche wurden die Schwämme durch Zugabe von 4 ml Phytoplankton gefüttert. Zusätzlich wurde dem Wasser zweimal pro Monat Vitamine und Spurenelemente zugesetzt. *Suberites domuncula* lebt in Symbiose mit dem Einsiedlerkrebs *Paguristes oculatus*. Dieser wurde zweimal pro Woche mit gefrorenen *Artemia salina* gefüttert. Die spezifische Dichte des Wassers wurde regelmäßig auf einen Wert von ca. 1,028 g/ml eingestellt.

4.2 Bakterienkultur

4.2.1 Kultivierung von Bakterien

Zum Inokulieren (Animpfen) von Flüssigmedium mit *E. coli* wurde dieses entweder mit Bakteriensuspension aus einem Glycerolstock (s. 4.2.2) oder mit einer von einer Agarplatte gepickten Kolonie versetzt. Sofern die Bakterien bereits mit einem Plasmid transformiert waren, welches eine Ampicillin-Resistenz vermittelte (z. B. pQE), wurde dem Medium das entsprechende selektierende Antibiotikum zugefügt (100 µg/ml), damit nur die gewünschten Bakterienstämme heranwachsen. Bakterienzellen, die bereits mit dem Plasmid pBK-CMV transformiert waren, wurden dagegen in kanamycinhaltigem Medium okuliert. Anschließend wurde die Kultur über Nacht bei 37°C und mit 250 rpm (*rounds per minute*) schüttelnd unter ausreichender Sauerstoffzufuhr inkubiert.

Zur Inkubation von Bakterien auf Agarplatten wurde dem LB-Medium Agar Agar zugesetzt. Die Inkubation erfolgte unter gleichen Bedingungen in einem Brutschrank, allerdings ohne Schütteln.

4.2.2 Kryokonservierung von Bakterien

Zur Langzeitaufbewahrung von Bakterienzellen (Bakterienstocks) wurde eine Übernachtskultur in einem 2 ml Reaktionsgefäß im Verhältnis 2:1 mit einer sterilisierten 1:1-Mischung aus LB-Medium und Glycerol 96% (V/V) versetzt. Die so hergestellte Dauerkultur wurde bei -80°C gelagert. Der Glycerolanteil schützt die Zellen dabei vor einer eventuellen Schädigung.

4.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zum Studium des Wachstums einer Bakterienkultur wurde die Lichtabsorption der Bakterienzellen im Medium gemessen. Hierzu wurde die entsprechende Bakterienkultur in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ und einem Lichtweg von 1 cm durchstrahlt und anschließend die Absorption des Lichtes durch die Bakterienkultur ermittelt. Eine Einheit dieser als Optische Dichte (OD) bezeichneten Größe entspricht bei *E.coli* einer Zellzahl von etwa $0,8 \times 10^9$ je ml (Brown, 2002). Für die Messung der optischen Dichte wurde ein Spektralphotometer benutzt und dabei ein Aliquot der Suspensionskultur 1:10 verdünnt und in einer 100 μl Mikrogasküvette gemessen.

4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*)

4.3.1 Standard-PCR

Die von Kary B. Mullis 1987 entwickelte Methode der PCR wird zur selektiven Vervielfältigung eines beliebigen DNA-Abschnitts eingesetzt, wobei als Voraussetzung die Enden dieser Sequenz bekannt sein müssen (Saiki *et al.*, 1988). Zu Beginn hybridisieren zwei kurze Oligonucleotide, die so genannten Primer, mit jeweils einem der beiden DNA-Stränge, um dann, meist durch die DNA-Polymerase I aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase), verlängert zu werden. Die Primer begrenzen den zu vervielfältigenden Abschnitt. Die so neu synthetisierte doppelsträngige DNA wird danach durch Temperaturerhöhung denaturiert, neue Primer können angelagert und der Prozess wiederholt werden. Dadurch, dass zwei Primer benutzt werden, jeweils für den *sense*- und *antisense*-Strang, erhält man mit jedem Zyklus der Synthese und Denaturierung eine Verdopplung des durch die Primer flankierten DNA-Abschnittes. Es handelt sich um eine exponentielle Amplifikation bei der die neu gebildeten Stränge wiederum als Matrize zur Verfügung

stehen. Die PCR besteht aus mehreren Schritten, die nach einem initialen fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 95°C zwischen 20 und 35 mal zyklisch wiederholt werden. Die gewünschte Sequenz liegt danach in 2^{30-35} Kopien vor. Folgende Schritte laufen nacheinander ab:

1. Denaturierung:

Durch Temperaturerhöhung auf 95°C wird die doppelsträngige Ausgangs-DNA in zwei Einzelstränge zerlegt, die als Matrize dienen.

2. Annealing:

Spezifische Primer (SP1 und SP2) hybridisieren bei spezifischer Schmelztemperatur T_m mit der komplementären Zielsequenz der DNA und flankieren somit den zu amplifizierenden Bereich.

3. Elongation:

Bei 72°C synthetisiert die *Taq*-Polymerase von den Primern ausgehend in 5'→3'-Richtung die beiden neuen cDNA-Stränge. Die *Taq*-Polymerase besitzt eine Polymeraseaktivität von 1000 nt/min. Die Elongationsdauer ist abhängig von der Größe der zu amplifizierenden Sequenz.

Nach dem Zyklus heftet die *Taq*-Polymerase in einem 10-minütigen terminalen Elongationsschritt ein einzelnes Adenosin an die 3'-Enden der PCR-Produkte, was bei einer eventuell nachfolgenden Ligation hilfreich ist.

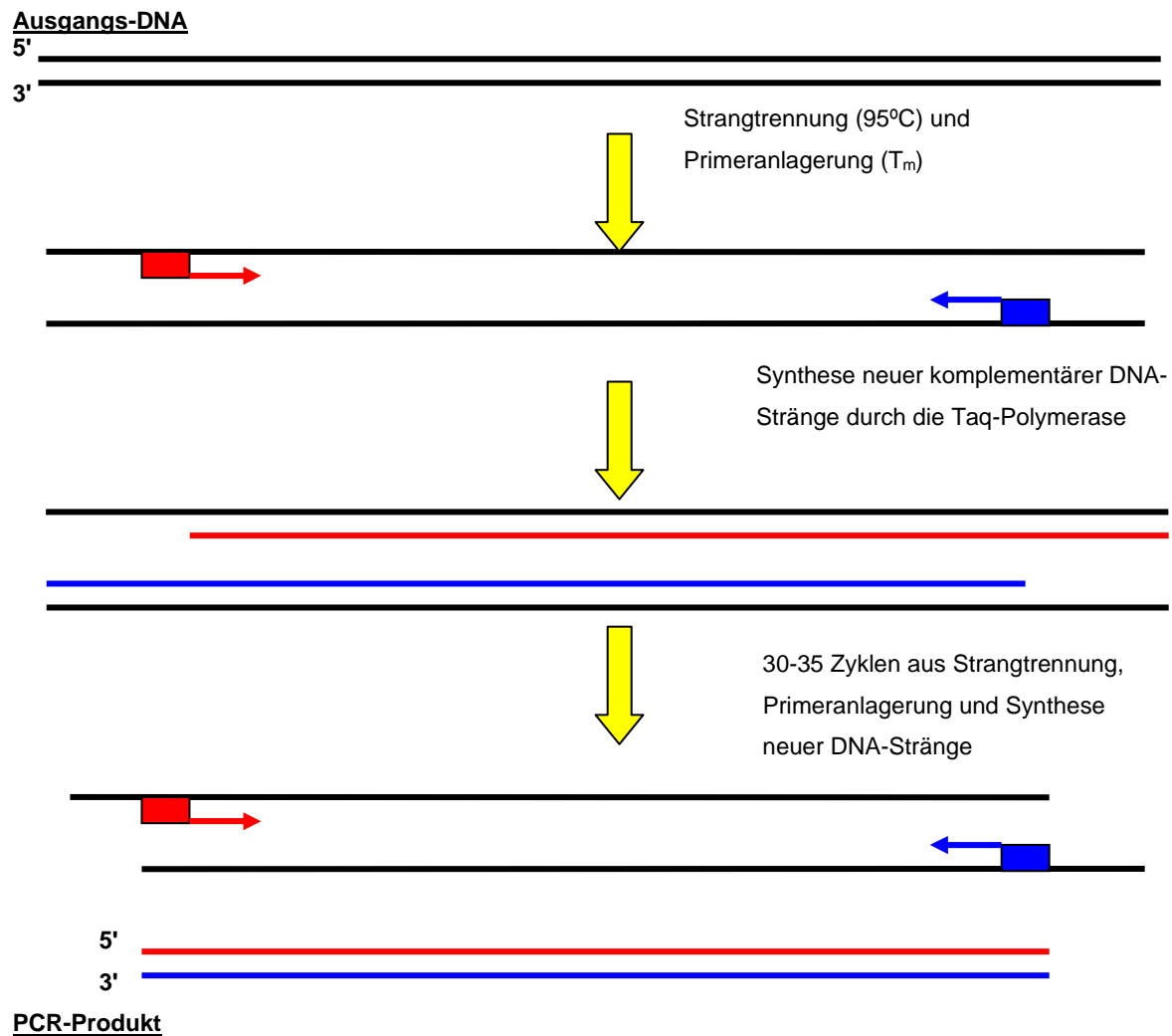


Abb. 8: Vereinfachte Darstellung einer PCR. Zunächst erfolgt bei 95°C für 30 sec. die Denaturierung des DNA-Doppelstranges. Anschließend erfolgt die Anlagerung (*Annealing*) der genspezifischen Primer (**GSP1** und **GSP2**) bei entsprechender T_m innerhalb von 30 sec. Die Synthese der neuen DNA-Stränge (*Elongation*) beginnt an den Primern und erfolgt durch die Taq-Polymerase bei 72°C für 1min/1 kb. Danach folgt ein Zyklus (30-35 x) einschließlich Denaturierung, Primeranlagerung und Neusynthese von DNA. Ein optimaler, terminaler Elongationsschritt von 10 min bei 72°C dient der Inaktivierung der Taq-Polymerase und dem Anheften eines einzelnen Adenosins an die jeweiligen 3'-Enden der PCR-Produkte.

Durch die Wahl geeigneter Primer können somit spezifisch bestimmte DNA-Bereiche amplifiziert werden. Das Amplifikationsprodukt kann im Anschluss mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Die PCR ist eine schnelle, einfache und sehr sensitive Methode, die für viele Anwendungen eingesetzt werden kann.

4.3.2 Primerdesign: Synthese sequenzspezifischer Primer

Als Primer werden kurze Oligonukleotide bezeichnet, die aufgrund ihrer komplementären Sequenz zum entsprechenden Matrizenstrang hochspezifisch an die zu amplifizierende DNA bzw. RNA binden und somit als Startpunkt für die Polymerase dienen. Sie stellen einen Adapter dar, mit dessen Hilfe Nukleinsäuren spezifisch amplifiziert, sequenziert oder markiert werden können. Für den Erfolg eines PCR-Experiments, gemessen in Spezifität und Sensitivität, ist das Design der Primer entscheidend. Bei der Ermittlung geeigneter Primersequenzen sind mehrere Parameter zu beachten:

Die Primerlänge beträgt im Schnitt 18-30 Basen, der Anteil an den Basen Guanidin und Cytosin (G+C) sollte zur Erhöhung der Hybridisierstabilität 40-60% betragen. Es dürfen nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander enthalten sein, um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen (*frame shifts*) zu vermeiden. Ein bis zwei Guanidin oder Cytosin am 3'-Ende ermöglichen eine bessere Bindung und somit Elongation, da diese drei Wasserstoffbrücken ausbilden. Allerdings besteht die Gefahr der Stabilisierung fehlhybridisierender Primer und folglich die Bildung unspezifischer PCR-Produkte, falls sich mehr als drei Guanidin oder Cytosin am 3'-Ende befinden (Rychilk und Rhodes, 1989; Rychilk, 1995). Des Weiteren sollten so wenig verwandte Sequenzen wie möglich in der *template*-DNA vorhanden sein, um die Gefahr der Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte möglichst gering zu halten. Allerdings sollte die *template*-DNA auch nicht zu komplex sein, da sonst leicht Artefakte amplifiziert werden. Die Annealingtemperatur sollte daher so hoch wie möglich gewählt werden. Allerdings sinkt mit steigender Temperatur aufgrund sinkender Annealingwahrscheinlichkeit die Ausbeute. Auf keinen Fall dürfen sich interne Sekundärstrukturen wie Haarnadeln (*hair pins*) bilden, weil diese die Hybridisierungswahrscheinlichkeit der Primer mit der *template*-DNA reduzieren (Rychilk und Rhodes, 1989; Saiki, 1988, Rychilk, 1993). Auch sollten die Primer nicht mit sich selbst hybridisieren können und sollten daher an ihren 3'-Enden möglichst gering komplementär sein, da die entstehenden Primerdimere die Menge verfügbarer Primer und folglich die Menge der Ausbeute reduzieren würden. Ebenso sollten die Primer so rein wie möglich sein. Ihre Schmelztemperatur (T_m , Temperatur, der der 50% der Primer mit der Zielsequenz dimerisieren) sollte nur geringfügig voneinander abweichen und wurde, für Primer, die aus bis zu 25 Basen bestehen, wie folgt berechnet (Thein et al. 1986)

$$T_m = [(C + G) \times 4 + (A + T) \times 2] - 4$$

Die Annealingtemperatur T_a berechnet man nachfolgend nach dieser Formel:

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

4.3.3 Isolation des Gens für Silicatein- α aus einer cDNA-Bibliothek mittels PCR

Die Spezifität der PCR macht es möglich, aus einer cDNA-Bank gewünschte DNA-Sequenzen gezielt zu amplifizieren und anschließend zu isolieren. Die cDNA-Bank von *Suberites domuncula* wurde von Herrn Dr. Kruse der Arbeitsgruppe W.E.G. Müller am Institut für Physiologische Chemie der Universität Mainz in den ZAP Express™-Vektor (Stratagene, Heidelberg) einkloniert (Kruse M. et al., 1997). Das in dieser Arbeit verwendete Silicateingen wurde auf diese Weise erhalten. Hierfür wurden ein genspezifischer Primer und ein vektorspezifischer Primer verwendet. Auf diese Weise war es möglich, dass jeweils das 5'-Ende oder das 3'-Ende der in den Vektor einklonierten cDNA vervielfältigt werden.

Durchführung der PCR:

In ein 0,2 ml Reaktionsgefäß wurden unter Sterilbank pipettiert:

10 x Puffer	5,0 μl
cDNA-Bank <i>S. domuncula</i>	2,0 μl
dNTP-Mix	2,5 μl
Primer 1	2,5 μl
Primer 2	2,5 μl
Taq-Polymerase	0,5 μl
<i>A. bidest.</i>	<u>35,0 μl</u>
Gesamtvolumen	50,0 μl

Die PCR wurde anschließend in einem Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<u>Denaturierung:</u>	95°C,	5 min
<u>Annealing:</u>	95°C,	30 sec.
	$T_m - 2^\circ\text{C}$,	30 sec.
	72°C, X min →	<u>30-35 Zyklen</u>
<u>Elongation:</u>	72°C,	10 min
	4°C,	∞

Danach wurde eine Agarosegelelektrophorese (s. 4.5.1) durchgeführt, um das Ergebnis zu kontrollieren.

4.3.4 PCR mit Vektorprimern (*Checking-PCR*)

Mit Hilfe der *Checking-PCR* wird geprüft, ob ein Insert in einem Plasmid bzw. ein Fragment in Bakterienzellen vorhanden ist und welche Größe es hat. Zur Durchführung werden neben der *template*-DNA und den beiden genspezifischen Oligonukleotidprimern ein Gemisch der vier Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), eine hitzestabile DNA-Polymerase (hier: *KOD XL*-Polymerase, isoliert aus *Thermococcus kodakaraensis*) sowie die vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer benötigt. Sofern dieser kein MgCl_2 enthält, ist es zum Reaktionsansatz hinzuzugeben, um die Reaktion zu optimieren. Es wurden hier vektorspezifische Primer (T3 bzw. T7) benutzt, die die Insertionsstellen flankieren. Als DNA-Matrize wurden hier Bakterienzellen eingesetzt, die nach der Transformation mit dem Silicateingen (s. 4.7) auf Selektionsplatten (s. 4.7.1) gewachsen waren.

Die benötigten Komponenten wurden in angegebener Reihenfolge in die entsprechende Menge *Aqua bidest.* pipettiert.

Reaktionsansatz (30 µl):

3	µl	10 x Polymerase-spezifischer Puffer
3	µl	10 mM dNTPs
1	µl	10 pmol Primer T3 bzw. T7
1	µl	10 pmol Primer SilB <i>forward/reverse</i>
		Bakterienzellen (mit Pipettenspitze von Selektionsplatten entnommen)
1	U	KOD XL-Polymerase
x	µl	<i>Aqua bidest.</i> zu 30 µl auffüllen.

PCR-Reaktion:

Zyklus 1	95°C, 1 min	Initialdenaturierung der Ausgangs-DNA
Zyklus 2-36	95°C, 20 sec	Denaturierung
	45°C, 15 sec(T_m)	Primer- <i>Annealing</i> (abh. von Primern)
	70°C, x sec	Elongation (abh. von Fragmentgröße)
Zyklus 37	70°C, 10 min	Konstruktion von 3'-A-Ende n

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurde ein Teil des PCR-Produktes einer Gelelektrophorese unterzogen.

4.3.5 Subklonierung mittels PCR

Sofern es sich bei der DNA, die mit Hilfe der PCR aus einer cDNA-Bank amplifiziert wurde, nur um ein Fragment der gesuchten Sequenz handelt, wird nach folgendem Schema vorgegangen: Nach der Ligation des Fragments in einen Vektor (s. 4.6.2), der folgenden Transformation von *E. coli* mit diesem Konstrukt (s. 4.7), der anschließenden Plasmidisolation (s. 4.4.3) und der nachfolgenden Sequenzierung des Inserts müssen neue Primer komplementär zu den Enden der analysierten Sequenz designt werden, damit die noch unbekannt Bereiche über das sog. *primer-walking* aus der cDNA erhalten werden können. Hierfür wurde ein genspezifischer Primer zusammen mit einem universellen Primer, der sich von der Vektorsequenz in der Nähe der Klonierungsstelle ableitet, eingesetzt.

4.4 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

4.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Je nach Weiterverwendung muss DNA von störenden Verunreinigungen wie z.B. Primern, Nukleotiden, Enzymen etc. befreit werden. Hierzu wurde das NucleoSpin[®]Extract 2 in 1: Purification of PCR products-Kit der (Machery-Nagel) eingesetzt. Auch hier waren alle benötigten Materialien und Puffer beinhaltet. Die Reinigung der Fragmente erfolgt durch Bindung der DNA an Silicagelpartikel einer Säule. Nach Waschschritten und Elution wurde die DNA in Puffer aufgenommen. Die Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des verwendeten Kits.

4.4.2 Extraktion aus Agarosegelen

Eine weitere Möglichkeit, PCR-Produkte aufzureinigen, ist deren Extraktion aus dem Agarosegel. Nach einer Gelelektrophorese (s. 4.5) können aufgetrennte DNA-Fragmente wieder zurückgewonnen werden. Dies kann z.B. mittels der Glasfaser-Fleece-Methode mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche) erfolgen. Nach der Elektrophorese wurde das gewünschte DNA-Fragment für max. 10 min mit Ethidiumbromid gefärbt und dann mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten. Zusammen mit 300 µl Bindepuffer pro 100 mg Gel wurde alles für 10 Minuten auf 60°C erwärmt und wiederholt gevortext. Durch das Schmelzen des Gels wurde das DNA-Fragment aus der Matrix freigesetzt. Die erhaltene Lösung wurde auf die Glasfasersäule gegeben und der Bindepuffer abzentrifugiert. Die DNA haftete nun an der Glasfasersäule und konnte mit ethanolhaltigem Waschpuffer gereinigt und nachfolgend mittels Elutionspuffer von der Säule entfernt und bei -20°C gelagert werden.

4.4.3 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung und Aufreinigung von max. 15 µg Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde das High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) verwendet. Die Zellen wurden zunächst alkalisch lysiert und mittels RNase A die bakterielle RNA entfernt. Anschließend wurden bakterielle Zellfragmente und Proteine präzipitiert und mittels Zentrifugation gefällt. Die Plasmid-DNA im Überstand wurde durch Anwesenheit von chaotropem Guanidin-Hydrochlorid an die Glasfasern der Säule gebunden. In nachfolgenden Wasch- und Zentrifugationsschritten wurde die DNA von

Verunreinigungen befreit und eluiert. Die Plasmide konnten direkt weiterverarbeitet werden, z.B. für eine Sequenzierung. Für die genaue Vorgehensweise siehe Protokoll des Kits.

4.4.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Ermittlung von Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden UV-Absorptionsmessungen durchgeführt. Die Extinktion (Ausmaß der Absorption) der elektromagnetischen Strahlung ist hierbei proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz und der zu durchlaufenden Schichtdicke (Wilson und Goulding, 1991). Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte spektrophotometrisch bei deren Absorptionsmaximum (260 nm). Bei einer Extinktion von 1 geht man von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Verdünnungsfaktor beachten), 40 µg/ml RNA und 33 µg/ml Oligonukleotid aus. Für reine DNA bzw. RNA gilt hier ein Verhältnis von E_{256}/E_{280} von ca. 1,8-2,0 bzw. 1,9-2,0 (Brown 2002). Verunreinigungen wie Proteine, die u.a. aus aromatischen Aminosäuren bestehen, haben die Eigenschaft, ebenfalls bei 280 nm zu absorbieren und verringern daher die o.g. Quotienten.

4.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

4.5.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Bei der Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren im elektrischen Feld aufgetrennt, indem diese aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen reziprok proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts zur Anode wandern (Helling, et al., 1974; McDonnell und Studier, 1977). Als Trägermaterial dient ein inertes, elektrisch neutrales Agarosegel. Das Polysaccharid Agarose wird aus Rotalgen gewonnen. In seiner Struktur alternieren jeweils D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactosereste. Durch Aufkochen in Puffer wird die Agarose gelöst und in einen Gelschlitten gegossen. Beim Abkühlen geliert diese, wobei sich Doppelhelices ausbilden, die sich parallel zu Fäden zusammenlagern. Ein 1%-iges Agarosegel hat eine Porengröße von ca. 150 nm (Schrimpf, 2002). Eine Änderung der Agarosekonzentration beeinflusst den Molekularsiebeffekt des Gels. Die Beweglichkeit geladener Moleküle wird zusätzlich vom pH-Wert, der Ionenstärke und Temperatur des Puffers sowie der elektrischen Feldstärke beeinflusst.

Die Agarosekonzentration wurde entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente gewählt. Größtenteils wurden 1%-ige, ca. 0,4 cm dicke Gele verwendet, die sich zur Trennung von Fragmenten zwischen 500 und 10.000 bp eignen. Die Agarose wurde mit der entsprechenden Menge an 1 x TAE-Puffer (bei langen Fragmenten) bzw. TBE-Puffer (bei kürzeren Fragmenten) aufgekocht. Nach Abkühlen auf 55°C wurde die Suspension luftblasenfrei in einen Gelschlitten mit Kamm zur Formung der Taschen gegossen. Das gelierte Gel wurde nach Entfernen des Kamms in einer Laufkammer platziert und mit 1 x TAE-Puffer (bzw. TBE-Puffer) überschichtet. Die Proben und der zur Größenbestimmung benötigte Marker wurden mit Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Der Probenpuffer enthielt Saccharose, um ein schnelles Absinken der DNA in die Taschen zu bewirken und Bromphenolblau, das eine Farbfront während des Gellaufs erzeugte. Die angelegte Spannung war abhängig von der Gelgröße und betrug 1 V/cm Gellänge. Der Lauf wurde gestoppt, wenn die Bromphenolblaufront des Probenpuffers, die sich auf gleicher Höhe mit ca. 300 bp großen DNA-Molekülen bewegt, etwa 4/5 der Gellänge zurückgelegt hatte.

<u>Laufpuffer 1 x TBE</u>		<u>6 x Probenpuffer</u>	
Tris-HCl	10,78 g/l	Bromphenolblau	0,25%
Borsäure	5,50 g/l	Saccharose (w/v)	40,0%
EDTA	0,74 g/l	in <i>Aqua bidest.</i>	
in <i>Aqua bidest.</i>			

4.5.2 Detektion aufgetrennter DNA mittels Ethidiumbromid bzw. SYBRTM green und halbquantitative Konzentrationsbestimmung

DNA-Fragmente, die in Agarosegelen aufgetrennt wurden, können mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen einzelne Basenpaare von Nukleinsäuren. Wird mit Licht einer Wellenlänge von 254-300 nm bestrahlt, erfolgt eine Lichtemission durch den DNA-Ethidiumbromidkomplex bei 590 nm als rot-orange leuchtende Banden (Crawford und Waring, 1967). Die Intensität der Fluoreszenz ist der DNA-Konzentration proportional, wobei die Mindestmenge für eine Detektion ca. 5 ng DNA beträgt. Durch Mitauftragen eines DNA-Molekulargewichtsstandards, der DNA-Fragmente in unterschiedlicher, bekannter Konzentration enthielt, konnte eine quantitative

Abschätzung der DNA-Fragmente erfolgen. Mit Hilfe eines Geldokumentationssystems konnten die Gele mit den fluoreszierenden Banden fotografiert werden. Die Agarosegele wurden je nach Dicke für 10-15 min in eine Ethidiumbromidlösung gelegt, welche 0,02% (w/v) Ethidiumbromid in TBE-Puffer enthielt.

In Fällen, in denen nur sehr geringe Mengen an DNA vorlagen, wurde auch der Cyaninfluoreszenzfarbstoff *SYBRTM green* verwendet. Dieser interkaliert hochspezifisch in doppelsträngige DNA und ist bis zu 8-fach sensitiver als Ethidiumbromid, daher können auch sehr geringe Mengen DNA sichtbar gemacht werden (Vitzthum et al., 1999). *SYBRTM green* wird optimal durch Licht der Wellenlänge 492 nm angeregt und emittiert bei 519 nm. Die Färbelösung bestand aus 10 µl *SYBRTM green* 10 000 x in DMSO in 100 ml *Aqua dest.*

4.6 Herstellung des Expressionskonstruktes (*E. coli pQE-30-plus-silicatein/ E. coli pQE-30-minus-silicatein*) durch Klonierung der Ziel-DNA-Sequenz in einen Expressionsvektor

Im Folgenden wird das Klonieren der Zielsequenz (Silicatein-α) in den Expressionsvektor beschrieben. Das nachfolgende Schema skizziert die Vorgehensweise. Der Vektor wird mittels Restriktionsverdau geschnitten und nachfolgend gereinigt. Das vorbereitete DNA-Insert wird durch Ligation in den Vektor eingebracht und im Anschluss in die kompetenten *E. coli* M15-Zellen transformiert. Ein Schema der Transformation befindet sich auf der nachfolgenden Seite.

