



Identifizierung, Expression und Charakterisierung
des Nanos-verwandten Proteins aus dem marinen
Schwamm *Suberites domuncula*

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Nadine Leidecker
geb. am 31.08.1978 in Mainz

Mainz, 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.08.2015

D77 (Dissertation Universität Mainz)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	1
1.	Porifera (Schwämme)	1
1.1	Anatomischer Aufbau der Porifera	3
1.2	Fortpflanzung und Entwicklung.....	8
1.3	Primmorphe – In vitro Kultivierung von Schwammzellen.....	12
2.	Nanos - RNA-bindendes Protein mit spezifischem Zinkfinger.....	13
2.1	Zinkfingerproteine.....	18
3.	Ziel dieser Arbeit.....	19
B	Material und Methoden.....	21
1.	Tiere.....	21
1.1	Systematik	21
1.2	Lebensweise und Habitus von <i>Suberites domuncula</i>	22
1.3	Herkunft und Hälterung der Tiere.....	22
2.	Chemikalien und Geräte.....	23
3.	Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	26
4.	Mikrobiologische Methoden.....	26
4.1	Bakterienstämme.....	26
4.2	Plasmidvektoren.....	26
4.3	Nährmedien und Agarplatten	27
4.4	Bakterienkulturen	28
4.4.1	Plattenkulturen	28
4.4.2	Flüssigkulturen	29
4.4.3	Glycerinkulturen.....	29
5.	Molekularbiologische Methoden	30
5.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
5.1.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	30
5.2	Primer-Design	31
5.2.1	Sequenzspezifische und vektorspezifische Primer.....	32

5.2.2	Fluoreszenzmarkierte Primer	32
5.2.3	Primer zur Herstellung der Expressionskonstrukte	32
5.2.3.1	Primer Konstrukt 1: Expression mit dem pTrcHis2A Vektor	33
5.2.3.2	Primer Konstrukt 2: Expression mit dem pET-51b(+) Vektor	34
5.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
5.3.1	Optimierung der PCR-Reaktionen	36
5.3.2	Touchdown-PCR	38
5.3.3	Klon-PCR	39
5.4	PCR-Aufreinigung	40
5.5	Gelelektrophorese	40
5.5.1	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	40
5.6	Extraktion der DNA aus Agarosegelen	43
5.7	Klonierung	43
5.7.1	Klonierung von PCR-Produkten	43
5.7.2	Die TOPO-Klonierung	44
5.7.3	Die gerichtete Klonierung der Expressionsvektoren	44
5.7.3.1	Spezifische Fragmentierung von DNA mit Typ-IIP- Restriktionsendonukleasen	44
5.7.3.2	Dephosphorylierung des pET-51b(+) Vektors	46
5.7.4	Ligation	47
5.7.5	Transformation kompetenter Bakterien	47
5.7.5.1	Transformation chemisch kompetenter Bakterien durch Hitzeschock	47
5.7.6	Blau-Weiss-Selektion	48
5.8	Isolierung von Plasmid-DNA	49
5.9	DNA-Sequenzierung	49
5.9.1	Herstellung des Sequenzierungsgels	51
5.9.2	Gelelektrophorese des Sequenzierungsgels	52
6.	Bioinformatische Methoden	53
6.1	Sequenzanalyse	53
6.1.1	Computergestützte Sequenzanalyse	53
6.1.2	Primer-Walking-Strategie	54
6.1.3	Sequenzierung mit vektorspezifischen Primern	54
6.1.4	Verwendete Programme und Datenbanken	54

7. Rekombinante Expression.....	55
7.1 Rekombinante Expression von Fusionsproteinen in Prokaryoten	55
7.1.1 Expression mit dem pTrcHis2A Vektor.....	55
7.1.2 Expression mit dem pET-51b(+) Vektor.....	57
8. Proteinbiochemische Methoden.....	58
8.1 Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels	
Affinitätschromatographie	58
8.1.1 Säulenchromatographie	59
8.1.1.1 Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit His-Tag unter	
denaturierenden Bedingungen.....	59
8.1.1.2 Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit His-Tag unter nativen	
Bedingungen.....	60
8.1.1.3 IMAC (Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie) mit dem	
Profinia™ - Protein Purification System	61
8.2 Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Strep•Tactin®	
Chromatographie.....	63
8.2.1 Aufreinigung des Expressionsproduktes mit Strep-Tag unter nativen	
Bedingungen.....	63
8.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	64
8.4 Konzentrierung von Proteinlösungen und Dialyse durch	
Ultrafiltration.....	64
8.5 Dialyse.....	65
8.6 Polyacrylamidgelelektrophorese	66
8.6.1 SDS-PAGE.....	66
8.6.2 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie-Brillantblau	67
8.7 Western Blot.....	67
8.7.1 Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen.....	67
8.7.2 Antikörper für die Immunodetektion	68
8.7.2.1 Anti-His (C-term) Antikörper	68
8.7.2.2 Anti-Sd_nrp Antikörper	68
8.7.2.3 Strep•Tag® II Monoklonaler Antikörper.....	68
8.7.3 Immunodetektion	69

8.7.4	Dokumentation der SDS-Gele und Western Blots	70
8.8	Herstellung polyklonaler Antikörper	70
8.8.1	Immunisierung und Serumgewinnung	71
8.8.2	Bestimmung des Antikörpertiters via ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	71
8.9	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	72
8.9.1	Fixierung des Gewebes und Anfertigung der histologischen Schnitte	73
8.9.2	Anfertigung der Schnitte mit dem Mikrotom.....	75
8.9.3	Inkubation der histologischen Schnitte mit primärem Antikörper.....	75
8.9.4	Inkubation der histologischen Schnitte mit sekundärem Antikörper	76
8.9.5	Färbung der histologischen Schnitte mit DAPI.....	77
8.9.6	Mikroskopie und Dokumentation der histologischen Schnitte	77
8.10	Extraktion von Proteinen aus Schwammgewebe.....	78
8.10.1	Isolierung des Nanos-verwandten Proteins <i>Sd_nrp</i> aus dem Gewebe von <i>Suberites domuncula</i>	79
9.	Zellkultur	80
9.1	Dissoziation von Schwammzellen und Kultivierung von Primmorphen.....	80
C	Ergebnisse	83
1.	Expression und proteinbiochemische Analyse des rekombinanten <i>Sd_nrp</i> (<i>Suberites domuncula</i> Nanos-verwandtes Protein).....	83
1.1	Identifizierung, Amplifizierung und Klonierung der cDNA von <i>Sd_nrp</i>	83
1.2	Sequenzierung und Sequenzanalyse von <i>Sd_nrp</i>	85
1.3	Analyse des Nanos-spezifischen Zinkfingers von <i>Sd_nrp</i>	87
1.3.1	Sequenzanalyse des Nanos-spezifischen Zinkfingers von <i>Sd_nrp</i>	87
1.3.2	Homologiemodell des Nanos-spezifischen Zinkfingers von <i>Sd_nrp</i>	88
1.3.3	Sequenzvergleich der beiden Nanos-verwandten Proteine von <i>Suberites domuncula</i> (<i>Sd_nrp</i>) und <i>Ephydatia fluviatilis</i> (<i>Efl_nrp</i>)	90
1.3.3	Multiples Alignment typischer Nanos-Proteine	92
1.4	Rekombinante Expression von <i>Sd_nrp</i> in <i>E. coli</i>	93

1.4.1	Generierung der DNA-Konstrukte (1+2) für die rekombinante Expression in den Vektoren pTrcHis2A und pET-51b(+)	93
1.4.2	Expressionsanalyse des rekombinanten Sd_nrp	95
1.5	Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie	96
1.5.1	Proteinaufreinigung via IMAC und Säulenchromatographie unter denaturierenden Bedingungen	96
1.5.1	Proteinaufreinigung via IMAC mit dem Profinia™ - Protein Purification System	98
2.	Nachweis des nativen Sd_nrp in Proteinextrakten aus dem Gewebe von <i>Suberites domuncula</i>	100
3.	Zellkultivierung von Schwamm-Primmorphen	102
4.	Immunfluoreszenz-Analysen des rekombinanten Sd_nrp	104
4.1	Expression von Sd_nrp im Pinacoderm und angrenzenden Zellschichten	104
4.2	Expression von Sd_nrp in einem 4 Tage alten Primmorphen	106
4.3	Expression von Sd_nrp in Gemmulae von <i>S. domuncula</i>	108
D	Diskussion	111
1.	Sequenzanalyse und rekombinante Expression von Sd_nrp	117
2.	Immunologische Analyse	123
3.	Phylogenetische Analysen und Stammbaum	128
E	Zusammenfassung	133
F	Anhang	134
1.	Abkürzungen	134
1.1	Allgemeine Abkürzungen	134
1.2	Abkürzungen der Organismen und der entsprechenden Proteine	137
1.3	Abkürzungen und IUPAC-Nomenklatur der Aminosäuren	138
2.	IUPAC-Code der Nukleinsäuren	138

3. Genetischer Standardcode.....	139
4. Primer.....	140
5. Programme und entsprechende Internetadressen.....	141
6. Sequenzen.....	142
6.1 Sd_nrp	142
7. Alignments	144
7.1 Multiples Alignment typischer Nanos-Proteine und Nanos- verwandter Proteine	144
G Literaturverzeichnis.....	145
 Danksagung.....	 167
 Curriculum Vitae	 Fehler! Textmarke nicht definiert.
 Erklärung	 170

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anatomie eines einfachen Schwammes: Anschnitt der Wandstruktur und Aufbau einer Choanocyte. Verändert nach Margulis & Schwartz, 1998.....	5
Abb. 2: Organisationstypen des Wasserleitungssystems der Schwämme.....	6
Abb. 3: Gemmula des Süßwasserschwamms <i>Ephydatia fluviatilis</i>	8
Abb. 4: Gemmulae des marinen Schwamms <i>Suberites domuncula</i>	9
Abb. 5: Primmorph von <i>Suberites domuncula</i>	12
Abb. 6: Faltungsschema eines typischen Zinkfingers	18
Abb. 7: <i>Suberites domuncula</i>	21
Abb. 8: Schema zur Anwendung von Roti®-Store Cryoröhrchen Firma Roth (Karlsruhe).....	30
Abb. 9: Forward Primer Konstrukt 1 pTrcHis2A Vektor	33
Abb. 10: Reverse Primer Konstrukt 1 pTrcHis2A Vektor	33
Abb. 11: Forward Primer Konstrukt 2 pET-51b(+)	34
Abb. 12: Reverse Primer Konstrukt 2 pET-51b(+)	34
Abb. 13: Zyklischer Temperaturverlauf der PCR	36
Abb. 14: Molekulargewichtsmarker	42
Abb. 15: Schema zur Verwendung der Slide-A-Lyzer™ Dialyse Kassetten.....	65
Abb. 16: Schema zur vollständigen Amplifizierung und Sequenzierung des EST-Klons.....	83
Abb. 17: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von <i>Sd_nrp</i>	84
Abb. 18: Schematische Darstellung der Genstruktur von <i>Sd_nrp</i>	85
Abb. 19: Screening des 5'-Bereichs von <i>Sd_nrp</i> nach einem möglichen Signalpeptid	86
Abb. 20: Schematischer Aufbau des Nanos-spezifischen Zinkfingers vom CCHC-Typ	87
Abb. 21: Homologiemodell der Zinkfinger-Domäne von <i>Sd_nrp</i>	88
Abb. 22: Ramachandran-Plot für das Homologiemodell der Zinkfinger-Domäne <i>Sd_nrp</i>	89
Abb. 23: Sequenzvergleich der Nanos-verwandten Proteine von <i>S. domuncula</i> und <i>E. fluviatilis</i>	91
Abb. 24: Ausschnitt eines multiplen Alignments der Zinkfingerdomäne typischer Nanos-Proteine	92
Abb. 25: Gelelektrophorese der DNA-Konstrukte (1+2) für die rekombinante Expression von <i>Sd_nrp</i>	94
Abb. 26: Sequenzen der Konstrukte zur rekombinanten Expression von <i>Sd_nrp</i>	95
Abb. 27: Rekombinante Expression und Aufreinigung von <i>Sd_nrp</i>	96
Abb. 28: Aufreinigung von <i>Sd_nrp</i> unter denaturierenden Bedingungen	98

Abb. 29: Aufreinigung von Sd_nrp mit dem Profinia™ - Protein Purification System unter denaturierenden Bedingungen.....	99
Abb. 30: Nachweis des nativen Proteins Sd_nrp in Proteinextrakten aus dem Gewebe von <i>S. domuncula</i>	100
Abb. 31: Primmorph des marinen Schwamms <i>Suberites domuncula</i>	102
Abb. 32: Sd_nrp Expression in Gewebeschnitten von <i>Suberites domuncula</i>	105
Abb. 33: Übersicht der Expression von Sd_nrp in Primmorphengewebe von <i>S. domuncula</i>	106
Abb. 34: Ausschnittsvergrößerung der Expression von Sd_nrp in Primmorphengewebe von <i>S. domuncula</i>	107
Abb. 35: Sd_nrp Expression in Gemmulae von <i>S. domuncula</i>	109
Abb. 36: Übersicht der Expression von Sd_nrp in Gemmulae von <i>S. domuncula</i>	109
Abb. 37: Konservierte Regionen der Nanos-Homologen unterschiedlicher Organismen	119
Abb. 38: Multiples Alignment der Nanos-verwandten Proteine der Schwämme	119
Abb. 39: 3'-UTR der cDNA von Sd_nrp (<i>Suberites domuncula</i>).....	121
Abb. 40: Schematische Zeichnung eines Querschnitts durch das Pinacoderm und die angrenzenden Zellschichten	123
Abb. 41: Sd_nrp Expression in einem 4 Tage alten Primmorphen von <i>S. domuncula</i>	125
Abb. 42: Sd_nrp Expression in den Gemmulae von <i>Suberites domuncula</i>	127
Abb. 43: Phylogenetische Analyse des Nanos-verwandten Proteins Sd_nrp von <i>Suberites domuncula</i>	130
Abb. 44: Alignment der Zinkfingerdomäne unterschiedlicher Nanos-homologer Proteine ..	132

A Einleitung

1. Porifera (Schwämme)

Die Schwämme (Phylum Porifera) repräsentieren einen der ältesten rezenten Tierstämme und werden heute den vielzelligen Tieren (Metazoa) zugeordnet. Fossile Funde in Guizhou, im Süden Chinas, reichen bis ins Präkambrium zurück (Li et al., 1998). Molekularbiologische Analysen deuten sogar auf einen Ursprung, vor etwa 800 Millionen Jahren hin (Pfeifer et al., 1993; Müller et al., 1998). Es wurden bisher ca. 8500 Arten beschrieben, die in allen marinen und limnischen Lebensräumen vertreten sind (Westheide & Rieger, 2013). Bei einem Großteil der Schwämme handelt es sich um Meeresschwämme, nur etwa 200 Arten sind im Süßwasser zu finden (Weissenfels, 1989). Die sessil lebenden Tiere sind in nahezu allen Gewässertiefen anzutreffen, besonders in benthischen Habitaten mit sehr klarem, unbelastetem Wasser begegnet man einer großen Artenvielfalt (Brusca & Brusca, 2003). Manche Meeresschwämme können eine Größe von bis zu 2 Meter erreichen, während der eher fladen- bzw. krustenförmige Körper der Süßwasserschwämme oft nur wenige Millimeter hoch ist (Weissenfels, 1989).

Aufgrund ihrer sessilen Lebensweise und des Fehlens von Nerven- und Muskelgewebe, war der evolutionäre Ursprung der Schwämme, und die Frage, ob es sich um Tiere oder Pflanzen handelt, lange Zeit ungeklärt. Sie wurden daher u. a. zunächst als Zoophyta (Donati, 1753) oder auch als Pflanzentiere (Haeckel, 1868) bezeichnet. Bis Ernst Haeckel sie dann 1896 auf der Basis von ontogenetischen und histologischen Untersuchungen zu den Metazoen stellte. Auch konnte erst in jüngster Zeit eindeutig geklärt werden, dass es sich bei den Schwämmen tatsächlich um mehrzellige Tiere handelt, und ihre Organisation mit unterschiedlich differenzierten Zelltypen, einem sogenannten Bauplan folgt (Müller et al., 2004).

Sie wurden daher oft auch als Parazoa (Nebentiere) bezeichnet und den Metazoa gegenüber gestellt (Müller, 2001). Erst die phylogenetische Analyse der Nukleotid- bzw. der resultierenden Aminosäure-Sequenzen protein-codierender Gene, welche charakteristisch für vielzellige Organismen sind, vor allem Gene codierend für Proteine der extrazellulären Matrix lieferten Belege für die Eingliederung der Schwämme innerhalb der Metazoa (Müller et al., 2004). Besonders von Bedeutung waren hierbei die Identifizierung des zu den Glykoproteinen gehörenden und an Zell-Zell-Kontakten beteiligten Galektins aus dem Schwamm *Geodia cydonium*, der kollagen- und fibronectinähnlichen Moleküle (Müller, 1998b), sowie der mit diesen Proteinen interagierenden Adhäsionsrezeptoren, den Integrinen (Pancer et al., 1997).

Dies waren eindeutige Hinweise für das Vorhandensein von grundlegenden strukturellen und regulatorischen Proteinen bei Schwämmen, wie sie auch in höheren Metazoen vorkommen und somit für die Monophylie der Metazoa sprechen (Müller et al., 1998).

Schwämme zählen heute zu den ursprünglichsten Vertretern der Metazoen (Müller, 2003). Die erste Entschlüsselung des kompletten Genoms eines Schwammes (*Amphimedon queenslandica*), ermöglichte neue Einblicke in ihr Gen-Repertoire, welches dem Satz an Genen und Signalwegen höherer Metazoen sehr ähnlich ist. So konnten u. a. Gene identifiziert werden, welche z.B. an der Zellproliferation und der Regulation der Entwicklung beteiligt sind (Srivastava et al., 2010). Diese systematische Suche nach charakteristischen Genen der Metazoa in den Genomen und Transkriptomen der Schwämme, wird dazu beitragen, den Ursprung und damit auch die Funktion vieler Proteine in höheren Organismen, u.a. auch dem Menschen, besser verstehen zu können.

Vor der Etablierung moderner molekularbiologischer Methoden, wurden Schwämme vorwiegend aufgrund der Beschaffenheit ihrer Skelettelemente, den Spiculae klassifiziert. Sie bestehen bei den Glas- und Kieselschwämme aus hydratisiertem, amorphen Silika, und bei den Kalkschwämme aus Calciumcarbonat (Krasko et al., 2000). Die heute vorliegenden molekularen Daten über ihre strukturellen und funktionellen Gene, bestätigen die Gliederung der Porifera in drei Klassen: Die Hexactinellida (Glasschwämme), die Demospongiae (Horn- oder Kieselschwämme) und die Calcarea (Kalkschwämme) (Hooper and Van Soest, 2002). Wobei die Klasse Demospongiae mit über 95 % der weltweit existierenden Arten, die größte der drei Gruppen darstellt (Bergquist, 1978).

Vor einigen Jahren sind marine Schwämme als begehrte Forschungsobjekte, besonders hinsichtlich biopharmazeutischer Interessen, wieder in den Fokus gerückt. Aufgrund ihrer feststehenden Lebensweise mussten sie sehr effektive Abwehrmechanismen gegen den Befall von Viren und Bakterien aber auch gegen potentielle Fressfeinde entwickeln um zu überleben (Laport et al., 2009). So enthalten viele Schwämme Toxine gegen Mikroorganismen, welche als pharmakologisch aktive Substanzen, eine potentielle Quelle für neue antimikrobielle und antivirale Medikamente darstellen (Blunt et al., 2005). Als Filtrierer feinsten organischer Partikel und aufgrund ihrer Beteiligung an der Bioerosion sind sie auch ökologisch von enormer Bedeutung (Bell, 2008; Diaz und Rützler, 2001).

1.1 Anatomischer Aufbau der Porifera

Schwämme haben sich in ihrer Form und Physiologie optimal an ihre Ernährungsweise und ihren Lebensraum angepasst. Um eine ausreichende Atmung (Gasaustausch) und Nahrungsaufnahme zu gewährleisten, ist der Bau des Schwammkörpers darauf spezialisiert, möglichst viel Wasser effektiv durch den Körper zu transportieren. So ähnelt der Aufbau eines adulten Schwammkörpers einem weit verzweigten Kanalsystem (Müller et al., 2004).

Der komplexe Filtrationsapparat dient zum einen der Nahrungsaufnahme in Form von organischen Partikeln wie z.B. bakteriellem Plankton, die über Phagocytose aufgenommen werden, und bereits gelösten Stoffen, die der Schwamm über Pinocytose aufnimmt. Und zum anderen gewährleistet er die Versorgung mit Sauerstoff und dient auch der Entsorgung überflüssiger Stoffwechselprodukte sowie der Freisetzung von Geschlechtszellen wie Spermatozoen und Oocyten (Westheide & Rieger, 2013). An der Ernährung sind auch mit vielen Schwämmen assoziierte Mikrosymbionten beteiligt, wie z.B. Bakterien und einzellige Algen. Durch die Speicherung von organischen Molekülen und der Produktion sekundärer Metabolite versorgen sie den Schwammkörper zusätzlich mit Nahrung (Thacker & Freeman, 2012). In den dem Licht ausgesetzten Teilen des Schwammes finden sich häufig photosynthetisch aktive Algen und Cyanobakterien, die ihrem Wirt organische Stoffe in Form von Makromolekülen liefern. Während man im übrigen Schwammgewebe meist heterotrophe und autotrophe Symbionten findet (Westheide & Rieger, 2003; Becerro et al., 2012).

Sämtliche inneren und äußeren zellulären Oberflächen sind an der Filtrierung beteiligt, und bestehen grundlegend aus zwei Zellschichten, dem Pinacoderm und dem Choanoderm. Die äußere Schicht des einfach gebauten Epithels der Schwämme, das Pinacoderm, besteht aus einer dünnen, einzelnen Schicht von Zellen, den Pinacocyten (Simpson, 1984). Darauf folgt eine Schicht aus Kragengeißelzellen, den Choanocyten, welche die Kragengeißelkammern, das Choanoderm auskleiden. Zwischen dem Pinacoderm und dem Choanoderm befindet sich eine mittlere, bindegewebeähnliche Schicht, das Mesohyl (Borojevic et al., 1966). Dabei handelt es sich um eine extrazelluläre Matrix, hauptsächlich bestehend aus Kollagen, Galektin und Glykokonjugaten (Müller et al., 1988), in der sich u.a. die organischen und anorganischen Elemente des Stützskeletts befinden (Bergquist, 1978). Die extrazelluläre Matrix der Schwämme birgt ein sehr komplexes, und umfangreiches Repertoire an Molekülen und ist daher an der Regulation und Kontrolle diverser Zellfunktionen im Schwamm beteiligt (Müller, 1997). Dazu gehören u.a. die Lokalisation und Adhäsion von Zellen, sowie die Steuerung des Immunsystems (Schütze et al., 2001). Schwammzellen sind in der Lage sich über bestimmte Strukturen ihrer Oberfläche miteinander in Verbindung zu treten bzw. Zellkontakte

herzustellen. Erste Studien zur Zell-Zell-Adhäsion bei Schwämmen wurden bereits 1907 von Wilson durchgeführt und lieferten auch Erkenntnisse über die erstaunliche Regenerationsfähigkeit dieser Tiere. So sind isolierte bzw. dissoziierte Schwammzellen sogar in der Lage, speziesspezifisch zu reassoziieren (Wilson, 1907). Dies wird durch eine extrazelluläre Substanz ermöglicht, welche als Aggregationsfaktor bezeichnet wird (Humphreys, 1963) und erstmals 1973 isoliert und anschließend charakterisiert werden konnte (Henkart et al., 1973; Müller & Zahn, 1973; Müller, 1982).

Die das Pinacoderm bildenden Pinacocyten werden je nach ihrer Position im Schwammkörper unterschieden. So werden die Zellen der äußeren Epithelien als Exopinacocyten, die der inneren, die Kanäle auskleidenden Epithelien als Endopinacocyten, und die Zellen der Schwammbasis, welche dem Organismus die Verankerung mit dem Untergrund ermöglichen, als Basopinacocyten bezeichnet. Diese unterschiedlichen Zelltypen bilden ihrer Bezeichnung entsprechend das Exopinacoderm, Endopinacoderm und Basopinacoderm (Simpson, 1984; De Vos et al., 1991; Müller et al., 2004). Zu den Pinacocyten zählen auch die Prosendopinacocyten, welche das einführende Kanalsystem bilden, und die das ausführende Kanalsystem bildenden Apendopinacocyten (Weissenfels, 1989). Bei den Kragengeißelzellen des Choanoderms, den Choanocyten, handelt es sich um sehr spezielle Zellen, welche für die Bewegung des Wassers durch den Schwammkörper verantwortlich sind. Sie tragen eine lange Geißel, welche von einem Kragen von Mikrovilli umgeben ist, welche zusätzlich untereinander quervernetzt sein können (Abb.1). Das Wasser dringt durch kleine Poren, die Ostien, in den Schwammkörper ein, passiert über die zuführenden Kanäle die zahlreichen Kragengeißelkammern mit den Choanocyten, um anschließend über die abführenden Kanäle und durch eine sogenannte Ausströmöffnung, das Osculum, wieder aus dem Körper auszutreten. Diese Ausströmöffnungen können auch mehrfach vorhanden sein. Die Wasserströmung wird hierbei zum einen passiv durch den Druck des Außenmediums, und aktiv durch den Flagellenschlag der Choanocyten in den Kragengeißelkammern erzeugt (Larsen und Riisgård, 1994).

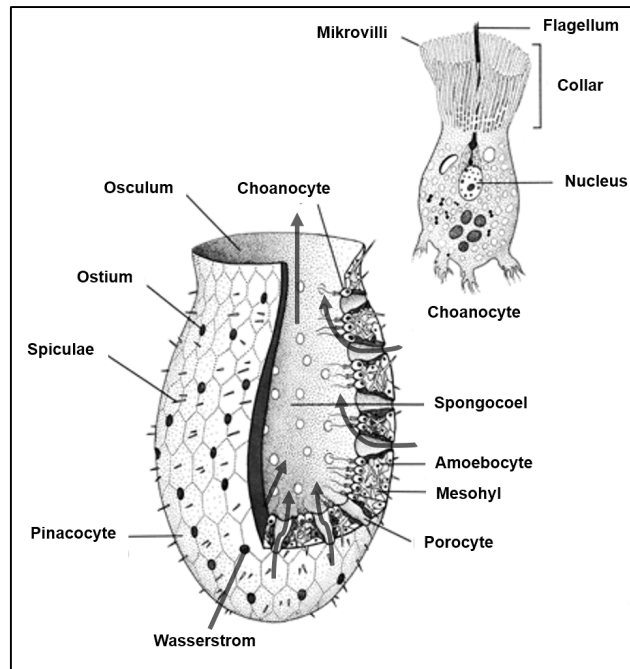


Abb. 1: Anatomie eines einfachen Schwammes: Anschnitt der Wandstruktur und Aufbau einer Choanocyte. Verändert nach Margulis & Schwartz, 1998.

Ihre Filtrationskapazität ist sehr variabel und beträgt ca. $0,002 - 84 \text{ cm}^3$ Wasser pro Sekunde und pro Kubikzentimeter Schwammgewebe (Müller et al., 2012). Vereinfacht gesagt bedeutet dies, dass ein Schwamm mit einem Volumen von etwa einem Liter in der Lage ist, in 10 s ca. 10 Liter Wasser zu filtrieren (Westheide & Rieger, 2013).

Das Wasserleitungssystem der Schwämme ist grundsätzlich in drei verschiedene Organisationstypen aufgeteilt (Haeckel, 1872). Der Leucontyp gilt als das komplexeste Kanalsystem, und entsteht durch zusätzliche Einfaltungen des Choanoderms und einer Vergrößerung der Mesohylschicht durch das kortikale Wachstum (Brusca & Brusca, 2003; Bergquist, 1978). Die strömungserzeugenden Kragengeißelkammern mit den zu- und abführenden Kanälen liegen hier in einer dichten und parallelen Anordnung (Abb. 2). Den meisten Schwämmen und fast allen Vertretern der Klasse Demospongiae liegt dieser Organisationstyp zu Grunde, wohingegen die simpleren Bauformen vom Ascon- und Sycontyp nur bei der Klasse Calcarea zu finden sind (Westheide & Rieger, 2013).

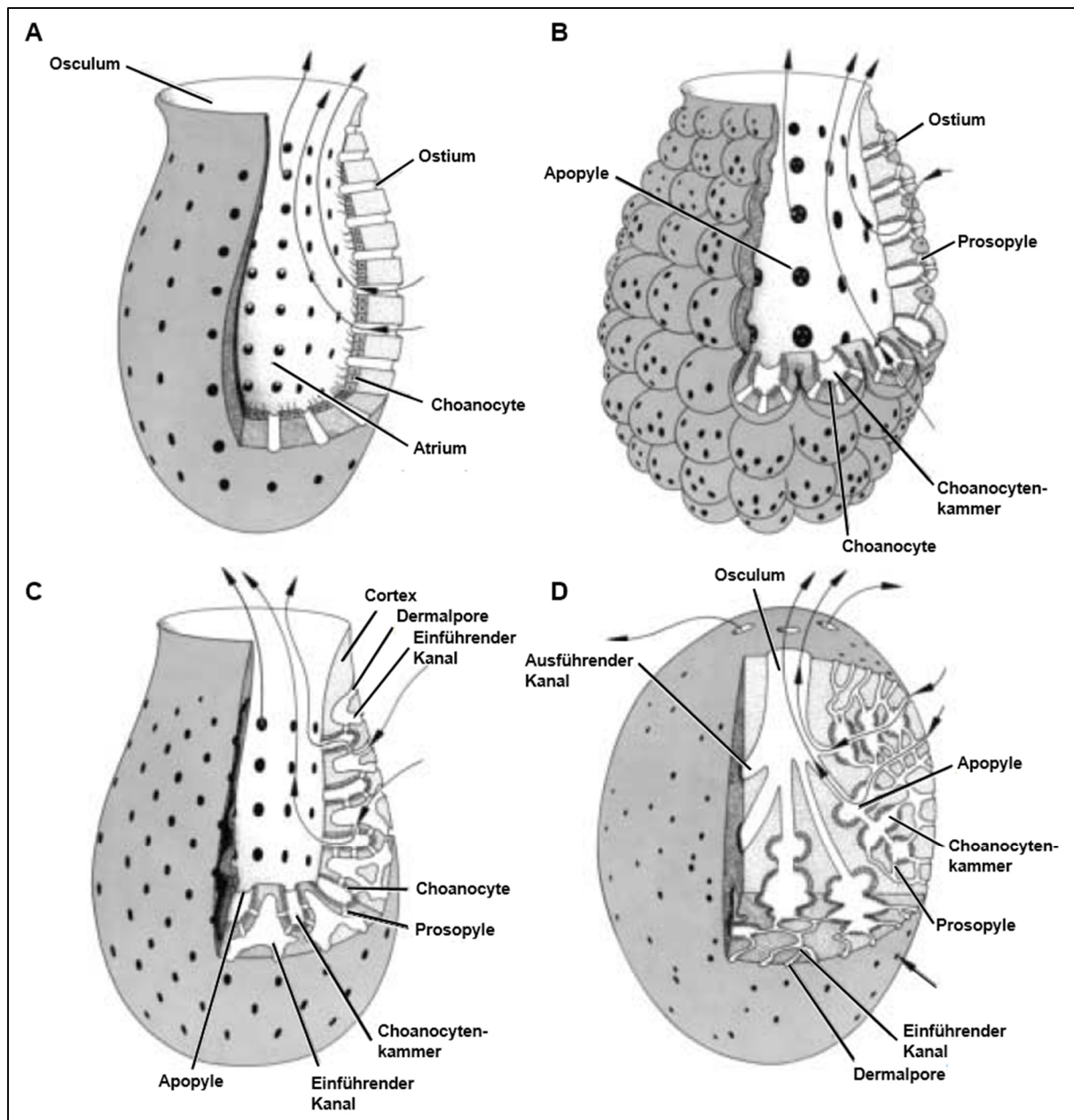


Abb. 2: Organisationstypen des Wasserleitungssystems der Schwämme

(A) Ascon-Typ. (B) Einfacher Sycon-Typ. (C) Komplexer Sycon-Typ mit Cortex. (D) Leucon-Typ. Die Pfeile zeigen die Richtung der Wasserströmung an. Verändert nach Brusca & Brusca, 2003.

Im Gegensatz zu der früheren Annahme, dass es sich bei Schwämmen um koloniebildende Tiere handelt, weiß man heute, dass die Gesamtheit eines Schwammes, die durch eine äußere Oberfläche bedeckt ist, als ein Schwammindividuum zu betrachten ist. Dafür spricht auch die Einstellung der Pumpbewegung der Choanocyten und die synchrone oskulare Kontraktion der Schwämme, da hier eine Art koordiniertes Verhalten zu beobachten ist (Brusca & Brusca, 2003). Ein gesamter Schwamm wächst wie ein gesamter Körper, beeinflusst von Umweltfaktoren wie z.B. den Substratkonturen und der vorhandenen Wasserströmung (Brusca & Brusca, 2003). Sie besitzen keine echten Organe und kein Nerven- oder Muskelgewebe,

verfügen aber über funktionelle Bereiche im Körper, welche durch die dort lokalisierten, spezifischen Zelltypen und Gewebe definiert sind (Leys and Hill, 2012). Zusätzlich verfügen sie mit den Archaeocyten über hoch mobile totipotente Zellen, die sich je nach Bedarf im Schwammkörper entsprechend differenzieren können (Müller et al., 2004). Sie werden daher auch als die Stammzellen der Schwämme beschrieben, und befinden sich u.a. im Mesohyl (Müller, 2006a). Neben den Archaeocyten und den von ihnen abgeleiteten Amoebocyten sind dort auch andere differenzierte Zelltypen lokalisiert, wie z.B. die an der Nahrungsspeicherung beteiligten Trophocyten, oder die mit Reservesubstanzen versehenen Zellen der Gemmulae, die Stato- oder Thesocyten (Höhr, 1977). Die übrigen Zelltypen des Mesohyl lassen sich ihren Funktionen nach in drei Gruppen unterteilen. Dazu gehören zunächst die Zellen des Stützskeletts, welche durch die Spongioblasten, Lophocyten und Skleroblasten vertreten sind. Als kontraktile Zellen, werden die Actinocyten bzw. Myocyten bezeichnet. Und dann findet man dort auch Zellen mit Einschlüssen, wie z.B. Sphaerulocyten. Diese Gruppe von Zellen ist ebenfalls an der Speicherung von Nahrung, an der Verdauung und an der Sekretion von Hormonen beteiligt (Westheide & Rieger, 2013).