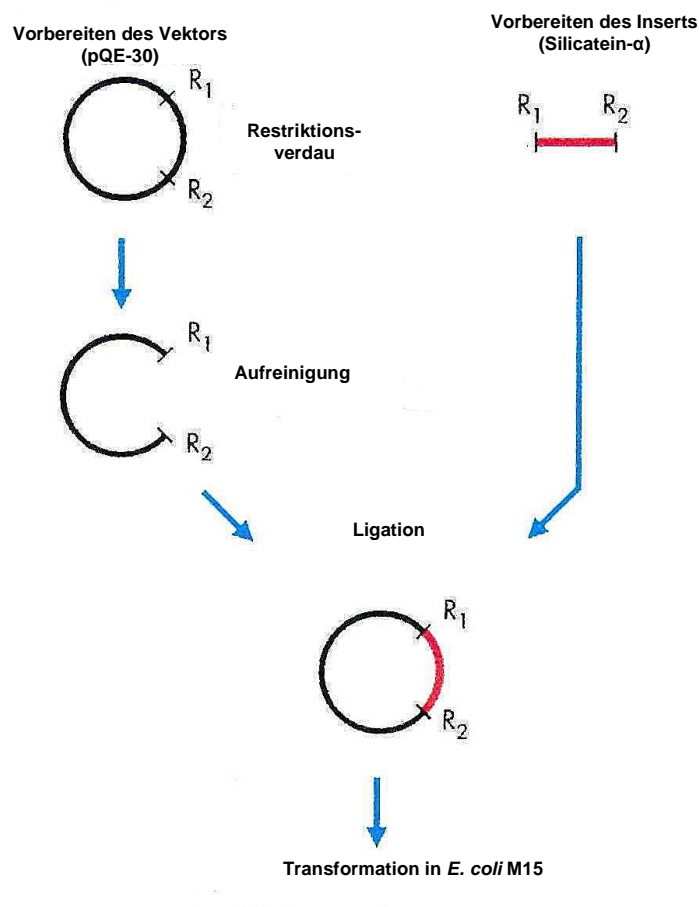


Abb. 9: Schema der Transformation des Silicatein- α -Gens in den Expressionsvektor pQE-30. Nach dem Restriktionsverdau des Vektors erfolgt die Aufreinigung und die Ligation mit dem Silicateingen, bevor der Vektor dann in die Bakterienzellen transformiert wird.

4.6.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen (Restriktionsverdau)

Für viele Experimente ist es nötig, DNA zu schneiden, beispielsweise zur Überprüfung, ob eine Ligation (s. 4.6.2) erfolgreich war oder zur Vorbereitung von Insert und Vektor vor einer Ligation. Hierzu bedient man sich der Restriktionsendonukleasen. Restriktionsenzyme sind ein natürlicher Abwehrmechanismus von Bakterien gegen fremde/virale DNA und haben sich mittlerweile zu einem der Hauptinstrumente der Gentechnologie entwickelt. Sie schneiden DNA an spezifischen Stellen durch Lösen der Phosphodiesterbindungen. Diese Restriktionsschnittstellen sind für jedes Enzym spezifisch, bestehen aus vier bis acht Basenpaaren und sind meist palindromisch (Nathans und Smith, 1975). Viele Enzyme schneiden die DNA in beiden Strängen an der gleichen Stelle, so dass glatte, so genannte *blunt ends* entstehen. Andere wiederum schneiden versetzt, so

dass kurze, überhängende Einzelstranganschnitte, so genannte *sticky ends* resultieren. Viele Vektoren enthalten *multiple cloning sites*, Bereiche mit einer hohen Dichte von Restriktionsschnittstellen. Meist schneidet man den Vektor mit zwei Enzymen an einer solchen Stelle. Dabei entstehen *sticky ends*, welche die Ligation des Vektors mit einem DNA-Fragment ermöglicht, welches die gleichen kohäsiven Enden aufweist. Die Wahl der Restriktionsenzyme ist sowohl vektor- als auch insert-abhängig. Es sollten immer solche Enzyme ausgewählt werden, die bei gleichen Pufferbedingungen arbeiten.

Reaktionsansatz (Endvolumen 30 µl):

x	µl	DNA (200-300 ng)
2	µl	10 x Puffer, enzyspezifisch
1	µl	Restriktionsenzym 1 (10 U)
1	µl	Restriktionsenzym 2 (10 U)
x	µl	<i>Aqua bidest.</i>

Der Reaktionsansatz wurde mindestens 1 h (höchstens 2 h) bei 37°C inkubiert und danach bei 65°C für 10 min denaturiert (inaktiviert). Anschließend wurde der Ansatz einer Agarosegelelektrophorese und nachfolgender Aufreinigung (s. 4.4.3) unterzogen.

4.6.2 Ligation von DNA

Als Ligation bezeichnet man das Verknüpfen zweier DNA-Moleküle, z.B. eines zu klonierenden DNA-Fragmentes mit einem Vektormolekül. Katalysiert wird diese Reaktion durch ein Enzym, welches aus dem Bakteriophagen T4 gewonnen wird (T4-DNA-Ligase). Ligasen sind in der Zelle für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zuständig. Sie bilden zwischen einer freien Hydroxygruppe am 3'-Ende der einen und der Phosphatgruppe am 5'-Ende der anderen DNA-Kette eine Phosphodiesterbildung aus, was sie auch zur Verknüpfung von DNA unterschiedlichen Ursprungs befähigt. In der Molekularbiologie geht der Ligation eine PCR voraus, bei der die terminale Transferase-Aktivität der *Taq*-Polymerase von Bedeutung ist. Durch sie wird an das 3'-Ende des erhaltenen DNA-Fragments ein einzelnes Nukleotid angehängt, welches aufgrund der hohen Affinität der Polymerase zu 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP) in der überwiegenden Mehrzahl ein

Adenylat ist (Clark, 1988). Durch Inkubation des gewünschten DNA-Fragments mit einem Vektormolekül, welches an den jeweiligen Enden ein Thymidin enthält, wird durch die Ligase eine T-A-Ligation ermöglicht. Die resultierenden rekombinanten Vektormoleküle können anschließend durch Bakterientransformation vervielfältigt werden, um in hoher Kopienzahl zur weiteren Verwendung zur Verfügung zu stehen. Für Ligationen wurde das *pQE-30-Vektor-System* (Expressionsvektor) von Qiagen verwendet:

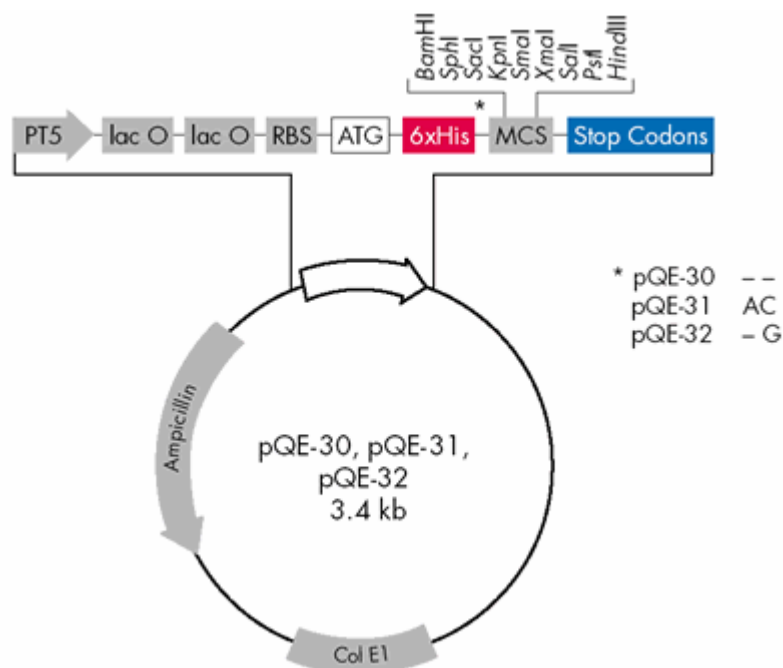


Abb. 10: Der verwendete pQE-30 Vektor (Quelle: Qiagen, *The QIAexpressionist* 06/2003, 5. Edition, Seite 33).

Für die Ligation sollten möglichst äquimolare Mengen der Reaktionspartner eingesetzt werden, und eine Selbstligation des Vektors bzw. des zu klonierenden Fragmentes zu vermeiden. Die Wahl des Vektors hing von der weiteren Verwendung ab. Alle Komponenten wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben. Bei linear gelieferten Vektoren wird der im Kit vorhandene Ligationspuffer mit dazugehöriger Ligase benutzt.

Ligationsansatz

1	µl	10 x T4-DNA-Ligasepuffer
7	µl	DNA
1	µl	Vektor (50 ng)
1	µl	T4-Ligase (1U)

Der Ansatz wurde ü.N. bei 4°C inkubiert und direkt ohne weitere Behandlung in der Transformation weiterverarbeitet. Eine Inkubation bei 65°C für 10 Minuten inaktivierte das Enzym.

4.7 Transformation

In der Natur kann DNA in Bakterien sowohl durch Konjugation, Transduktion und Infektion, aber auch durch direkte Aufnahme (Transformation) übertragen werden (Hanahan, 1983). In der Gentechnik wird diese Methode genutzt, um beispielsweise artifizielle Plasmide zu vervielfältigen. Heutzutage bezeichnet Transformation die Aufnahme aller DNA-Moleküle durch Bakterienzellen, unabhängig von Typ der Zelle und ob die Zelle durch diesen Prozess nachweisbar verändert wird (Brown, 1996). Plasmide werden in Zellen eingeschleust und dann vervielfältigt, sofern der Replikationsursprung erkannt wird. Die meisten Bakterienzellen nehmen Fremd-DNA *in vivo* nur begrenzt auf (Infektion, Konjugation), daher müssen die zu transformierenden Zellen zuerst physikalisch und danach chemisch behandelt werden, um für eine leichtere DNA-Aufnahme kompetent zu werden.

4.7.1 Transformationsansatz

Für alle Transformationen wurden kompetente *E. coli* M15-Zellen verwendet. Für jede Reaktion wurde ein Aliquot mit 50 µl kompetenten Zellen von -80°C direkt auf Eis überführt und 5 min aufgetaut. Kompetente Zellen sind extrem empfindlich und erfordern eine vorsichtige Behandlung, sie können z.B. nur durch vorsichtiges Klopfen am Reaktionsgefäß gemischt werden. Nachdem 2 µl Ligationsansatz zu jeweils 25 µl kompetenten Zellen gegeben wurde, wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock von 1 min bei 42°C und die sofortige 2-minütige Inkubation auf Eis ermöglichten die Aufnahme der DNA in die Bakterienzellen. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für 45 min bei 37°C und 250 rpm inkubiert und danach auf LB-Agarplatten, die 0,01%

Carbenicillin enthielten, ausplattiert, um diejenigen Zellen zu selektieren, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen haben. Die Platten wurden ü.N. bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle der Klone auf die Aufnahme des gewünschten Plasmids erfolgte wie beschrieben durch Überführung von Bakterienkolonien in 12 µl LB-Flüssigmedium mit 0,01% Carbenicillin und anschließender Plasmidpräparation, Restriktionsverdau und PCR.

Ligationsansatz:

4 µl aufgereinigtes PCR-Produkt

1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl₂)

1 µl pQE-30-Vektor

4.8 Expression von Silicatein in *E. coli*

Gene von Interesse lassen sich gezielt in Vektoren klonieren, die z.B. in Prokaryoten durch geeignete Promotoren die entsprechenden Proteine exprimieren. Als besondere Eigenschaft verfügen die verwendeten Vektoren über die Fähigkeit, an das C-terminale Ende des Proteins sechs Histidinreste anzufügen (6 x His-*tag*), was eine spätere Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie erlaubt. Man unterscheidet zwei Arten von Vektoren, die Unterschiede in ihren Regulierungsmöglichkeiten und der synthetisierten Proteinmenge aufweisen. Vektoren mit streng regulierten Promotoren (z.B. pBAD) schalten die Expression erst nach Zugabe des entsprechenden Induktors an und stellen geringe Proteinmengen her (*tight* regulierte Vektoren). Von Vorteil ist hierbei, dass die exprimierten Proteine meist löslich und somit funktionell aktiv bleiben (Lee 1980; Lee et al. 1987). Bei hochexprimierenden Vektoren (z.B. pQE-30, der in dieser Arbeit eingesetzt wurde) erfolgt eine Basalexpression auch ohne Zugabe eines Induktors (dies wird als *leaky* bezeichnet), um große Proteinmengen zu erhalten. Das hier exprimierte Silicatein- α wurde mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie nach Lyse der Zellen aufgereinigt, bevor es zur Herstellung polyklonaler Antikörper verwendet wurde.

4.8.1 Konstruktion des Expressionsklons

Die cDNA für das Gen Silicatein- α (Krasko et al., 2000) aus dem Schwamm *S. domuncula* (Porifera, Demospongiae, Hadromerida) wurde aus einer bereits vorhandenen cDNA-Bibliothek isoliert. Danach wurde das Gen mit Hilfe der

Restriktionsenzyme *Bam*HI (5′-Ende) und *Hind*III (3′-Ende) in den pBK-CMV-Vektor eingefügt. Das DNA-Segment innerhalb des offenen Leserahmens (*open reading frame*, ORF), das den Nukleotiden nt₃₆₇ bis nt₁₀₂₃ entspricht (Aminosäuren 113 bis 330 des „reifen“ Proteins der kurzen Form von Silicatein- α) wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (s. 4.3) unter Verwendung genspezifischer Primer isoliert, amplifiziert und aufgereinigt. Das 657 bp lange Stück wurde in den Expressionsvektor pQE-30 (Qiagen, Hilden, Deutschland) kloniert (s. 4.7). Dieser Vektor besitzt am 5′-Ende eine Polyhistidin-Region. Das Silicatein- α wurde in *E. coli* (M15) exprimiert, das aufgereinigte Protein hat eine Größe von 25 kDa. Mit Hilfe dieses rekombinanten Proteins konnten polyklonale Antikörper (PoAb-aSILIC) (Müller et al., 2005b) hergestellt werden.

MLVTVVVLGLLGFASAAQPKFEFVEEWQLWKSTHSMYESQLMELERHLTWLSNK
 KYIEQHNVNSHIFGFTLAMNQFGDLSELEYANYLGQYRIEDKKSGNYSKTFQRDPLQ
DYPEAVDWRKTGAVTAVKDQDGCASAFSAMGALEGANALAKGNAVSLSEQNID
CSIPYGNHGCHGGNMYDAFLYVIANEGVDQDSAYPFVVGKQSSCNYSKYKGTSM
GMVSIKSGSESDLQAAVSNVGPVSVVAIDGANSAFRFYYSYSGVYDSSRCSSSLNHAM
VVTGYGSYNGKKYWLAKNSWGTVNSGYVMMARNKYNQCGIATDASYPTL

Abb. 11: Von *Suberites domuncula* cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz für Silicatein. Transfiziert und exprimiert wurde der unterstrichene Bereich.

Als Kontrolle dienten M15 Bakterien, die ebenfalls mit dem pQE-30 Expressionsklon transformiert worden waren. Allerdings enthielt dieser Expressionsklon im Unterschied zu *E. coli pQE-30-plus-silicatein* den pQE-30-Vektor ohne Silicateingen: *E. coli pQE-30-minus-silicatein*.

4.8.2 Heterologe Expression von Silicatein- α in *E. coli*

Hierfür wurden zwei *E. coli* M15-Stämme, die jeweils mit dem pQE-30-Vektor transformiert worden waren, eingesetzt. Einmal enthielt der Vektor das Gen für Silicatein und einmal nicht (Kontrolle). Jeweils 1 ml einer Übernachtskultur des Expressionsklons

E. coli pQE-30-plus-silicatein und der Kontrolle *E. coli pQE-30-minus-silicatein*

wurden in 50 ml LB-Medium mit 20 µg/ml Carbenicillin bei 37°C im Schüttelinkubator (160 rpm) kultiviert, bis die log-Phase ($OD_{600} = 0,55$) erreicht war. Die Expression des Fusionsproteins wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und für bis zu 5h bei gleich bleibenden Bedingungen fortgeführt. Jeweils nach 1h, 2h, 3h, 4h und 5h wurden Proben (20 ml) entnommen. Ebenso wurde direkt nach Zugabe von IPTG wurde eine Probe (20 ml) entnommen ($=t_0$ vor Expression) und bei -20°C gelagert, bis sie parallel zu den Proben nach Expression weiter verarbeitet werden konnte (s.u.). Zusätzlich wurden bei einigen Proben dem Medium 60 µM Natriumsilicat hinzugefügt.

Es wurden vier verschiedene Ansätze wie oben beschrieben hergestellt:

1. *E. coli pQE-30-plus-silicatein* + 60 µM Natriumsilicat
2. *E. coli pQE-30-plus-silicatein*
3. *E. coli pQE-30-minus-silicatein* + 60 µM Natriumsilicat
4. *E. coli pQE-30-minus-silicatein*

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation pelletiert (10.000 x g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet (3 g) wurde einmal mit PBS-Puffer mit pH 7,4 gewaschen und bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 25 ml Lysereagens BugBuster™ inklusive Benzonase und Proteinase-Inhibitor-Mix resuspendiert und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur lysiert. Nach der Lyse wurden die Proben zusätzlich mit Ultraschall behandelt (7 x 20 s) und waren dann für die Auftrennung mittels SDS-PAGE und alle weiteren Versuche bereit.

BugBuster™-Lyse-Mischung:

50 ml BugBuster™ Protein Extraction Reagent

15 µl Benzoase (Endonuklease)

1 Tablette Complete-Mini Proteinase-Inhibitor-Mix

4.9 Immuncytochemische Färbung von Zellen

Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht den Nachweis und die Lokalisierung spezifischer Proteine in Zellen. Das Prinzip dieser Technik beruht wie z.B. der *Western Blot* auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Bei der indirekten

Immunfluoreszenz detektiert ein Primärantikörper ein Antigen (hier: Silicatein- α) und wird wiederum von einem mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörper erkannt. Im Gegensatz zur Immunodetektion mittels Western-Blot (s. 4.12) ist der zweite Antikörper hier mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Nachdem dieser durch Licht entsprechender Wellenlänge angeregt wurde, emittiert der Fluoreszenzfarbstoff eine sichtbare Fluoreszenzstrahlung.

Zusätzlich zu dieser immunzytochemischen Methode ist es möglich, den Zellkern der Bakterienzellen durch Färbung der nuklearen DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol) sichtbar zu machen. DAPI bildet Komplexe mit doppelsträngiger DNA. Die Verbindung lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen (A: Adenin, T: Thymin) in der kleinen Furche der DNA an. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaner Farbe. In Verbindung mit doppelsträngiger DNA liegt das Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 358 nm, das Emissionsmaximum bei 461 nm.

Übernachtskulturen von *E. coli pQE-30-plus-silicatein* und *E. coli pQE-30-minus-silicatein* wurden in frisches LB-Medium transferiert und bei 37°C unter Zugabe von IPTG für 4 Stunden inkubiert. Danach wurden die Kulturen zweimal mit Minimalmedium gewaschen und zentrifugiert (10 min bei 5300 rpm, 4°C) und das Pellet danach direkt mit Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht, ohne vorher die Zellen mit EDTA, Triton X-100 oder Lysozym zu permeabilisieren. Die unpermeabilisierten Bakterien wurden auf Objektträger überführt und Proben zuerst mit Blockingreagenz aus 5% fettfreiem Milchpulver und 1,5% BSA inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in einer mit Parafilm abgedeckten Feuchtkammer für 3 h bei 4°C (PoAb-aSilic, 1:2000 Verdünnung in PBS). Nachfolgend wurden die Proben mit dem zweiten Antikörper (*Cy3-conjugated F(ab0)2 goat anti-rabbit IgG*, 1:2000) für 2h bei 37°C inkubiert. Zwischen allen Schritten wurden die Proben jeweils 5 min mit PBS gewaschen.

Parallel dazu wurden Präparate nach Inkubation mit beiden Antikörpern für 3 x 5 min mit PBS gewaschen und für 30 min mit 5 mg/ml DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindol, 5 μ g/ml in 0,3% BSA) im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt, um die DNA im Zellkern sichtbar zu machen. Nach der Inkubation erfolgte wieder ein 5-minütiger Waschschrift mit PBS. Um eine Austrocknung der Proben zu vermeiden, wurden die

Proben abgedeckt und die Deckgläser mit Nagellack verschlossen. Als Kontrolle dienten jeweils Antikörper, die mit rekombinantem Silicatein (Müller et al., 2005b) inkubiert wurden.

4.10 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die mikroskopische Auswertung der gefärbten Proben wurde mit einem Olympus AHBT3 Lichtmikroskop mit AH3-RFC Fluoreszenzlichtsystem durchgeführt (Filter G). Die präparierten Proben wurden mit Licht definierter Wellenlänge angeregt (546 nm), um die Fluoreszenzemission des Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpers bei 570 nm zu detektieren.

Die mit DAPI gefärbten Proben wurden unter blauem Fluoreszenzlicht (Filter U, Excitation bei 365 nm und Emission bei 450 nm) untersucht, um die DNA der Zellkerne darzustellen. Dieselben Areale auf dem Objektträger wurden zusätzlich mit Nomarski-Optik untersucht. Als Negativkontrolle diente Präimmunserum anstelle von Antikörpern. Die Aufnahmen wurden über eine angeschlossene CCD-Kamera digitalisiert und konnten mit der Software Olympus analySIS (V3.0) analysiert werden.

4.11 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Trennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichts (Laemmli, 1970). Proteine werden durch Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und das SDS lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an diese an. Dadurch erhalten die Proteine eine negative Nettoladung, welche proportional zu ihrem Molekulargewicht ist (Weber und Osborn, 1969). Sollten über Disulfidbrücken kovalent gebundene Proteinuntereinheiten vorhanden sein, werden diese durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol abgetrennt. Als Trennmatrix werden Polyacrylamidgele verwendet. Der prozentuale Anteil des Acrylamid/Bisacrylamid-Gemischs im Gel variiert je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine. Die zu verwendende Acrylamidkonzentration sinkt mit steigendem Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine.

4.11.1 Herstellung von Proteinextrakt aus *E. coli*-Zellen

Um Proteine aus Zellen und Geweben gelelektrophoretisch auftrennen zu können, muss man einen Proteinextrakt aus dem Probenmaterial herstellen. Arbeiten unter ständiger Kühlung sowie Zugabe von Proteinase-Inhibitoren und denaturierenden Agenzien verhindern den Proteinabbau durch endogene Proteasen.

Flüssige Bakterienkulturen nach Expression wurden bei maximaler Geschwindigkeit (10.000 x g, 5 min) zentrifugiert und das Pellet in 500 µl BugBuster™-Reagenz resuspendiert und 1 h bei Raumtemperatur lysiert. Diese Lösung stellt den Gesamtextrakt nach Expression dar und wurde für die Durchführung der SDS-PAGE verwendet. Zuvor wurde die Proteinkonzentration spektrophotometrisch nach Bradford bestimmt und ein Probenvolumen, das 50 µg Protein enthält, auf das Gel aufgetragen.

4.11.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde photometrisch nach Bradford (1976) gemessen. Das hierzu verwendete Roti-Quant® enthält Coomassie Brilliant-Blue R250, das drei Zustände annehmen kann: kationisch, neutral und anionisch, welche bei unterschiedlichen Wellenlängen absorbieren. Bindet ein Protein mit seinen basischen Aminosäuren, wird der Farbstoff in den anionischen Zustand überführt, was eine Absorptionsänderung zur Folge hat. Diese kann in einem ELISA-Reader bei 595 nm gemessen werden.

Für die Messung wurden 150 µl Proteinextrakt bzw. 150 µl verschiedener BSA-Verdünnungen mit definierter Proteinkonzentration (Referenz) in einer 96-well Platte mit 150 µl Roti-Quant® gemischt. Als Blindproben diente Probenpuffer, der der gleichen Prozedur unterzogen wurde. Die Extinktion wurde dreifach bei 595 nm gemessen und dann der Mittelwert berechnet. Anhand der durch die BSA-Verdünnungsreihe ermittelten Eichkurve wurden die Proteinkonzentrationen der Extrakte dann bestimmt und die gewünschte Proteinkonzentration von 50 µg konnte auf das Gel aufgetragen werden.

4.11.3 Durchführung der SDS-PAGE

Für das hier untersuchte Silicatein wurden 12%-ige Polyacrylamidgele verwendet (s.u.). Für die Gelherstellung und den danach folgenden vertikalen Lauf des Gels wurde das Mini-Protean II-System von Bio-Rad verwendet. Die Polymerisation der

Gellösung wurde durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat gestartet und dann N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), das die Bildung freier Radikale aus APS katalysiert, hinzugefügt. Die freien Radikale wiederum initiieren die Kettenreaktion und erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit. Es handelt sich um eine diskontinuierliche Proteinauftrennung, da auf das polymerisierte Trenngel ein niederprozentiges Sammelgel (8%) gegossen wurde. Mittels Teflonkamm wurden Aussparungen (Taschen) im Gel erhalten, in welche die Proben pipettiert werden konnten.

Bestandteile	Trenngel 12%	Sammelgel 6%
40 % Acrylamidlösung	4,00 ml	2,00 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,50 ml	—
1,0 M Tris/HCl pH 6,8	—	2,50 ml
10 % SDS (w/v)	0,05 ml	0,05 ml
<i>A. bidest.</i>	3,30 ml	5,30 ml
10 % APS (w/v)	0,10 ml	0,10 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

Tabelle 1: Pipettierschema für die Herstellung der Acrylamidgele.

Bevor die Proteinproben aufgetragen werden konnten, wurden diese (50 µg Protein) mit reduzierendem Probenpuffer (5:1, s.u.) gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Der hier verwendete *prestained* Proteinmarker konnte direkt aufgetragen werden. Die Gelkammer wurde mit Laufpuffer gefüllt, das System zusammengesetzt und Strom angelegt. Die angelegte Stromstärke für den Gellauf betrug 40 mA pro Gel (7 cm x 8 cm x 1 mm).

5 x SDS-Probenpuffer

0,25 M Tris-HCl, pH 6,8

50 % Saccharose (w/v)

10 % SDS (w/v)

0,2 % Bromphenolblau (w/v)

12,5 % β-Mercaptoethanol (v/v)

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 % SDS (w/v)

4.11.4 Färben der SDS-Gele mit Coomassie-Blau

Die aufgetrennten Proteine in den Polyacrylamidgelen wurden mit Coomassie detektiert. Das GelCode[®] *Blue Stain reagent* enthält den kolloidal gelösten Farbstoff Coomassie G-250, welcher in die Gelmatrix eindringt und die darin enthaltenen Proteine spezifisch anfärbt. Durch anschließendes Waschen (*water wash EnhancementTM*) wird nicht proteingebundenes Reagenz entfernt, die Gelmatrix erscheint farblos und die Proteinbanden sind blau gefärbt.

Nach dem Gellauf wurde das sich in den Gelen befindende SDS durch 10-minütiges Waschen in *A. dest.* entfernt und mit dem GelCode[®]-Reagenz für mindestens 40 min schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde so lange mit *A. dest.* gewaschen, bis die blauen Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Gele konnten dann mit dem Geldokumentationssystem GelDoc 2K gescannt und bearbeitet werden.

4.12 Western Blotting

Die Methode des *Western Blotting* erlaubt es, zuvor gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine quantitativ aus dem Polyacrylamidgel auf die Oberfläche einer immobilisierenden Nylonmembran zu transferieren. Das Trennmuster der Proteine bleibt erhalten und sie werden für den Nachweis mit immunologischen Methoden zugänglich gemacht (Towbin et al., 1979). Angewendet wurde das *semi-dry blotting*-Verfahren im „Sandwich-Aufbau“ (Westermeier et al., 1989). Acht Lagen mit Blottingpuffer getränktes Filterpapier in Größe des Gels wurden auf die Anode der *Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad) gelegt und eine mit Methanol aktivierte und ebenfalls mit Blottingpuffer getränkte Membran gleicher Größe darauf platziert. Darauf wurden sowohl das Gel als auch wiederum acht weitere in Puffer getränkte Lagen Filterpapier aufgebracht. Nach dem Aufsetzen der Kathode wurde der Transfer der negativ geladenen Proteine von der Kathode zur Anode bei 1 mA/cm² für 75 min durchgeführt. Die Banden des Proteinmarkers wurden nach dem Transfer mit Bleistift markiert und die Membran ü.N. bei 4°C in einer 5%-igen Blockierungslösung inkubiert, um die restlichen noch freien Bindungsstellen abzusättigen. Die Detektion der Proteine erfolgte indirekt durch enzymgekoppelte sekundäre Antikörper, die der Erkennung der proteinspezifischen primären Antikörpern dienten. Hierfür wurde am nächsten Tag die Membran 5 x für jeweils 5 min mit TBST gewaschen und danach für 75 min mit dem Primärantikörper

(Anti-Silicatein-Antikörper PoAb-aSILIC 1:2000 in TBS/0,5 % Blockierungsreagenz) schüttelnd bei RT inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden in fünf weiteren Waschschritten mit TBST unter Schütteln entfernt und die Membran danach mit dem AP-gekoppelten Sekundärantikörper *anti-rabbit IgG* (1:2000 in TBS/0,5 % Blockierungsreagenz) für 1 h bei RT inkubiert, um die erwünschten Proteine zu detektieren. Danach erfolgten letzte Waschschrritte (5 x 5 min mit TBST, 1 x 5 min TBS), bevor die Membran für 3 min in P3-Puffer inkubiert und mit NBT/X-Phosphat, dem Substrat der alkalischen Phosphatase (AP, an den Sekundärantikörper gekoppelt) entwickelt wurde. Die alkalische Phosphatase katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe von 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (X-Phosphat). Es entsteht das entsprechende Indoxyl, das wiederum zu einem Keton tautomerisiert. Unter den Detektionsbedingungen dimerisiert dieses Keton und es entsteht das blaue Indigo. Gleichzeitig werden Protonen freigesetzt, welche NBT zum purpurnen Diformazan reduzieren. Die Nachweisgrenze des NBT/X-Phosphat Systems liegt bei 100 pg Protein.

Transferpuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % Methanol (v/v)

in *A. dest.*TBS

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

150 mM NaCl

in *A. dest.*Blockierungsreagenz

5 % Proteinlösung (hier Milchprotein) in TBS

TBS-T0,05 % Tween[®]20 in TBS**4.13 Nachweis der Biosilicatbildung durch *E. coli*****4.13.1 Färbung von Bakterienzellen mit Rhodamin 123**

Bei den Rhodaminen handelt es sich um Fluoreszenzfarbstoffe die chemisch ähnliche, auf Xanthen basierende Strukturen besitzen, wie z. B. Rhodamin 6G, Rhodamin B oder Rhodamin 123. Je nach ihrer Struktur fluoreszieren Rhodamine vom gelb-grünen bis in den orange-roten Spektralbereich. Rhodamine werden u. a. als Farbstoffe für Papier und Textilien, in Leuchtpigmenten, in Farbstofflasern sowie in der Zellbiologie eingesetzt, wo sie als Marker in der Fluoreszenzmikroskopie

dienen. Rhodamin 123 besitzt die Eigenschaft, Polymere anzufärben und ist zudem nicht toxisch für Zellen. In diesem Versuch wurde von *E. coli*-Zellen gebildetes poly(Silicat) mit Rhodamin 123 angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht (Müller et al., 2005b).

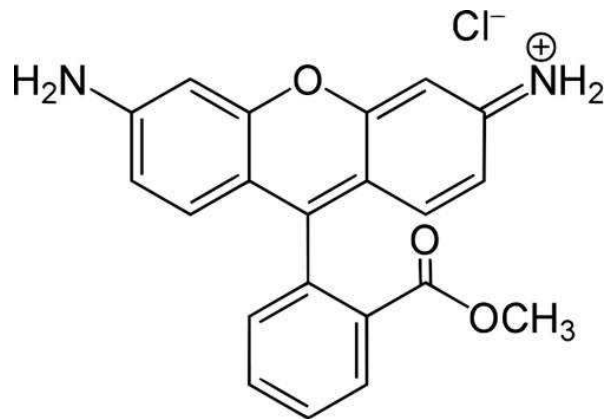


Abb. 12: Strukturformel von Rhodamin 123. Das Rhodamin-Gerüst besitzt an der Aminogruppe eine positive Ladung. Als Gegenion fungiert das Chlorid-Anion.

(http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/u/O/1/Rhodamine_123.jpg; 01.05.2011)

Die Silicateinbakterien *E. coli pQE-30-plus-silicatein* und *pQE-30-minus-silicatein* als Negativkontrolle wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln und mit Zusatz von Carbenicillin (5 µg/ml) in LB-Medium inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen in frisches LB-Medium überimpft und bei einer OD₆₀₀ nach Zugabe von IPTG (0,5 M, davon 1 µl je ml Bakterienkultur) für 4 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurden die Kulturen abzentrifugiert (200 rpm, RT) und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen, um störende Bestandteile aus dem LB-Medium zu entfernen. Das Pellet wurde in PBS-Puffer resuspendiert und mit 60 µM Natriumsilicat für 3 h dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze abzentrifugiert und das Pellet auf einen Objektträger aufgebracht. Die getrocknete Probe wurde mit Rhodamin 123 für eine Stunde gefärbt und danach mit *A. dest.* entfärbt. Die Auswertung erfolgte mit dem Olympus AHB3 Lichtmikroskop mit AH3-RFC Fluoreszenzlichtsystem bei einer Extinktion von 488 nm und einer Emission von 530 nm.

4.13.2 Nachweis freier Kieselsäure mittels Aquaquant® Silicat

(Kieselsäure)-Test

Übernachtskulturen der beiden *E. coli*-Stämme, *pQE-30-minus-silicatein* und *E. coli pQE-30-plus-silicatein* wurden 4 h lang in Anwesenheit von IPTG inkubiert. Danach wurden 60 µM Natriumsilicat zugesetzt und für weitere 3 h inkubiert. Letztendlich wurden die Proben von flüssigem LB-Medium auf Objektträger transferiert und mit Rhodamin123 inkubiert, um gebildetes (Poly)Silicat sichtbar zu machen (Müller et al., 2005b). In einer zweiten Reihe von Experimenten wurden Aliquots einer flüssigen Übernachtskultur der beiden *E. coli*-Stämme, *pQE-30-minus-silicatein* und *E. coli pQE-30-plus-silicatein*, bei 10.000 x g zentrifugiert, die Pellets resuspendiert und bei 37°C auf LB-Agarplatten, die 5 mg/ml Carbenicillin enthielten für 48 h inkubiert, bis 5 mm große Kolonien sichtbar waren. Danach wurden die Kolonien für 24 h mit einer Lösung von 60 µM Natriumsilicat überschichtet und für weitere 24 h inkubiert. Zur Auswertung wurden die Kolonien mit den silicatidentifizierenden Reagenzien des Aquaquant® Silicat (Kieselsäure)-Test-Kits überschichtet, um lösliches Silica durch den β -Silicomolybdatocolor-Komplex sichtbar zu machen (Iler 1979; Dietzel et al., 1995).

Der Silicat (Kieselsäure)-Test (Merck) basiert auf folgender Methode: Silicat-Ionen bilden in schwefelsaurer Lösung mit Molybdat-Ionen eine gelbe Heteropolysäure. Diese wird dann zu Silicomolybdänblau reduziert. Die Konzentration von Silicat in Lösung wird halbquantitativ durch visuellen Vergleich der Farbe der Messlösung mit den Farbfeldern einer Farbkarte ermittelt. In dem hier beschriebenen Versuch sollte auf Agar nachgewiesen werden, ob freie (ionisierte) oder polymerisierte Kieselsäure (poly(Silicat)) auf bzw. im direkten Umfeld der Bakterienkolonie vorhanden ist. Die Reagenzien wurden nach Protokoll nacheinander aufgetropft und inkubiert. Die Färbung erscheint zwei Minuten, nachdem das letzte Reagenz aufgetropft wurde. Erscheint eine blaue Färbung, hat die o.g. Reduktion zu Silicomolybdänblau stattgefunden. Dies weist auf vorhandene Silicationen im Medium hin, welche nicht polymerisiert sind. Tritt keine blaue Färbung auf, waren keine freien Silicationen für die Reaktion vorhanden. Dies ist dann der Fall, wenn von den Bakterien exprimiertes Silicatein die Silicationen aus dem Medium zu poly(Silicat) polymerisiert hat.

4.14 Wachstumsstudien

Um die Lebensfähigkeit und das Wachstumsverhalten der Bakterienzellen mit und ohne Silicateingen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu bestimmen, wurden die entsprechenden Wachstumskinetiken der beiden Stämme über einen Zeitraum von 18 h gemessen. Die Kulturen wurden mit oder ohne Zugabe von 60 μM Natriumsilicat in flüssigem LB-Medium bei 37°C in einem Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Es wurden jeweils drei verschiedene Bakterienstämme sowohl ohne als auch mit Zugabe von Kieselsäure zum Medium inkubiert: *E. coli* ohne Vektor, *E. coli* mit „leerem“ pQE-30-Vektor sowie *E. coli* mit pQE-30-Vektor und Silicatein-Insert.

Das Wachstum der Kulturen wurde photospektrometrisch gemessen. Zum Startzeitpunkt t_0 sowie nach 2, 7, 13 und 18 Stunden wurden Proben entnommen und deren optische Dichte (OD) bei 600 nm gemessen. Hatte die gemessene OD einen Wert von über 0,3 wurden die Proben mit dem entsprechenden Medium verdünnt und erneut gemessen. Aus den gemessenen Werten wurden Wachstumskurven erstellt und diese miteinander verglichen.

4.15 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von *E. coli*

Das Rasterelektronenmikroskop (REM) wird hauptsächlich zur Untersuchung von Oberflächenformen räumlich strukturierter Objekte eingesetzt. Der nutzbare Vergrößerungsbereich erstreckt sich von etwa 5-facher bis zu etwa 100.000-facher Vergrößerung. Das erreichbare Auflösungsvermögen ist im Vergleich zum Lichtmikroskop um ca. den Faktor 100 besser, die erreichbare Tiefenschärfe sogar ca. um den Faktor 300 besser. Diese Vorteile erlauben zahlreiche Anwendungen, z.B. im Bereich der Materialuntersuchung, Oberflächenbeurteilung, Schadensanalyse, Kriminalistik, Biologie und Medizin sowie Halbleitertechnologie.

Die Technik des Rasterelektronenmikroskops eignet sich hervorragend für morphologische Untersuchungen an biologischen Proben verschiedener Präparationsarten. Wie beim Transmissions-Elektronenmikroskop TEM wird auch beim REM ein Elektronenstrahl von einer beheizten Kathode, die als Strahlungsquelle dient, erzeugt. Im REM wird das Objekt jedoch nicht komplett ausgeleuchtet, sondern der Elektronenstrahl wird auf einen kleinen Punkt auf der Oberfläche des Objekts fokussiert. Dieser bestrahlte Punkt sendet Elektronen aus, die von einem Detektor gesammelt werden. Hierbei entsteht ein Signal, welches

verstärkt und auf einer Bildröhre als Punkt abgebildet wird. Somit entspricht ein Punkt auf dem Leuchtschirm der Bildröhre einem Punkt auf der Oberfläche des betrachteten Objekts. Mittels einer so genannten Ablenkeinheit wird ein elektrisches Feld über den Elektronenstrahl im Mikroskop und über den Elektronenstrahl in der Bildröhre angelegt. Dadurch werden beide Strahlen um einen genau definierten Betrag ausgerichtet; ein anderer Punkt auf dem Objekt wird beleuchtet und auf der Bildröhre abgebildet. Mit Hilfe eines Rastergenerators wird der Elektronenstrahl des Mikroskops Punkt für Punkt über die Oberfläche des Objekts (deutsch: „rastern“, engl.: „*scanning*“) geführt, was auf dem Leuchtschirm ein Bild der Oberfläche entstehen lässt. Der Vergrößerungseffekt entsteht durch die Tatsache, dass das über dem Elektronenstrahl der Bildröhre angelegte elektrische Feld stärker ist, als das Feld, welches über dem Strahl im Mikroskop angelegt wird. Damit sich das Präparat durch den Elektronenstrahl nicht elektrisch auflädt, wird seine Oberfläche mit einem dünnen Film einer leitenden Substanz (meist Kohlenstoff bzw. Gold) bedampft (gesputtert). Bei modernen, recht hochauflösenden REM-Geräten ist die Goldbedampfung allerdings nicht mehr erforderlich.

Mittels REM-Analyse wurden die morphologischen Eigenschaften sowohl der *E. coli*-Zellen, die das Silicateingen tragen wie auch die der *E. coli*-Zellen ohne das Silicateingen in Kultur nach Expression von Silicatein sowie nach Inkubation mit Natriumsilicat untersucht. Nachdem das Medium entfernt worden war, wurden die Zellen mit 2,5%-igem Glutaraldehyd in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,8) fixiert, mittels graduerter Ethanolserie dehydriert und luftgetrocknet. Die Proben wurden auf Aluminiumhalterungen aufgebracht, die mit adhäsiver Kohle überzogen waren und mit einem Gemini Leo 1530 hochauflösenden Feldelektronenmikroskop untersucht, nachdem die Proben zuvor mit Gold (10 nm) bedampft (gesputtert) worden waren.

4.16 Untersuchung der Einwirkung verschiedener Stressoren auf *E. coli*-Zellen nach Expression und Inkubation mit Natriumsilicat mittels *Fast Micromethod* (DNA-Strangbruch Assay)

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Bakterienzellen, die das Silicateingen enthalten, nach Expression und Inkubation mit Natriumsilicat anders auf die Exposition verschiedener Stressoren reagieren, als gleich behandelte Zellen, die nicht mit Natriumsilicat inkubiert worden waren. Dies sollte mittels Messung der

genomischen DNA-Integrität (bzw. der Messung von DNA-Schädigung) mit dem DNA-Strangbruch-Assay (*Fast Micromethod*) geschehen. Bei der *Fast Micromethod* handelt es sich um einen fluoreszenzbasierten Mikroplatten-Assay, der eine sensitive und schnelle Messung von DNA-Einzelstrangbrüchen und deren Reparatur *in vitro* ermöglicht (Batel et al., 1999). Diese Methode kann in der Bestimmung von DNA-Schäden in Zellen und Geweben sowohl nach Bestrahlung oder Chemotherapie als auch nach Einwirkung von Mutagenen und Karzinogenen (Genotoxine in der Umwelt) Anwendung finden. Die Zerstörung und Reparatur von DNA können sowohl in menschlichen, tierischen als auch pflanzlichen Zell- und Gewebeproben bestimmt werden (Chauvin et al., 1998; Schröder et al., 1999; Batel et al., 1999). Die Bestimmung von strahleninduzierten DNA-Strangbrüchen kann dabei helfen, die Reaktion eines Tumors auf die Radiotherapie zu prognostizieren (Elmendorf-Dreikorn et al., 1999). In dieser Arbeit wurde die Methode eingesetzt, um zu untersuchen, welche Folgen die Einwirkung verschiedener Stressoren auf die DNA-Integrität der beiden Bakterienstämme hat. Es sollte herausgefunden werden, wie sich verschiedene Stressoren auf die silicateinexprimierenden Bakterienzellen auswirken, nachdem diese nach der Expression von Silicatein mit Natriumsilicat inkubiert worden waren.

4.16.1 Testprinzip der *Fast Micromethod*

Die DNA ist ein doppelsträngiges Molekül. Beide Stränge werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammengehalten. Zudem sind sie rechtsgängig zu einer Doppelhelix gewunden. Diese Helixstruktur bleibt auch bei Strangbrüchen, alkali-labilen Stellen und unvollständiger Exzisionsreparatur bestehen. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen beiden Strängen werden bei einem pH-Wert im Bereich von 12 gelockert. Die Stränge separieren sich nicht sofort, da sie umeinander gewunden sind. Für eine Trennung ist eine Entwindung erforderlich, welche eine bestimmte Zeit benötigt. Ein DNA-Molekül, das bereits Einzelstrangbrüche enthält, entwindet sich deutlich schneller als unversehrte DNA. Je kürzer das doppelsträngige DNA-Molekül ist und je höher die Frequenz von Einzelstrangbrüchen und alkalilablen Stellen, desto schneller findet die Strangtrennung unter alkalischen Bedingungen statt. Dies bedeutet, dass eine erhöhte Strangseparationsrate als sensitive Messung der DNA-Integrität, von Strangbrüchen und alkalilablen Stellen verwendet werden kann (Kohn et al., 1976;

Ahnström und Erixon, 1973). Der Assay nutzt einen spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, das Fluorochrom PicoGreen[®], welches nur an doppelsträngige und nicht an einzelsträngige DNA, RNA oder Proteine binden kann, was die Quantifizierung von Doppelstrang-DNA ermöglicht. Somit ist die *Fast Micromethod* in der Lage, die Frequenz von Einzelstrangbrüchen in der DNA zu messen und somit die direkte Messung der DNA-Denaturierung zu ermöglichen. Die Methode beinhaltet eine einfache und schnelle Lyse von Zellen in Anwesenheit von EDTA, SDS und einer hohen Ureakonzentration mit anschließender DNA-Denaturierung bei pH 12,4 nach Zugabe von NaOH. Die Sensitivität des Assays erlaubt die Quantifizierung bereits im Bereich von 25 pg/ml doppelsträngiger DNA-Standardlösungen mit einem gewöhnlichen Spektrofluorometer oder Fluoreszenz-Mikroplattenreader.

4.16.2 Vorbereitung der Bakterienzellen

Eine Übernachtskultur des *E. coli*-Stamms *pQE-30-plus-silicatein* wurde über Nacht bei RT unter Anwesenheit von IPTG exprimiert. Die Bakterienkultur wurden zentrifugiert (13.000 rpm, 5 min) und das Pellet in PBS-Puffer (pH 7,2) resuspendiert. Die Suspension wurde in zwei Proben aufgeteilt. Die eine Probe wurde 3 h bei RT im Dunkeln mit 60 µM Natriumsilicat inkubiert, während die zweite Probe unter gleichen Bedingungen ohne Natriumsilicat inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde erneut zentrifugiert, um das Natriumsilicat zu entfernen, und die Zellen wiederum in PBS-Puffer resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge gemessen. Um die erforderliche Zellkonzentration von $0,12 \times 10^9$ Zellen/ml, die sich in Vorversuchen als optimal erwiesen hat zu erreichen, wurde eine entsprechende Verdünnung der Zellsuspension in PBS hergestellt. Die so vorbereiteten Zellen wurden danach verschiedenen Stressoren ausgesetzt.

4.16.3 Einwirkung verschiedener Stressoren auf die Bakterienzellen nach Expression von Silicatein und Inkubation mit Natriumsilicat

Nach Expression von Silicatein und anschließender Inkubation mit und ohne Natriumsilicat wurden die Bakterien verschiedenen Stressoren ausgesetzt und zu untersuchen, ob die Inkubation mit Natriumsilicat eine Auswirkung auf die mechanische Belastbarkeit der Silicatbakterien hat.

4.16.3.1 UVB-Bestrahlung der Bakterienzellen

Verwendet wurde eine Sonnensimulationslampe, die das gesamte solare Spektrum umfasst. Es wurde ein Filter (H2) eingesetzt, der die Strahlung unter 295 nm zurückhält und nur für Strahlung im Bereich von ≥ 295 nm durchlässig ist (s. Abb. 13). Die Bestrahlung liegt hier im Bereich von UV-B sowie des für Menschen sichtbaren Lichts (s. Abb. 14).

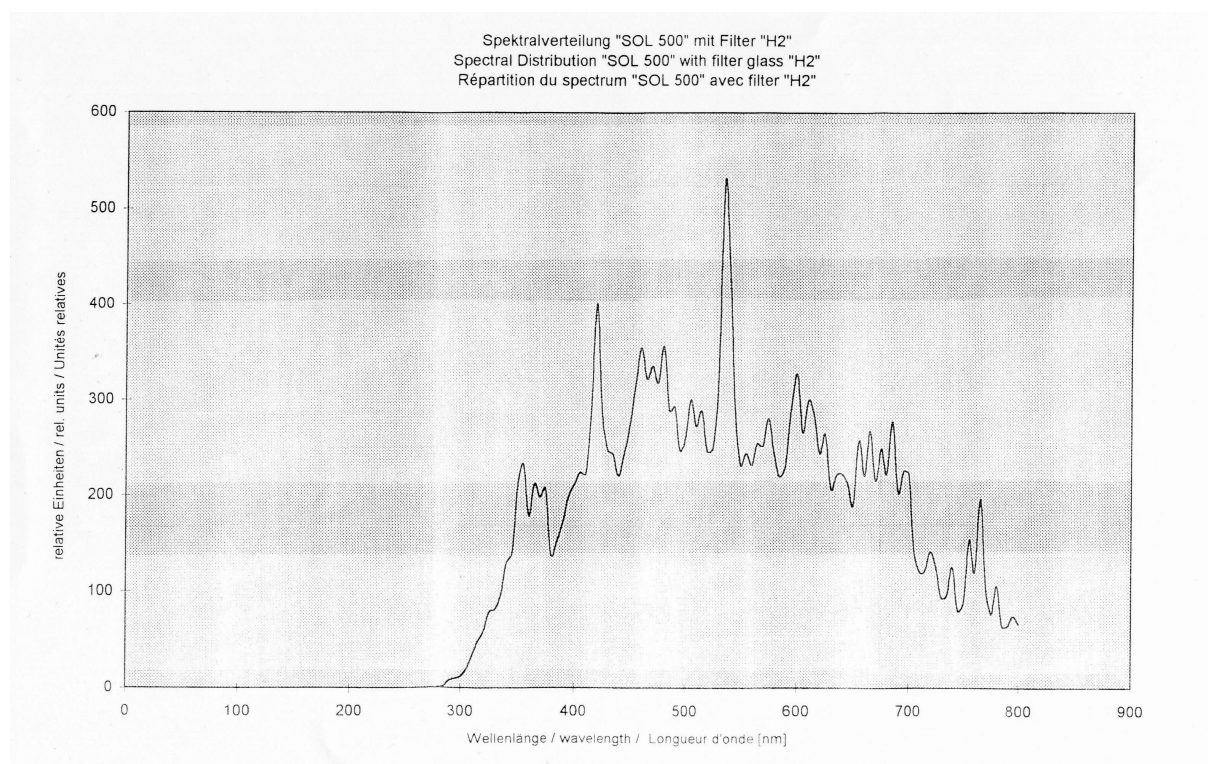


Abb. 13: Spektralverteilung der eingesetzten UV-Lampe Sol 500 mit Filter H2 (Dr. Höhnle GmbH, München).

Das für Menschen sichtbare Licht erstreckt sich über den Bereich von 400-780 nm:

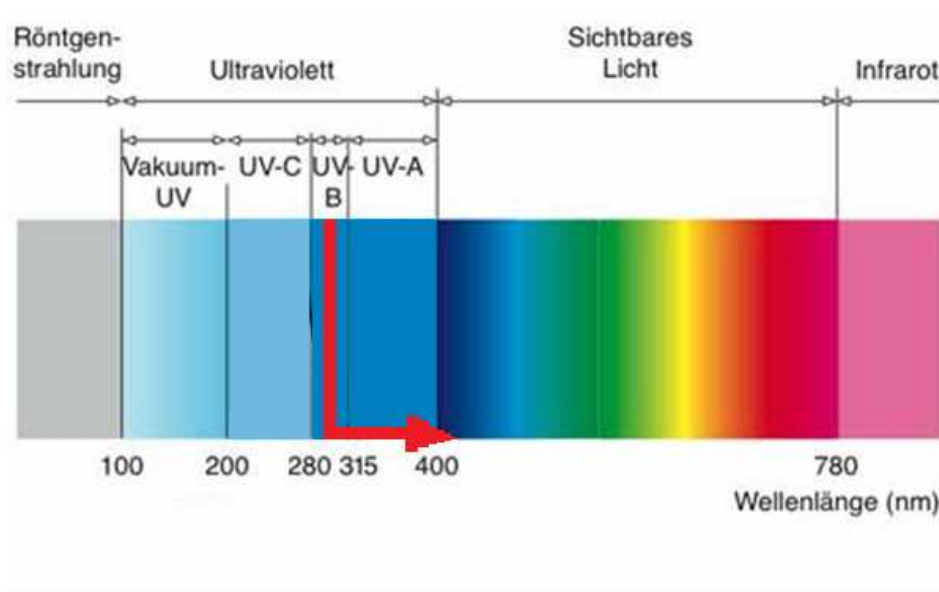


Abb.14: UV-Spektrum (100-400 nm). Die hier verwendete Strahlung befindet sich im UV-B-Bereich, von 295 – 800 nm (roter Pfeil). Verändert nach http://www.stern.it/uv_de.htm, 15. März 2011).

Die Bestrahlung der Bakterienzellen wurde auf Eis durchgeführt. Eine mit Eis gefüllte Styroporbox wurde so unter der Lampe platziert, dass sich die Bakterienzellen in Petrischalen genau im Abstand von 30 cm unter der Lampe befanden. Eine einminütige Bestrahlung entspricht $7,2 \text{ J/m}^2$. Die UV-Bestrahlung wurde zeitlich variiert und dauerte jeweils 0, 2, 5, 8, 10, 12, 15 und 18 Minuten. Hierfür wurden die Zellen in der vorgeschriebenen Konzentration in kleine Petrischalen transferiert (35 x 10 mm, je 1 ml) und in die mit Eis gefüllte Box platziert. Von jeder Probe wurden 250 μl entnommen, zentrifugiert (13.000 rpm, 5 min) und danach das Pellet in 250 μl BugBuster™ *Protein Extraction Reagent* (ohne Zusatz von Benzonase und Protease-Inhibitor) resuspendiert.

Bestrahlungszeit (min)	Entsprechende Bestrahlungsdosis (J/m ²)
0	0
2	14,4
5	36
8	57,6
10	72
12	86,4
15	108
18	129,6

Tabelle 2: Bestrahlungsdosis in J/m² pro Zeiteinheit

4.16.3.2 Mechanische Beanspruchung der Silicathülle durch Schütteln/Mixen

Nach Vorbereitung der Bakterienzellen wie unter 4.17.2 beschrieben, wurden jeweils 0,5 ml der beiden Proben in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und in einem Eppendormixer bei 1400 rpm bei 24°C 10 min lang geschüttelt. Danach wurden die Zellen nicht mehr zentrifugiert, sondern sofort auf Eis überführt und die Fast Micromethod durchgeführt (s. 4.16.4), um die DNA-Integrität zu messen.

4.16.3.3 Bakteriellles Wachstum während mechanischer Beanspruchung anhand DNA-Messung

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die mechanisch beanspruchten Bakterienzellen während des Schüttelvorgangs bei RT in der Lage sind, zu wachsen. Dazu wurde ein Teil der Bakterienkulturen wie in 4.16.2 vorbereitet und in einem Eppendorf-Mixer 1, 3, 10, 20, 30 und 60 min lang geschüttelt. Danach wurde mittels Fast Micromethod nicht wie sonst die Strangbrüche (SSF), sondern die Menge der intakten DNA pro Zeiteinheit während des Schüttelns gemessen. Eine Zunahme an DNA wurde in der Auswertung bakterielllem Wachstum gleichgesetzt. Durch Vergleich der Werte der Bakterien, die mit und ohne Natriumsilicat inkubiert wurden, sollten Rückschlüsse auf eine Veränderung der Eigenschaften der Bakterienzellen durch die Expression von Silicatein und anschließende Inkubation mit Natriumsilicat geschlossen werden.

4.16.3.4 Behandlung der Zellen mit Ultraschall

Nach Vorbereitung der Bakterienzellen wie unter 4.16.2 beschrieben, wurden jeweils 0,5 ml der beiden Proben in ein 1,5 ml Eppendorfgesäß überführt und bei 22°C für 1,2,3,6,10 und 15 min in ein Ultraschallbad gelegt. Danach wurden die Zellen nicht mehr weiterbehandelt, sondern sofort auf Eis überführt und die Fast Micromethod durchgeführt (s. 4.16.4).