Das Stützskelett der Schwämme kann aus organischen und anorganischen Elementen bestehen, wobei die Skelettnadeln oder Spiculae in der Regel einzeln im Schwamm vorliegen, und durch Spongin oder Kollagen zu einem Verbund zusammengelagert sind. Dieses Netzwerk aus den Kollagenfibrillen des Mesohyls, den Sponginfasern und den organischen bzw. anorganischen Skelettelementen, verleiht dem Schwammkörper sowohl Stabilität als auch Flexibilität (Ereskovsky, 2010) und ist zudem auch ein Schutz vor Fressfeinden.

1.2 Fortpflanzung und Entwicklung

Unter den Schwämmen (Phylum Porifera) existieren sowohl getrenntgeschlechtliche als auch hermaphroditische Arten (Bergquist, 1978; Westheide & Rieger, 2013), welche sich sexuell über Geschlechtszellen (Simpson, 1984), oder auch asexuell z.B. durch Gemmulation vermehren können (Weissenfels, 1989). Weitere Formen der asexuellen Vermehrung sind z.B. unspezifische Fragmentation oder die Bildung interner und externer Knospen (Bergquist, 1978; Westheide & Rieger, 2013). Bei der Gemmulation kommt es innerhalb des Schwammkörpers zur Ausbildung sogenannter Gemmulae, einer Form von Dauerstadien, welche an die Umgebung abgegeben werden, um ökologisch ungünstige Umweltbedingungen zu überdauern (Connes et al., 1974). Die Entstehung der Gemmulae und der artspezifische Aufbau der Gemmula-Schale wurde von Weissenfels (1989) sehr ausführlich für den Süßwasserschwamm *Ephydatia fluviatilis* beschrieben. In reifem Zustand bestehen sie dort vorwiegend aus den reservestoffhaltigen Thesocyten, welche aus den totipotenten Archaeocyten entstehen (Simpson, 1984) und von einer harten Schale aus Spongin umgeben sind (Abb. 3). Diese Schale verfügt über eine Öffnung, welche als Porus oder Mikropyle bezeichnet wird, und das Schlüpfen der Jungschwämme aus den Gemmulae ermöglicht (Weissenfels, 1989).

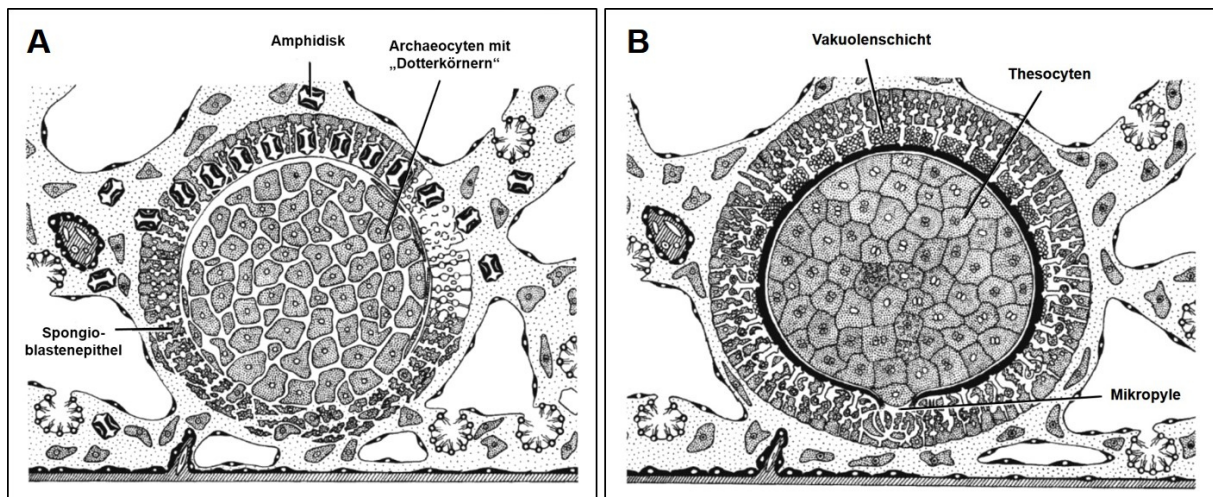


Abb. 3: Gemmula des Süßwasserschwamms *Ephydatia fluviatilis*

A) 4 Tage alte Gemmula-Anlage mit beginnender Bildung des Spongioblasten-Epithels, welches die Spongin-schale formt. Deutlich sind die einkernigen Archaeocyten im Inneren der Gemmula zu sehen. B) 7 Tage alte Gemmula-Anlage mit zweikernigen Thesocyten (Verändert nach Weissenfels, 1989).

Bei dem marinen Schwamm *Suberites domuncula*, ein Vertreter der Klasse Demospongiae (Horn- oder Kieselschwämme), konnte die Bildung von Gemmulae bereits im Jahre 1930 von W. Arndt beschrieben werden. Weiteren Studien zufolge, gelang es die Gemmulation künstlich zu induzieren, durch die Fütterung dieser Schwämme mit hitzedeaktivierten *E. coli* Bakterien

(Rasmont, 1963; Wagner et al., 1998). Die im Durchschnitt ca. 0,4 mm großen Gemmulae von *Suberites domuncula* (Abb. 4) haben eine leicht kugelige, ovale Form, und konnten für die Versuche in der vorliegenden Arbeit von der Schale der marinen Schnecke *Trunculariopsis trunculus* (Gastropoda; Muricidae) entnommen werden, welche den Schwämmen oft als Substrat dient (Herland-Meewis, 1948; Schröder et al., 2004).

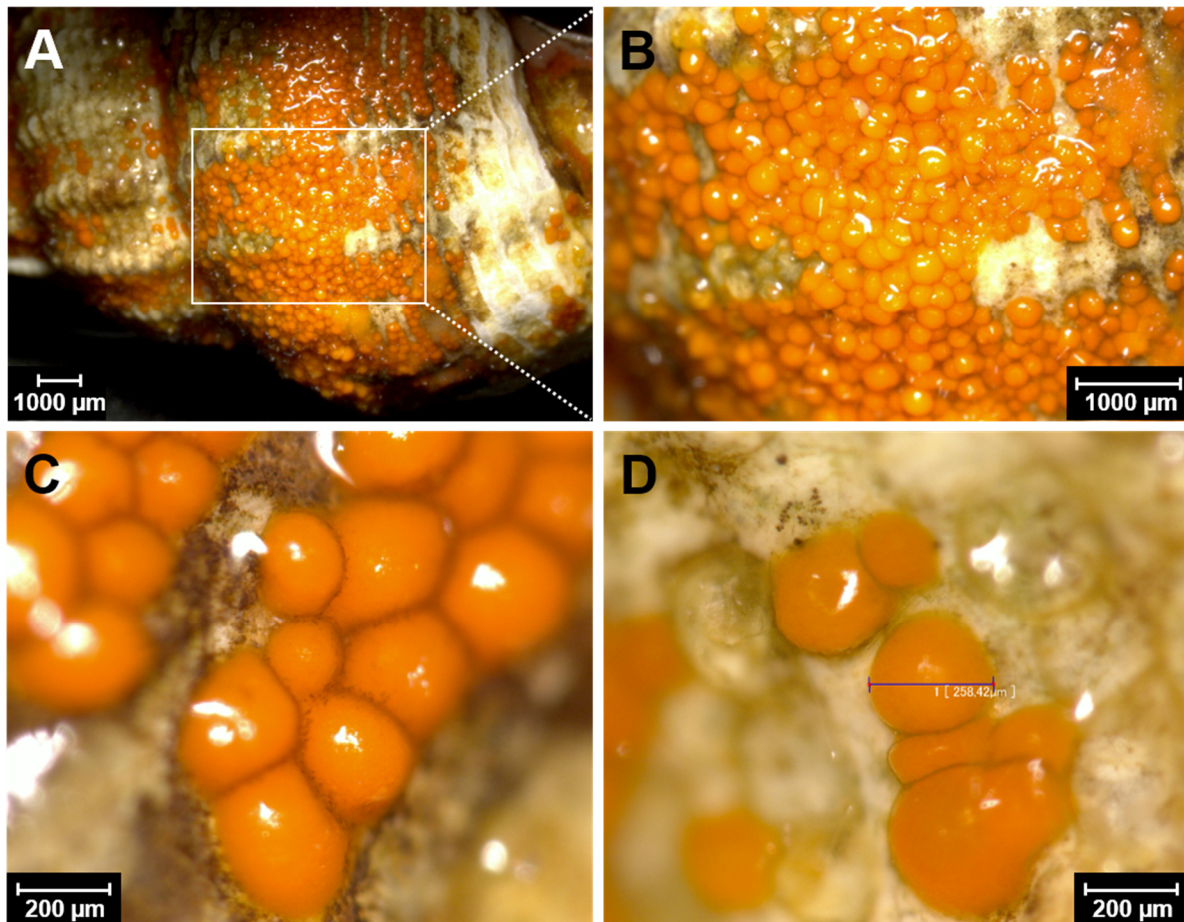


Abb. 4: Gemmulae des marinen Schwamms *Suberites domuncula*

(A) Gemmulae von *Suberites domuncula* auf der Schale der marinen Schnecke *Trunculariopsis trunculus* (Gastropoda; Muricidae) (Vergrößerung 20 x). (B) Ausschnittsvergrößerung der Gemmulae aus Bild A (100 x). (C) Vergrößerte Darstellung (200 x) einer Gruppe Gemmulae. Diese sind aber auch vereinzelt auf der Schale zu beobachten. (D) Echtzeitmessung zur exakten Größendarstellung der Gemmulae (Vergrößerung 200 x). Alle Aufnahmen wurden mit einem Digitalmikroskop (VHX 1000; Keyence, Neu-Isenburg) unter Verwendung des Zoomobjektivs VH-Z20R (20-200 x) angefertigt.

Die Gemmula-Schale der Demospongiae besteht aus Spongin, einem jodreichen Derivat des Kollagens, welche zu ca. 8 nm breiten Sponginfasern bzw. Mikrofilamenten gebündelt sein können. Sie können entweder als einziger Bestandteil der Schale ein organisches Skelett bilden, oder sie können in Verbindung mit mineralischen Skelettelementen auftreten (Westheide & Rieger, 2013).

Bei der sexuellen Fortpflanzung dagegen, entstehen die Gameten im Falle der Oocyten aus den Archaeocyten (Witte & Barthel, 1994) und die Spermatozoen aus den Choanocyten (Westheide & Rieger, 2013). Die zum größten Teil hermaphroditen Schwämme produzieren die Oocyten und Spermatozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten, so dass man die sich differenzierenden Geschlechtszellen, aufgrund fehlender Gonaden im Mesohyl der Tiere verteilt findet (Bergquist, 1978). Über die wasserleitenden Kanäle des Schwammkörpers werden die Spermatozoen dann ins freie Wasser ausgestoßen bzw. bei einer inneren Befruchtung, in den Schwamm eingestrudelt (Westheide & Rieger, 2013).

Die Vertreter der Klassen Hexactinellida, Homoscleromorpha und Calcarea gelten als vivipar, während Schwämme der Klasse Demospongiae 1956 von Lévi aufgrund ihrer Fortpflanzungsstrategie in zwei Gruppen unterteilt wurden. Die erste Gruppe, welche durch die Unterklasse Ceractinomorpha (Lévi, 1953) repräsentiert wird, wurde anhand der dort beobachteten inneren Befruchtung und der Entwicklung der Embryos im Mesohyl der adulten Tiere (Muttertiere) charakterisiert. Sie zeigen daher eine ovovivipare bzw. vivipare Fortpflanzungsweise. Die zweite Gruppe gehört zur Unterklasse der Tetractinomorpha und ist durch eine äußere Befruchtung und die Entwicklung der Larven außerhalb des Körpers der adulten Tiere charakterisiert (Lévi, 1953). Sie wird daher als ovipare Fortpflanzungsform bezeichnet (Ereskovsky, 2010). Die Mehrzahl der oviparen Schwammspezies sind getrenntgeschlechtlich, so konnte z.B. bei der zu den Tetractinomorpha gehörenden Spezies *Suberites domuncula* die Produktion von Oocyten und Larven histologisch bzw. lichtmikroskopisch nachgewiesen werden (Perovic-Ottstadt et al., 2004a).

Bisher war es nur aufgrund zytologischer Marker möglich, die Differenzierungswege der Schwammzellen nachzuvollziehen (Boury-Esnault und Rützler, 1997). So deuten bereits 1966 von Borojevic durchgeführte Untersuchungen daraufhin, dass die Archaeocyten den Ursprung oder Ausgangspunkt der Differenzierungswege bilden, welche bis zu den letztlich ausdifferenzierten Zelltypen führen. Aktuelle Studien zufolge, handelt es sich bei den mobilen Archaeocyten des Mesohyls um totipotente Zellen, weshalb sie auch als die Stammzellen der Schwämme bezeichnet werden (Simpson, 1984; Müller et al., 2004; Müller, 2006a).

Dieser vorwiegend in Süßwasserschwämmen untersuchte Zelltyp verfügt über einen großen Nucleus mit Nucleolus, ein endoplasmatisches Reticulum und einen Golgi-Apparat. Sie sind zur Phagozytose befähigt und können sich zu verschiedenen Zellen differenzieren, weshalb sie bei adulten Schwämmen immer in größerer Zahl vorhanden sind (Weissenfels, 1989; Boury-Esnault und Rützler, 1997). Die oft beschriebene Fähigkeit zur Regeneration der Schwämme

z.B. nach Verletzungen, beruht auf der Mobilität und der Fähigkeit zur Proliferation der Archaeocyten (Wilson, 1907; Simpson, 1984).

In Schwämmen welche aus Gemmulae oder aus Aggregaten dissoziierter Zellen entstanden sind, entwickeln sich die Choanocyten aus Archaeocyten (Buscema et al., 1980). Wie die Archaeocyten zeigen auch sie ein großes Differenzierungspotential. Neben ihren Funktionen wie z.B. der Erzeugung der Wasserströmung und der Aufnahme der Nahrungspartikel im Schwammkörper, verfügen sie ebenfalls über die Fähigkeit sich in andere Zellen zu differenzieren. Zu diesen Zelltypen gehören andere Choanocyten, Spermatocyten und Oocyten (Leys & Hill, 2012). Laut einiger Studien zufolge sind sie sogar in der Lage sich in Archaeocyten zu differenzieren (Connes et al., 1974; Diaz, 1977), weshalb man sie ebenfalls als eine Art von Stammzellen betrachtet (Funayama et al., 2010).

1.3 Primmorphe – In vitro Kultivierung von Schwammzellen

Für die Untersuchungen grundlegender Funktionen bei Schwämmen, wie z.B. der Zellproliferation hat man lange Zeit versucht Schwammzellen zu kultivieren und eine Art konstante Zelllinie zu erzeugen und zu erhalten. Dies erwies sich als schwierig, trotz der Beobachtung, dass sich bei Schwämmen in nahezu allen Zelltypen eine hohe Telomerase-Aktivität nachweisen lässt (Koziol et al., 1998). Diese besondere Eigenschaft der Schwammzellen, konnte in den Zellen höherer Metazoen nicht beobachtet werden (Custodio et al., 1998). Bei den Telomerasen handelt es sich um Enzyme in Zellkernen, welche dort die Endbereiche von Chromosomen, die Telomere ständig erneuern. Dies ist notwendig, da bei jeder Replikation der DNA, ein Teil der Telomere verloren geht. Durch den stetigen Erhalt der Telomere wird bei Zellteilungen eine Verkürzung der Chromosomen verhindert. Schwammzellen, welche nach der Dissoziation ihre Zellkontakte zueinander verloren haben, stellen ihre Telomeraseaktivität ein (Koziol et al., 1998). Dies wird deutlich in Zellsuspensionen, welche aus vereinzelt oder dissoziierten Schwammzellen bestehen, und entweder nach kurzer Zeit absterben, vergleichbar mit dem Prozess der Apoptose (Wagner et al., 1998), oder in einem nicht-proliferierenden, inaktiven Zustand verharren.