4.16.4 *Fast Micromethod*

Zu beachten ist, dass immer die gleiche Zellzahl eingesetzt werden muss, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Als am besten geeignete Zelldichte haben sich ca. $0,12 \times 10^9$ Zellen/ml in 25 µl Calcium- und magnesiumfreiem PBS erwiesen. Während der Versuchsdurchführung müssen alle Proben, die PicoGreen® enthalten, mit Aluminiumfolie abgedeckt werden, da der Farbstoff lichtempfindlich ist. Die Zell-Lyse findet direkt in den Wells der schwarzen Mikrotiterplatte (96 wells) statt. Zu 25 µl Zellsuspension wurden ohne zu mischen oder schütteln 25 µl Lysepuffer mit PicoGreen® gegeben. Die Platte wird danach lichtgeschützt 40 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 250 µl einer 0,1M NaOH/20mM EDTA Lösung pro Well wurde der pH-Wert der Ansätze auf 12,4 erhöht und somit die Denaturierung der DNA gestartet. Dieser Vorgang kann als abnehmende Fluoreszenz gemessen werden. Die Messung fand sofort mit dem Fluoroskan II bei einer Exzitationswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm statt. Es wurde über einen Zeitraum von 40 min alle 5 min gemessen. Somit können Einzelstrangbrüche und alkali-labile Stellen sowie intermediäre Brüche während der DNA-Reparatur gemessen werden.

4.16.5 Auswertung der *Fast Micromethod*

Um eine statistische Auswertbarkeit zu gewährleisten, wurden für alle Proben mindestens vier Replikate gemessen. Die gemessenen Werte wurden gemittelt und der Leerwert (ebenfalls gemittelt) abgezogen. Als Leerwert diente PBS (Calcium- und magnesiumfrei). Der gemessene Wert der noch nicht entwundenen DNA der Proben zum Zeitpunkt Null (Start der Messung) dient als Kontrolle und wird als 100% doppelsträngige DNA gesetzt (dsDNA). Aufgrund der schnelleren Entwindung von DNA mit Einzelstrangbrüchen werden bei solchen Proben niedrigere Werte gemessen. Die gemessenen Effekte wurden als „*Strand Scission*“

Factors“ (SSF) ausgedrückt und nach einer Denaturierungszeit von 20 min wie folgt berechnet:

$$\text{SSF} = \log (\% \text{ dsDNA der Probe} / \% \text{ dsDNA der Kontrolle})$$

Negative SSF-Werte weisen auf einen erhöhten Anteil von DNA-Einzelstrangbrüchen hin. Um die grafische Darstellung der Ergebnisse zu erleichtern, wurden die SSF-Werte mit -1 multipliziert.

5 ERGEBNISSE

5.1 Expression von Silicatein in *E. coli* in Abhängigkeit von Natriumsilicat

5.1.1 *Western Blot*

Die heterologe Expression von Silicatein- α wurde unter Verwendung des Expressionsvektors pQE-30 in *E. coli* durchgeführt (s. 4.6). Für die *Western Blot*-Analysen wurden Aliquots von 10 ml Proteinextrakt (enthielten jeweils 50 μ g Protein) eingesetzt. Abbildung 15 A zeigt die Expressionsrate von Silicatein im zeitlichen Verlauf. Die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kulturen wurden wie in Kapitel 4.8.2 beschrieben mit IPTG induziert. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten (0–5 h) wurden aus den Kulturen Proben entnommen und Proteinextrakte hergestellt. Die Proteinextrakte (jeweils 50 μ g) wurden mittels *Western Blot* unter Verwendung der Antikörper gegen Silicatein- α (PoAb-aSilic) untersucht. Die Bakterien, die mit dem Silicateingen transformiert worden waren (pQE-30+) wurden wie folgt inkubiert: 0 h (Bande a), 1 h (b), 2 h (c), 3 h (d), 4 h (e), 5 h (f). Als Kontrolle wurde *E. coli* mit dem Vektor ohne Silicateingen (pQE-30-) für 5 h inkubiert (Bande g). Die Extrakte die zum Zeitpunkt von 0 h, die direkt nach der Inokulation des Mediums mit den logarithmisch wachsenden *E. coli* (pQE-30-plus-silicatein) aus den Übernachtskulturen gewonnen worden waren, zeigten nach SDS-Gelelektrophorese und darauf folgendem *Western Blot* keine entsprechende Bande für Silicatein (Größe 25 kDa, s. Abb. 15 A, Bande a). Doch bereits eine Stunde nach Zugabe von IPTG zu den Kulturen konnte eine 25-kDa-Silicateinbande identifiziert werden. (Abb. 15 A, Bande b). Die Expressionsstärke steigt innerhalb der 5-stündigen Inkubation von einfach (nach 1h) bis auf das fünffache nach 5-stündiger Inkubation an. (Abb. 15 A, Banden c–f). Die Kontrollkultur *E. coli*, die nur den Expressionsvektor ohne das Silicateingen enthielt (pQE-30-minus-silicatein), zeigt keine Silicateinbande mit 25 kDa im *Western Blot* (Abb. 15 A, Bande g).

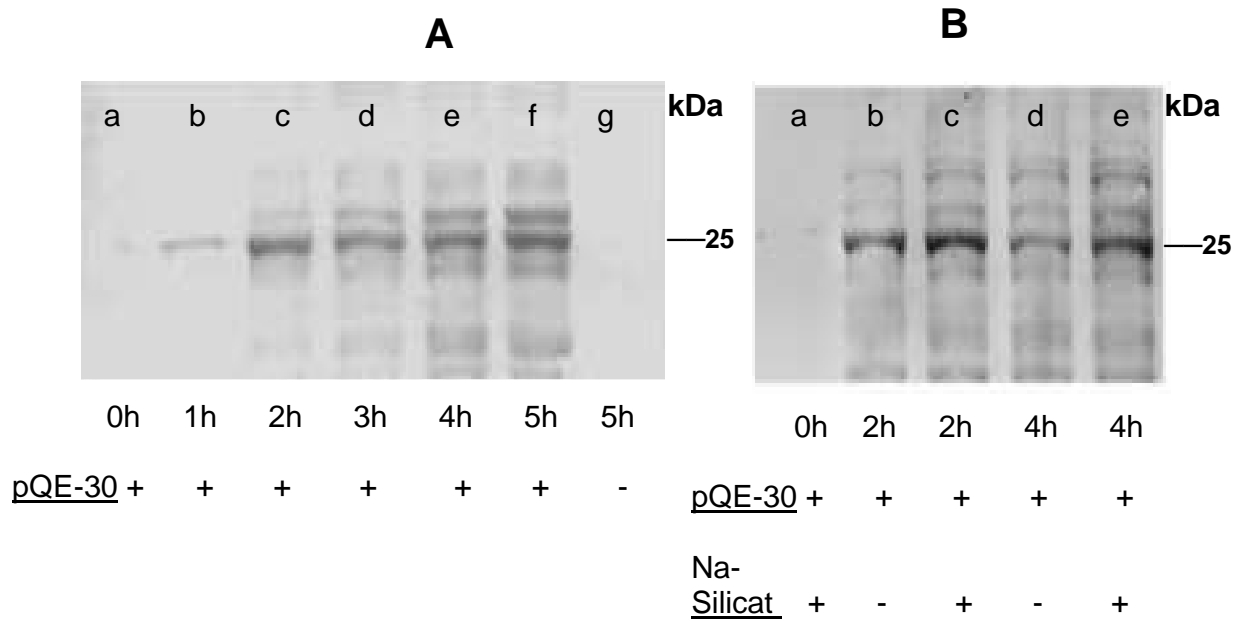


Abb. 15: Effekt von Natriumsilicat auf die Expressionsrate von Silicatein in *E. coli*. Die Bakterien wurden entweder mit dem Silicatein- α -Gen aus *S. domuncula* (*pQE-30-plus-silicatein*, pQE-30+) oder nur mit dem Expressionsvektor ohne das Gen (*pQE-30-minus-silicatein*, pQE-30-) transformiert. **A:** Expressionsrate von Silicatein im zeitlichen Verlauf. Nach 5 Stunden ist bei *E. coli*-Zellen, die das Silicateingen nicht enthalten, keine Expression von Silicatein vorhanden, während *E. coli*-Zellen mit Silicateingen eine deutliche Expression von Silicatein aufweisen. **B:** Effekt von Natriumsilicat auf die Expression von Silicatein. Die Anwesenheit von Natriumsilicat erhöht die Expressionsrate von Silicatein.

In einer weiteren Reihe von Untersuchungen wurden die transformierten *E. coli*-Zellen (*pQE-30-plus-silicatein*) in Standard-LB-Medium sowohl mit als auch ohne Zusatz von 60 μ M Natriumsilicat inkubiert (siehe Abbildung 15 B). Es sollte der Effekt von Natriumsilicat (60 μ M) auf die IPTG-induzierte Expression von Silicatein- α untersucht werden. Proben von *E. coli*-Kulturen (pQE-30+) wurden in Abwesenheit (-) oder Anwesenheit von Natriumsilicat (+) für 0–4 h inkubiert. Danach wurden Proteinextrakte der Proben hergestellt und mittels *Western Blot* analysiert. Die 25-kDa-Bande korrespondiert zu der des Proteins Silicatein. Vorausgehende Tests zeigten, dass während der Initialperiode der Induktion mit IPTG (1–4 Std.) die größten Unterschiede im Expressionslevel bestehen. Der *Western Blot* zeigt bereits nach

zweistündiger Inkubation mit IPTG eine stärkere Bande bei 25 kDa bei den Bakterienkulturen, die das Silicateinogen enthielten und zusätzlich mit Natriumsilicat inkubiert worden waren (Abb. 15 B, Bande c im Vergleich zu b) im Vergleich zu Kulturen ohne Natriumsilicat im Medium. Eine semiquantitative Analyse der Banden ergab, dass die Intensität der Bande von Extrakten IPTG-induzierter Stämme bei Anwesenheit von Natriumsilicat (Bande c), 1,8-fach höher ist, als die der Bakterien, die nur mit IPTG inkubiert worden waren (Bande b). Noch auffälliger ist der Intensitätsunterschied der Silicateinbande bei Anwesenheit von Natriumsilicat nach 4-stündiger Inkubation: sie entspricht dem 2,6-fachen (Bande e im Vergleich zu d) gegenüber Inkubation ohne Natriumsilicat. Zu Beginn des Experiments, zur Zeit Null, ist keine Bande bei 25 kDa sichtbar. (s. Abb. 15 B, Bande a).

5.1.2 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Ergebnisse des *Western Blots* zeigten, dass das Level der Silicateinexpression in IPTG-induzierten Bakterien nach Inkubation mit Natriumsilicat ansteigt. Um diese Aussage weiter zu überprüfen bzw. bestätigen, wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt (Abb. 16). Für diesen Versuch wurden die Bakterienzellen nicht permeabilisiert. Um die Bakterien der Proben auf dem Objektträger identifizieren zu können, wurde die DNA-Färbung mit DAPI (Abb. 16 A-b, B-b, C-b) sowie die Untersuchung mittels Nomarski-Optik durchgeführt (Abb. 16 A-a, B-a, C-a).

Die Bakterienkulturen, die für vier Stunden ohne Induktion durch IPTG inkubiert worden waren (*E. coli*, pQE-30-plus-silicatein), zeigten keine Reaktion mit den Antikörpern gegen Silicatein (hier nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigten Bakterien, die vier Stunden in Gegenwart von IPTG inkubiert worden waren (*E. coli*, pQE-30-plus-silicatein) eine starke Fluoreszenz, nachdem sie zuerst mit PoAb-aSilic und danach mit dem Cy3-gelabelten zweiten Antikörper inkubiert worden waren (Abb. 16 A-c). Noch heller und intensiver zeigte sich die Reaktion mit dem PoAb-aSilic/Cy3 Antikörpersystem nach vierstündiger Co-Inkubation der Bakterien mit IPTG und Natriumsilicat (Abb. 16 B-c). Keine Fluoreszenz zeigten die Bakterien, die zwar den Vektor, aber nicht das Silicateinogen in sich trugen (*E. coli* pQE-30-minus-silicatein, Abb. 16 C-c). In einem Kontrollexperiment wurde Präimmunserum statt Antikörper eingesetzt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Wie erwartet zeigte sich keine Immunreaktion (nicht gezeigt). Ebenfalls keine spezifische Reaktion

zeigt sich bei einer Kultur von *E. coli* (*pQE-30-plus-silicatein*) die mit einer PoAb-aSilic Antikörper-Lösung inkubiert wurden, die mit rekombinantem Silicatein prä-adsorbiert war (nicht gezeigt).

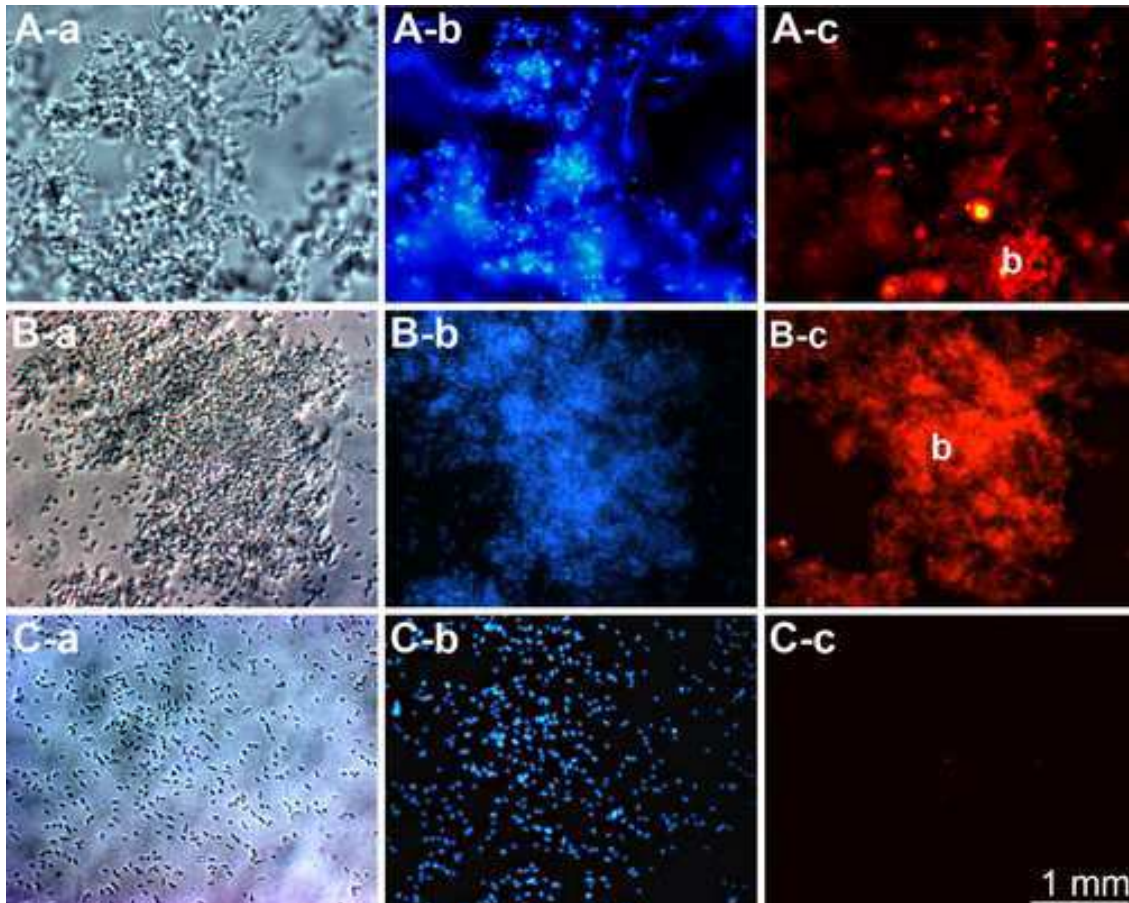


Abb. 16. Expression des Silicatein- α -Gens in *E. coli* (Immunofluoreszenzfärbung). Vor der Reaktion mit anti-Silicatein-Antikörpern (PoAb-aSilic) wurden die Bakterien nicht permeabilisiert. Um die Bakterien zu identifizieren, wurden beide Analysen mittels Nomarski-Optik (A-a, B-a, C-a) und Färbung mit dem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI durchgeführt (A-b, B-b, C-b). **(A)** Die Bakterien (*E. coli*, *pQE-30-plus-silicatein*) wurden für 4 h in Anwesenheit von IPTG inkubiert. Die Bakterienkolonien (b) reagierten dann mit zuerst PoAb-aSilic und danach mit dem gelabelten Sekundärantikörper (A-c). **(B)** Parallel durchgeführter Versuch: *E. coli* (*pQE-30-plus-silicatein*), gewachsen in Medium mit 60 μ M Kieselsäure zu IPTG. Gefärbt mit Antikörpern gegen Silicatein (B-c). **(C)** *E. coli*-Zellen (*pQE-30-minus-silicatein*), inkubiert mit PoAb-aSilic/Cy3-gelabelten sekundären AK (C-c).

5.2 Biosilicabildung durch *E. coli* nach Transformation mit dem Silicatein- α -Gen

5.2.1 Färbung mit Rhodamin 123

Übernachtskulturen der beiden *E. coli*-Stämme mit und ohne Silicateingen, *pQE-30-minus-silicatein* und *E. coli pQE-30-plus-silicatein* wurden 4 h lang in IPTG-haltigem Medium inkubiert. Danach wurden den Ansätzen 60 μ M Natriumsilicat hinzugefügt und diese für weitere 3 h inkubiert. Letztendlich wurden die Proben vom flüssigen LB-Medium auf Objektträger aufgebracht und mit Rhodamin123 inkubiert, um eventuell gebildetes poly(Silicat) sichtbar zu machen (Müller et al., 2005b).

Nachdem mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden konnte, dass *E.coli*-Zellen, die mit dem Gen für Silicatein- α transformiert worden waren (*pQE-30-plus-silicatein*) aufgrund der Expression von Silicatein eine starke Fluoreszenz zeigten, sollte weiterhin untersucht werden, ob das rekombinante Silicatein auch enzymatisch aktiv ist. Hierfür wurden die Bakterien für insgesamt 7 h mit IPTG und während der letzten 3h zusätzlich mit Natriumsilicat inkubiert. Nach anschließender Reaktion mit dem Fluorochrom Rhodamin 123 zeigten die *Cluster* der Bakterien, die kein Silicateingen enthielten (*E. coli pQE-30-minus-silicatein*) unter optimalen Reaktionsbedingungen so gut wie keine Färbung (s. Abb. 17 A-a und A-b). Im Gegensatz hierzu zeigten Kolonien von *E. coli pQE-30-plus-silicatein*, die als *Cluster* in dickem, gelartigem Schleim auftraten, nach Reaktion mit Rhodamin 123 eine intensive Grünfärbung. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass sich poly(Silicat) um die Bakterien herum befand. Die grün fluoreszierenden, viskosen Massen erreichten Durchmesser von bis zu 5 mm (Abb. 17 B-a und B-b).

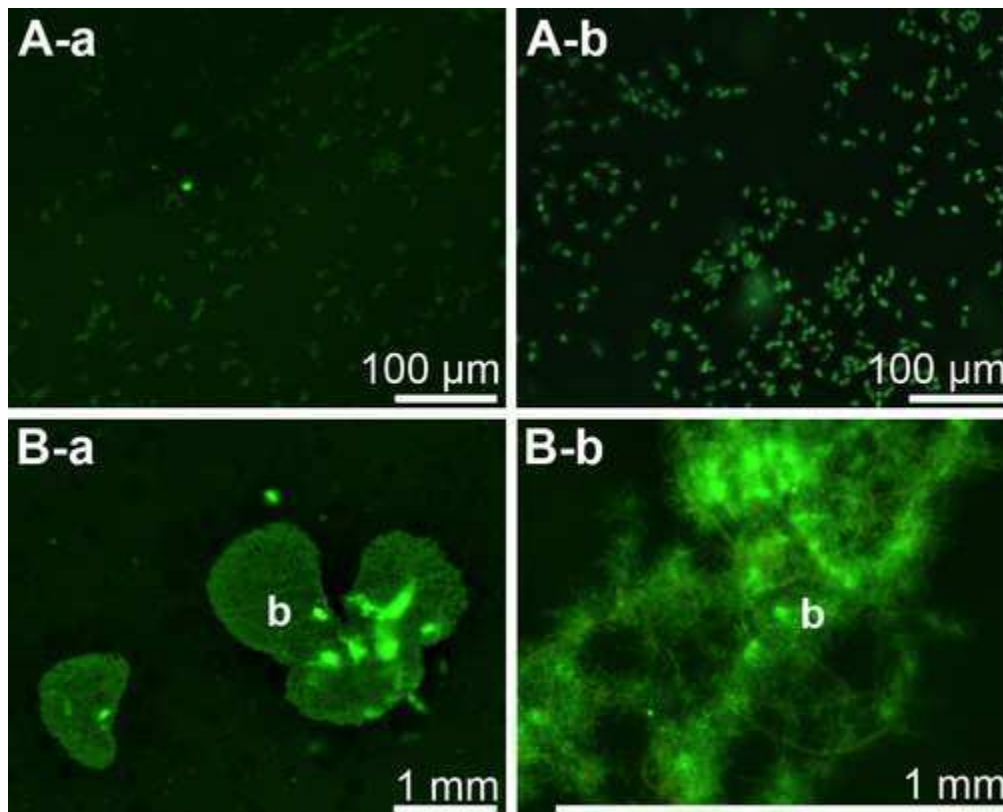


Abb. 17: Poly(Silicat)-Bildung durch *E. coli*. Die Bakterien (b) wurden entweder mit dem Vektor ohne Silicateingen (*pQE-30-minus-silicatein*, A-a und A-b) oder mit dem Silicatein- α -Gen (*pQE-30-plus-silicatein*; B-a und B-b) transformiert. Nach Induktion mit IPTG (7 h) und Inkubation mit Natriumsilicat (3 h) wurden die Bakterienproben mit Rhodamin 123 gefärbt und mittels Fluoreszenzlichtmikroskopie analysiert.

5.2.2 Nachweis freier Kieselsäure mittels Aquaquant[®] Silicat (Kieselsäure)-Test

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurden Aliquots einer flüssigen Übernachtskultur von *E. Coli* mit und ohne Silicateininsert bei 10.000 x g zentrifugiert, die Pellets in LB-Medium resuspendiert und danach für 48 h bei 37°C auf LB-Agarplatten inkubiert, die 5 mg/ml Carbenicillin enthielten. Danach wurden 5 mm große Kolonien für mit einer Lösung mit 60 µM Natriumsilicat überschichtet und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung wurden die Kolonien mit den Silicat-identifizierenden Reagenzien des Aquaquant[®] Silicat (Kieselsäure)-Test gemäß Protokoll überschichtet, um lösliches Silica durch den β -Silicomolybdatocolor-

Komplex sichtbar zu machen (Iler 1979; Dietzel und Usdowski, 1995) und um die chemische Beschaffenheit des durch die Bakterien gebildeten Silica zu identifizieren. Silicat-Ionen bilden in schwefelsaurer Lösung mit Molybdat-Ionen eine gelbe Heteropolysäure. Diese wird zu Silicomolybdänblau reduziert. Die Intensität der Blaufärbung entspricht der Höhe der Silicat-Konzentration. Dieses System von Färbelösungen weist visuell lösliches Silica (= nicht polymerisiert) nach, indem der blaue β -Silicomolybdato-Farbkomplex gebildet wird.

Die Kolonien von *E. coli pQE-30-minus-silicatein* reagierten mit den Reagenzien unter Bildung einer leicht blauen Farbe (Abb. 18, linke Seite). Die Farbintensität nimmt mit der Zeit zu. Dies zeigt, dass die Bakterienkolonien freie, lösliche Kieselsäure enthalten. Die Färbung entstand auch, wenn die Agarplatten vor der Analyse gewaschen wurden. Die Kolonien von *E. coli pQE-30-plus-silicatein* dagegen blieben nach Inkubation mit den Nachweisreagenzien für 7 min (Abb. 18, rechte Seite), weißlich, ohne Blaufärbung. Dies weist darauf hin, dass im Bereich der Bakterienkolonien poly(Silicat) gebildet wurde und keine freie Kieselsäure im Bereich der Bakterienzellen mehr vorhanden war. Interessanterweise war der Agar um die Kolonien herum blau gefärbt, was die Anwesenheit von freier, restlicher Kieselsäure im umgebenden Agar aufzeigt. Bei den Bakterienkolonien von *E. coli pQE-30-minus-silicatein* waren dagegen sowohl die Kolonien selber, als auch der umgebende Agar blau gefärbt (s. Abb. 18, nachfolgende Seite).

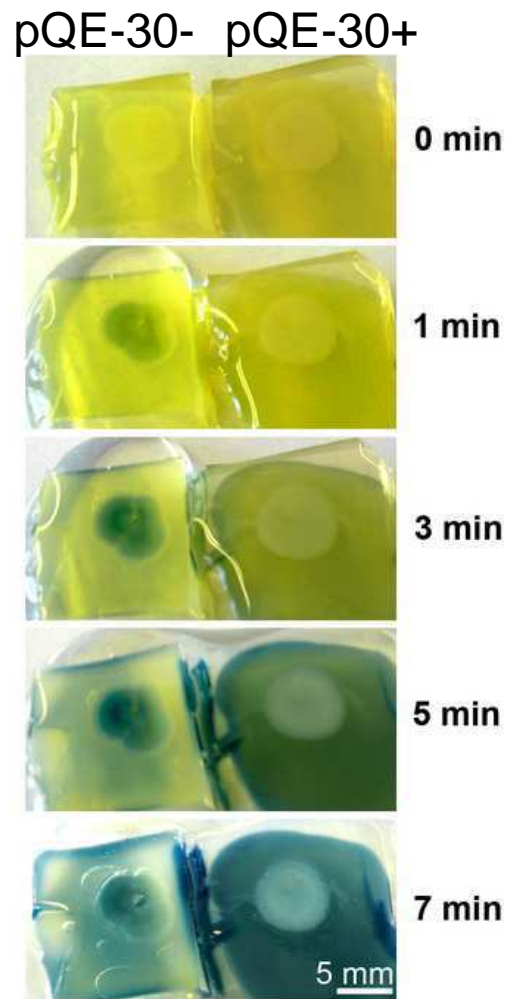


Abb. 18: Identifizierung der chemischen Beschaffenheit von poly(Silicat) in Bakterien, die in Anwesenheit von Kieselsäure auf Agar gewachsen sind. *E. coli* ohne Gen für Silicatein (*E. coli pQE-30-minus-silicatein*, links) und Bakterienzellen, die das Silicatein- α -Gen (*E. coli pQE-30-plus-silicatein*, rechts) tragen wurden für 48 h auf Agar (37°C) inkubiert. Danach wurde mit 60 μ M Natriumsilicat überschichtet und die Kulturen für weitere 24 h bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden anschließend mit den silicatdetektierenden Reagenzien des Aquaquant[®] Silicat (Kieselsäure)-Test überschichtet. Die Farbentwicklung wurde innerhalb einer Zeitspanne von 0–7 min detektiert. Es ist deutlich zu sehen, dass die Kolonien der Bakterien ohne Silicateingen blau gefärbt waren, während die Kolonien der Bakterien mit Silicateingen weiß blieben.

5.3 Wachstumsstudien

Um die Lebensfähigkeit und das Wachstumsverhalten der beiden *E. coli*-Kulturen unter verschiedenen Bedingungen zu bestimmen, wurden die jeweiligen Wachstumskinetiken der Stämme mit und ohne Silicateingen über einen Zeitraum von 18 h beobachtet. Die Kulturen wurden entweder ohne oder in Anwesenheit von

60 μM Kieselsäure inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, dass alle drei Kulturen, *E. coli* ohne Vektor, *E. coli* mit leerem pQE-30-Vektor sowie mit pQE-30 Vektor plus Insert (*pQE-30-plus-silicatein*) fast die gleiche Wachstumskinetik aufweisen, unabhängig davon, ob Kieselsäure im Inkubationsmedium anwesend war oder nicht (Abb. 19).

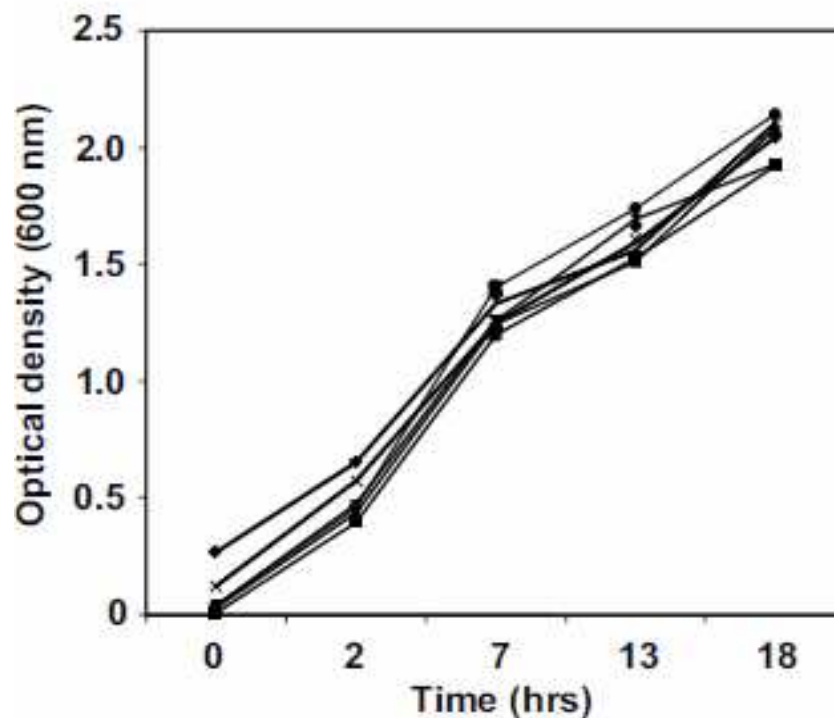


Abb.19: Wachstumskinetik von *E. coli* in LB-Medium in An- und Abwesenheit von Kieselsäure. Folgende Bakterienkulturen wurden eingesetzt: In Anwesenheit von Kieselsäure: *E. coli* ohne Vektor (●), *E. coli* mit pQE-30 Vektor (■), *E. coli* mit pQE-30 Vektor plus Insert (*pQE-30-plus-silicatein*; *); in Anwesenheit von Kieselsäure: *E. coli* ohne Vektor (▲), mit pQE-30 Vektor (◆), mit pQE-30 Vektor plus Insert (*pQE-30-plus-silicatein*, x). Die Wachstumskurven sind übereinander gelagert. Die Versuchsdauer betrug 18 h.

5.4 REM-Analyse

Für rasterelektronenmikroskopische Analysen (REM) wurden Flüssigkulturen von *E. coli*-Zellen, die mit dem Silicateingen transformiert worden waren, *E. coli* mit Expressionsvektor ohne das Silicateingen sowie *E. coli* ohne Expressionsvektor über 48 h sowohl mit und ohne Zusatz von IPTG und 60 μM Kieselsäure im Medium inkubiert. Die Aufnahmen zeigen, dass die Bakterien ohne Expressionsvektor, die in Anwesenheit von Kieselsäure gewachsen waren, als einzelne Zellen sichtbar waren (Abb. 20 A und D). *E. coli*-Zellen, die den Vektor ohne Silicateingen enthielten (pQE-

30) zeigten das gleiche Erscheinungsbild (Abb. 20 B, E und G) von einzelnen Zellen. Die Untersuchung der Bakterienzellen, die das Silicateingen enthielten zeigten, dass deren Oberflächen miteinander verbunden sind (Abb. 20 C und F) und die Zellen somit nicht mehr einzeln zu erkennen waren. Die nähere Untersuchung ergab, dass die Verbindungen der Zellen untereinander durch eine viskose Schicht entstehen, die sich an der Oberfläche der Zellen befindet (Abb. 20 H und I). Somit unterscheiden sich die Bakterienzellen, die das Silicateingen tragen, ganz deutlich von den Zellen, die den Expressionsvektor ohne Gen oder keinen Expressionsvektor enthielten.

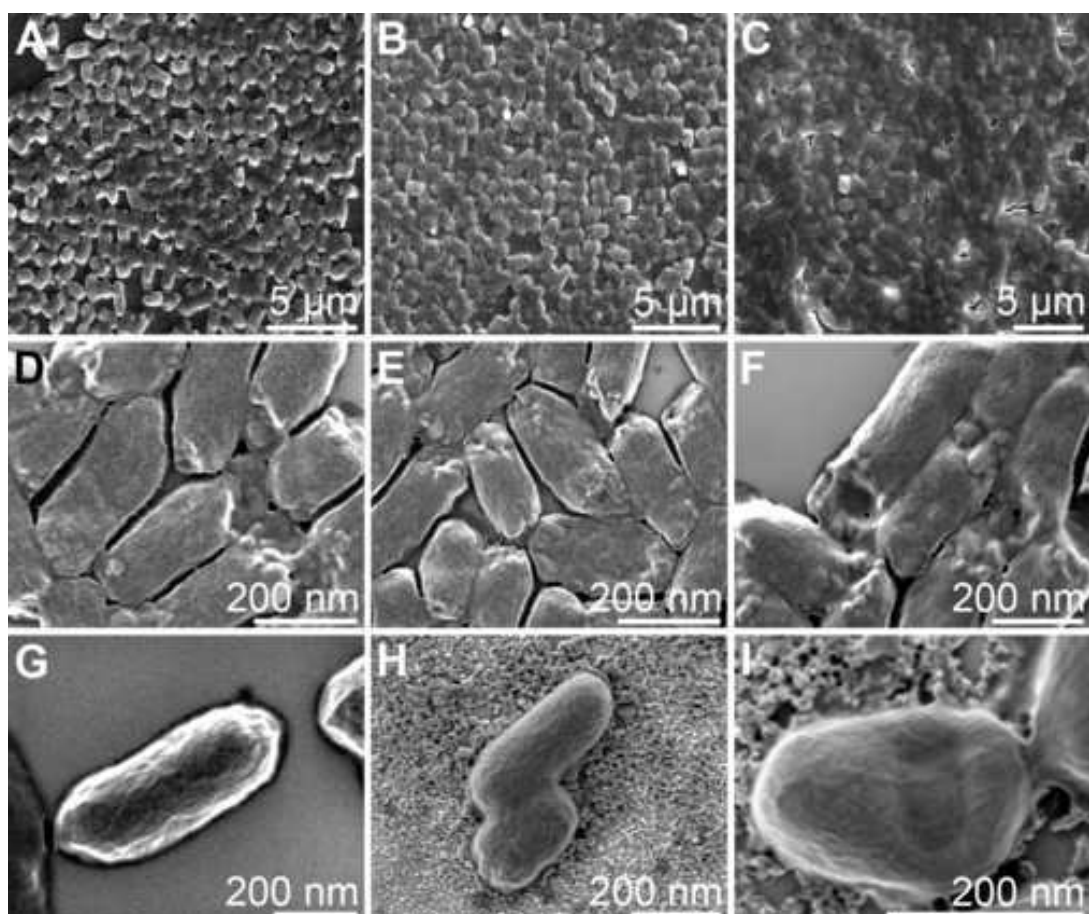


Abb. 20: REM-Analyse von *E. coli*. Bakterien ohne Vektor (A, D), *E. coli* ohne Silicateingen (*E. coli pQE-30-minus-silicatein* (B, E), sowie Bakterien mit Silicateingen (*pQE-30-plus-silicatein*) (C, F, H, I) wurden für 48 h in LB-Medium in Anwesenheit von 60 µM Kieselsäure inkubiert. Die Bilder D–I wurden mit einem hochauflösenden Feldemissionsrasterelektronenmikroskop aufgenommen.

5.5 Einwirkung verschiedener Stressoren auf die Bakterienzellen nach Expression von Silicatein und Inkubation mit Natriumsilicat

5.5.1 UVB-Bestrahlung der Bakterienzellen

Die ersten Ergebnisse zeigen, dass die Bakterien, die mit Natriumsilicat inkubiert worden waren (+MS), geringere SFF-Werte aufweisen, als Bakterien ohne Natriumsilicatinkubation (-MS, s. Abb. 21). Hier sieht man signifikante Werte bei 10-minütiger, 15-minütiger und 20-minütiger Bestrahlung mit UV-Licht. Es ist deutlich zu sehen, dass die Bakterien, die nicht mit Natriumsilicat inkubiert worden waren, mehr DNA-Strangbrüche (SFF) aufweisen als diejenigen Bakterien, die mit Natriumsilicat inkubiert worden waren.

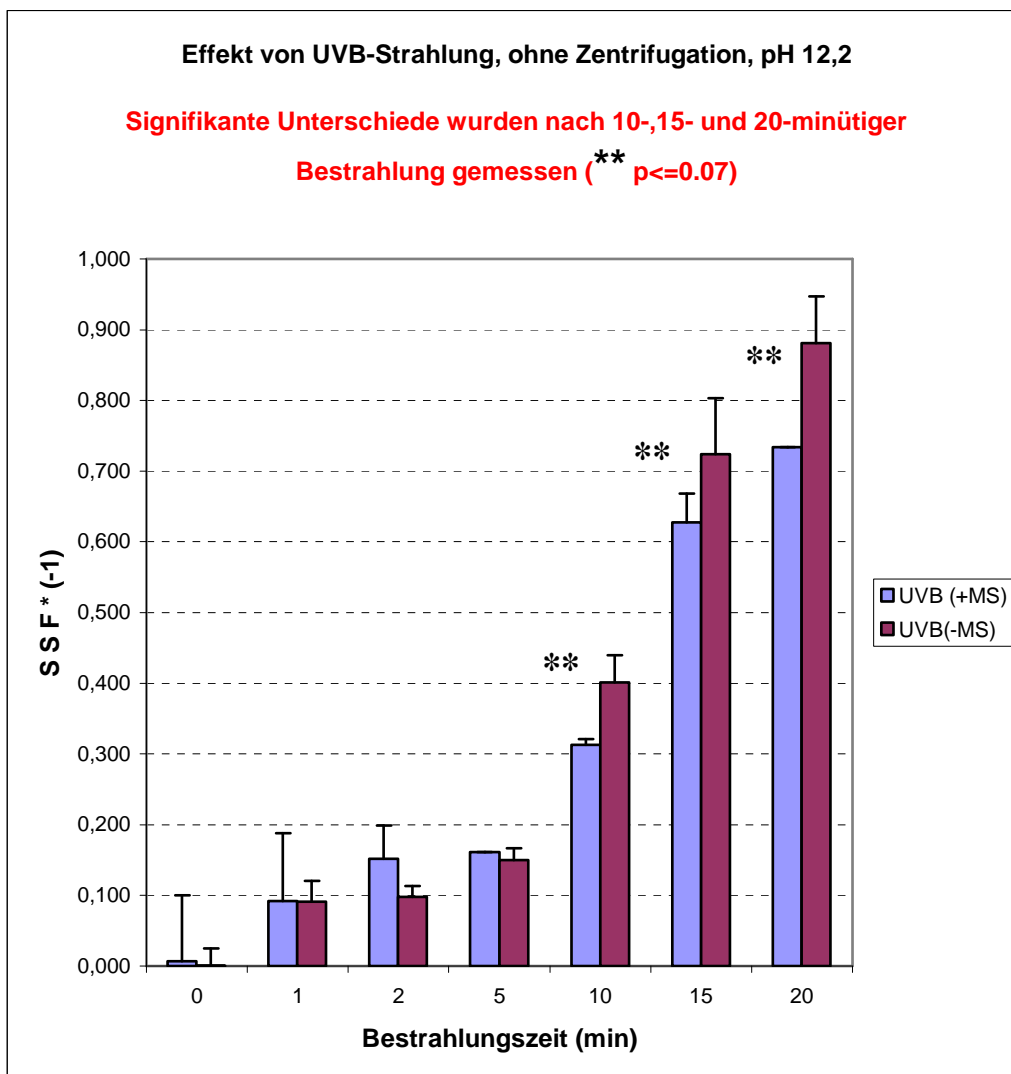


Abb. 21: Effekt von UV-Strahlung auf *E. coli* mit und ohne Inkubation mit Natriumsilicat nach Expression von Silicatein im Vergleich. UVB (+MS): UVB-Bestrahlung von *E. coli*-Zellen nach Inkubation mit Natriumsilicat; UVB (-MS): UVB-Bestrahlung von *E. coli*-Zellen ohne Inkubation mit Natriumsilicat.

5.5.2 Mechanische Beanspruchung der Silicathülle durch Schütteln/Mixen

In Abb. 22 sind die SSF *(-1)-Werte der Silicateinbakterien mit und ohne Inkubation mit Natriumsilicat dargestellt. Es handelt sich hier um negative Werte, da die gemessene Fluoreszenz für keine der gemessenen Proben abgenommen hat und die Werte somit ein positives Vorzeichen aufwiesen. Durch die Multiplikation der gemessenen Werte mit -1 konnten die Strangbrüche besser grafisch dargestellt werden. Es wurden hier keine DNA-Strangbrüche gemessen, sondern die Zunahme der intakten, doppelsträngigen DNA. Signifikante Werte sind bei 30-minütigem sowie 60-minütigem Schütteln zu sehen. Die Silicateinbakterien mit Natriumsilicat zeigen eine deutlich höhere Zunahme an doppelsträngiger DNA als die Bakterien, die nach der Silicateinexpression nicht mit Natriumsilicat inkubiert worden waren. Dennoch zeigen beide Bakterienstämme, sowohl +MS als auch -MS keine DNA-Strangbrüche, die durch das Schütteln verursacht worden waren.

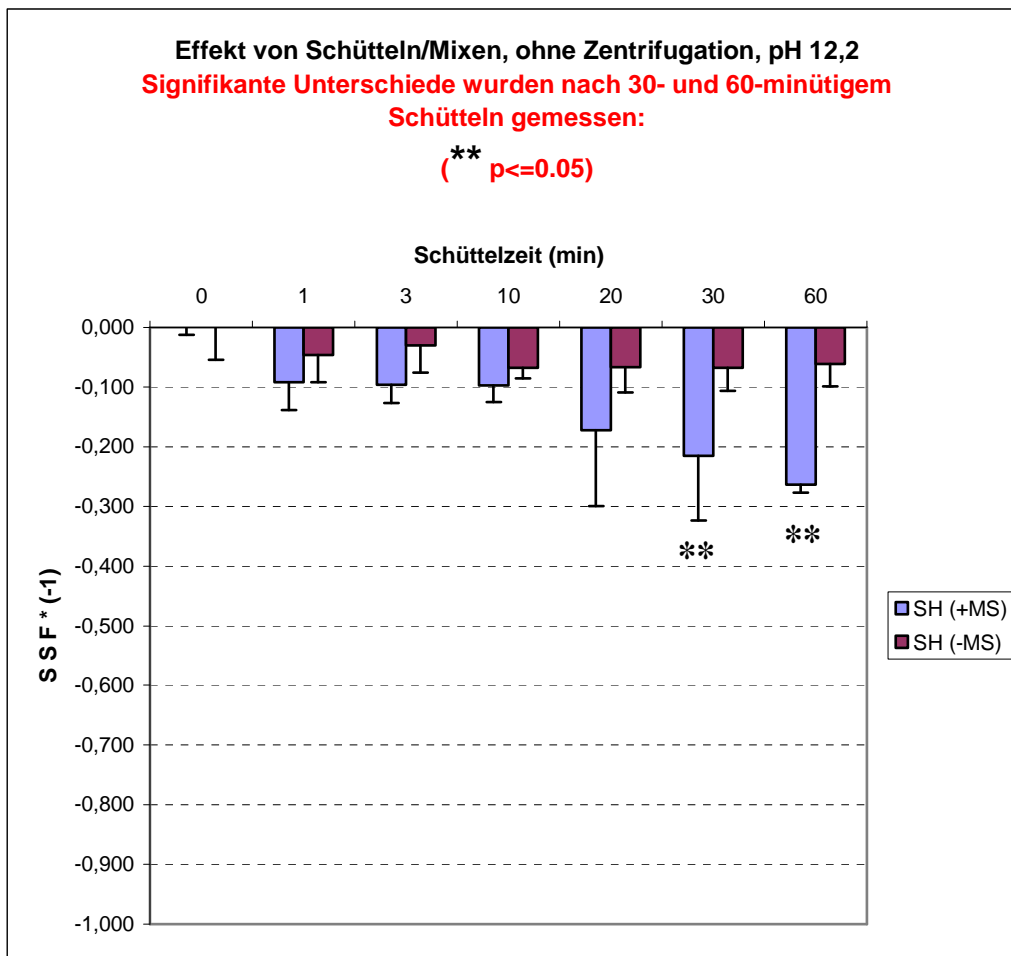


Abb. 22: Auswirkung von Schütteln/Mixen auf die DNA-Integrität von Silicateinbakterien mit und ohne Natriumsilicatinkubation. UVB (+MS): UVB-Bestrahlung von *E. coli*-Zellen nach Inkubation mit Natriumsilicat; UVB (-MS): UVB-Bestrahlung von *E. coli*-Zellen ohne Inkubation mit Natriumsilicat.

5.5.3 Untersuchung des bakteriellen Wachstums während mechanischer Beanspruchung anhand DNA-Fluoreszenz-Messung

In diesem Versuch wurden die gemessenen Werte für die DNA-Fluoreszenz nicht in Strangbrüche umgerechnet, sondern grafisch gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 23). Anhand der Fluoreszenz in Prozent konnte so die Zu- oder Abnahme der DNA-Menge und dadurch das Wachstum der Bakterien abgeschätzt werden. Gleich zu Beginn nach 1 min Schütteln zeigt sich ein Unterschied bezüglich der Fluoreszenz. Die Silicateinbakterien mit Natriumsilicat-Inkubation zeigen einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenz bis zu über 140 % nach 60 min Schütteln, während die Silicateinbakterien ohne Natriumsilicat bereits nach 21 min Schütteln eine leichte Abnahme der Fluoreszenz zeigen. Auch nach 60 min Schütteln bleibt die Fluoreszenz der *E. coli*-Zellen, die nicht mit Natriumsilicat inkubiert worden waren, im Bereich zwischen 90% und 100% im Vergleich zur Ausgangsfluoreszenz. Die DNA-Integrität steigt also bei den +MS-Bakterien mit der Zeit des Schüttelns, bei den -MS-Bakterien hingegen nicht.

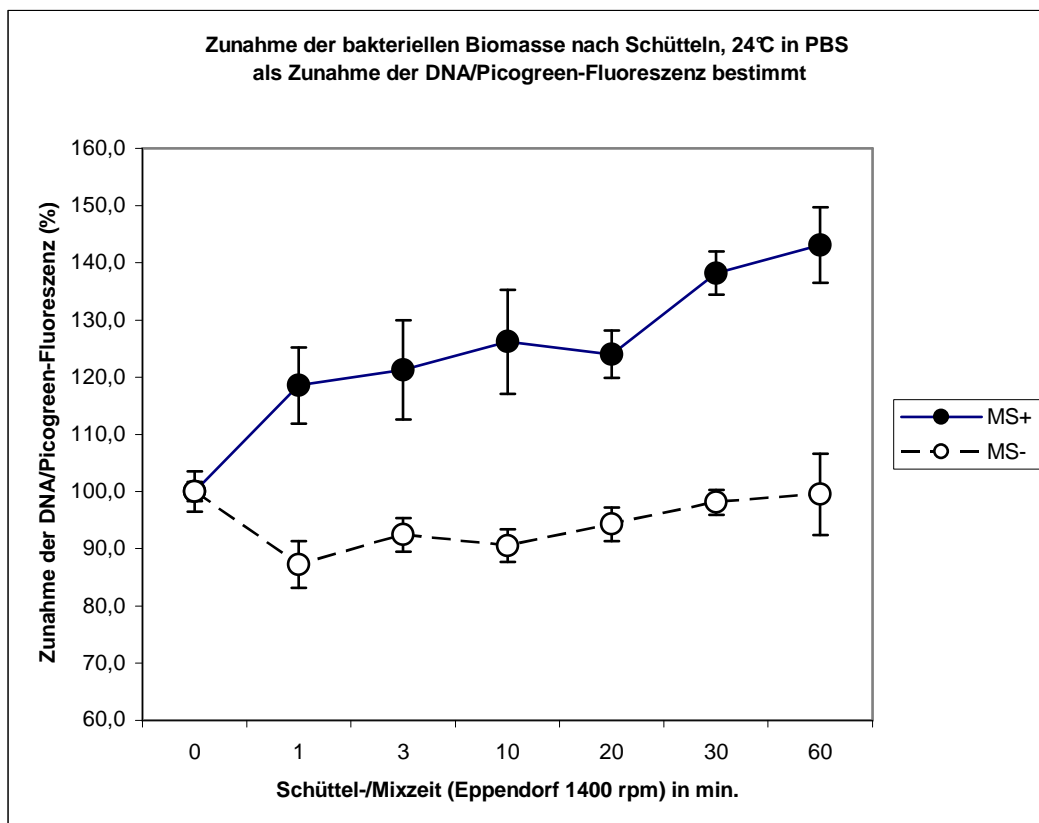


Abb. 23: Darstellung der Änderung der Fluoreszenz bei Silicateinbakterien mit und ohne Natriumsilicatinkubation zum Vergleich des bakteriellen Wachstums (abgeschätzt an der Menge doppelsträngiger DNA). MS+: *E. coli*-Zellen nach Inkubation mit Natriumsilicat; MS-: *E. coli*-Zellen ohne Inkubation mit Natriumsilicat.

5.5.4 Behandlung der Zellen mit Ultraschall

Als weitere Art von mechanischem Stress wurde die Behandlung von Bakterienzellen (MS+, MS-) im Ultraschallbad eingesetzt. In Abb. 24 sind die SSF * (-1) im Verlauf von 15 Minuten dargestellt. Hier zeigen sich ganz deutlich schon von Beginn an höhere Werte von Strangbrüchen bei den Silicateinbakterien, die nach der Expression mit Natriumsilicat inkubiert worden waren als bei den Silicateinbakterien, die nicht mit Natriumsilicat inkubiert worden waren. Letztere zeigten durchgehend weniger DNA-Strangbrüche. Diese Ergebnisse der Anwendung von Ultraschall als mechanischer Stressfaktor zeigt nun erstmals gegenteilige Effekte der Inkubation von Silicateinbakterien in natriumsilikathaltigem Medium als die vorhergehenden Untersuchungen.

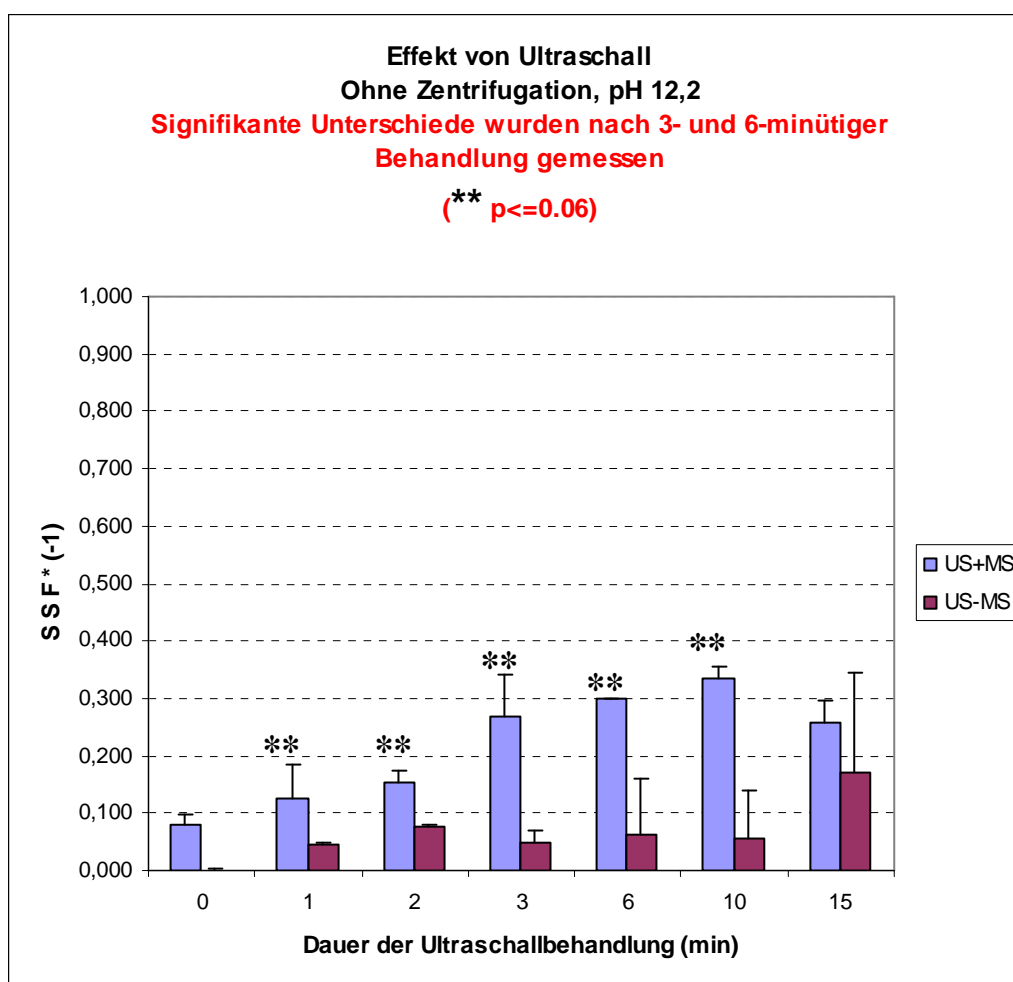


Abb. 24: Effekt von Ultraschall als mechanischer Stress auf *E. coli* mit und ohne Inkubation mit Natriumsilicat nach Expression. US+MS: Ultraschallbehandlung von *E. coli*-Zellen nach Inkubation mit Natriumsilicat; US-MS: Ultraschallbehandlung von *E. coli*-Zellen ohne Inkubation mit Natriumsilicat.

Der unterschiedliche Effekt von Ultraschall auf die beiden Bakterientypen ist in Abb. 25 nochmals in anderer Form dargestellt. Gemessen wurde wiederum die Fluoreszenz der DNA und diese wurde direkt gegen die Zeit aufgetragen. Erneut ist der Unterschied zwischen den beiden Bakterientypen zu sehen. Zu Anfang nimmt die Fluoreszenz beider Proben ab. Nach ca. 3 min Ultraschallbehandlung zeigen die –MS-Bakterien wieder eine stärkere Fluoreszenz als die +-MS-Zellen, die nach 15 min nur noch ca. 65% der Ausgangsfluoreszenz zeigen. Die –MS-Zellen dagegen zeigen noch eine Fluoreszenz von > 80% des Ausgangswertes.