Unter speziellen Kulturbedingungen gelang es erstmals multizelluläre Aggregate von dissoziierten Schwammzellen zu erzeugen (Custodio et al., 1998; Müller et al., 1999). Werden Schwammzellen aus ihrem Verband im Gewebe gelöst, also dissoziiert, und anschließend in ein bestimmtes Nährmedium überführt (Kapitel B 9.1), dann bilden sich spontan neue Zellkontakte zwischen den Zellen aus. Nach einer Kultivierungszeit von etwa 4-5 Tagen, lassen sich kleine schwammartige Gebilde beobachten (Abb. 5). Dabei handelt es sich um eine spezielle Form von 3D-Zellaggregaten, die als Primmorphe bezeichnet werden.

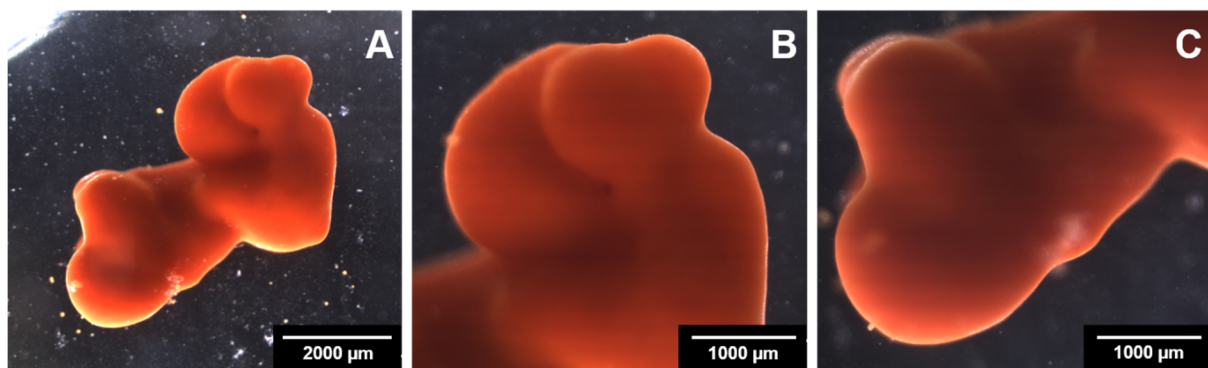


Abb. 5: Primmorph von *Suberites domuncula*

A) Primmorph von *Suberites domuncula*, 4 Tage nach der Dissoziation der Schwammzellen und ihrer anschließender Kultivierung in calcium- und magnesiumfreien Meerwasser (CMFSW), versetzt mit Antibiotika (Vergrößerung x 2). (B) u. (C) Vergrößerungen des Primmorphs (4 x). Die lichtmikroskopischen Bilder wurden mit einem digitalen, inversen Durchlichtmikroskop (Evos® XL; Peqlab, Erlangen) angefertigt.

Diese gewebeähnlichen Aggregate können anschließend über einen Zeitraum von mehr als fünf Monaten kultiviert werden. Die auf diese Weise wieder assoziierten Zellen der Primmorphe zeigen eine positive Telomerase-Aktivität und sind zur Synthese von DNA befähigt, weshalb sie auch ihre Teilungsfähigkeit wiedererlangen und proliferieren (Müller et al., 1999). Diese Beobachtungen erfolgten nach dem Einsatz von Bromdesoxyuridin (BrdU, 5-Brom-2-desoxyuridin), dem chemischen Analogon des natürlichen Nukleosids Thymidin (bzw. Desoxyuridin). Es kann von den Zellen aufgenommen werden und wird anstelle des Desoxythymidintriphosphat (dTTP) während der Replikation in der Synthese-Phase des Zellzyklus in die DNA integriert. Es kann dann anschließend immunhistochemisch mit Hilfe von gegen BrdU gerichteter Antikörper in den Zellen nachgewiesen werden und ist ein Hinweis auf neu synthetisierte DNA. Die Beobachtung der hohen Telomerase-Aktivität in nahezu allen Schwammzelltypen ist wahrscheinlich auch eine Erklärung für die Feststellung, dass manche Individuen einiger Schwammspezies ein extrem hohes Lebensalter von mehr als 1500 Jahren erreichen können (Lehnert & Reitner, 1997).

2. Nanos - RNA-bindendes Protein mit spezifischem Zinkfinger

Das Nanos-Gen codiert für ein RNA-bindendes Protein, welches innerhalb der Invertebraten und Vertebraten an der regulatorischen Kontrolle der Translation beteiligt ist (Gavis & Lehmann, 1994; Curtis et al., 1995b; Köprunner et al., 2001). Die räumliche und zeitliche Regulation der mRNA-Expression spielt eine essentielle Rolle während der Embryonalentwicklung eukaryotischer Organismen. An dieser Regulation sind sequenzspezifische RNA-bindende Proteine beteiligt, welche durch das Rekrutieren von sogenannten Effektorkomplexen, die Expression ihrer Ziel-mRNAs verhindern (Bhandari et al., 2014). Erstmals bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als maternales Effekttgen identifiziert, kodiert Nanos dort für ein RNA-bindendes Protein (Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1991; Wang & Lehmann, 1991), welches an der Etablierung der anterior-posterioren Achse (Längsachse) des frühen Embryos bei *Drosophila* beteiligt ist (St. Johnston & Nüsslein-Volhard, 1992). Darüber hinaus übernehmen Mitglieder der Nanos-Proteinfamilie wichtige und teilweise konservierte Funktionen bei der Entwicklung und Regulierung der Urkeimzellen (engl. primordial germ cells, PGCs). Dabei ist es z.B. für die Reifung und Migration der Polzellen (Kobayashi et al., 1996, Asaoka-Taguchi et al., 1999) bzw. der späteren Keimzellen (Forbes & Lehmann, 1998), sowie für die Aufrechterhaltung bzw. Selbsterneuerung der

Stammzellen verantwortlich (Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1991). Des Weiteren konnten Mitglieder der Nanos-Proteinfamilie bisher in zahlreichen Vertretern der Invertebraten- und Vertebratenklassen identifiziert und z.T. funktionell beschrieben werden (Lai et al., 2011). Zu diesen Organismen gehören z.B. Hydra (Mochizuki et al., 2000), Blutegel (Kang et al., 2002), Fadenwurm (Subramaniam & Seydoux, 1999), Zebrafisch (Köprunner et al., 2001) und Frosch (Mosquera et al., 1993). Auch in der Klasse Mammalia sind Homologe des Nanos-Proteins beobachtet und untersucht worden, wie z.B. in der Maus (Tsuda et al., 2003) und im Menschen (Jaruzelska et al., 2003). In diesen Studien konnte auch gezeigt werden, dass Mutationen des Nanos-Proteins weitreichende Konsequenzen zur Folge haben, wie z.B. einem verfrühten Eintritt der Urkeimzellen in die Mitose (Asaoka-Taguchi et al., 1999), das Ausbleiben der Wanderung dieser Zellen zu den Gonaden (Kobayashi et al., 1996), der Eintritt dieser Zellen in die Apoptose (Hayashi et al., 2004; Sato et al., 2007) und die Aufrechterhaltung des Stammzellstatus betroffener Zellen in den adulten Tieren unterbleibt (Forbes & Lehmann, 1998). Die Beobachtung hoher Konzentrationen von Nanos in den Urkeimzellen (PGCs) (Wang et al., 1994), und zahlreiche Studien orthologer Nanos-Proteine in Zusammenhang mit Funktionen in den Keimzellen bzw. der Keimbahn unterschiedlicher Vertreter der Invertebraten- und Vertebraten, sprechen für eine ursprüngliche Funktion dieses Proteins in der Keimbahn (Kobayashi et al., 1996; Asaoka-Taguchi et al., 1999; Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1991). Darüberhinaus sind diese Beobachtungen ein Hinweis auf die konservierte Funktion dieser Proteine. Dabei spielt u.a. ihre spezifische Zinkfingerdomäne, welche innerhalb der Metazoa eine hochkonservierte, funktionelle Region darstellt, eine wichtige Rolle (Curtis et al., 1997, Hashimoto et al., 2010).

Bei der ursprünglich beschriebenen Funktion von Nanos, der Etablierung der anterior-posterioren Achse in dem Organismus *Drosophila*, wird die RNA des Nanos-Gens während der Oogenese maternal synthetisiert und am Ende der Oogenese am posterioren Pol der Eizelle (Oocyte) positioniert (Wang et al., 1994; Curtis et al., 1995b). Die Lokalisation der mRNA erfolgt u.a. über F-Aktin, ein Strukturprotein des Zytoskeletts der Oocyte (Kugler & Lasko, 2009; Watson et al., 2010). Ein weiterer Mechanismus zur asymmetrischen Lokalisation von mRNAs in Oocyten und frühen Embryos kombiniert den Abbau und Schutz dieser mRNAs. So werden z.B. ubiquitinär im Cytoplasma verteilte Transkripte in bestimmten Bereichen abgebaut, während Transkripte, welche sich in den gewünschten Bereichen des Cytoplasmas bereits angereichert haben, vor dem Abbau geschützt werden (Semotok et al., 2005). Beispielsweise befinden sich ca. 95 % der Nanos-Transkripte zunächst im Cytoplasma verteilt, bis die Eliminierung unlokalisierter Nanos-mRNAs, sowie die Repression der Translation

dieser mRNAs durch die Beteiligung des RNA-bindenden Proteins Smaug, zu einer Anreicherung der Nanos-mRNA im posterioren Bereich führt (Smibert et al., 1996; Semotok et al., 2005). Während der Befruchtung erfolgt dann die Translation dieser mRNA an der entsprechenden Position, und führt zu einem von posterior nach anterior gerichteten Gradienten des Nanos-Proteins in den Oocyten von *Drosophila* (Curtis et al., 1995b). In der nachfolgenden Embryogenese erfolgt nun die Bindung des Nanos-Proteins an die im posterioren Bereich positionierte mRNA des maternalen Effektgens *hunchback*. Als Zinkfinger-Transkriptionsfaktor reguliert *hunchback* die Transkription von Genen, welche an der Bildung der anterioren Bereiche, wie Kopf und Thorax verantwortlich sind (Tautz et al., 1987; Hülskamp et al., 1990). Nanos verhindert die Translation des *hunchback* Proteins im posterioren Bereich des Embryos, und ermöglicht so die Bildung abdominalen Segmente des Embryos (Arrizabalaga & Lehmann, 1999). Daher werden Nanos-Proteine auch als Translationsrepressoren bezeichnet, welche in der Lage sind, über eine evolutionär hoch konservierte C-terminale Region, an RNA zu binden. Innerhalb dieser C-terminalen Region befindet sich die für Nanos-Proteine typische und für deren Funktion unerlässliche Zinkfinger Domäne mit dem spezifischen Sequenzmotiv Cys-Cys-His-Cys (Curtis et al., 1997). Es handelt sich dabei um zwei potentielle Bindungsstellen für jeweils ein Zinkmolekül (Zn (II)) (Hashimoto et al., 2010). Wird auch nur eine dieser Bindungsstellen blockiert oder zerstört, führt das zu Fehlfunktionen des Proteins (Curtis et al., 1997).

Die Bindung des Zielgens *hunchback* erfolgt innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz, welche als Nanos Response Element (NRE) bezeichnet wird (Wharton & Struhl, 1991). Dieses besteht aus zwei Kopien eines Uracil-reichen, 16 Nukleotide langen Sequenzmotivs im 3'-UTR der *hunchback* mRNA (Zamore et al., 1997). In *in vivo* Versuchen konnte bewiesen werden, dass Mutationen in diesen *hunchback* Zielsequenzen, eine Repression der Translation durch das Nanos-Protein verhindern. Allerdings konnte dieses Resultat bei der anschließenden Durchführung eines entsprechenden *in vitro* Versuchs nicht bestätigt werden (Curtis et al., 1997). So dass man davon ausgeht, dass die Bindung an RNA zwar mit hoher Affinität, aber mit geringer Sequenzspezifität erfolgt (Curtis et al., 1997) und dass die Interaktionen der Nanos-Proteine mit dem Zielgen, der *hunchback* mRNA, innerhalb eines Proteinkomplexes erfolgen (Zamore et al., 1997). An diesem Proteinkomplex sind zwei weitere Proteine, zum einen Pumilio, ebenfalls ein RNA-bindendes Protein, und zum anderen Brain Tumor beteiligt. Pumilio initiiert die Bildung dieses quartären Komplexes und erkennt die spezifische Sequenz des Nanos Response Elements (NRE) (Sonoda & Wharton, 1999; Baines, 2005). Es rekrutiert dabei das Nanos-Protein sozusagen zu seiner spezifischen Ziel-RNA und ermöglicht über eine

334 Aminosäuren lange, C-terminale Region, die Bindung an das NRE im 3'-UTR der hunchback mRNA (Arrizabalaga & Lehmann, 1999). Die Lokalisation der Repression wird in diesem Zusammenhang durch das Nanos-Protein festgelegt (Zamore et al., 1997).

Einer der wichtigsten Mechanismen zur Regulation maternaler Transkripte, ist die Modulation des Poly (A)-Tails. In den meisten Fällen steht die Repression der Translation in Oocyten und frühen Embryos in Zusammenhang mit einem verkürzten Poly (A)-Tail, welcher nur noch ca. 30-50 Nukleotide umfasst, so dass es zu einer reduzierten Bindung des Poly (A)-bindenden Proteins (PABP) kommt und eine Inhibition der Translation zur Folge hat (de Moor & Richter, 1999; Collart & Panasenko, 2012). Längere Poly (A)-Tails von ca. 200 Nukleotiden dagegen, ermöglichen die Bindung der PABPs und somit auch die Interaktion dieser Poly (A)-bindenden Proteine mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor eIF4F. Dieser ist mit der 5'-Cap-Struktur verbunden, so dass es durch die Interaktion des Initiationsfaktors eIF4F mit dem PABP zu einer Zirkularisierung der mRNA kommt, und nur intakte mRNAs translatiert werden. Darüberhinaus erhöhen sie durch die Rekrutierung der kleinen ribosomalen Untereinheit den Start der Translation (Wiederhold & Passmore, 2010). Zur Unterdrückung der Expression der Ziel-mRNAs via Deadenylierung, rekrutiert das RNA-bindende Protein Nanos den aus mehreren Untereinheiten bestehenden CCR4-NOT Deadenylase Komplex (engl.: Carbon catabolite repressor protein 4 - Negative regulator of transcription complex). Dabei handelt es sich um einen innerhalb der Eukaryoten von der Hefe bis hin zum Menschen konservierten, universellen Regulator der Genexpression (Collart, 2003). Während mRNA abbauende Enzyme wie z.B. eine poly (A)-spezifische Exoribonuklease (3'-Exoribonuklease) und die Endoribonuklease IV bereits schon sehr früh u.a. in Eileitern von Hühnern und in Kalbsthymus charakterisiert wurden (Müller, 1976; Schröder et al., 1980), gelang der erste physikalische Beweis für eine enzymatische Funktion des Ccr4/Caf1-Komplexes erst im Jahre 2001 bei *Saccharomyces cerevisiae* (Daugeron et al., 2001; Tucker et al., 2001). Entscheidend hierbei war die Demonstration, dass es sich bei beiden katalytischen Proteinuntereinheiten Ccr4 und Caf1 des CCR4-NOT-Komplexes, um Komponenten einer der wichtigsten cytoplasmatischen mRNA Deadenylasen in der Hefe handelt. In diesem Organismus besteht der Kernkomplex aus insgesamt 9 Untereinheiten: Ccr4, Caf1, Caf40, Caf130, NOT1-NOT5, und konnte dort in 2 unterschiedlichen Molekulargewicht-Varianten nachgewiesen werden, zum einen in einer 0.9-1.2 MDa, und zum anderen in einer 1.9-2 MDa-Variante (Collart, 2003).

Die drei humanen Nanos Paralogen (Nanos 1-3) interagieren z.B. mit der CNOT1 Untereinheit des CCR4-NOT Komplexes über ein kurzes Sequenzmotiv (NIM: CNOT1-interagierendes Motiv), welches in allen Vertebraten und einigen Invertebraten als konserviert gilt (Bhandari et

al., 2014). Analysen der Kristallstruktur eines an CNOT1 gebunden, humanen Nanos1 NIM Peptids zeigten, dass das Protein durch die Insertion konservierter aromatischer Aminosäurereste eine konservierte hydrophobe Tasche auf der Oberfläche des CNOT1 Proteins öffnet (Bhandari et al., 2014). Dort konnte auch gezeigt werden, dass Substitutionen dieser aromatischen Reste in den Nanos1-3 NIMs die Bindung an CNOT1 verhindern und somit auch ihre Funktion als Translationsrepressoren unterbunden wird. Im Gegensatz zu den humanen Nanos-Homologen konnte für zwei Nanos-Homologe der Maus Nanos2 und Nanos3 gezeigt werden, dass diese jeweils mit unterschiedlichen Komponenten des CCR4-NOT-Komplexes interagieren (Suzuki et al., 2014). Während die Expression von Nanos3 in der Maus unmittelbar nach der Entstehung der Urkeimzellen (PGCs) beginnt und bis hin zu den Migrationsstadien dieser Zellen anhält, wird Nanos2 ausschließlich in den männlichen Keimzellen innerhalb der Gonaden exprimiert und ist dort an Vorgängen der sexuellen Differenzierung beteiligt (Tsuda et al., 2003). Die Beobachtung, dass Nanos3 dort direkt mit der CNOT8 und Nanos2 mit CNOT1 Untereinheit des Komplexes interagiert, ist laut dieser Studie eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Funktionen der beiden Proteine in den männlichen Keimzellen der Maus (Suzuki et al., 2014). Einer anderen Untersuchung zufolge, interagiert das Nanos-Protein in der Keimbahn von *Drosophila* mit einer weiteren, der CNOT4 Untereinheit des CCR4-NOT-Komplexes (Kadyrova et al., 2007). Dort rekrutiert Nanos zusammen mit dem Protein Pumilio die Deadenylase CAF1 des Komplexes zur Kontrolle bzw. Repression der Translation der maternalen Cyclin B mRNA, und verhindert dadurch sozusagen als Proliferationshemmer den vorzeitigen Eintritt der Urkeimzellen in die Mitose. Darüberhinaus interagiert das Nanos-Protein auch während seiner Funktion bei der Selbsterneuerung der Stammzellen der Keimbahn von *Drosophila* mit der CCR4-Deadenylase (Joly et al., 2013). Dort wurde die mei-P26 mRNA, welche für ein Protein der Trim-NHL Tumorsuppressorfamilie (engl.: Tripartite motif containing protein) codiert, als Ziel-mRNA des Translations-Repressor-Komplexes identifiziert. Dieser besteht aus den beiden Proteinen Nanos und Pumilio, sowie der CCR4 Deadenylase des CCR4-NOT-Komplexes (Joly et al., 2013). Das Mei-P26 Protein spielt eine essentielle Rolle in der Regulation und Kontrolle des Zellschicksals innerhalb der Stammzellen der Keimbahn und hat dort ebenfalls wie das Protein Brat eine von *C.elegans* bis hin zur Maus konservierte Funktion (Wulczyn et al., 2011). Die hier genannten Beispiele sollen verdeutlichen, wie vielfältig und komplex sich die Wirkungsweise dieser Proteine innerhalb der Invertebraten und Vertebraten darstellt, und das man gerade erst am Anfang steht, ihre Funktionen innerhalb der Keimbahn dieser Organismen zu verstehen.

2.1 Zinkfingerproteine

Zinkfingerproteine verfügen über funktionelle Domänen, über die sie in der Lage sind Nukleinsäuren wie DNA oder RNA zu erkennen und zu binden. 1983 wurde während der Studien an einem Transkriptionsfaktor TFIIIA von Oocyten des Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) entdeckt, dass dieser gebundene Zinkionen enthält und diese für die spezifische Bindung von DNA essentiell sind (Hanas et al., 1983). Mit Hilfe weiterer Studien konnte eine tandemartige Sequenz identifiziert werden, welche dem Motiv (Tyr, Phe)-X-Cys-X₂₋₄-Cys-X₃-Phe-X₅-Leu-X₂-His-X_{3,4}-His-X_{2,6} folgt, in der jedes X für eine variable Aminosäure steht (Ginsberg et al., 1984; Brown et al., 1985; Miller et al., 1985).

Jedes dieser repetitiven tandem Motive innerhalb eines Proteins, bindet koordinativ ein Zinkion, weshalb man diese Domänen als Zinkfinger bezeichnet (Miller et al., 1985; Klug, 2010). Dazu bilden die an bestimmten Positionen im Protein konservierten Aminosäuren Cystein und Histidin ein strukturelles Zentrum, indem das Metallion gebunden werden kann (Miller et al., 1985) (Abb. 6). Dabei wird die tetraedrische Bindung eines Zinkions (Zn^{2+}) durch die starken Wechselwirkungen mit den Schwefel-, Stickstoff- oder Sauerstoffatomen der Aminosäuren stabilisiert. Cystein bindet dabei das Zink koordinativ über die SH-Gruppe, und das Histidin über den Imidazolring. Eine Blockierung oder Zerstörung dieser Bindungsstellen, führt zu Fehlfunktionen des Proteins, so dass diese als essentiell für die Funktion der Proteine gelten (Curtis et al., 1997).

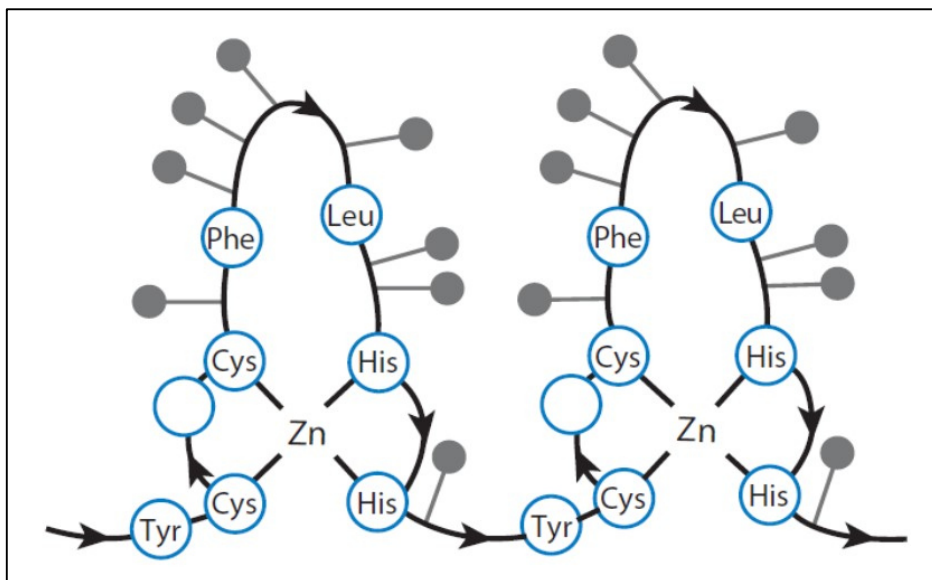


Abb. 6: Faltungsschema eines typischen Zinkfingers

In der Abbildung ist deutlich die lineare Anordnung der repetitiven, strukturellen Einheiten der Zinkfinger-Module zu erkennen. In deren Zentren befinden sich jeweils die tetraedrisch angeordneten Zink-Liganden Cystein und Histidin, welchen hier das Sequenzmotiv Cys-Cys-His-His zu Grunde liegt. Die grauen Punkte stehen für

Aminosäurepositionen, welche mit den Nukleinsäuren interagieren können. Zusätzlich sind die drei hydrophilen Gruppen (Phe, Leu, Tyr) hervorgehoben, welche den hydrophoben, strukturellen Kern bilden. Verändert nach Klug, 2010.

Durch die Bindung eines Zinkatoms in den Zinkfingerdomänen, verändert sich zudem die Konformation des Proteins, so dass es eine schleifenförmige Struktur annimmt, und so der großen Furche der DNA folgt (Stryer, 2009). Dabei bildet eine α -Helix innerhalb der Domäne spezifische Kontakte mit den Rändern der Basenpaare der großen Furche aus (Abb. 6) (Wolfe et al., 2000). Die Erkennung bzw. die Bindung der Nukleinsäuren kann hier auf spezifische und unspezifische Weise erfolgen. Dies konnte in Studien an dem Transkriptionsfaktor TFIIIA belegt werden (Clemens et al., 1993). Der Mechanismus der Erkennung von RNA-Sequenzen dagegen, weicht von dem der dsDNA ab, da die Bindung an dsRNA hauptsächlich über Wechselwirkungen mit den Phosphaten und den hydrophoben Stapelkräften mit verfügbaren Nukleotiden erreicht wird (Brown, 2005). Das Protein TFIIIA ist in der Lage, sowohl RNA als auch DNA zu binden, so dass man hier von dem sogenannten „one structure fits all“ Prinzip ausgeht (Clemens et al., 1993; Brown, 2005).

Die Abfolge der an der Bindung von Nukleinsäuren beteiligten konservierten Cysteine und Histidine in den funktionellen Domänen der Zinkfinger-Proteine, entspricht bestimmten Strukturmotiven wie Cys-Cys (CC) oder Cys-His (CH), welche bisher in vielen Variationen in unterschiedlichen Proteinen beobachtet werden konnten. Dazu gehören z.B. RNA-bindende Zinkfinger-Proteine wie das HIV-1 Nukleokapsid (CCHC), das Reovirus $\sigma 3$ (CCHH) und das Kernprotein HUA1 von Arabidopsis (CCCH) (Brown, 2005), sowie Vertreter der Nanos-Proteinfamilie (CCHC) (Curtis et al., 1997).

3. Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die cDNA und das Protein des Nanos-Homologs in dem marinen Schwamm *Suberites domuncula* identifiziert, exprimiert und sowohl biochemisch als auch immunologisch charakterisiert werden. Das Protein Nanos wurde erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert (Wang & Lehmann, 1991) und ist dort an Vorgängen der Achsendeterminierung (Curtis et al., 1997), sowie an der Regulation und Entwicklung der Keimbahnzellen beteiligt (Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1991; Köprunner et al., 2001; Tsuda et al., 2003; Wang & Lin, 2004). Zudem konnte auch eine Funktion im Zusammenhang mit dem Protein Cyclin B in der Keimbahn von *Drosophila* nachgewiesen werden, so dass eine Beteiligung der Nanos-Proteine an der Regulation bzw. Steuerung der

Proliferation von Zellen vermutet wird (Kadyrova et al., 2007). Daher wurde im Rahmen der von mir durchgeführten Expressionsanalysen gezielt nach Hinweisen gesucht, die eine Funktion des Nanos-verwandten Proteins innerhalb der Stammzellen oder Keimzellen der Schwämme vermuten lässt.

Von den Schwammspezies *Ephydatia fluviatilis* und *Amphimedon queenslandica* sind bereits Sequenzdaten Nanos-verwandter Proteine bzw. deren cDNA bekannt, welche aber nicht näher charakterisiert wurden. Daher ist über die Eigenschaften und Funktionen, die es speziell in diesen Organismen ausübt, bisher wenig bzw. nichts bekannt. Die Nanos-Proteine konnten außer in *Drosophila* auch in vielen anderen Invertebraten und Vertebraten wie z.B. in Nesseltieren, Seeigeln, Fadenwürmern, Zebrafischen, Mäusen und auch im Menschen nachgewiesen und näher untersucht werden (Kapitel A 2). Oft fand man dort sogar mehr als eine Genvariante vor, sowie auch unterschiedliche Expressionsorte im Gewebe, was unter anderem auf verschiedene Funktionen dieser Isoformen im Organismus hinweisen könnte.

Charakteristisch für die bisher beschriebenen Nanos-Proteine ist, dass sie alle über eine spezifische, hochkonservierte Zinkfingerdomäne verfügen (Zamore et al., 1997). Sie wurde für den Zebrafisch *Danio rerio* näher beschrieben, da es dort gelungen ist, die Kristallstruktur der beiden Nanos-Zinkfinger aufzuklären (Hashimoto et al., 2009, 2010).

Die Konservierung dieser Struktur in zahlreichen Vertretern der Metazoa, ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei den Nanos-Proteinen um sehr ursprüngliche Proteine handelt (Kobayashi et al., 1996; Asaoka-Taguchi et al., 1999; Lehmann & Nüsslein-Volhard, 1991). Daher war es auch interessant, die im Rahmen meiner Arbeit ermittelten Sequenzdaten von Sd_nrp mit den bereits veröffentlichten Gensequenzen der Nanos-Proteine anderer Spezies zu vergleichen und phylogenetisch zu analysieren. Mit der Identifizierung und der Expressionsanalyse von Sd_nrp im marinen Schwamm *Suberites domuncula*, sowie der anschließenden immunologischen und biochemischen Charakterisierung, sollten Hinweise zu den möglichen Funktionen der Nanos-Proteine in Schwämmen gesammelt und interpretiert werden. Damit soll diese Arbeit auch eine Grundlage für funktionelle und strukturelle Studien der Nanos-Proteine bei Schwämmen bilden, sowie zur Charakterisierung dieser RNA-bindenden Proteine beitragen.

B Material und Methoden

1. Tiere

1.1 Systematik

Reich	Metazoa (Vielzellige Tiere)
Stamm	Porifera (Schwämme)
Klasse	Demospongiae (Horn- oder Kieselschwämme)
Ordnung	Hadromerida
Familie	Suberitidae
Gattung	<i>Suberites</i>
Art	<i>Suberites domuncula</i>



Abb. 7: *Suberites domuncula*

Quelle: Inst. f. Physiologische Chemie, JGU Mainz, Prof. Dr. W.E.G. Müller.

1.2 Lebensweise und Habitus von *Suberites domuncula*

Die zu den marinen Schwämmen zählende Art *Suberites domuncula* wurde 1792 zum ersten Mal von Giuseppe Olivi (Synonym: *Alcyonium domuncula*) beschrieben und ist hauptsächlich im adriatischen Raum vertreten (Olivi, 1792; Hooper & van Soest, 2002). Diese Art hat eine leicht kugelige, ovale Form und kann eine Größe von bis zu 20 cm erreichen. Die Oberfläche der Schwämme, das äußere Epithel (Pinacoderm) ist außergewöhnlich glatt und feinporig. Sie präsentiert sich zudem in einem vielfältigen Farbspektrum. Am häufigsten sind rote oder orangefarbene Exemplare zu beobachten, eher seltener dagegen sind gelbe, hellblaue und violette Farbschläge (Hooper & van Soest, 2002; Riedl et al., 2011).

Phylogenetisch werden sie den Demospongiae (Horn- oder Kieselschwämmen) zugeordnet, die mit mehr als 7000 Arten, neben den Hexactinellida und den Calcarea das größte Taxon der rezenten Schwämme bilden. Ihr Stützskelett besteht meist aus einer organischen Komponente, dem kollagenartigen Spongin, und einer anorganischen Komponente, den aus Siliziumdioxid bestehenden Skelettnadeln (Kieselspiculae) (Westheide & Rieger, 2003). Wobei diese Komponenten auch völlig fehlen können. Die eigentlich sessilen Schwämme leben in Symbiose mit einem Einsiedlerkrebs der Art *Pagurites oculatus* (Ordnung: Decapoda; Familie: Paguridae), welcher häufig die Schalen der marinen Schnecke *Trunculariopsis trunculus* (Gastropoda; Muricidae) besiedelt (Herland-Meewis, 1948). Von dieser Lebensweise profitieren beide Individuen. Der auf der Schneckenschale aufsitzende Schwamm kann so seinen Lebensbereich und damit auch den Zugang zu Nahrung erweitern, während der Einsiedlerkrebs das Schneckenhaus dauerhaft bewohnen kann, da die Wohnröhre durch den Schwamm stetig vergrößert wird. Zudem kann auf der Oberfläche der Schwämme manchmal die Gastropodenart *Bittium spec.* bei der Nahrungsaufnahme beobachtet werden (Müller et al., 2012).

1.3 Herkunft und Hälterung der Tiere

Die für die Untersuchungen notwendigen Tiere wurden vom Zentrum für marine Forschung (CMR) des Ruđer Bošković Instituts Zagreb zur Verfügung gestellt. Sie stammen aus Rovinj an der Westküste der kroatischen Halbinsel Istrien und wurden dort von Tauchern aus etwa 10 bis 30 m Tiefe geborgen. Die Hälterung der Tiere erfolgte in den Salzwasser-Aquarien des Instituts für Physiologische Chemie in Mainz. Die Temperatur der 200 Liter Becken betrug ca. 16-18 °C und die Salinität wurde möglichst konstant bei Werten zwischen 35 und 38 Promille gehalten (ca. 35-38 g Tropic Marin Meersalz pro Liter Osmosewasser; Dr. Biener GmbH, Wartenberg).

Zur Ernährung der Schwämme wurde das Aquarienwasser mit einer Phytoplanktonlösung angereichert (Menge nach Herstellerempfehlung: NutriMarine, Firma Gro Tech, Affalterbach). Die mit den Schwämmen in Symbiose lebenden Einsiedlerkrebse wurden mit Artemia Salinenkrebse in Form von Frostfutter (Firma Amtra, Rodgau) gefüttert.

2. Chemikalien und Geräte

Sämtliche für diese Arbeit im Labor verwendeten Chemikalien, wurden von den im Folgenden angegebenen Firmen in Analysequalität bezogen: Applichem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Fermentas (Thermo Fisher Scientific, Schwerte), Thermo Scientific (Schwerte), Invitrogen (Life Technologies, Darmstadt), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt), Novagen (Merck Millipore, Darmstadt), Peqlab (Erlangen), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Hamburg). Die verwendeten Reaktionsgefäße der Größen 1,5 ml bzw. 2 ml stammen von der Firma Brand (Wertheim) und die 0,2 ml bzw. 0,5 ml Gefäße von der Firma Thermo Scientific (Schwerte). Zentrifugenröhrchen mit 50 ml und 15 ml Volumen, Petrischalen und Pipettenspitzen wurden von der Firma Greiner Bio One (Frickenhausen) bezogen. Die Verwendung spezieller Reagenziensets (Kits) wird an entsprechender Stelle im Text genannt. Sie wurden u.a. von den Firmen Invitrogen (Life Technologies, Darmstadt), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim) und Macherey-Nagel (Düren) bezogen. Nähere Angaben zu verwendeten Materialien finden sich an entsprechenden Stellen im Text.