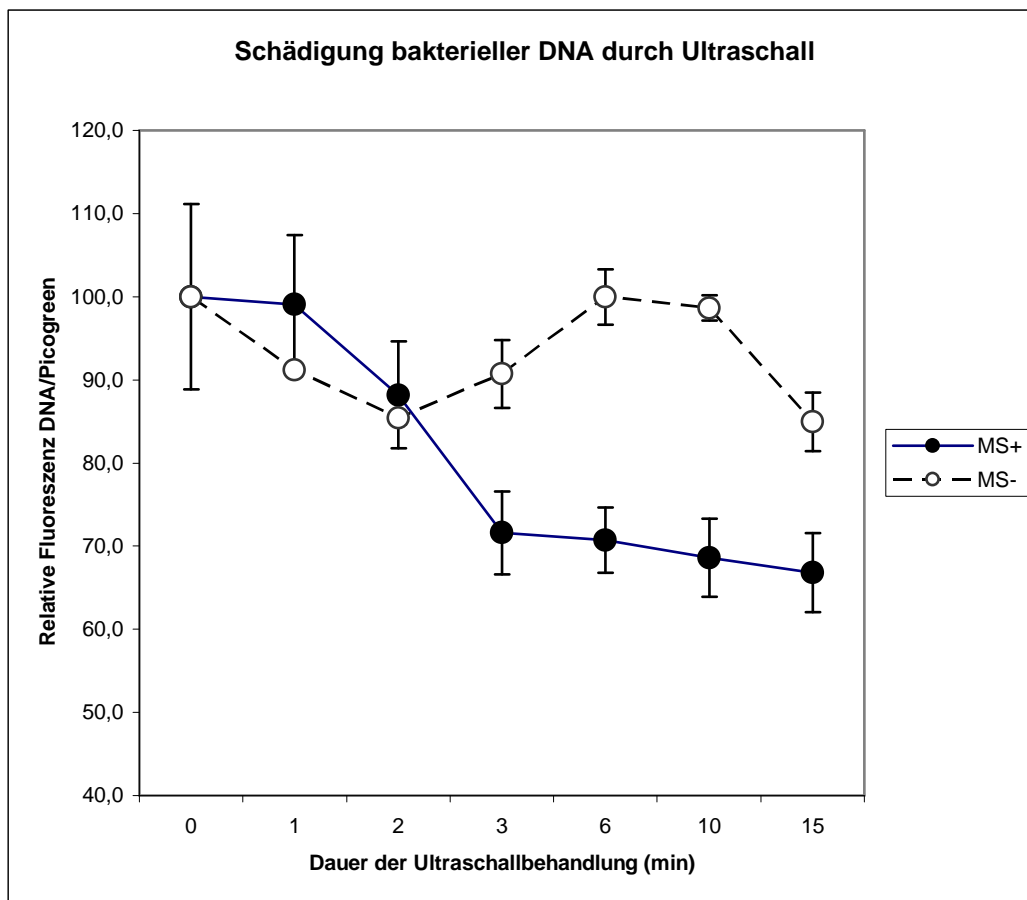


Abb. 25: Darstellung des Aufbrechens der bakteriellen DNA-Stränge durch Ultraschallbehandlung. Zu sehen ist die Fluoreszenz von DNA/PicoGreen® pro Zeiteinheit. MS+: *E. coli*-Zellen nach Inkubation mit Natriumsilicat; MS-: *E. coli*-Zellen ohne Inkubation mit Natriumsilicat.

6 DISKUSSION

6.1 Expression von Silicatein durch *E. coli* in Abhängigkeit von Natriumsilicat

In dieser Arbeit wurde Silicatein mit dem Ziel, sowohl die Expressionskinetik zu analysieren als auch den bakteriellen Wirt zu verkapseln, in *E. coli* transformiert (s. Abb. 26). Wie erwartet exprimierte der *E. coli* Stamm (*pQE-30-plus-silicatein*) nach Induktion mit IPTG Silicatein, während der *E. coli* Stamm, der nur den Vektor, aber nicht das Gen für Silicatein enthielt (*pQE-30-minus-silicatein*), keine Silicateinexpression zeigte. Sehr erstaunlich war das Ergebnis, dass die Zugabe von Natriumsilicat in das Medium eine signifikante Hochregulierung der heterologen Expression von Silicatein in *E. coli* hervorruft. Die durchgeführten Western-Blots unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern gegen Silicatein zeigten, dass das Level des rekombinanten Proteins nach 4-stündiger Inkubation mit Natriumsilicat auf das 2,6-fache im Vergleich zu Silicateinbakterien, die nicht mit Natriumsilicat inkubiert worden waren, anstieg (s. Abb. 15). Immunfluoreszenzstudien unter Verwendung der polyklonalen Antikörper gegen Silicatein zeigten den gleichen Effekt (s. Abb. 16). Die Expression der Silicateingene bei *Suberites domuncula* wird u.a. durch die extrazelluläre Konzentration an gelöstem Silicat reguliert, wobei die Silicatkonzentration auch das Gen für Kollagen steuert, welches ebenfalls an der Bildung der Schwamm-Spiculae beteiligt ist. Bei Studien mit Schwamm-Primmorphen wurde nachgewiesen, dass das Gen für Silicatein bei Anwesenheit von Silizium in der Umgebung hochreguliert wird: Nach Erhöhung der Konzentration von gelöstem Silicat im Seewassermedium von ca. 1 μM auf ca. 60 μM wurde die Expression von Silicatein durch die Primmorphe stark hochreguliert. Bei höherer Siliziumkonzentration war nur eine schwache Expression vorhanden (Krasko et al. 2000). Des Weiteren wird die Expression von Silicatein durch die Konzentration extrazellulärer Eisenionen beeinflusst (Krasko et al., 2000; Müller et al., 2003c).

Für die Immunfluoreszenzexperimente wurde die bakterielle Zellwand nicht mit einem Chelator, Detergenz oder Enzym permeabilisiert. Die Prozedur der Immunfluoreszenzmikroskopiemachte deutlich, dass sich das exprimierte Silicatein während des Zentrifugationsvorgangs zusammen mit den Bakterien als Pellet abgelagert hatte (s. Abb. 16). Sehr starke Immunosignale zeigten sich um die Bakteriencluster der Kulturen herum, die mit Kieselsäure inkubiert worden waren

(s. Abb. 16 B). Bis heute wurde ein solch stimulierender Effekt von Kieselsäure auf die Silicateinexpression in diesem Zusammenhang nicht beschrieben.

Es wurde bereits beschrieben, dass *E. coli* in lebendem Zustand in Silica-Gel gehalten werden kann (Croce et al., 2004), in welchem die Zellen ihre Fähigkeit, rekombinante Proteine zu exprimieren, beibehalten (Chen und Strevett, 2003). Ebenso ist bereits bekannt, dass die *E. coli*-Zellen an Silicapartikel oder Glasoberflächen hafteten, wenn Huminsäuren anwesend waren (Desimone et al., 2005). Der erste Nachweis, dass Silicagele keinen nachteiligen Effekt auf *E. coli* ausüben, wurde bereits publiziert (Parent und Velegol, 2004). Die Autoren konnten zeigen, dass mehr Bakterienzellen in Silicagel kultivierbar verblieben, als in wässrigen Suspensionen. In der Studie wurde hervorgehoben, dass Silicagele möglicherweise den Bakterien erlauben, mittels chemischer Kommunikation (*quorum sensing*) zu interagieren (Parent und Velegol, 2004). Neuere Wachstumsstudien mit *E. coli* in Medium, das Silica-Nanopartikel enthält, zeigten ebenso keine ersichtlichen Zeichen von Toxizität für die Bakterien (Nassif et al., 2004). Der pQE-30-Vektor, der den T5-Promotor sowie das lac-Operon enthält (Williams et al., 2006) wurde nie auf Promotoraktivität in Anwesenheit von IPTG zusammen mit Silicat untersucht. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass in Anwesenheit von Kieselsäure die Freisetzung des rekombinanten Silicateins von *E. coli* (*pQE-30-plus-silicatein*) drastisch ansteigt.

6.2 Biosilicabildung durch *E. coli* nach Transformation mit dem Silicatein- α -Gen

Um nachzuweisen, dass das durch *E. coli* rekombinant produzierte Silicatein für die Bildung von poly(Silicat) aus monomerer Kieselsäure verantwortlich ist, wurden die Bakterien in natriumsilicathaltigem Medium inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterienproben mit Rhodamin 123 gefärbt (Slupska et al., 1999). Hierbei konnte eine helle, grüne Fluoreszenz gezeigt werden. Es wurden keine Lamellen identifiziert (s. Abb. 17). Der Farbstoff Rhodamin 123 bindet an polymere Silica-Verbindungen (Li et al., 1989). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde das Fluorochrom in die sich bildenden Silica-Partikel eingebaut. Die Tatsache, dass Rhodamin 123 an die Bakterienoberfläche gebunden hat, kann als Beweis

angesehen werden, dass poly(Silicat) um die Bakterien herum gebildet wurde und diese somit mit amorphem Silica verkapselt waren.

In einer weiteren Serie von Experimenten wurden die auf LB-Agar in Gegenwart von Kieselsäure gewachsenen Bakterien mit einem Testsystem für freie Kieselsäure getestet, welches die Kolonien aufgrund des β -Silicomolybdat-Komplex blau anfärbt (Iler, 1979; Dietzel und Usdowski, 1995). Bakterien, welche das Silicateinogen enthielten (*pQE-30-plus-silicatein*) zeigten keine Farbreaktion in Verbindung mit den Reagenzien, während *E. coli*-Zellen, die nur den Expressionsvektor, nicht aber das Silicateinogen enthielten (*pQE-30-minus-silicatein*), stark blau gefärbt waren (s. Abb. 18). Dies ist auf eine Akkumulation freier Kieselsäure in den *E. coli*-Zellen und dem umgebenden Agar zurückzuführen. Dieses Ergebnis unterstützt die Schlussfolgerung, dass *E. coli pQE-30-plus-silicatein* poly(Silicat) bildet, welches nicht durch die Reagenzien blau angefärbt wird, während in den Proben von *E. coli pQE-30-minus-silicatein* nur monomere Kieselsäure vorhanden ist, die als positive Reaktion mit den Reagenzien des Testsystems für freie Kieselsäure blau gefärbt wird.

Rekombinantes Silicatein behält seine katalytische Aktivität auch nach Immobilisierung an Oberflächen (Tahir et al. 2004) bei. Es konnte durch Tahir und Kollegen erfolgreich an der Oberfläche von Gold immobilisiert werden. Das rekombinante Silicatein bindet dabei über sein Histidin-Tag an den Chelatbildner NTA-Alkanthiol indem ein Ni^{2+} -Komplex gebildet wird. Die Bildung von Biosilica durch das immobilisierte Protein konnte mit Hilfe verschiedener Techniken wie Rasterkraft-Mikroskopie (*Scanning Force Microscopy*, SFM) und Rasterelektronenmikroskopie (SEM) nachgewiesen werden (Tahir et al. 2004).

Es wird angenommen, dass das nach Transformation mit dem Silicateinogen und Induktion mit IPTG durch die *E. coli*-Zellen (*pQE-30-plus-Silicatein*) exprimierte Silicatein an deren Zelloberfläche abgeschieden wird. Dort katalysiert es nach weiterer Inkubation mit monomerer Kieselsäure (Natriumsilicat) die Bildung von poly(Silicat). Wie bereits in Kapitel 1.6 beschrieben, wird durch die Verkapselung lebender Zellen bioaktives Material immobilisiert (Muealidhar et al., 2001). Durch Verkapselung werden Mikroorganismen u.a. vor Stress (Mellati et al., 2010) und dem Angriff durch abbauende Enzyme geschützt.

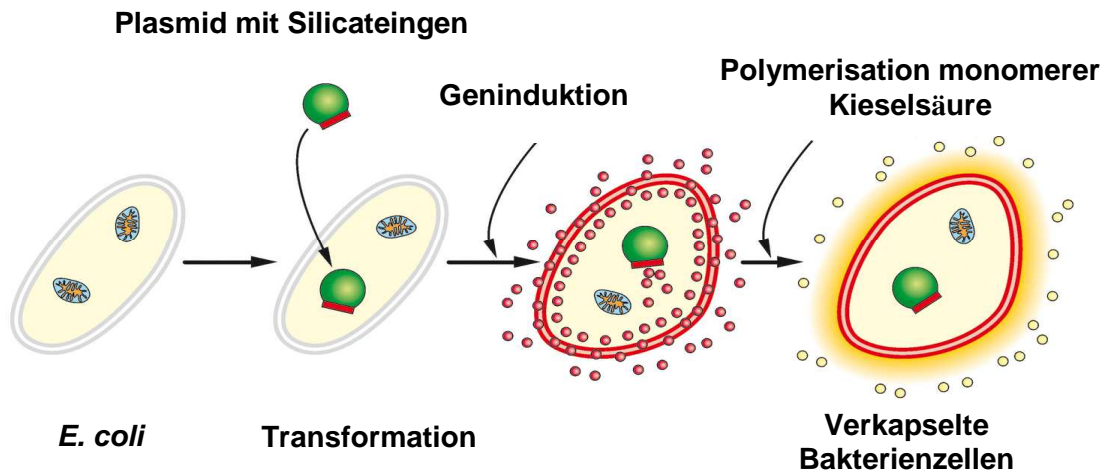


Abb. 26: Schema der Verkapselung von *E. coli* mit poly(Silicat). Nach der Expression wird das rekombinante Silicatein an der Zelloberfläche deponiert und katalysiert dort die Bildung von poly(Silicat) aus Kieselsäure.

6.3 Wachstumsstudien

Die Messwerte für die Wachstumskurven der *E. coli*-Zellen wurden sowohl in An- als auch in Abwesenheit von expressionsinduzierendem IPTG sowie von gelöster Kieselsäure im Kulturmedium gemessen. Die Wachstumskinetik aller Proben, unabhängig von der Anwesenheit von IPTG oder Kieselsäure waren nahezu identisch (s. Abb. 19). Dies unterstützt die Schlussfolgerung, dass die Silicathülle, die an der Zelloberfläche von *E. coli* (*pQE-30-plus-silicatein*) nach Induktion mit IPTG und Inkubation mit Kieselsäure gebildet wurde, keinen negativen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Bakterien zur Folge hat. Die Bakterien müssen demzufolge eine Möglichkeit haben, trotz Silicathülle weiterhin Nährstoffe aus dem umgebenden Medium aufzunehmen und sich zu teilen. Ebenso scheinen sie in der Lage zu sein, Stoffwechselprodukte nach außen auszuscheiden. Silicatein besitzt eine sowohl anabole (Silica-Polymerase) als auch katabole Aktivität (Silica-Esterase) (Müller et al., 2008). Deshalb kann angenommen werden, dass sich, katalysiert durch Silicatein, an der Bakterienoberfläche eine flexible Silica-Hülle gebildet hat. Diese scheint aufgrund der Esterase-Aktivität des exprimierten Silicateins umgebaut oder perforiert werden zu können. Die Silica-Hülle ermöglicht den Bakterienzellen weiterhin ein Wachstum, das mit nicht-verkapselten Bakterien vergleichbar ist. Al-Saraj und Kollegen beschrieben bereits, dass Bakterien, die mittels Sol-Gel-

Technologie verkapselt wurden, ihren Stoffwechsel aufrecht erhalten, da das Gel feine Poren besitzt, durch die Nährstoffe in die Zelle gelangen und Nebenprodukte die Zelle verlassen können (Al-Saraj et al., 1999). Laut Gadd und White weisen verkapselte Zellen sogar eine verbesserte Vitalität im Vergleich zu nicht verkapselten Zellen auf (Gadd und White, 1993).

6.4 REM-Analyse

Um die Ergebnisse der hochregulierten Expression von funktionell aktivem Silicatein in und um die transformierten Bakterien herum zu unterstützen, die zuvor mit der Immunofluoreszenzfärbung (s. 5.1.2) und durch chemische Analysen (Silicomolybdat-Reaktion, s. 5.2.2) gezeigt werden konnte, wurden zusätzlich elektronenmikroskopische Studien durchgeführt. Diese zeigten, dass *E. coli* (*pQE-30-plus-silicatein*) nach Induktion mit IPTG und nachfolgender Inkubation mit Kieselsäure an ihrer Zelloberfläche eine Hülle aus Silica aufweisen (s. Abb. 20). All diese Ergebnisse bestärken die Vermutung, dass die mit dem Silicatein transformierten *E. coli*-Zellen tatsächlich in der Lage sind, sich mittels exprimiertem und aktivem Silicatein mit einer Hülle aus poly(Silicat) zu verkapseln. Zudem sind diese verkapselten Bakterien weiterhin in der Lage, Stoffwechsel zu betreiben und zeigen normales Wachstumsverhalten (s. Abb. 19) im Vergleich zu Bakterien, die zwar den Expressionsvektor, nicht aber das Silicatein enthielten.

6.5 Mechanismus der Silicateinreaktion

Das Schwammprotein Silicatein ist das erste Enzym, von dem beschrieben wurde, dass es die Bildung eines anorganischen Polymers (Silica) aus einem monomeren Vorläufer (Tetraethoxysilan oder Orthokieselsäure) katalysiert (Schröder et al., 2010). Die Silicateine weisen eine sehr hohe Ähnlichkeit zu den Cathepsinen, eine Familie der Cysteinproteasen auf. Genauer betrachtet sind sie der Cathepsin L-Unterklasse der papainähnlichen Cysteinproteinasen (Shimizu et al., 1998, Weaver und Morse, 2003) zuzuordnen. Im Gegensatz zu Silicatein sind Cathepsine nicht in der Lage, Silica zu präzipitieren (Schröder et al., 2007a). Neuere Untersuchungen zeigen eine größere Ähnlichkeit der Silicateine zu Cathepsin S als, wie bisher angenommen, zu Cathepsin L (Müller et al., 2007d). Sowohl Silicatein- α als auch Cathepsin S enthalten jeweils sechs zusätzliche Cysteinreste, die an der Bildung intramolekularer

Disulfidbrücken beteiligt sind, was darauf schließen lässt, dass beide Proteine die gleiche dreidimensionale Struktur besitzen. Im Vergleich zu Cathepsin S ist der Cysteinrest des aktiven Zentrums in Silicatein- α durch einen Serinrest ersetzt. Dieser Serinrest ist essentiell für den katalytischen Mechanismus von Silicatein. Zusätzlich ist ein Hydroxy-Aminosäuren-(Serin-)Cluster (AS₂₆₇ bis AS₂₇₄; Shimizu et al., 1998, Krasko et al., 2000) im Silicateinmolekül vorhanden (Schröder et al., 2007a). Von diesem wird angenommen, dass er als Template für die Biosilica-Ablage dient. Eine weitere markante Stelle innerhalb der Silicatein-Gensequenz ist die katalytische Triade im aktiven Zentrum von Silicatein. Sie konnte bis zu Histidin, Asparagin und Serin hin eingegrenzt werden (Cha et al., 1999). Es konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass die Hydroxylgruppe des Ser-26 und der Imidazolrest von His-165 Schlüsselrollen bei der Kondensation von TEOS spielen. Es wird vermutet, dass diese Funktionalitäten an der Bildung von pentavalenten Silizium-Übergangsformen beteiligt sind, welche durch eine Donor-Bindung zum Stickstoff des Imidazol stabilisiert werden (Zhou et al., 1999). Neue Daten der Arbeitsgruppe Prof. W.E.G. Müller haben bestätigt, dass Silicatein eine duale Enzymfunktion besitzt, Es fungiert sowohl als Silica-Polymerase, als auch als Silica-Esterase (Müller et al., 2008). Silicateine, wie das in dieser Arbeit verwendete Silicatein- α , können mittlerweile erfolgreich in *E. coli* exprimiert werden (Krasko et al., 2000; Chat et al., 1999). Die so erhaltenen rekombinanten Enzyme behalten ihre enzymatische Aktivität bei und sind in der Lage, aus Siliziumalkoxiden oder Kieselsäure/Orthosilicat bei Raumtemperatur, neutralem pH-Wert und in wässrigen Puffersystemen poly(Silicat) zu bilden.

Bisher basierten die Modelle der silicateinkatalysierten Bildung von poly(Silicat) auf der Verwendung synthetischer Substrate (hydrolytische Spaltung von Tetraethoxysilan zu Silanolkomponenten) oder sie berücksichtigten nur die Bildung von kaum reaktiven Kieselsäure-Dimeren. Die genaue Wirkungsweise von Silicatein war bisher vor allem deswegen unklar, weil das physiologische Substrat nicht bekannt ist (Schröder et al., 2010). Es ist annehmbar, dass der Mechanismus der enzymatischen Bildung von poly(Silicat) ähnlichen Prinzipien folgt, wie sie für die chemische Polykondensationsreaktion beschrieben wurden. Das Startmolekül für die chemische Polykondensationsreaktion ist das Monomer Orthokieselsäure, in welchem das Siliziumatom tetraedrisch von 4 Hydroxylgruppen umgeben ist.

[Si(OH)₄]. Bei neutralem pH-Wert und einer Konzentration von 1-2 mM geht dieses Molekül mehrere Polykondensationsreaktionen ein und es werden Siloxanbindungen (Si-O-Si) gebildet (Mann, 2001 und Iler 1979). Diese Reaktion wird nicht von Enzymen katalysiert und kann sowohl zwischen zwei nicht ionisierten Kieselsäuremolekülen als auch zwischen einem ionisierten und einem nicht ionisierten Kieselsäuremolekül stattfinden (Schröder et al., 2008). Bei den initialen Produkten der Polykondensationsreaktion handelt es sich um Dimere, die bevorzugt mit Monomeren reagieren, um Trimere und höhere Oligomere zu bilden (Schröder et al., 2010). Bisher wurden die Untersuchungen bezüglich der Enzymaktivität von Silicatein hauptsächlich mit TEOS (Tetraethoxysilan) *in vitro* durchgeführt (Cha et al., 1999). Der Reaktionsmechanismus von Silicatein mit Kieselsäure, die vermutlich das physiologischen Substrat in Schwämmendarstellt, wurde bisher nicht untersucht.

Cha et al. (Cha et al., 1999) stellten vor einigen Jahren die These eines Zweischnitt-Mechanismus für die silicateinvermittelte Silicabildung mit TEOS als Substrat auf. Den ersten (geschwindigkeitsbestimmenden) Schritt stellt demnach die Hydrolyse des Alkoxidsubstrates dar. Darauf folgt Schritt 2, nämlich die nachfolgende Polymerisierung der resultierenden Silanolkomponenten unter Bildung von poly(Silicat) (Polykondensations-Reaktion) Die Interaktion der Hydroxylgruppe der Seitenkette des Serinrestes mit der Imidazolgruppe des Histidinrestes des aktiven Zentrums des Enzyms wird als essentiell für den katalytischen Mechanismus von Silicatein angesehen (Zhou et al., 1999). Der geschwindigkeitbestimmende Schritt hierbei ist die Hydrolyse des Alkoxids zu Beginn, die benötigt wird, um die reaktive Si-O-Spezie zu bilden. Die Rate der spontanen Hydrolyse ist bei neutralem pH am niedrigsten (Iler, 1979). Die Nucleophilität der Serin-Hydroxylgruppe scheint durch die Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu dem Imidazol-Stickstoff erhöht zu werden, wodurch der nukleophile Angriff (S_N2) der Hydroxylgruppe auf das Silizium des Alkoxid-Substrates leichter vonstatten geht. Der nukleophile Angriff auf das Silizium setzt Ethanol frei. Es wird ein pentavalentes Intermediat gebildet (Cha et al., 1999; Zhou et al., 1999). Die vorübergehende kovalente Bindung zwischen Enzym und Substrat wird dann durch Wasser hydrolysiert. Die reaktiven Silanolmoleküle, die durch die Hydrolyse gebildet werden, gehen danach Kondensationsreaktionen ein. Silizium-Alkoxide, wie sie in den *in vitro* Assays zur Untersuchung der Silicateinaktivität verwendet werden, sind keine natürlichen Vorläufermoleküle der

Silicabildung in Schwämmen. Das natürliche Substrat des Enzyms ist bis jetzt noch nicht bekannt. Kieselsäure bildet Komplexe mit Katecholen, bestimmten Zuckern oder Polyolen (Evans et al., 1990; Perry et al., 1992; Harrison et al., 1995; Harrison 1996; Kinrade et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass Silicatein eng mit (zuckerbindenden) Lectinen verbunden ist (Müller et al., 2007a; Wiens et al., 2006). Von daher ist es vorstellbar, dass Kieselsäure-Zucker-Komplexe mögliche Substrate für Silicatein darstellen, wie z.B. bei der Biosilifizierung bei Diatomeen vermutet (Kinrade et al., 2002). Bemerkenswert ist, dass Silicatein neben einer Silica-polymerisierenden Aktivität auch eine proteolytische (Cathepsin-ähnliche) Aktivität aufweist, welche ebenfalls an der Spiculaebildung beteiligt sein könnte (Müller et al., 2003b).

Für die katalytische Bildung von poly(Silicat) durch Silicatein schlagen Schröder et al. nun ein neues Modell vor, das die Bildung einer reaktiven und ringförmigen Kieselsäurespezies annimmt, welche die Polykondensierung von poly(Silicat) begünstigt (Schröder et al., 2010). Man geht hier von dem möglichen physiologischen Substrat Orthokieselsäure aus. Anhand der Röntgenstruktur des humanen Procathepsin S wurde ein 3D-Modell des reifen Silicatein- α -Moleküls erstellt. Die 3D-Modellstudien zeigen, dass das synthetische Substrat TEOS zwar in der Substrat-Tasche von Silicatein- α Platz findet, aber für das natürliche Substrat Orthosilicat mehr Platz vorhanden ist, da dessen Moleküle kleiner als die von TEOS sind. Analysen ergaben, dass Oligomere von bis zu acht Einheiten in der Substrat-Tasche des Silicatein- α -Moleküls von *Suberites domuncula* Platz finden (Schröder et al., 2010). Die nachfolgende Abbildung 27 zeigt die einzelnen Reaktionsschritte der durch Silicatein- α katalysierten Polykondensierung von amorphem Silica. .

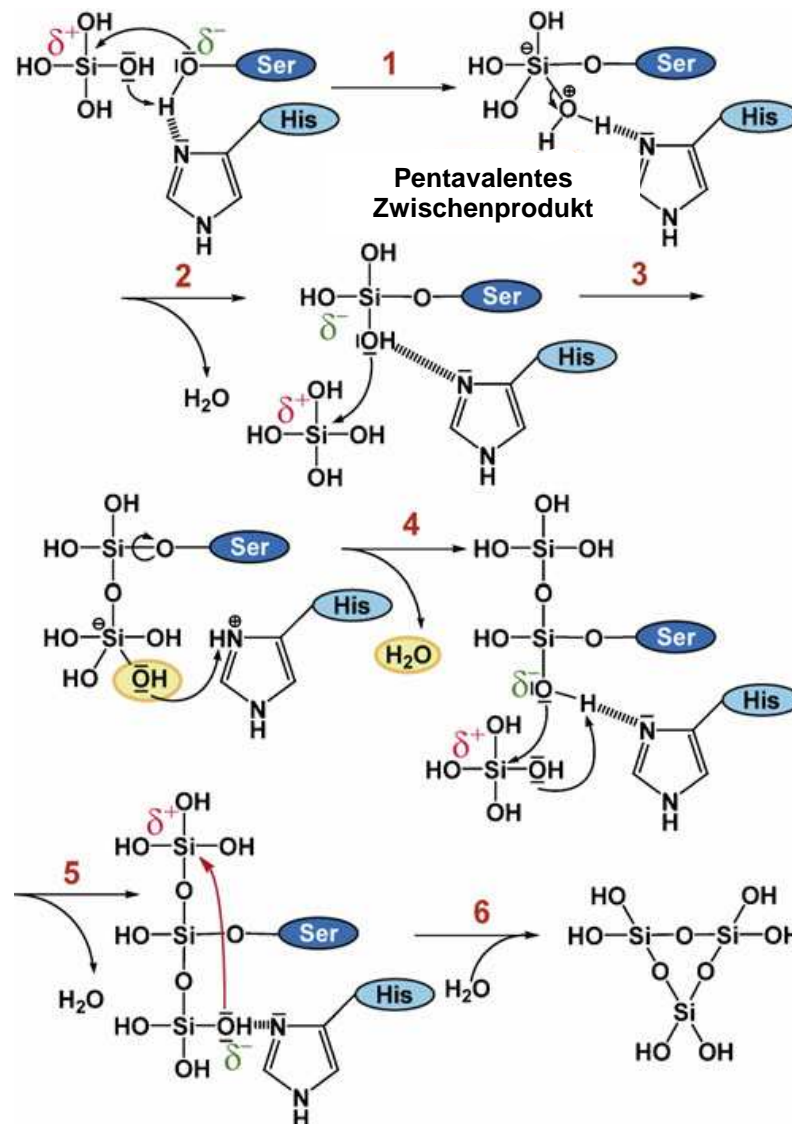


Abb. 27: Vorgeschlagener Mechanismus der Silicateinreaktion (aus: Schröder et al; 2010). **Schritt 1:** Nukleophiler Angriff des Sauerstoffatoms des Serins auf das Substrat und Transfer eines Protons vom Stickstoff des Imidazols des Histidinrestes auf die OH-Gruppe des Kieselsäuremoleküls. **Schritt 2:** Freisetzen eines Wassermoleküls aus dem gebildeten pentavalenten Intermediat. **Schritt 3:** Nukleophiler Angriff des Sauerstoffatoms einer der OH-Gruppen des kovalent gebundenen Kieselsäuremoleküls auf das Siliziumatom eines zweiten Kieselsäuremoleküls, ermöglicht durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen der gebundenen Kieselsäure und dem Stickstoff des Imidazols. **Schritt 4:** Freisetzung von Wasser nach Übertragung eines Protons von der Imidazolgruppe. **Schritt 5:** Nukleophiler Angriff des Sauerstoffatoms einer weiteren OH-Gruppe des ersten Kieselsäuremoleküls nach Rotation der Si-O-C-Bindung zwischen diesem Molekül und des Serinsrests des Enzyms auf das Siliziumatom einer dritten Orthokieselsäureart, wiederum ermöglicht durch Wasserstoffbrückenbindung an das Stickstoffmolekül des Imidazols. **Schritt 6:** Ringbildung der gebildeten (enzymgebundenen) Triokieselsäure durch nukleophilen Angriff des (negativ geladenen) Sauerstoffs einer OH-Gruppe der zuletzt

aufgenommenen Kieselsäureart auf das (positiv geladene) Silizium der zweiten Kieselsäureart und Abgabe des gebildeten reaktiven Trisiloxanringes nach Hydrolyse der Si-O-C-Bindung.