VE-H₂O: Nichtsterile Lösungen und Puffer wurden mit vollentsalztem Wasser hergestellt.

Milli-Q-H₂O: Für die Herstellung steriler Lösungen und Puffer wurde hochreines Milli-Q-Wasser verwendet. Dieses wurde entweder direkt vor Gebrauch der Millipore-Filteranlage entnommen oder das VE-H₂O wurde mit Hilfe spezieller Filter (z.B. SteritopTM Filtereinheiten, Merck Millipore) steril filtriert.

DEPC-H₂O: Die Verwendung von DEPC-Wasser ist im Text an entsprechender Stelle beschrieben. Es wurde in 20 ml Glasflaschen von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

Standardmäßig wurden, falls im Text nicht anders angegeben, folgende Geräte verwendet:

Zentrifugen: Kühlbare Tischzentrifugen: Biofuge fresco und Fresco 17, Firma Heraeus (Hanau); 5415 R Firma Eppendorf (Hamburg)

Stand Kühlzentrifuge: Sorvall RC-5B, Firma Du Pont Instruments (Wilmington, USA)

Minizentrifuge: Spectrafuge, Firma neoLab (Heidelberg)

Photometer: UV/Vis-Spektralphotometer: NanoDrop™ 2000c, Firma Thermo Scientific (Schwerte)
Multifunktions-Spektralreader: Varioskan® Flash, Firma Thermo Scientific (Schwerte)

Autoklav: DX-23 und VX-75, Firma Systec (Wettenberg)

pH-Meter: SevenCompact™, Firma Mettler Toledo (Gießen)

Thermocycler: PeqSTAR 2 x Gradient, Firma Peqlab (Erlangen)

Wasserbad: Exatherm electronic U3, Firma Julabo (Seelbach)

Heizgeräte: Heizblock HB-2, Firma Wealtec (Cambridge, UK)
Magnetrührer mit Heizung: Ret Ikamag, Firma Ika (Staufen)

Inkubationsgeräte: Brutschrank: Firma Memmert (Schwabach)
Schüttelinkubator: WiseCube; Wisd Laborgeräte, Firma Witeg (Wertheim)
Schüttler: Rocker 25, Firma Labnet (Dülmen) in Verbindung mit
Thermostatschrank: Aqualytic (Dortmund)
Kühlbarer Thermomixer: HLC MKR23 Firma Ditabis (Pforzheim)

Paraffinstrecktisch: Firma Guwina-Hofmann (Berlin)

UV-Geräte: UV-Transilluminator mit Geldokumentationssystem: Firma Peqlab (Erlangen); S/W Video-Thermodrucker P 93 (Mitsubishi)

Elektrophoresegeräte: Horizontale Minigel-Elektrophorese: PerfectBlue Gelsystem Mini S und Mini M, Firma Peqlab (Erlangen)
Novex Mini-Cell: Firma Life Technologies (Darmstadt)
Netzgerät Power Pac 300: Firma Bio-Rad (München)

Mikroskope: Inverses Mikroskop: Wilovert S, Firma Hund (Wetzlar)
Fluoreszenzmikroskop: Vanox AHB T3, Firma Olympus (Hamburg)
Digitales, inverses Durchlichtmikroskop: Evos[®] XL Firma Peqlab (Erlangen)
Digitales Mikroskop: VHX-1000 Firma Keyence (Neu-Isenburg)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop: LSM 710 Firma Zeiss (Göttingen)

Sonstige Geräte: Schneidegerät: Mikrotom RM2145 Firma Leica (Wetzlar)
Ultraschallgerät: Sonifier Cell Disruptor B-12 Firma Branson
Ultraschall (Dietzenbach)
Sterile Arbeitsbank: Laminarflow Firma Köttermann (Uetze)
Präzisionswaage: Sartorius (Göttingen)
Vortexgerät: Reax 2000 Firma Heidolph (Schwabach)
Mikroliterpipetten: 0,5 - 2 / 10 / 20 / 100 / 200 / 1000 µl
Luftpolsterpipetten: Firma Gilson (Limburg)
Homogenisator: Precellys[®] 24 Peqlab (Erlangen)

3. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Für sämtliche molekularbiologischen und mikrobiologischen Arbeiten wurden entsprechende Laborgeräte, Lösungen und Verbrauchsmaterialien vor der Verwendung bei einer Temperatur von mindestens 121 °C und 1 bar Überdruck für 30 Minuten autoklaviert. Bei einer davon abweichenden Vorgehensweise, wird im Text an entsprechender Stelle darauf hingewiesen. Für die Herstellung der Puffer und Lösungen wurde je nach Bedarf entweder VE-H₂O, Milli-Q-H₂O oder DEPC-H₂O verwendet (siehe Abschnitt 3). Zum Eigenschutz und um Kontaminationen der Proben zu vermeiden wurden bei allen Arbeiten Einmalhandschuhe aus Latex getragen. Im Umgang mit Chemikalien wie z.B. Polyacrylamid oder Ethidiumbromid, wurden Einmalhandschuhe aus Nitril verwendet. Bei Arbeiten mit DNA und besonders RNA, wurde darauf geachtet, möglichst RNase- und DNase-freie Arbeitsbedingungen zu schaffen. Dazu wurde z.B. eine PCR Workstation (Peqlab, Erlangen), gestopfte Pipettenspitzen, RNase freie Glas- u. Plastikwaren und DEPC-H₂O verwendet. Empfindliche Protein-, Enzym- und Nukleinsäure-Lösungen wurden während des Gebrauchs stets auf Eis transportiert bzw. kurzfristig darin gelagert.

4. Mikrobiologische Methoden

4.1 Bakterienstämme

- *E. coli* One Shot® TOP10 Chemically Competent (Invitrogen; Life Technologies, Darmstadt)
- *E. coli* NovaBlue Singles™ Competent Cells (Novagen; Merck Millipore, Darmstadt)
- *E. coli* One Shot® BL21(DE3) pLysS Chemically Competent (Invitrogen; Life Technologies, Darmstadt)
- *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) pLysS Competent Cells (Novagen; Merck Millipore, Darmstadt)

4.2 Plasmidvektoren

- pCR® 2.1-TOPO® Vector (Invitrogen; Life Technologies, Darmstadt)
- pCR® II-TOPO® Vector (Invitrogen; Life Technologies, Darmstadt)
- pTrcHis2A (Invitrogen; Life Technologies, Darmstadt)
- pET 51b(+) (Novagen; Merck Millipore, Darmstadt)

4.3 Nährmedien und Agarplatten

SOC-Medium: SOC-Medium (Invitrogen; Life Technologies, Darmstadt) wurde zur Optimierung der Proliferation chemisch-kompetenter *E. coli* Bakterien nach der Transformation eingesetzt (Kapitel B 5.7.5). Es besteht in der Basis aus SOB-Medium, dem 20 mM Glukose zugesetzt wurde.

LB-Medium: LB-Medium (engl. lysogeny broth) wurde nach der Rezeptur LB-Miller (10 g/l NaCl) als Standard-Nährmedium zur Kultivierung von *E. coli* Bakterien eingesetzt.

Autoinduktionsmedium: Für die Synthese größerer Proteinmengen wurden die Expressionskulturen mit dem Overnight Express™ Instant LB oder TB Medium der Firma Novagen (Merck Millipore, Darmstadt) angesetzt. Diese Medien enthalten Komponenten, welche von den Bakterien unterschiedlich/zeitlich versetzt verstoffwechselt werden, so dass zunächst eine hohe Zelldichte erreicht wird, bevor anschließend die Proteinexpression automatisch induziert wird. Sie Vorbereitung der Medien erfolgte exakt nach Angaben des Herstellers.

LB-Agar: LB-Agar besteht in der Basis aus den Inhaltsstoffen von LB-Medium, dem 15 g/l Agar zugesetzt wurde.

LB-Medium (Luria/Miller) und LB-Agar (Luria/Miller) wurden von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen und nach den Angaben des Herstellers angesetzt. Anschließend wurden die Medien bei einer Temperatur von 121 °C für 30 Minuten autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösungen auf etwa 55 °C konnte je nach Bedarf die jeweils erforderliche Menge eines Antibiotikums zugegeben werden.

Durch den Einsatz von Antibiotika in Nährmedien und Nährböden kann ein selektives Wachstum von resistenten Bakterien erreicht werden. Zuvor werden die auf Plasmidvektoren lokalisierten Antibiotika-Resistenzgene, via Transformation in die Bakterien eingeschleust.

Ampicillin:	Stammlösung: 50 mg/ml in H ₂ O Lagerung: Aliquot bei -20 °C Arbeitskonzentration: LB-Medium und -Agar 50-100 µg/ml
Carbenicillin:	Stammlösung: 50 mg/ml in 50 % Ethanol und 50 % H ₂ O Lagerung: Aliquot bei -20 °C Arbeitskonzentration: LB-Medium und -Agar 20-60 µg/ml
Chloramphenicol:	Stammlösung: 34 mg/ml in Ethanol Lagerung: Aliquot bei -20 °C; dunkel lagern Arbeitskonzentration: LB-Medium und -Agar 170 µg/ml (Plasmid-Amplifikation); 10-30 µg/ml (Selektion resistenter Bakterien)
Kanamycin:	Stammlösung: 10 mg/ml in H ₂ O Lagerung: Aliquot bei -20 °C Arbeitskonzentration: LB-Medium und -Agar 100 µg/ml

Zur Identifizierung der rekombinanten, Plasmid tragenden Bakterienkolonien, kann eine sogenannte Blau-Weiß-Selektion durchgeführt werden (Kapitel B 5.7.6).

Dazu wurde der noch flüssige Nährboden (LB-Agar) mit dem entsprechenden Antibiotikum, 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid) und 80 µg/ml X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Galactopyranosid) versetzt, um ihn anschließend ca. 1 cm hoch in sterile Petrischalen zu gießen. Bestimmte Genotypen der hier verwendeten *E. coli* Stämme, wie z.B. Top10 benötigen kein IPTG mehr für die Blau-Weiß-Selektion. Nach dem Polymerisieren und Auskühlen der Lösung wurden die Petrischalen verschlossen, mit Parafilm® abgedichtet und mit dem Kulturboden nach oben zeigend, bei 4°C im Kühlraum gelagert.

4.4 Bakterienkulturen

4.4.1 Plattenkulturen

Zur Kultivierung von Bakterien einer Transformationsreaktion oder einer Glycerinkultur, wurde die Bakteriensuspension unter sterilen Bedingungen auf einem Nährboden (LB-Agar) ausgestrichen. Für die anschließende Selektion resistenter Bakterien, wurde der LB-Agar zuvor

mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Nährböden werden dann über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Sie können gut verschlossen (z.B. mit Parafilm®) einige Monate bei 4 °C gelagert werden.

4.4.2 Flüssigkulturen

Flüssigkulturen können je nach Bedarf in beliebigen Volumina angesetzt werden. Dazu ist es wichtig, immer ein entsprechend großes Inkubationsgefäß zu verwenden, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Bakterien zu gewährleisten. Hierzu wurde das gewünschte Volumen an Nährmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt (Kapitel B 4.3) und anschließend mit einer Bakterienkolonie oder einer frischen Über-Nacht-Kultur beimpft.

Für eine Standardkultur wurden 3 bis 5 ml LB-Medium in ein steriles 15 oder 50 ml Zentrifugationsgefäß mit Membranverschluss gefüllt (Cellstar® Cellreactor™ Tubes, Greiner bio-one, Frickenhausen), anschließend eine selektierte Bakterienkolonie mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig von der Agarplatte aufgenommen und samt Pipettenspitze in das vorbereitete Zentrifugationsgefäß überführt. Die so beimpfte Kultur wurde dann über Nacht bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt.

4.4.3 Glycerinkulturen

Für die dauerhafte Lagerung von Bakterien in sogenannten Gefrier- oder Glycerinkulturen wurden die Roti®-Store Cryoröhrchen der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet. Die Gefäße enthalten einige Glaskügelchen mit einer speziellen Oberfläche für die Bindung der Bakterien und Cryomedium, welches die Bakterien während des Gefriervorgangs schützt. Die Verwendung der Cryoröhrchen erfolgte nach Angaben des Herstellers, und ist in der Abb. 8 schematisch dargestellt. Aus einer frischen Über-Nachtkultur wurden 0,5 ml Bakteriensuspension in das Röhrchen pipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde der Überstand vollständig entnommen und die Cryoröhrchen bei -80 °C gelagert. Zur Rekultivierung entnimmt man ein Glaskügelchen und beimpft damit eine gewünschte Menge Nährmedium.

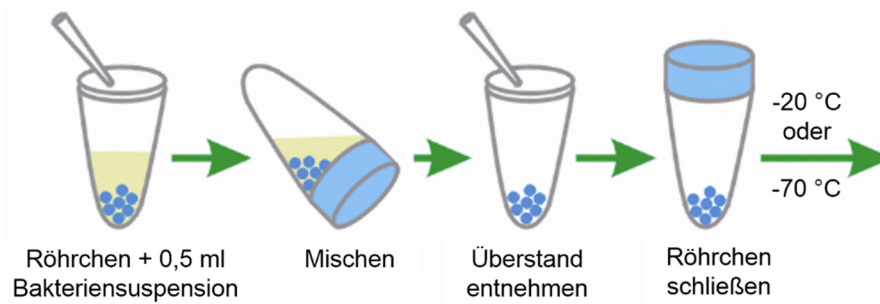


Abb. 8: Schema zur Anwendung von Roti®-Store Cryoröhrchen Firma Roth (Karlsruhe)
 Quelle: Verändert nach Roth (www.carlroth.de/media/_de-de/usage/P730.pdf)

5. Molekularbiologische Methoden

5.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

5.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Aufgrund der Eigenschaft von Nukleinsäuren Licht bestimmter Wellenlängen zu absorbieren, ist es möglich ihre Konzentration in Lösungen zu bestimmen. Die Absorption beruht auf den aromatischen Ringen der Nukleobasen und ihr Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Sie kann in photometrisch mit Quarzküvetten bestimmt werden. Bei Wellenlängen im UV-Bereich über 200 nm verwendet man Quarzglas, da es in diesem Bereich selbst kein Licht absorbiert, also eine hohe Transmission aufweist.

Man bestimmt die sogenannte Extinktion oder optische Dichte (OD) einer Lösung und beschreibt die Abschwächung des Lichtstrahls nach Durchtritt eines Mediums. Sie ist abhängig von der Wellenlänge, der Schichtdicke des Mediums (bei den meisten Küvetten liegt sie bei 1 cm) und hier von der Konformation der Nukleinsäure. Nichtbasengepaarte Nukleinsäuren besitzen eine höhere Absorption als Doppelstrang-DNA. Dieser Effekt wird als Hyperchromie bezeichnet. Eine Lösung mit einem Absorptionswert von 1 enthält z.B. 50 µg/ml doppelsträngige DNA:

1 OD₂₆₀ entspricht	50 µg/ml dsDNA
	40 µg/ml ssDNA
	33 µg/ml ssRNA

Um den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung zu ermitteln, bestimmt man daher oft gleichzeitig den Anteil an Proteinkontaminationen. Ihr Absorptionsmaximum liegt bei 280 nm und beruht hauptsächlich auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin. Die

Reinheit der Nukleinsäurelösung ergibt sich aus dem Quotient der beiden Werte, der Absorption bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}). Bei einem Wert von 1,8 handelt es sich um eine reine DNA-Lösung bzw. bei einem Wert von 2,0 um eine reine RNA-Lösung. Sind diese Werte signifikant kleiner, ist dies ein Hinweis auf Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol, die aufgrund der Isolierungsmethoden von Nukleinsäuren auftreten können.

5.2 Primer-Design

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Primer (Oligonukleotide) wurden in lyophilisiertem Zustand von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) bezogen. Für die Anfertigung der Stammlösung (Endkonzentration: 100 pmol) wurden die lyophilisierten Primer nach Herstellervorgaben in dem entsprechenden Volumen DEPC-H₂O gelöst. Für die anschließende Verwendung in PCR-Reaktionen wurde, wenn im Text nicht anders angegeben, von jedem Primer eine 1:10 Verdünnung (Endkonzentration: 10 pmol) aus der Stammlösung hergestellt.

Für die gezielte Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte mit Hilfe der PCR (Kapitel B 5.3) benötigt man bekannte Teilsequenzen, sogenannte Primer als Startpunkt. Diese kurzen Oligonukleotide stellen den DNA-Polymerasen eine Hydroxygruppe (3'OH-Ende) zur Verfügung und flankieren den spezifischen DNA-Abschnitt, welcher amplifiziert werden soll. Die Sequenz der Primer wird durch die Nukleotidabfolge an den Enden dieses DNA-Abschnitts vorgegeben.

Bei dem Entwurf der Primer sollten ggf. folgende Punkte beachtet werden:

- PCR-Primer sollten zwischen 18 – 30 Nukleotide lang sein
- Vermeidung der Ausbildung von Sekundärstrukturen bzw. Primer-Dimeren: Primer sollten nicht durch inter- oder intramolekulare komplementäre Bereiche, mit sich selbst, noch mit dem korrespondierenden Primer hybridisieren können.
- Der Guanodin-Cytosin-Gehalt eines Primers sollte in etwa bei 50 % liegen, da er einen wesentlichen Einfluss auf die Schmelztemperatur hat. Sie nimmt mit steigendem GC-Gehalt zu.
- In den letzten fünf Nukleotiden eines Primers sollten idealerweise Guanodin oder Cytosin vorkommen, was zu einer höheren Bindungsspezifität des Primers beitragen kann.

- Die Schmelztemperatur der Primer (T_m) liegt standardmäßig zwischen 55 °C und 65 °C. Sie sollte bei zwei verwendeten Primern möglichst nicht oder nur gering voneinander abweichen.

Bei dem Entwerfen der Primer, welche für die Sequenzierung nach der sogenannte Primer-Walking-Strategie zum Einsatz kamen, wurden auf einen ausreichend großen Überlappungsbereich geachtet, um die neu synthetisierten Sequenzabschnitte anschließend sicher zuordnen zu können. Darüber hinaus sind bei Sequenzierungsreaktionen, die ersten 20 bis 40 Nukleotide meist nicht einwandfrei sequenziert.

5.2.1 Sequenzspezifische und vektorspezifische Primer

Die in dieser Arbeit eingesetzten sequenzspezifischen Primer wurden mit dem Online Programm Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) entworfen und anschließend mit dem Onlinedienst Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) auf die oben im Text genannten Eigenschaften geprüft. Die bereits vorhandenen EST-Sequenzdaten dienten an dieser Stelle für die Suche nach geeigneten Primersequenzen.

5.2.2 Fluoreszenzmarkierte Primer

Für die in dieser Arbeit angewendete Methode des Cycle Sequencing benötigt man Primer, welche durch eine angehängte fluoreszierende Gruppe, eine detektierbare Eigenschaft besitzen. Daher wurden für die beiden möglichen Kanäle 700 nm und 800 nm des DNA-Sequenzierers NEN® Model 4300 DNA Analyzer (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg vor der Höhe), jeweils die Infrarotfarbstoffe IRDye 700 und IRDye 800 gewählt. Die markierten Primer wurden in lyophilisierter Form über die Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) bezogen.

5.2.3 Primer zur Herstellung der Expressionskonstrukte

Für die Amplifizierung von DNA-Konstrukten zur rekombinanten Expression mit den Vektoren pTrcHis2A und pET-51b(+) mussten zuvor spezielle Primer konstruiert werden. Diese enthielten sowohl die insert- bzw. sequenzspezifische Information, als auch die entsprechenden Schnittstellen der Restriktionsenzyme. Da die Restriktionsschnittstellen hier sehr nahe am Ende des DNA-Fragmentes lagen, wurden jeweils den Anforderungen des Restriktionsenzym entsprechend eine gewisse Anzahl beliebiger Nukleotide vor und nach der Schnittstelle positioniert. Durch diese Flankierung der Schnittstellen kann die Restriktion um ein vielfaches gesteigert werden.

5.2.3.1 Primer Konstrukt 1: Expression mit dem pTrcHis2A Vektor

Forward Primer

Der Forward-Primer beginnt zunächst mit fünf beliebig gewählten Nukleotiden, die zur Stabilisierung bzw. zur besseren Erkennung der Schnittstelle durch das Restriktionsenzym dienen. Diesem Teil folgt dann die 6 bp lange, palindromische Schnittstelle des Enzyms Nco I. Danach wurden zur Erhaltung des Leserahmens zwei weitere Nukleotide eingefügt, denen dann eine 9 bp lange Sequenz folgte, welche identisch mit dem 5'-Ende des Zielproteins Sd_nrp ist. Es sollte darauf geachtet werden, dass die beliebig eingefügten Nukleotide nicht für ein Stopcodon codieren, da sonst der Leserahmen unterbrochen wird.



Abb. 9: Forward Primer Konstrukt 1 pTrcHis2A Vektor

Reverse Primer

Der Reverse-Primer ist hier in reverse komplementärer Orientierung dargestellt, und wurde in dieser Form auch vom Hersteller bezogen. Er beginnt ebenfalls mit fünf beliebigen Nukleotiden, welche für ein verbessertes Restriktionsergebnis sorgen. Diesem Teil folgt dann die 6 bp lange Schnittstelle des Enzyms Hind III und eine 9 bp lange Sequenz, welche identisch mit dem 3'-Ende des Zielproteins Sd_nrp ist.



Abb. 10: Reverse Primer Konstrukt 1 pTrcHis2A Vektor

5.2.3.2 Primer Konstrukt 2: Expression mit dem pET-51b(+) Vektor

Bei der Konzeption dieser Primer, wurde auf die gleiche Weise vorgegangen, wie schon bei den Primern für das Konstrukt 1.

Forward Primer

Zur Flankierung der BamHI Schnittstelle beginnt der Forward-Primer mit drei beliebig gewählten Nukleotiden. Nach der Schnittstelle folgen vier weitere beliebig gewählte Nukleotide, wovon drei zur Flankierung dienen und eines zur Erhaltung des Leserahmens. Diesem Teil folgt dann die spezifische, 9 bp lange Sequenz, identisch mit dem 5'-Ende des Zielproteins Sd_nrp.



Abb. 11: Forward Primer Konstrukt 2 pET-51b(+)

Reverse Primer

Der Reverse-Primer ist ebenfalls in reverse komplementärer Orientierung dargestellt. Er beginnt zur Flankierung der Schnittstelle von Not I mit acht beliebigen Nukleotiden. Diesem Teil folgt dann die 6 bp lange Schnittstelle des Enzyms. Zur Erhaltung des Leserahmens wurden dann vier weitere Nukleotide eingefügt, denen dann eine 9 bp lange Sequenz folgte, welche identisch mit dem 3'-Ende des Zielproteins Sd_nrp ist.



Abb. 12: Reverse Primer Konstrukt 2 pET-51b(+)

5.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction, PCR*) ist eine der herausragendsten molekularbiologischen Methoden, welche 1983 von Kary B. Mullis entwickelt wurde (Lottspeich & Engels, 2008). Sie ermöglichte neben der zu dieser Zeit bereits bekannten Technik der DNA-Synthese, erstmals eine gezielte in vitro Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte. Durch diese extrem sensitive Reaktion war es möglich, DNA in kurzer Zeit exponentiell zu amplifizieren, ausgehend von theoretisch nur einem einzelnen Nukleinsäure-Abschnitt als Matrize. Ermöglicht wird diese Reaktion durch bestimmte, hitzestabile Enzyme, die DNA-Polymerasen. Sie sind in der Lage einen einzelsträngigen DNA-Matrizenstrang zu einem DNA-Doppelstrang zu komplettieren. Dazu benötigen sie eine Hydroxygruppe, welche in Form eines freien 3'-OH-Endes von einem kurzen Oligonukleotid (*Primer*) zur Verfügung gestellt wird (Kapitel B 5.2). Diese etwa 20 Nukleotide langen Primer binden an die einzelsträngige DNA-Matrize (engl. *template*), welche den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt repräsentiert. Durch das Hinzufügen von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängern die DNA-Polymerasen den Primer zu einem durchgehenden DNA-Strang. Die PCR-Reaktion folgt einem vorgegebenen Temperatur- und Zeitverlauf, der im Wesentlichen aus drei sich zyklisch wiederholenden Schritten besteht:

Schritt 1: Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch Hitze bei etwa 92 – 98 °C für ca. 20 – 45 Sekunden.

Schritt 2: Annealing oder Anlagerung der Primer an die DNA-Matrize bei 45 – 60 °C für ca. 30 Sekunden.

Schritt 3: Die DNA-Polymerase synthetisiert den neuen DNA-Strang ausgehend von den an der Matrize angelagerten Primern bei 72 °C. Dieser Schritt wird als Extension bezeichnet. Für ein DNA-Fragment mit der Länge von 1000 bp, benötigt die DNA-Polymerase ca. 1 Minute.

Thermocycler-Programm: Standard-PCR

Initiale Denaturierung 92 – 98 °C für 3 – 10 min

1. Denaturierung	93 – 94 °C für 20 – 45 s
2. Annealing	46 – 60 °C für 30 s
3. Extension	72 °C 1 min/1 kb DNA

Finale Extension 72 °C 5 – 10 min

Kühlung 4 °C ∞

Schritte 1 – 3
30 - 35 Zyklen

Vor dem Schritt 1 findet einmalig eine sogenannte Initiale Denaturierung statt, welche die meist doppelsträngig vorliegende DNA zunächst für ca. 3 min bei 92 – 98 °C vollständig denaturieren soll. Nachdem die gewünschte Anzahl Zyklen durchlaufen wurde (30-35 Zyklen), findet ein finaler Extensionsschritt bei 72 °C für ca. 10 Minuten statt. Dieser dient zur Fertigstellung bzw. Auffüllung aller noch unvollständigen DNA-Stränge.

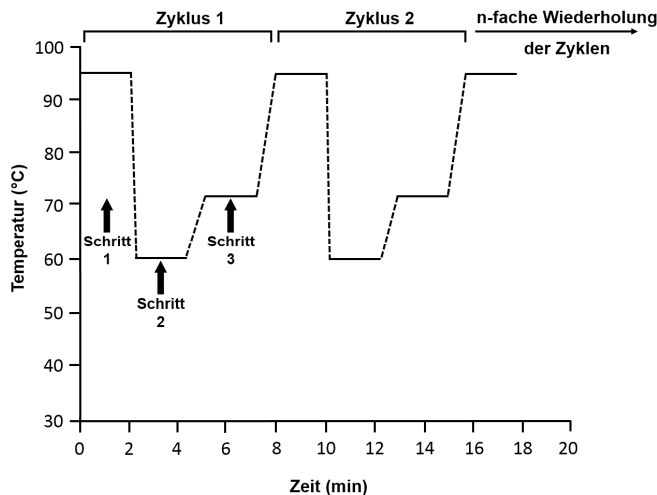


Abb. 13: Zyklischer Temperaturverlauf der PCR

(Verändert nach A. Graham; C.R. Newton; PCR; Spektrum Akademischer Verlag; 1994)

Verwendete Enzyme zur Durchführung der PCR-Reaktionen:

- *Taq* DNA Polymerase, rekombinant (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt)
- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes; Thermo Scientific, Schwerte)
- Dream*Taq* Green PCR Master Mix (2 x) (Fermentas; Thermo Scientific, Schwerte)
- PCR Master Mix (2 x) (Fermentas; Thermo Scientific; Schwerte)

5.3.1 Optimierung der PCR-Reaktionen

Alle für die PCR-Reaktion erforderlichen Komponenten können entweder einzeln hinzugefügt werden, so dass eine Variation in der Konzentration der einzelnen Reagenzien möglich ist, oder man verwendet einen sogenannten Mastermix, der alle Komponenten in Standard Konzentration enthält. Diese haben den Vorteil von Zeitersparnis und einem geringeren Kontaminationsrisiko, da weniger Pipettierschritte notwendig sind. Für Routine Anwendungen wie z.B. Klon-PCR, wurden daher diese gebrauchsfertigen Produkte verwendet. Um sehr diffizile DNA-Abschnitte amplifizieren zu können, wurden zur Optimierung der PCR-Ergebnisse folgende Reaktionskomponenten und Parameter variiert:

Temperaturprofil der PCR:

Der in Kapitel B 5.3 beschriebene Temperaturverlauf einer PCR erlaubt einen sehr großen Spielraum bei der Temperaturgestaltung. So kann z.B. die Variation der Länge, der einzelnen Schritte wie z.B. des sich wiederholenden Extensionsschrittes, der finalen Extension und auch der initialen Denaturierung, zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen der PCR führen.

Annealing-Temperatur:

Zu Beginn wurde eine Annealing-Temperatur gewählt, die ca. 5°C unter der Schmelztemperatur des Primerpaares lag. Dann erfolgten Temperaturanpassungen in 2°C-Schritten. Die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer, wurden den Angaben des Herstellers (Firma Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) entnommen.

Konzentration der Magnesiumionen:

Die Konzentration von $MgCl_2$ -Ionen im Reaktionsansatz beeinflusst den Einbau der dNTPs, und hat somit direkten Einfluss auf die sogenannte Prozessivität der DNA-Polymerase. Diese beschreibt die Anzahl an Katalyseschritten des Enzyms, bevor sie von der Matrize abdiffundiert. Auf diese Weise kann sowohl die Ausbeute eines Fragmentes, als auch die Spezifität für ein Fragment in der Reaktion gesteigert werden. Bei der vorliegenden Arbeit wurde bei einer standard Konzentration von 1,5 mM Magnesiumchloridlösung begonnen und bei Bedarf auf maximal 5 mM erhöht.

Primer:

Falls möglich wurden mehrere Primerpaare verwendet, da bereits Unterschiede von nur wenigen Nukleotiden, sich sehr stark auf das Ergebnis der PCR auswirken können. Kriterien zur Auswahl der Primer werden im Kapitel B 5.2 näher erläutert.

Template-Konzentration:

Für die Ermittlung der optimalen Konzentration an Template DNA für die PCR wurden folgende Punkte berücksichtigt:

1. Um welche DNA / RNA handelt es sich (Plasmid-DNA, Gesamt-RNA, cDNA etc.).
2. Welche Qualität und Konzentration hat die DNA / RNA (photometrische Analyse, Kapitel B 8.3).

Bei dem Einsatz von cDNA (cDNA-Bank einkloniert in einen Plasmidvektor) wurde mit einer Konzentration von ca. 30 ng gearbeitet. Plasmid-DNA wurde in Konzentrationen von 100 bis 300 ng eingesetzt.

PCR-Methoden:

Für einen Standard PCR-Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50 µl, wurden die Komponenten nach folgendem Pipettierschema in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß zusammengefügt:

Standard PCR-Reaktionsansatz (50µl)

PCR-Reagens	Volumen	Endkonzentration
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/ µl)	0,5 µl	0,05 Units
10 x PCR-Puffer (200 mM Tris/HCl pH 8,4; 500 mM KCl)	5 µl	1 x
10 mM dNTP Mix	1 µl	0,2 mM
50 mM MgCl ₂	1,5 - 5 µl	1,5 - 5 mM
forward Primer (10 µM)	1 - 2,5 µl	0,2 – 0,5 µM
reverse Primer (10 µM)	1 - 2,5 µl	0,2 – 0,5 µM
Template DNA	x µl	k. A.*
mit x µl H ₂ O auf 50µl Reaktionsvolumen auffüllen		

(* Aufgrund der enormen Vielfalt an Matrizen DNA, kann für die Konzentration des Templates kein Standardwert angegeben werden. Dieser muss von jedem Anwender selbst experimentell ermittelt werden. Die bei dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen sind im Abschnitt „Template-Konzentration“ dieses Kapitels aufgeführt.)

Alle Komponenten und Enzyme wurden während des Pipettierens ständig auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert und dann direkt im Thermocycler inkubiert.

5.3.2 Touchdown-PCR

Mit Hilfe der Touchdown-PCR kann die Spezifität für ein bestimmtes DNA-Fragment entscheidend verbessert werden um so die Ausbeute des gewünschten PCR-Produktes zu erhöhen (Korbie & Mattick, 2008). Diese Methode erlaubt ein schrittweises Herantasten an die optimale Annealing-Temperatur, um eine möglichst spezifische Bindung der Primer an das gewünschte Ziel-Fragment zu erreichen. Man beginnt meist mit einer anfänglichen Annealing-Temperatur, die ca. 5-10 °C über der Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegt, was im Idealfall zu der hohen Spezifität der Primer-Bindung führt. Nun wird nach jedem Zyklus die Temperatur

schrittweise abgesenkt, was zu einer weniger spezifischen Bindung der Primer führt. Da man aber davon ausgeht, dass bereits ausreichend viele spezifische Matrizen-Moleküle amplifiziert wurden, findet nun vermehrt die Amplifikation dieser gewünschten DNA-Fragmente statt. Die Synthese unspezifischer PCR-Produkte kann auf diese Weise verhindert bzw. deutlich vermindert werden (Roux, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Touchdown-PCR-Methode in vereinfachter Form, z.B. nach folgendem Temperaturprofil angewendet:

Thermocycler-Programm: Touchdown-PCR

Initiale Denaturierung 95 °C für 3 min

Denaturierung I 95 °C für 30 s

Annealing II 58 °C (- 0.1 °C pro Zyklus) für 30 s Schritt I-III: 30 - 35 Zyklen

Extension III 72 °C 1 min/1 kb DNA

Finale Extension 72 °C 5 min

Kühlung 4 °C ∞

5.3.3 Klon-PCR

Nach der Transformation von Bakterien, wurde zur Identifizierung positiver Klone, eine Klon-PCR durchgeführt. Dazu wurde der Dream*Taq* Green PCR Master Mix (2 x) der Firma Fermentas (Thermo Scientific, Schwerte) nach dem unten aufgeführten Pipettierschema verwendet. Zur Beimpfung des PCR-Reaktionsansatzes mit dem Bakterienklon, wurde die entsprechende Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen und mehrmals in den Reaktionsansatz getaucht. Dieser enthielt zu diesem Zeitpunkt nur das DEPC H₂O, die restlichen Komponenten wurden erst nach der Beimpfung hinzugefügt.