Es wird angenommen, dass sowohl die Anwesenheit der Serin- und Histidinreste im katalytischen Zentrum von Silicatein als auch Ihre Interaktion während der Bildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ser-OH und dem N des Imidazols des Histidinrestes essentiell für diesen katalytischen Mechanismus sind. Wie auch der von Cha et al. (1999) vorgeschlagene Mechanismus beginnt der von Schröder et al. (2010) vorgeschlagene Mechanismus mit dem initialen Schritt des nukleophilen Angriffs (Typ S_N2) des elektronegativen Sauerstoffatoms der OH-Gruppe des Serinrestes auf das elektropositive Silizium-Atom eines Kieselsäuremoleküls in der katalytischen Tasche des Silicatein- α -Moleküls (s. Abb. 27, Schritt 1). Vermutlich erleichtert die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Serin und Histidin diesen Schritt, der die Nukleophilie der OH-Gruppe des Serins erhöht. Der Protonentransfer vom N-Atom des Histidins (Wasserstoffbrückenbindung zwischen Serin und Histidin) auf eine der OH-Gruppen des pentavalenten, gebildeten Intermediates führt dann zur Freisetzung eines Wassermoleküls (Abb. 27, Schritt 2). Dies wiederum führt zur Bildung einer Kieselsäure-Spezies, die kovalent an den Serinrest im katalytischen Zentrum des Silicateins gebunden ist. Diese vollzieht dann einen nukleophilen Angriff auf das Siliziumatom eines zweiten Kieselsäuremoleküls, das in die Substrattasche von Silicatein eintritt. Hierdurch wird die Nukleophilie des angreifenden Sauerstoffatoms der OH-Gruppe des ersten Kieselsäuremoleküls wahrscheinlich erhöht, nachdem eine Wasserstoffbrückenbindung zum Imidazol des Histidinrestes im katalytischen Zentrum von Silicatein ausgebildet wurde (s. Abb. 27, Schritt 3). Durch die Freisetzung eines Wassermoleküls, erleichtert durch Protonentransfer vom Stickstoff des Imidazols des Histidinrestes, wird ein Dikieselsäuremolekül gebildet (s. Abb. 27, Schritt 4). Dieses ist durch eine esterähnliche Bindung an Silicatein gebunden. Eine Drehung der Esterbindung ermöglicht dann Wechselwirkungen einer zweiten OH-Gruppe der enzymgebundenen Kieselsäureeinheit mit dem Stickstoff des Imidazols des Histidinrestes im katalytischen Zentrum. Dies ermöglicht ein weiteres Wachstum der Dikieselsäure durch nukleophilen Angriff auf ein drittes Kieselsäuremolekül (s. Abb. 27, Schritt 5). Durch Wiederholung der 4 Schritte nukleophiler Angriff, Protonenübertragung, Freisetzung von Wasser und Rotation werden immer größere Kieselsäureoligomere gebildet. Schröder et al. (2010)

schlagen vor, dass die Freisetzung der silicateingebundenen Trikieselsäure (oder höhere Oligomere) durch Ringbildung derselben erfolgt. Die kovalente Bindung zwischen Silicatein und dem Kieselsäureoligomer wird durch Wasser hydrolysiert (s. Abb. 27, Schritt 6). In dem von Schröder et al. (2010) vorgeschlagenen Mechanismus ist Wasser lediglich im Freisetzungsschritt des gebildeten Kieselsäureoligomers beteiligt. Dies entspricht dem Mechanismus für das Substrat TEOS, wie er von Cha et al. (1999) vorgeschlagen wurde, bei der die hydrolytische Freisetzung einer enzymgebundenen Triethoxysilanol-Spezies erfolgt. Eine weitere Polymerisierung von Kieselsäure durch die silicateinkatalysierte Reaktion scheint durch chemische Prozesse angetrieben zu werden (Wiens et al., 2009). Das Wachstum der Partikel durch den so genannten Ostwald-Reifeprozess führt letztendlich zur Bildung bzw. Ablagerung von größeren, weniger löslichen Partikeln auf Kosten von Kieselsäure, die aus kleineren, löslicheren Partikeln besteht (Perry, 2003; Perry und Keeling-Tucker, 2000).

6.6 Einwirkung verschiedener Stressoren auf die Bakterienzellen nach Expression von Silicatein und Inkubation mit Natriumsilicat

In diesen Experimenten wurden *E. coli*-Zellen, die mit dem Silicatein transformiert worden waren eingesetzt. Nach der Expression von Silicatein wurden die Zellen mit Natriumsilicat inkubiert. Als Kontrolle dienten Bakterien, die zwar Silicatein exprimiert hatten, aber nicht mit Natriumsilicat inkubiert worden waren.. Es sollte untersucht werden, ob mit poly(Silicat) verkapselte Bakterien andere Eigenschaften besitzen als unverkapselte Zellen und ob sie im Vergleich zu unverkapselten Bakterien resistenter gegen verschiedene Stressfaktoren sind. Die UV-Bestrahlung im Bereich von 200 - 300 nm (UV-B und UV-C) findet in der Trinkwasseraufbereitung zur Abtötung von Bakterienzellen Verwendung (Bolton, 1999). Die für diese Arbeit verwendete UV-B-Strahlung lag im Bereich von 295 nm aufwärts. UV-Strahlen verursachen direkte Schäden an der DNA wie die z.B. Bildung von Thymin-Dimeren und Strangbrüchen. Ist die Zelle dann nicht in der Lage, die Schäden mit Hilfe ihrer Reparaturmechanismen zu beheben, spricht man von letaler Schädigung. Die Zelle kann sich nicht mehr replizieren und stirbt.

Nach der Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht wurde der DNA-Strangbruch-Assay durchgeführt, um die Fluoreszenz der doppelsträngigen DNA zu messen. Die

Fluoreszenz wurde in Strangbruchfaktoren (SSF) umgerechnet, die das Maß der DNA-Schädigung anzeigen. Nach 10, 15 und 20 Minuten Bestrahlung zeigen sich signifikante Werte. Es ist ein Unterschied in der Anzahl der DNA-Strangbrüche bei Zellen mit und ohne Silicathülle zu erkennen. Die mit poly(Silicat) umhüllten Zellen zeigen deutlich geringere Werte bezüglich DNA-Schädigung, als die Bakterienzellen ohne Silicathülle. Sie scheinen also im Vergleich zu Bakterienzellen ohne Silicathülle eine gewisse Resistenz gegen UV-Strahlung zu besitzen und in der Lage sein, die Strahlung abzuschirmen. Poly(Silicat), das mit Hilfe des Enzyms Silicatein von Schwämmen produziert wird, besteht aus glasartigem, amorphem Silica (Schröder, 2008). Die mit dem Silicatein transformierten Bakterien exprimieren Silicatein, das in der Lage ist, freie Kieselsäure (Natriumsilicat) zu polymerisieren. Es ist anzunehmen, dass die so um die Bakterienzellen gebildete Hülle aus amorphem Silica besteht. Sie scheint die Eigenschaften bzw. die Resistenz der silicateinexprimierenden Zellen gegen UV-induzierten Stress dahingehend verändert zu haben, dass eine UV-Bestrahlung weniger DNS-Schäden hervorruft, als bei Kontrollbakterien, die nicht mit Natriumsilicat inkubiert worden waren.

Weitere Versuche zur Beschaffenheit und Zusammensetzung der Hülle sowie eine Intensivierung der Bestrahlungsstudien sind zur weiteren Untersuchung unerlässlich, da es sich hier um einleitende Untersuchungen handelte. Interessant sind auch Untersuchungen der Reparaturmechanismen dieser Bakterien nach Bestrahlung, sowohl mit dem Fast Mikroassay, als auch auf genetischer Ebene. Die Bakterienzellen verfügen über verschiedene genetische und metabolische Antwortmöglichkeiten auf Stresseinwirkung. Zum Beispiel wird das SOS-System durch DNA-Schäden induziert. Das so genannte RecA-Protein wird durch das Vorhandensein einsträngiger DNA-Bereiche aktiviert und agiert als Rekombinationsenzym und als Protease. Neben dieser und weiterer Dunkelreparatur-Mechanismen gibt es auch durch Licht induzierte DNA-Reparaturmechanismen (Photoreaktivierung). Weiterführende Versuche mit verschiedenen einzelnen oder kombinierten Stressoren, die auf die Bakterienzellen einwirken sind erforderlich, um die Reaktion der silicateinexprimierenden Bakterien auf Stress sowohl mit dem DNA-Strangbruch-Assay als auch auf genetischer Ebene bezüglich eventueller Veränderungen der bakteriellen Reparaturmechanismen weiter zu untersuchen.

In einem weiteren Versuch wurde die mechanische Belastbarkeit der mit poly(Silicat) umhüllten Bakterien untersucht. Die Proben wurden unterschiedlich lange und höchstens 60 Minuten bei RT stark geschüttelt. Die Ergebnisse des DNA-Strangbruch-Assays zeigen negative SSF $\cdot(-1)$ -Werte. Dies rührt daher, dass keine abnehmende bzw. negative Fluoreszenz gemessen wurde, sondern alle Messwerte positive Vorzeichen hatten. Durch die Multiplikation mit -1 zur Berechnung der DNA-Strangbrüche ergaben sich negative Werte. Dies zeigt, dass sowohl die Bakterien mit als auch ohne Silicahülle keine DNA-Strangbrüche und somit keine DNA-Schädigung als Folge von mechanischem Stress aufweisen. Es zeigt sich sogar eine Zunahme der integrierten DNA im Laufe der Zeit. Dies lässt vermuten, dass in der Zeit des Schüttelns weiterhin ein Wachstum der Bakterienkulturen stattgefunden hat. Dennoch ist ein Unterschied zwischen den beiden Proben zu sehen, am signifikantesten nach 30-minütigem und nach 60-minütigem Schütteln. Die Zellen, die eine Hülle aus poly(Silicat) besitzen, zeigen eine deutlich stärkere Zunahme von doppelsträngiger DNA. Somit scheint die Silicahülle die mechanische Belastbarkeit dieser Bakterien zu erhöhen. Es wurde bereits beschrieben, dass Mikroorganismen, die verkapselt wurden besser gegen Stress geschützt sind (Mellati et al., 2010).

In einem dritten Versuch wurde die gemessene Fluoreszenz der wie zuvor beschrieben geschüttelten Bakterien nicht in Strangbrüche (SSF) umgerechnet, sondern wurde direkt gegen die Zeit aufgetragen. Es sollte untersucht werden, ob und wie die Bakterien während der Stressexposition weiter wachsen. Dies geschieht, indem man die gemessene Fluoreszenz einer Zunahme an DNA gleichsetzt. Hier zeigt sich ebenfalls eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz der verkapselten Bakterien im Vergleich zu den Bakterien ohne Hülle. Es findet eine Zunahme an doppelsträngiger DNA statt, während die DNA-Menge der nicht verkapselten Bakterien sogar etwas abnimmt. Dies lässt wiederum vermuten, dass die verkapselten Bakterien trotz mechanischem Stress sehr gut in der Lage sind, sich weiter zu vermehren. Nach einer Stunde Schütteln in mit PBS verdünntem Medium haben die verkapselten Bakterien ihre DNA-Menge bzw. Biomasse um mehr als 40% erhöht. In den Bakterien ohne Silicahülle ist dies nicht der Fall, hier hat die DNA-Menge im Vergleich zum Versuchsbeginn geringfügig abgenommen. Dies könnte wiederum ein Indiz auf eine schützende Wirkung der Silicahülle gegen mechanischen

Stress bzw. auf eine erhöhte Stressresistenz der Bakterienzellen sein. Die Vorteile verkapselter Zellen wurden bereits beschrieben. Die Aktivität von Zellen in einer Sol-Gel-Matrix bleibt erhalten, während die Resistenz gegen Faktoren wie Temperatur, Proteasen und Nukleasen erhöht wird (Fennouh et al., 1999). Die Vitalität von verkapselten Zellen erhöht sich im Gegensatz zu nicht-verkapselten Zellen (Gadd und White, 1993).

Eine weitere Art von mechanischem Stress stellt die Behandlung mit Ultraschall dar. Ziel dieses Versuchs war es, die verkapselten Bakterienzellen einer weiteren Art von mechanischem Stress auszusetzen, um zu überprüfen, ob die Hülle aus poly(Silicat) eine Resistenz bzw. veränderte Eigenschaften der Zellen verleiht. Hier zeigt sich nun erstmals ein gegenteiliges Ergebnis bei den Bakterienzellen, die zuvor mit Natriumsilicat inkubiert worden waren. Die verkapselten Bakterien weisen durchgehend deutlich mehr Strangbrüche und somit eine stärkere DNA-Schädigung auf als die unverkapselten Bakterienzellen. Am signifikantesten sind die Unterschiede nach 3- sowie 6-minütiger Exposition. Die Verkapselung mit poly(Silicat) scheint den Bakterien bezüglich der Ultraschallexposition von Nachteil zu sein. Generell wird Ultraschall im Labor sowohl zur Zell-Lyse, Spaltung von DNA-Molekülen als auch zur Sterilisation verwendet (Brown 2002). Die Silicathülle bietet den Bakterien in diesem Falle keinen Schutz bzw. erhöhte Resistenz der Bakterienzellen, sondern ist eher von Nachteil. Möglicherweise wird der Effekt von Ultraschall auf die Zelle durch das Vorhandensein der Silicaschicht verstärkt. Auch hier sind intensivere Untersuchungen notwendig, um genauere Aussagen diesbezüglich treffen zu können.

6.7 Ausblick

Biosilica-bildende Organismen sind in der Lage, eine große strukturelle Varietät an Silicateskelettelementen vom Nano- bis hin zum Makromaßstab zu bilden. In den letzten Jahren konnte erstmals Einblick in den Mechanismus und die Moleküle erlangt werden, die der Silicabildung zugrunde liegen. Es wurden neue Enzymgruppen (Schwamm-silicateine) und Proteine/Polyamine (Silaffine aus Diatomeen) entdeckt, die an der Grenzfläche von anorganischer Chemie und Biochemie agieren. Die Nanokompositmaterialien, die vor allem durch die Schwammenzyme Silicatein und Silicase (Müller 2004; Schröder 2005) sind von

extremem Interesse für die Anwendung in der Nano(Bio)Technologie (Ingsemansson und Knezevic 2005). Die einmalige Eigenschaft der biokatalytischen (silicateinvermittelten) Silicabildung bildet eine neue Möglichkeit, unter milden Bedingungen (niedrige Temperatur, niedriger Druck und fast neutraler pH-Wert) Silicatglas herzustellen. Herkömmliche Methoden verlangen die Anwendung von hohen Temperaturen und Drücken sowie den Einsatz ätzender Chemikalien. Diese innovative Technologie erlaubt die Produktion von Metalloxidüberzügen (Silica und andere Metalloxide) auf organischen (Bio)Materialien und die Entwicklung biomimetischer Herstellungsprozesse neuer nanostrukturierter Materialien und Hilfsmittel in der Opto- und Mikroelektronik-Industrie (Müller und Schröder, 2004 und 2005; Pisignano et al., 2005, Kisailus et al., 2006).

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7.1 Abkürzungen

A

Abb.	Abbildung
A. dest.	Destilliertes Wasser
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)

B

BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin

C

°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	Circa
cDNA	<i>complementary</i> DNA (komplementäre DNA)
Cd	Cadmium
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid

D

dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfatoxid

DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
G	
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GSP	genspezifischer Primer
Gt	Gigatonnen
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H	
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
I	
IPTG	Isopropyl-β-D- thiogalactosid
J	
J/m ²	Joule pro Quadratmeter
K	
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	
l	Liter
LB	Luria broth

M

m	Meter
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
MS	Metasilicat
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)

N

N	Stickstoff
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
ng	Nanogramm
Ni	Nickel
nm	Nanometer
Nt, nt	Nukleotide

O

OD	optische Dichte
----	-----------------

P

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Picogramm
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i> (Wasserstoffionen-Konzentration)

R

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAse	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur

S

s.	siehe
<i>S. domuncula.</i>	<i>Suberites domuncula</i>
SDS	(<i>sodium</i>) Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSC	<i>sodium salt citrate</i> , Natriumcitrat
SSF	<i>strand scission factor</i> (Strangbruchfaktor)

T

t	Tonne
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (dreifach gepufferte Salzlösung)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
T _m	<i>melting temperature</i> (Schmelztemperatur)
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) Aminomethan
Tween [®] 20	Poly(oxyethylen) ₂₀ -Sorbitanmonolaurat

U

U	<i>unit(s)</i> , Einheiten
ü.N.	Über Nacht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
UV	Ultraviolett
UV-A	Ultraviolette Strahlung, 380-315 nm
UV-B	Ultraviolette Strahlung, 315-280 nm
UV-C	Ultraviolette Strahlung, 280-200 nm

V

V	Volt
VP	Vektorprimer
(v/v)	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)

W

(w/v)	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
-------	------------------------------------------------

X

X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
-------	---------------------------------------------------------

Z

z.B	zum Beispiel
-----	--------------

7.2 Abkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide

1- Buchstabencode	3- Buchstabencode	Aminosäure
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Tab. 3: Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Einbuchstabencode	Nukleotid
A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
G	Guanin

Tab. 4: Abkürzungscodes für Nukleotide

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Beispiele für Vertreter der Hexactinellida: <i>Euplectella aspergillum</i> : 1a) Schulze, 1887; Quelle: http://www.gutenberg.org/files/20417/20417h/images/image199a.jpg , 23. Januar 2010	12
	1b) Foto: Prof. Dr. W.E.G. Müller	12
Abb. 2:	Strukturen der Hexactinellida (aus: Ernst Haeckel "Kunstformen der Natur", 1899-1904; unten rechts <i>Euplectella aspergillum</i> ; http://caliban.mpizkoeln.mpg.de/~stueber/haeckel/kunstformen/natur.html , 21. März 2011)	12
Abb. 3:	Vertreter der Calcarea: <i>Sycon raphanus</i> (Foto: Prof. Dr. W.E.G. Müller)	13
Abb. 4:	Vertreter der Demospongiae: <i>Geodia cydonium</i> (Foto: Prof. Dr. W.E.G. Müller)	13
Abb. 5:	Schwammanatomie (verändert nach: Campbell N.A: Biologie, 1997)	15
Abb. 6:	Morphologische Baupläne von Schwämmen (verändert nach Wehner und Gehring, 1995)	16
Abb. 7:	Ein Exemplar von <i>Suberites domuncula</i> mit Einsiedlerkrebs (Foto: Prof. Dr. W.E.G. Müller)	19
Abb. 8:	Vereinfachte Darstellung einer PCR	32
Abb. 9:	Schema der Transformation des Silicatein- α -Gens in den Expressionsvektor pQE-30	41
Abb. 10:	Der verwendete pQE-30 Vektor (Quelle: Qiagen, <i>The QIAexpressionist</i> 06/2003, 5. Edition, Seite 33)	43
Abb. 11:	Von <i>Suberites domuncula</i> cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz für Silicatein	46
Abb. 12:	Strukturformel von Rhodamin 123 (Quelle: http://0.tqn.com/d/chemistry/1/0/u/O/1/Rhodamine_123.jpg ; 01.05.2011)	54
Abb. 13:	Spektralverteilung der eingesetzten UV-Lampe Sol 500 mit Filter H2 (Dr. Höhnle GmbH, München)	60
Abb.14:	UV-Spektrum (100-400 nm).Verändert nach http://www.stern.it/uv_de.htm , 15. März 2011)	61

Abb. 15:	Effekt von Natriumsilicat auf die Expressionsrate von Silicatein in <i>E. coli</i>	66
Abb. 16:	Expression des Silicatein- α -Gens in <i>E. coli</i> (Immunofärbung)	68
Abb. 17:	Biosilicabildung durch <i>E. coli</i>	70
Abb. 18:	Identifizierung der chemischen Beschaffenheit von Silica in Bakterien, die in Anwesenheit von Kieselsäure auf Agar gewachsen sind	72
Abb. 19:	Wachstumskinetik von <i>E. coli</i> in LB-Medium in An- und Abwesenheit von Kieselsäure	73
Abb. 20:	REM-Analyse von <i>E. coli</i>	74
Abb. 21:	Effekt von UV-Strahlung auf <i>E. coli</i> mit und ohne Inkubation mit Natriumsilicat nach Expression von Silicatein im Vergleich	75
Abb. 22:	Auswirkung von Schütteln/Mixen auf die DNA-Integrität von Silicateinbakterien mit und ohne Natriumsilicatinkubation	76
Abb. 23:	Darstellung der Änderung der Fluoreszenz bei Silicateinbakterien mit und ohne Natriumsilicatinkubation zum Vergleich des bakteriellen Wachstums (abgeschätzt an der Menge doppelsträngiger DNA)	77
Abb. 24:	Effekt von Ultraschall als mechanischer Stress auf <i>E. coli</i> mit und ohne Inkubation mit Natriumsilicat nach Expression	78
Abb. 25:	Darstellung des Aufbrechens der bakteriellen DNA-Stränge durch Ultraschallbehandlung	79
Abb. 26:	Schema der Verkapselung von <i>E. coli</i> mit poly(Silicat)	83
Abb. 27:	Vorgeschlagener Mechanismus der Silicateinreaktion	88

9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Pipettierschema für die Herstellung der Acrylamidgele	51
Tabelle 2:	Bestrahlungsdosis in J/m^2 pro Zeiteinheit	62
Tabelle 4:	Abkürzungscodes für Nukleotide	100
Tabelle 3:	Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren	100

10 LITERATURVERZEICHNIS

Ahnström G., Erixon K. (1973) Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Strand separation in alkaline solution. *Int. J. Radiat. Biolog.* 23(3), 285-289.

Aizenberg J., Sundar V., 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.

Allen L. H., Matijevic E. (1970) Stability of colloidal silica: II. Ion exchange. *J. Colloid Interface Sci.* 33, 420–429.

Al-Saraj M., Abdel-Latif M.S., El-Nahal I., Baraka R. (1999) Bioaccumulation of some hazardous metals by sol–gel entrapped microorganisms. *J. Non-Cryst. Solids* 248, 137-140.

Arndt W. (1930) Schwämme - Porifera, Spongien. In *Tabulae Biologicae*, ed. C. Oppenheimer and L. Pincussen, W. Junk, Berlin, 39–120.

Avnir D., Kaufman V.R. (1987) Alcohol is an unnecessary additive in the silicon alkoxide sol-gel process. *J. Non-Cryst. Solids* 192, 180-182.

Batel R., Jakšić Z., Bihari N., Hamer B., Fafanđjel M., Chauvin C., Schröder H.C., Zahn R.K., Müller W.E.G. (1999) A microplate assay for DNA damage determination (fast micromethod) *Anal. Biochem.* 270, 195-200.

Bhatia R.B., Brinker C.J., Gupta A.K., Singh A.K. (2000) Aqueous sol-gel process for protein encapsulation. *Chem. Mater.* 12, 2434-2441.

Blumbach B., Diehl-Seifert B., Seack J., Steffen R., Müller I.M., Müller W.E.G. (1999) Cloning and expression of new receptors belonging to the immunoglobulin superfamily from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* 49, 751-763.

Böhm M., Schröder H.C., Müller I.M., Müller W.E.G, Gamulin V. (2000) The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is conserved in metazoans: Cloning and activation of p38 of the SAPK2 subfamily from the sponge *Suberites domuncula*. *Biology of Cell* 92, 95-104.

Bolton, J.R. 1999 Ultraviolet application handbook. Bolton Photosciences Inc.

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.

Brinker C.J., Scherer G. (1990) Sol-gel Science, The Physics and Chemistry of sol-gel Processing. Boston, MA, Academic Press.

Brown T.A. (2002) Gentechnologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag.

Campbell N.A. (1997) Biologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin und Oxford. 649-651.

Campostrini R., Carturan G., Caniato R., Piovan A., Filippini R., Innocenti G., Cappelletti E.M. (1996) Immobilization of plant cells in hybrid sol-gel materials. *J. Sol-Gel Sci. Techn.* 7, 87-97.

Carturan G., Campostrini R., Dire S., Scardi V., De Alteris E. (1989) Inorganic gels for immobilization of biocatalysts: inclusion of invertase-active whole cells of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) into thin layers of SiO₂ gel deposited on glass sheets. *J. Mol. Catal.* 57, 13-16.

Cha J.N., Shimizu K., Zhou Y., Christianssen 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.

Chauvin C., Heidenreich E., Elmendorff-Dreikorn K., Slor H., Kutzner J., Batel R., Schröder H.C. (1998) Lack of correlation between apoptosis and DNA single-strand breaks in X-irradiated human peripheral blood mononuclear cells in the course of ageing. *Mech. Ageing Dev.* 106, 117-128.

Chen G., Strevett K.A. (2003) Microbial deposition in porous media: A surface thermodynamic investigation. *Environ. Eng. Sci.* 20, 237-248.

Chen Q., Kenausis G.L., Heller A. (1998) Stability of oxidases immobilized in silica gels. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 4582-4585.

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

Compton S., Jones. C. (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal. Biochem.* 151, 369-374.

Coradin T., Livage J. (2007) Aqueous silicates in biological sol-gel applications: new perspectives for old precursors. *Accounts Chem. Res.* 40, 819-826.

Coradin T., Livage J. (2001) Effect of some amino acids and peptides on silicic acid polymerization. *Colloids Surf. B* 21, 329–336.

Coradin T., Nassif N., Livage J. (2001) Silica-alginate composites for microencapsulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 5-6, 429-434.

Crawford L.V., Waring M.J. (1967) Supercoiling of polyomavirus DNA measured by its interaction with ethidium bromide. *J. Mol. Biol.* 25, 23-30.

Croce G., Frache A., Milanesio M., Marchese L., Causà M., Viterbo D., Barbaglia A., Bolis V., Bavestrello G., Cerrano C., Benatti U., Pozzolini M., Giovine M., Amenitsch H. (2004) Structural characterization of siliceous spicules from marine sponges. *Biophys. J.* 86, 526-534.

Curnow P., Bessette P.H., Kisailus D., Murr M.M., Daugherty P.S., Morse D.E. (2005) Enzymatic synthesis of layered titanium phosphates at low temperature and neutral pH by cell-surface display of Silicatein α . *J. Am. Chem. Soc.* 127, 15749–15755.

Currey J. D. (2005) Hierarchies in biomineral structures. *Science*, 309, 253–254.

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

Desimone M.F., De Marzi M.C., Copello G.J., Fernández M.M., Malchiodi E.L., Diaz L.E. (2005) Efficient preservation in a silicon oxide matrix of *Escherichia coli*, producer of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotech.* 68, 747-752.

Dietzel M., Usdowski E. (1995) Depolymerization of soluble silicate in dilute aqueous solutions. *Colloid. Polym. Sci.* 273, 590-597.

Drury J.L., Mooney D.J. (2003) Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337-4351.

Elmendorf-Dreikorn K., Chauvin C., Slor H., Kutzner J., Batel R. Müller W.E.G., Schröder, H.C. (1999) Assessment of DNA damage and repair in human peripheral blood mononuclear cells using a novel DNA unwinding technique. *Cell. Mol. Biol.* 45, 211-218.

Evans D. F., Par J., Coker E.N. (1990) Nuclear Magnetic Resonance studies of silicon(IV) complexes in aqueous solution-I. Tris-Catecholato complexes. *Polyhedron* 9, 813–823.

Fennouh S., Guyon S., Jourdat C., Livage J., Roux C. (1999) Encapsulation of bacteria in silica gels. _Activité β -galactosidase d'*Escherichia coli* dans des gels de silice. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series IIC - Chemistry 2, 625-630.

Funayama N., Nakatsukasa M., Kuraku S., Takechi K., Dohi M., Iwabe N., Miyata T. and Agata K. (2005) Isolation of Ef silicatein and Ef lectin as molecular markers for sclerocytes and cells involved in innate immunity in the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Zool. Sci.* 22, 1113–1122.

Gadd G.M., White C. (1993) Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology? *Trends Biotechnol.* 11, 353-359.

Gill, I., Ballesteros, A. (2000) Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals (Review). *Tibtech* 18, 282-296.

Guan C., Wang G., Jing J., Wang J., Wang H., Tan M. (2008) Bioencapsulation of living yeast (*Pichia pastoris*) with silica after transformation with lysozyme gene. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 48, 369-377.

Gundacker D., Leys S.P., Schröder H.C., Müller I.M., Müller W.E.G. (2001) Isolation and cloning of a C-type lectin from the hexactinellid sponge *Aphrocallistes vastus*: a putative aggregation factor. *Glycobiol.* 11, 21-9.

Hanahan D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

Harcet M., Rollerb M., Četkovića H., Perinaa D., Wiens M., Müller W.E.G., Vlahoviček K. (2010) Demosponge EST sequencing reveals a complex genetic toolkit of the simplest metazoans. *Mol. Biol. Evol.* 27, 2747-2756.

Harrison C.C. (1996) Evidence for intramolecular macromolecules containing protein from plant silicas. *Phytochemistry* 41, 37–42.

Harrison C.C., Loton N. (1995) Novel routes to designer silicas: studies of the decomposition of $(M^+)_2[Si(C_6H_4O_2)_3] \cdot xH_2O$. Importance of M^+ identity of the kinetics of oligomerisation and the structural characteristics of the silicas produced. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 91, 4287–4297.

Helling R.B., Goodman H.M., Boyer H.W. (1974) Analysis of R. EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose gelelectrophoresis. *J. Virol.* 14, 1235-1244.

Hench L.L., West J.K. (1990) The sol-gel process. *Chem. Rev.* 90, 33–72.

Hiort J., Maksimenka K., Reichert M, Perović-Ottstadt S., Lin W.H., Wray V., Steube K., Schaumann K., Weber H., Proksch P., Ebel R., Müller W.E.G., Bringmann G. (2004) New Natural Products from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *J. Nat. Prod.* 67, 1532-1543.

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

Iler R. K. (1971) Relation of particle size of colloidal silica to the amount of a cationic polymer required for flocculation and surface coverage *J. Colloid Interface Sci.* 37, 364–373.

Iler R. K. (1979) The chemistry of silica, John Wiley & Sons, New York.

Ingsemansson K.T., Knezevic M. (2005) European Commission: 100 technology offers stemming from EU biotechnology RTD results, Directorate-General for Research, ed. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 156–157.

Kaluzhnaya, O.V., Belikov, S.I., Schröder, H.C., Rothenberger, M., Zapf, S., Kaandorp, J.A., Boreiko, A., Müller, I.M., Müller, W.E.G. (2005a) 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., Wiens M., Giovine M., Krasko A., Müller I.M., Müller W.E.G. (2005b) Dynamics of skeletal formation in the Lake Baikal sponge *Lubomirskia baicalensis*. Part II. Molecular biological studies. *Naturwissenschaften*, 92, 134–138.

Kinrade S.D., Del Nin J.W., Schach A.S., Sloan T.A., Wilson K.L., Knight C.T.G. (1999) Stable five- and six-coordinated silicate anions in aqueous solution. *Science* 285, 1542–1545.

Kinrade S. D., Gillson A.M.E, Knight C. T. G. (2002) Si-29 NMR evidence of a transient hexavalent silicon complex in the diatom *Navicula pelliculosa*. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 307–309.

Kinrade S.D., Maa K.J., Schach A.S., Sloan T.A., Knight C.T.G. (1999) *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3149–3151.

Kisailus D., Choi J.H., Weaver J.C., Yang W., Morse D.E. (2005) Enzymatic synthesis and nanostructural control of gallium oxide at low temperature. *Adv. Mater.* 17, 314–318.

Knoblich B., Gerber T. (2001) Aggregation in SiO₂ sols from sodium silicate solutions. *J. Non-Cryst. Solids* 283, 109–113.

Kohn K., Erickson, L.C., Ewig R.A, Friedman C.A (1976) Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* 15, 4629-4637.

- Krasko A., Gamulin V., Seack J., Steffen R., Schröder H.C., Müller W.E.G. (1997)** Cathepsin, a major protease of the marine sponge *Geodia cydonium*, purification of the enzyme and molecular cloning of cDNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6, 296-307.
- Krasko A., Lorenz B., Batel R., Schröder 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.
- Krasko A., Schröder H.C., Batel R., Grebenjuk V.A., Steffen R., Müller I. M., Müller W.E.G. (2002)** Iron induces proliferation and morphogenesis in primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*. *DNA Cell. Biol.* 21, 67–80.
- Kröger N., Deutzmann R., Bergsdorf C., Sumper M. (2000)** Species specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97, 14133–14138.
- Kröger, N., Deutzmann, R., Sumper, M. (1999)** Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science* 286, 1129–1132.
- Kruse M., Gamulin V., Cetkovic H., Pancer Z., Müller I.M., Müller W.E.G. (1996)** Molecular evolution of the metazoan protein kinase C multigene family. *J. Mol. Evol.* 43, 374-383.
- 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. *Mol. Biol. Evol.* 14, 1326–1334.
- Kruse M., Steffen R., Batel R., Müller I.M., Müller W.E.G. (1999)** Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponges. *J. Cell. Sci* 112, 4305-4313.
- Lee, N. (1980)** Molecular aspects of *ara* regulation. In *The Operon*, J. H. Miller and W.S. Reznikoff, eds. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory), 389-410.

Lee, N., Francklyn, C., Hamilton, E.P. (1987) Arabinose-induced binding of araC protein to *araI2* activates the *araBAD* operon promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8814-8818.

Leys, S.P., Mackie G.O., (1997) Electrical recording from a glass sponge. *Nature* 387, 29 - 31.

Li C.W., Chu S., Lee M. (1989) Characterizing silica deposition vesicles in diatoms. *Protoplasma* 151, 158-163.

Liu D.M., Chen J.W. (1999) Encapsulation of protein molecules in transparent porous silica matrices via an aqueous colloidal sol-gel process. *Acta Mater.* 47, 4535-4544.

Livage J., Roux C., Da Costa J.M., Desportes I., Quinson J.Y. (1996) Immunoassays in *sol-gel* matrices *J Sol-Gel Sci Techn* 7:45-51.

Mann S. (2001) Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry. (Oxford Chemistry Masters), Oxford University.

Matys S., Raff J., Soltmann U., Selenska-Pobell S., Böttcher H., Pompe W. (2004) Calcium dipicolinate induced germination of *Bacillus* spores embedded in thin silica layers: novel perspectives for the usage of biocers. *Chem. Mater.* 16, 5549-5551.

Mellati, A., Attar H., Farahani M.F. (2010) Microencapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* using a novel sol-gel method and investigate on its bioactivity. *Asian J. Biotechnol.*, 2: 127-132.

Mizutani T., Nagase H., Fujiwara N., Ogoshi H. (1998) Silicic acid polymerization catalyzed by amines and polyamines. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 71, 2017–2022.

Mort J. S. (2002) in Handbook of Proteolytic Enzymes, ed. Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner J. F., Academic Press, Amsterdam, 617–624.

Müller W.E.G. (1995) Molecular phylogeny of Metazoa [Animals]: monophyletic origin. *Naturwissenschaften* 82, 321–329.

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

Müller W.E.G. (2001) How was metazoan threshold crossed: the hypothetical Urmetazoa. *Comp. Biochem. Physiol.* 129A, 433–460.

Müller W.E.G., Batel R., Schröder H.C., Müller I.M. (2004a) Traditional and modern biomedical prospecting: Part I - The history. sustainable exploitation of biodiversity (Sponges and Invertebrates) in the Adriatic sea in Rovinj (Croatia). *Evid.-based Complement. Alternat. Med.* 1, 71-82.

Müller W.E.G., Belikov S.I., Schröder H.C. (2006a) Biosilica, the raw material of the new millennium: sustainable production in Lake Baikal. *Science - First Hand* 3. 26-35.

Müller W.E.G., Belikov S. I., Tremel W., Perry C.C., Gieskes W.W.C., Boreiko A. Schröder H.C. (2006b) Siliceous spicules in marine demosponges (example *Suberites domuncula*). *Micron* 37, 107–120.

Müller W.E.G., Böhm M., Batel R., De Rosa S., Tommonaro G., Müller I.M. Schröder H.C. (2000) Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis of avarol by primmorphs from *Dysidea avara*. *J. Nat. Prod.* 63, 1077-1081.

Müller W.E.G., Böhm M., Grebenjuk V.A., Skorokhod A., Müller I.M., Gamulin V. (2002) Conservation of the positions of metazoan introns from sponges to humans. *Gene* 295, 299-309.

Müller W.E.G, Boreiko A., Brandt D., Osinga R., Ushijima H., Hamer B., Krasko A., Xupeng C., Müller I. M., Schröder H.C. (2005a) Selenium affects biosilica formation in the demosponge *Suberites domuncula*: effect on gene expression and spicule formation. *FEBS J.* 272, 3838–3852.

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., Brümmer F., Batel R., Müller I.M., Schröder H.C. (2003a) Molecular biodiversity. Case study: Porifera (sponges). *Naturwissenschaften* 90, 103-120.

Müller W.E.G., Eckert C., Kropf K., Wang X., Schloßmacher U., Seckert C., Wolf S. E., Tremel W., Schröder H. C. (2007b) Formation of the giant spicules of the deep sea hexactinellid *Monorhaphis chuni* (Schulze 1904): electron microscopical and biochemical studies. *Cell Tissue Res.* 329, 363–378.

Müller W.E.G., Engel S., Wang X., Wolf S.E., Tremel W., Thakur N.L., Krasko A., Divekar M., Schröder H.C. (2008): Bioencapsulation of living bacteria (*Escherichia coli*) with poly(silicate) after transformation with silicatein- α gene. *Biomaterials* 29 (7), 771-779.

Müller W.E.G., Grebenjuk V.A., Le Pennec G., Schröder H.C., Brümmer F., Hentschel U., Müller I.M., Breter H.-J. (2004b) Sustainable production of bioactive compounds by sponges – cell culture and gene cluster approach: A Review. *Mar. Biotechnol.* 6, 105-117.

Müller W.E.G, Krasko A., Le Pennec G., Schröder H. C. (2003b) Biochemistry and Cell Biology of Silica Formation in Sponges. *Microsc. Res. Tech.* 62, 368–377.

Müller W.E.G, Krasko A., Le Pennec G., Steffen R., Wiens M., Ammar M.S.A., Müller I.M., Schröder H. C. (2003c) Molecular mechanism of spicule formation in the

demosponge *Suberites domuncula*: Silicatein-Collagen-Myotrophin. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 33, 195–221.

Müller W.E.G., Lorenz A., Krasko A., Schröder H.C. (2007c) Silicatein-mediated synthesis of amorphous silicates and siloxanes and use thereof. United States Patent No.US 7,169,589 B2.

Müller W.E.G., Müller I.M., Gamulin V. (1994) On the monophyletic evolution of the metazoa. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 2083-2096.

Müller W.E.G., Rothenberger M., Boreiko A., Tremel W., Reiber A., Schröder H.C. (2005b) Formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. *Cell Tiss. Res.* 321, 285–297.

Müller W.E.G., Schloßmacher U., Wang X., Boreiko A., Brandt D. Wolf S.E., Tremel W., Schröder H.C. (2008) Poly(silicate)-metabolizing silicatein in siliceous spicules and silicasomes of demosponges comprises dual enzymatic activities (silica-polymerase and silica-esterase). *FEBS J.* 275(2), 362-70.

Müller W.E.G., Schröder H.C., Wiens M., Perović-Ottstadt S., Batel R., Müller I.M. (2004c) Traditional and modern biomedical prospecting: Part II: the benefits. Approaches for a sustainable exploitation of biodiversity (secondary metabolites and biomaterials from sponges). *Evidenced-based Complementary and Alternative Medicine* 1, 133-144.

Müller W.E.G., Wang X., Belikov S.I., Tremel W., Schloßmacher U., Natoli A., Brandt D., Boreiko A., Tahir M.N., Müller I.M., Schröder H.C. (2007d) Formation of siliceous spicules in demosponges: example *Suberites domuncula*. In: Bäuerlein E., editor. *Handbook of Biomineralization; Vol. 1: Biological Aspects and Structure Formation*. Weinheim: Wiley-VCH; 59-82.

Müller W.E.G., Wiens M., Adell T., Gamulin V., Schröder H.C., Müller I.M. (2004d) Bauplan of Urmetazoa: basis for genetic complexity of Metazoa. *Int. Rev. Cytol.* 235, 53-92.

Muralidhar R.V., Jayachandran G., Singh P. (2001) Development of high-density cultivation systems by bioencapsulation. *Current Science* 81, 263-269.

Murr M. M., Morse D. E. (2005) Fractal intermediates in the self-assembly of Silicatein filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11657–11662.

Nassif N., Bouvet O., Rager M.N., Roux C., Coradin T., Livage J. (2002) Living bacteria in silica gels. *Nature Materials* 1, 42-44.

Nassif N., Roux C., Coradin T., Bouvet O.M.M., Livage J. (2004) Bacteria quorum sensing in silica matrices. *J. Mater. Sci.* 14, 2264-2268.

Nassif N., Roux C., Coradin T., Rager M.N., Bouvet O.M.M., Livage J. (2003) A sol-gel matrix to preserve the viability of encapsulated bacteria. *J. Mater. Chem.* 13, 203-208.

Nathans D., Smith H.O., (1975) Restriction endonucleases in the analyses and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 273-293.

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.

Pahler S., Blumbach B., Müller I.M., Müller W.E.G. (1998) A putative multiadhesive basal lamina protein from the marine sponge *Geodia cydonium*: cloning of the cDNA encoding a fibronectin- an SRCR- as well as a complement control protein module. *J. Exp. Zool.* 282, 332-343.

Parent M.E., Velegol D. (2004) *E. coli* adhesion to silica in the presence of humic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 39, 45–51.

Peppas N.A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H. (2000) Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 27-46.

Perry C.C. (2003) Silicification: the Processes by Which Organisms Capture and Mineralize Silica. *Rev. Mineral. Geochem.* 54, 291–327.

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. Lu Y. (1992) Preparation of silicas from silicon complexes: role of cellulose in polymerization and aggregation control. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 88, 2915–2921.

Pisera A. (2003) Some aspects of silica deposition in lithistid demosponge desmas. *Micr. Res. Techn.* 62, 336-355.

Pisignano D., Maruccio G., Mele E., Persano L., Di Benedetto F., Cingolani R. (2005) Polymer nanofibers by soft lithography. *Appl. Physics Lett.* 87, 123109-123109-3.

Pope, E.J.A., Braun, K., Peterson, C.M. (1997) Bioartificial Organs I: Silica gel encapsulated pancreatic islets for the treatment of diabetes mellitus. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 8, 635-639.

Pozzolini M., Sturla L., Cerrano C., Bavestrello G., Camardella L., Parodi A.M., Raheli F., Benatti U., Müller W.E.G., Giovine M. (2004) Molecular cloning of silicatein gene from marine sponge *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae) and development of primmorphs as a model for biosilicification studies. *Mar. Biotechnol.* 6, 594-603.

Premkumar J.R., Lev O., Rosen R., Belkin S. (2001) Encapsulation of luminous recombinant *E. coli* in sol-gel silicate films. *Adv. Mater.* 13, 1773-1775.

Prouzet E., Khani Z., Bertrand M., Tokumoto M., Guyot-Ferreol V., Tranchant J.F. (2006) An example of integrative chemistry: combined gelation of boehmite and sodium alginate for the formation of porous beads. *Microp. Mesop. Mat.* 96, 369-375.

Quiagen (2003) The QIAexpressionist™. A handbook for high-level expression and purification of 6 x His-tagged proteins. Fifth Edition, 33.

Reiswig H. (1979) Histology of Hexactinellida (Porifera). In "Biologie des Spongiaires, Sponge Biology" (C. Lévi and N. Boury-Esnault, Eds.), pp. 173-180. Col. Int. CNRS No. 291, Paris.

Reitner J., Wörheide G. (2002) in Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges, ed. J. Hooper N. A. and R. W. M. Van Soest, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 52–70.

Rychilk W. (1995) Priming efficiency in PCR. *Biotechniques*. 18, 84-6, 88-90.

Rychilk W. (1993) Selection of primers for polymerase chain reaction, in PCR protocols. methods in molecular biology 15:31. B. A White, B. A. (Ed.) Humana Press Inc. Totowa, NJ.

Rychilk W., Rhodes R.E. (1989) A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 17, 8543-8551.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.H., Higushi R., Horn G.T., Mullis K. B., Erlich H A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

Sandford F. (2003) Physical and chemical analysis of siliceous skeletons in six sponges of two groups (Demospongiae and Hexactinellida) *Microsc. Res. Tech.* 62, 336–355.

Schäcke H., Rinkevich B., Gamulin V., Müller I.M., Müller W.E.G. (1994) Immunoglobulin-like domain is present in the extracellular part of the receptor tyrosinkinase from the marine sponge *Geodia cydonium*. *J. Mol. Recognition* 7, 273-276.

Schrimpf G. (2002) Gentechnische Methoden, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg und Berlin.

Schröder H.C., Batel R., Lauenroth S., Hassanein H.M.A., Lacorn M., Sinat T., Steinhart H., Müller W.E.G. (1999) Induction of DNA damage and expression of heat shock protein HSP70 by polychlorinated biphenyls in the marine sponge *Suberites domuncula*. *J. Exptl. Mar. Biol. Ecol.* 233, 285-300.

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., Brandt D., Schloßmacher U., Wang X., Muhammad N.T., Tremel W., Belikov S.I., Müller W.E.G. (2007a) Enzymatic production of biosilica glass using enzymes from sponges: basic aspects and application in nanobiotechnology (material sciences and medicine). *Naturwissenschaften* 94, 339-359.

Schröder H.C., Krasko A., Batel R., Skorokhod A., Pahler S., Kruse M., Müller I.M., W.E.G. Müller (2000) Stimulation of protein (collagen) synthesis in sponge cells by a cardiac myotrophin-related molecule from *Suberites domuncula*. *FASEB J.* 14, 2022-2031.

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, 250–268.

Schröder H.C., Natalio F., Shukoor I., Tremel W., Schloßmacher U., Wang X., Müller W.E.G. (2007b) 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., Grebenjuk V. A., Engel S., Müller I.M., Müller W.E.G. (2005) Biosilica formation in spicules of the sponge *Suberites domuncula*: Synchronous expression of a gene cluster. *Genomics* 85, 666–678.

Schröder H.C., Perović-Ottstadt S., Rothenberger M., Wiens M., Schwertner H., Batel R., Korzhev M., Müller I. M., Müller W.E.G. (2004a) 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., Perović-Ottstadt S., Wiens M., Batel R., Müller I.M., Müller W.E.G. (2004b) Differentiation capacity of the epithelial cells in the sponge *Suberites domuncula*. *Cell Tissue Res.* 316, 271–280.

Schröder H.C., Schloßmacher U., Boreiko A., Natalio F., Baranowska M., Brandt D., Wang X.H., Tremel W., Wiens M., Müller W.E.G. (2009) Silicatein: Nanobiotechnological and Biomedical applications. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 47, 251–273.

Schröder H.C., Wang X., Tremel W., Ushijima H., Müller W.E.G. (2008) Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. *Nat. Prod. Rep.* 25, 455–474.

Schröder H.C., Wiens M., Schloßmacher U., Brandt D., Müller W.E.G. (2010) Silicatein-Mediated Polycondensation of Orthosilicic Acid: Modeling of a Catalytic Mechanism Involving Ring Formation. *Silicon* DOI: 10.1007/s12633-010-9057-4.

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

Schulze F.E., Hexactinellida. Wissenschaftliche Ergebnisse der Deutschen Tiefsee – Expedition auf dem Dampfer “Valdivia” 1898–1899, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1904, 1–266.

Schuurhuis G.J., Muijen M.M., Oberink J.W., de Boer F., Ossenkoppele G.J., Broxterman H.J. (1999) Large populations of non-clonogenic early apoptotic CD34-positive cells are present in frozen-thawed peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marr. Trans.* 27, 487-498.

Schwab D.W., Shore R.E. (1971) Fine structure and composition of a siliceous sponge spicule. *Biol. Bull.* 140, 125–136.

Seack J., Pancer Z., Müller I.M., Müller W.E.G. (1997) Molecular cloning and primary structure of an Rh (Rhesus) antigen-like protein from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Immunogenetics* 46, 493-498.

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

Simpson T.L (1984) "The Cell Biology of Sponges". Springer-Verlag, New York.

Slupska M.M., Luther W.M., Chiang J.H., Yang H., Miller J.H. (1999) Functional Expression of hMYH, a human homolog of the *Escherichia coli* MutY protein. *J. Bacteriol.* 181, 6210-6213.

Storch V. und Welsch U. (1996) Kükenthal. Zoologisches Praktikum. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck und Ulm, 45-53.

Tahir M.N., Eberhardt M., Therese H.A., Kolb U., Theato P., Müller W.E.G., Schröder H.C., Tremel W. (2006) From single molecules to nanoscopically structured functional materials: Au nanocrystal growth on TiO₂ nanorods controlled by surface bound silicatein. *Angew. Chem., Int. Ed.* 45, 4803-4809.

Tahir M.N., Théato P., Müller W.E.G., Schröder H.C., Boreiko A., Faiß S., Janshoff A., Huth J., Tremel W. (2005) Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein. *Chem. Comm.* 44, 5533–5535.

Tahir M. N., Theato P., Müller W.E.G., Schröder H.C., Janshoff A., Zhang J., Huth J., Tremel W. (2004) Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidin-tagged silicatein. *Chem. Commun.* 2848-2849.

Tolbert, S.H., Firouzi A., Stucky G.D., Chmelka B.F. (1997) Magnetic field alignment of ordered silicate-surfactant composites and mesoporous silica. *Science* 278, 264-268.

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

Uriz M. J. (2006) Mineral skeletogenesis in sponges. *Can. J. Zool.* 84, 322–356.

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., Turon X., Becerro M.A. (2003a) Silica deposition in demosponges. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 33, 163–193.

Uriz, M.J., Turon, X., Becerro, M.A., Agell, G. (2003b) Silicious spicules and skeleton frameworks in sponges: origin, diversity, ultrastructural patterns, and biological functions. *Microsc. Res. Tech.* 62, 279-299.

Villaverde A. (2010) Nanotechnology, bionanotechnology and microbial cell factories. *Microbial Cell Factories* 9, 53.

Vitzthum F., Geiger G., Bisswanger H., Brunner H., Bernhagen J. (1999) A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double stranded DNA using SYBR Green I and a imaging system. *Anal. Biochem.* 276, 59.

Walter S.L., Flinn B.D., Mayer G. (2007) Effects of loading rate on the mechanical behavior of a natural rigid composite. *Acta Biomater.* 3, 377–382.

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.

Weaver J.C., Pietrasanta L.I., Hedin N., Chmelka B.F., Hansma P.K., Morse D.E. (2003) Nanostructural features of demosponge biosilica. *J. Struct. Biol.* 144, 271–281.

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

Wehner R., Gehring W. (1995) Zoologie, 23. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York. 626-632.

Weissenfels N. (1989) Biologie und Mikroskopische Anatomie der Süßwasserschwämme (*Spongillidae*), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Weissenfels, N., Landschoff, H.W. (1977) Bau und Funktion des Süßwasser-Schwamms *Ephydatia fluviatilis* L. (Porifera). IV. Die Entwicklung der monaxialen SiO₂-Nadeln in Sandwich-Kulturen. *Zool. Jahrbuch Abt. Anat.* 98, 355-371.

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

Wiens M., Bausen M., Natalio F., Link T., Schloßmacher U., Müller W.E.G (2009) The role of the silicatein- α interactor silintaphin-1 in biomimetic biomineralization. *Biomaterials* 30, 1648–1656.

Wiens M., Belikov S.I., Kaluzhnaya O.V., Krasko A., Schröder H.C., Perović-Ottstadt S., Müller W.E.G. (2006) Molecular control of serial module formation along

the apical-basal axis in the sponge *Lubomirskia baicalensis*: silicateins, mannose-binding lectin and mago nashi. *Dev. Genes Evol.* 216, 229–242.

Wiens M., Seack J., Koziol C., Hassanein H.M.A., Steffen R., Korzhev M., Schröder H.C., Müller W.E.G. (1999) 17[beta]-Estradiol-dependent regulation of chaperone expression and telomerase activity in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Mar. Biol.* 133, 1-10.

Williams D.N., Ehrman S.H., Holoman T.R.P. (2005) Evaluation of the microbial growth response to inorganic nanoparticles. *J. Nanobiotechnol.* 4, 1186-1477.

Willmer, P. (1994) Invertebrate Relationships. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Wilson K., Goulding K.H. (1991) Methoden der Biochemie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart und New York. 335-340.

Zhang C., Mao, C. (2008) Bacteria as factories. *Nat. Nanotech.* 3, 707-708.

Zhou Y., Shimizu K., Cha J.N., Stucky G.D., Morse D.E. (1999) Efficient catalysis of polysiloxane synthesis by silicatein α requires specific hydroxy and imidazole functionalities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38, 780–782.

11 DANKSAGUNG

12 LEBENSLAUF

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Bioverkapselung lebender Bakterien (*Escherichia coli*) mit poly(Silicat)
nach Transformation mit dem Silicatein- α -Gen“**

selbständig verfasst und keine anderen als die genannten Hilfsmittel verwendet zu haben. Des Weiteren versichere ich, dass ich diese Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung oder die gleiche oder Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht habe.

(Ort, Datum)

Sylvia Engel