Reaktionsansatz der Klon-PCR

6,25 µl Dream *Taq* Green PCR Master Mix (2 x)

0,5 µl M13 forward Primer (10 pmol)

0,5 µl M13 reverse Primer (10 pmol)

4,25 µl DEPC H₂O

Gesamtvolumen 12,5 µl

Die Klon-PCR wurde mit dem Thermocycler-Programm der Touchdown-PCR durchgeführt (Kapitel B 5.3.2).

5.4 PCR-Aufreinigung

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden im Anschluss an die PCR von den restlichen, unverbrauchten Komponenten des PCR-Reaktionsansatzes, wie z.B. Primern gereinigt, da sie bei nachfolgenden Reaktionen stören können. Dazu wurde das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) und das *High Pure PCR Product Purification Kit* der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Das Funktionsprinzip dieser Reagenziensets ist in Kapitel B 5.6 ausführlicher beschrieben.

5.5 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist eine Analysemethode zum Nachweis und der Größentrennung von Nukleinsäuren und Proteinen. Das Wirkprinzip beruht auf der Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Innerhalb eines festen Trägermaterials beeinflussen die charakteristischen Eigenschaften verschiedener Moleküle wie z.B. Konformation und Molekulargewicht, ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Die verschiedenen Bestandteile einer Suspensionen bzw. eines Substanzgemisches, können so ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Daher erfolgt hier die Auftrennung innerhalb einer festen Gelmatrix wie z.B. Agarose oder Polyacrylamid.

5.5.1 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Nukleinsäuren besitzen aufgrund ihrer Struktur eine gleichbleibende negative Ladungsdichte, weshalb sie im Gegensatz zu Proteinen im elektrischen Feld pH-unabhängig in Richtung Anode wandern. Für die negative Ladung ist das charakteristische Zucker-Phosphat -Rückgrat der DNA verantwortlich. Als Gelmaterial wurde Agarose verwendet, ein aus marinen Rotalgenarten gewonnenes Polymer. Es besteht aus glykosidisch verbundener D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose. Erhitzt man die Substanz zusammen mit Wasser bzw. Puffer, dann bildet sie nach dem Aushärten eine gitterartige Matrix, deren Porengröße durch die Agarosekonzentration bestimmt wird. Konformation und Größe der DNA-Fragmente beeinflussen die Geschwindigkeit, mit der sie durch die Gelmatrix wandern, so dass kleinere Fragmente etwas schneller durch die Poren gelangen als größere. Hier wurde ein horizontales Elektrophoresesystem der Firma Peqlab (Erlangen) verwendet, mit einer konstanten Spannung von ca. 8 V pro cm Elektrodenabstand (ca. 80-100 V) und Agarosegele mit der Konzentration von 1% Agarose. Zur Detektion der DNA mit UV-Licht (Wellenlänge 254-366 nm), wurden die Agarosegele im Anschluss an die Elektrophorese mit dem organischen Fluoreszenzfarbstoff

Ethidiumbromid inkubiert. Seine planare Struktur ermöglicht ein Interkalieren in doppelsträngige und einzelsträngige DNA bzw. RNA. Die Intensität der Leuchtstärke ist proportional zur DNA- bzw. RNA-Konzentration und ermöglicht so auch eine Aussage über die vorliegende Menge an DNA zu treffen. Vorbereitend für die Gelelektrophorese wurde 1g Agarosepulver durch aufkochen in 100 ml 1 x TBE-Puffer gelöst und nach kurzem Abkühlen in die abgedichteten Gelschlitten (Firma Peqlab, Erlangen) gegossen. Nachdem Auskühlen wurden sie in die mit 1 x TBE-Puffer (Laufpuffer) gefüllte horizontale Elektrophorese-Kammer überführt. Die DNA-Proben wurden mit sogenanntem Ladepuffer (6 x Loading dye, Fermentas) versetzt und in die Geltaschen pipettiert.

Um anschließend die Größe der DNA-Banden zu ermitteln, wurde ein geeigneter DNA-Marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) auf das Gel aufgetragen. Je nach anschließender Verwendung der Gele, wurde eine konstante Spannung von 80-100 V angelegt.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele mit einem Geldokumentations-System fotografiert und evtl. DNA-Banden zu präparativen Zwecken ausgeschnitten.

Verwendete Reagenzien und Lösungen:

TBE-Puffer: TBE-Puffer (10 x konzentriert) enthält 1,0 M Tris-Borat und 20 mM EDTA in destilliertem, deionisierten Wasser (pH 8,3). Er wurde in 10 x konzentrierter Form von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen und dann mit VE-H₂O 1:10 verdünnt, z.B. für den Einsatz als Laufpuffer.

Ladepuffer: Der 6x konzentrierte Ladepuffer (6 x DNA Loading Dye; Fermentas) enthält 10 mM Tris-HCL; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol FF; 60 % Glycerol; 60 mM EDTA und wurde von der Firma Thermo Scientific (Schwerte) bezogen.

Ethidiumbromidlösung: Die Stammlösung zum Fluoreszenznachweis von Nukleinsäuren (1%ige Lösung in Wasser; 10 mg/ml) wurde von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt.

Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid) ist ein giftiges und stark mutagenes Reagenz. Daher sind beim Umgang mit dieser Substanz besondere Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten. Alle Arbeiten mit Ethidiumbromid wurden zum Schutz

ausschließlich an speziell gesicherten und gekennzeichneten Arbeitsplätzen und mit Einweghandschuhen aus Nitril durchgeführt.

Molekulargewicht-Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas; Thermo Scientific, Schwerte)

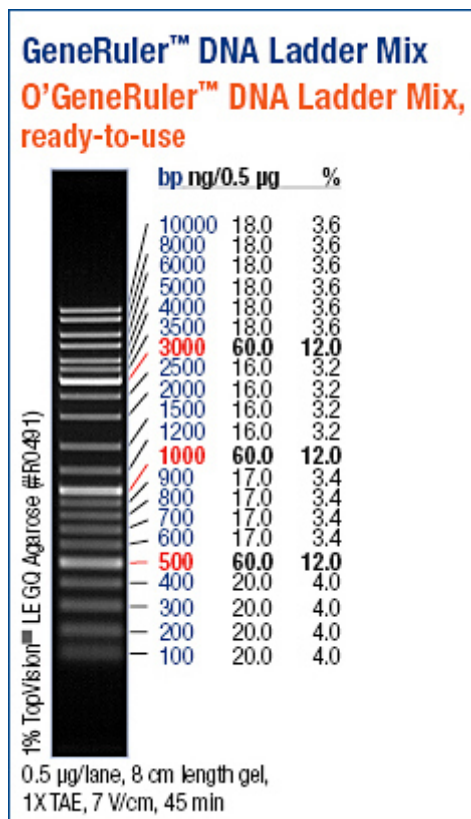


Abb. 14: Molekulargewichtsmarker

Quelle: www.thermoscientificbio.com/generuler-dna-ladder-mix/ready-to-use/

5.6 Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Im Anschluss an die Elektrophorese eines präparativen Agarosegels wurden die gewünschten DNA-Banden unter der Exposition von UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA sollte dabei so kurz wie möglich dem UV-Licht ausgesetzt werden, da es sonst zu irreversiblen Schäden der DNA kommen kann.

Zur Extraktion der DNA aus den Agarosegel-Stücken, wurde das *High Pure PCR Product Purification Kit* der Firma Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Isolierung der DNA werden hierbei Zentrifugenfilter mit integrierten Silikamembranen verwendet. In Anwesenheit von chaotropen Salzen, welche Wasserstoffbrückenbindungen aufbrechen, wird die Hydrathülle der Nukleinsäuren gestört, so dass die DNA reversibel an das Silikamaterial gebunden wird. Nun kann diese mit Hochsalzpuffern gewaschen werden, um unerwünschte Substanzen zu entfernen. Unter dem Einsatz von Niedrigsalzpuffern eluiert die DNA wieder von der Membran. Bei sehr geringen DNA-Konzentrationen wurde für diesen Elutionsschritt 50 µl DEPC-H₂O verwendet, welches zuvor auf 70 °C erhitzt wurde. Dadurch kann die Rückgewinnung der DNA von der Silikamembran verbessert werden.

5.7 Klonierung

5.7.1 Klonierung von PCR-Produkten

Um bestimmte DNA-Fragmente näher charakterisieren zu können, ist es notwendig diese zuvor zu isolieren, ggf. zu modifizieren, und anschließend in möglichst hoher Reinheit zu amplifizieren. Dazu wird das gewünschte DNA-Fragment in einen geeigneten Plasmid-Vektor integriert und nach der Überführung in einen Wirtsorganismus, von diesem vervielfältigt. Zum einen wird nun die rekombinante DNA von der Wirtszelle, z.B. von dem sehr einfach zu kultivierenden Bakterium *Escherichia coli* repliziert, und zum anderen vermehrt sich auch das Bakterium selbst. Ausgehend von dieser Zelle entstehen in kürzester Zeit Millionen Kopien, die zu einer Kolonie heranwachsen. Alle Zellen dieser Kolonie sind genetisch absolut identisch und werden daher als Klone bezeichnet, was auch den Begriff des Klonierens geprägt hat.

5.7.2 Die TOPO-Klonierung

In der vorliegenden Arbeit wurde das TOPO® TA Cloning® Dual Promoter Kit der Firma Invitrogen (Life Technologies, Darmstadt) verwendet, welches auf der TOPO-TA-Klonierungsmethode basiert. Die sogenannten TOPO-Vektoren werden vom Hersteller in linearisierter Form geliefert und sind mit einer Vaccinia DNA-Topoisomerase I gekoppelt, welche die Ligationsreaktion ohne Ligase ermöglicht. Für die Reaktion werden PCR-Produkte mit einem 3'-Desoxyadenin-Überhang benötigt, der hier durch die Verwendung einer *Taq*-Polymerase bei der PCR hergestellt wurde. Der linearisierte Vektor dagegen besitzt ein 3'-Desoxythymidin-Überhang, produziert von der Topoisomerase I, so dass Insert und Plasmidvektor innerhalb weniger Minuten Inkubationszeit ligiert (kovalent verknüpft) werden können. Die Topoisomerase I bindet spezifisch an die Sequenz 5'-CCCTT-3' der Ziel-DNA (Insert) und katalysiert die Spaltung der Phosphodiester-Bindung des DNA-Stranges. Es kommt zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem nun freien 3'-Phosphat-Ende des geöffneten Einzelstranges und dem im aktiven Zentrum liegenden Tyrosyl-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I. Auf diese Weise wird die aus der Phosphodiesterbindung stammende Energie gespeichert und ermöglicht die Übertragung der 3'-Phosphatgruppe auf das freie 5'-OH-Ende des Inserts. Das Insert wird so mit dem Vektor ligiert, und das Enzym spaltet sich ab. Zur Durchführung der Klonierung wurden die PCR-Produkte in einer Gelelektrophorese analysiert, die entsprechende DNA-Bande aus dem präparativen Gel ausgeschnitten, und die DNA extrahiert (Kapitel B 5.6). Anschließend wurde der Reaktionsansatz für die Ligation, entsprechend den Vorgaben des Herstellers vorbereitet (Kapitel B 5.7.4) und die chemisch-kompetenten Bakterien mit diesen Ligationsansätzen via Hitzeschock transformiert (Kapitel B 5.7.5).

5.7.3 Die gerichtete Klonierung der Expressionsvektoren

5.7.3.1 Spezifische Fragmentierung von DNA mit Typ-IIP-Restriktionsendonukleasen

Um ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Plasmidvektor zu integrieren, wurde u.a. eine Restriktion mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Bei dieser Methode wurden zunächst zwei DNA-Fragmente, hier die Insert-DNA, die zuvor via PCR amplifiziert wurde, und der Plasmidvektor, mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Um die dazu geeigneten Restriktionsenzyme auszuwählen, wurde das Internetprogramm NEBcutter verwendet. Für die

Reaktion wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ IIP verwendet, sie erkennen palindromische (symmetrische) Sequenzen und hydrolysieren die DNA innerhalb dieser Erkennungssequenz. Dabei können entweder glatte oder überhängende Enden entstehen. Sie haben keine Methyltransferase-Aktivität und benötigen in den meisten Fällen nur Magnesium als Cofaktor. Bei der anschließenden Ligation mittels der T4-DNA-Ligase, wurden die zueinander kompatiblen Enden der Einzelstränge kovalent miteinander verbunden.

Nach der Herstellung der DNA-Konstrukte (Kapitel B 5.2.3.1 und C 1.4.1), wurde der Restriktionsverdau mit zwei Restriktionsenzymen gleichzeitig durchgeführt. Bei der Durchführung dieses sogenannten Doppelverdaus wurde zuvor mit Hilfe des Internetprogramms Double Digest Finder (www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder) ein für beide Enzyme kompatibler Puffer ausgewählt. Diese Vorgehensweise entfiel bei der Verwendung des CutSmart™ Puffers, da dieser für nahezu alle Enzyme des Herstellers New England Biolabs (Frankfurt) geeignet ist. Die Restriktionsansätze wurden dann nach folgendem Pipettierschema vorbereitet, anschließend im Thermocycler über Nacht bei 16 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Bei der Restriktion der Plasmidvektoren wurde analog verfahren. Die hier verwendeten Enzyme sowie die zugehörigen Puffer sind nachfolgend aufgelistet. Bei den verwendeten HF-Enzymen handelt es sich um sogenannte High Fidelity Restriktionsendonukleasen (HF) mit stark reduzierter Star-Aktivität. Das bedeutet, die Eigenschaft der Enzyme neben der spezifischen Erkennungssequenz, auch ähnliche Sequenzmotive zu erkennen, ist deutlich geringer ausgeprägt. Alle hier verwendeten Enzyme und zugehörige Komponenten stammen von der Firma New England Biolabs (Frankfurt).

Restriktion: Konstrukt 2 / pET-51b(+)		Restriktion: Konstrukt 1 / pTrcHis2A	
1 µg	Insert-DNA / Vektor-DNA	1 µg	Insert-DNA / Vektor-DNA
0,5 µl	BamHI-HF® (20 KU/ml)	0,5 µl	NcoI (10 KU/ml)
0,5 µl	NotI-HF® (20 KU/ml)	0,5 µl	HindIII (10 KU/ml)
5 µl	CutSmart™ Buffer (10x)	5 µl	NEBuffer 4 (10x)
x µl	DEPC H ₂ O	x µl	DEPC H ₂ O
Gesamtvolumen 50 µl			

Nach erfolgter Restriktion, Dephosphorylierung (Kapitel B 5.7.3.2) und Aufreinigung konnte der Plasmid-Vektor für die anschließende Klonierung verwendet werden. Dazu wurden die Expressionsvektoren mit den jeweiligen DNA-Konstrukten ligiert (Kapitel B 5.7.4) und zunächst in chemisch-kompetente TOP 10 Bakterien transformiert (Kapitel B 5.7.5). Die positiven Klone

wurden mittels Klon-PCR und Gelelektrophorese überprüft (Kapitel B 5.3.3. und B 5.5). Nach der Kultivierung der Bakterien (Kapitel B 4.4) wurde die rekombinante Plasmid-DNA isoliert und zur Überprüfung des Leserahmens sequenziert (Kapitel B 5.8 und B 5.9). Anschließend erfolgte die Transformation der Plasmide in Expressionsbakterien nach Angaben der entsprechenden Hersteller (Kapitel B 4.1).

5.7.3.2 Dephosphorylierung des pET-51b(+) Vektors

Da die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme innerhalb des pET-51b(+) Vektors relativ nahe beieinander liegen, wurde die Vektor-DNA im Anschluss an die Restriktion dephosphoryliert. Dies verringert das Auftreten von nicht-rekombinanten Plasmiden während der Ligation. Für die Dephosphorylierung wurde die Calf Intestine Phosphatase (CIP) verwendet, eine alkalische Phosphatase welche die Hydrolyse freier Phosphatgruppen katalysiert. Die Reaktionskomponenten wurden von der Firma NEB bezogen und nach folgendem Pipettierschema angesetzt.

Dephosphorylierung: pET-51b(+)	
1-5 µg	Plasmid-DNA
5 µl	CIP Puffer (10x)
1 µl	CIP Enzym
x µl	DEPC H ₂ O
Gesamtvolumen 20 µl	

Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei 37 °C, wurde der Reaktionsansatz mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) aufgereinigt. Dabei wurde während des Waschschrtes der Guanidiniumhydrochlorid-haltige Puffer des *High Pure Plasmid Isolation Kit* der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Dieser verbessert die Separation des Enzyms von den Nukleinsäuren und erhöht so die anschließende Elution der DNA von der Silikamembran. Anschließend wurde die Vektor-DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.7.4 Ligation

Für die Ligationsreaktionen der TOPO-Klonierung wurden die Komponenten des TOPO® TA Cloning® Dual Promoter Kit der Firma Invitrogen (Life Technologies, Darmstadt) exakt nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Bei den Ligationen der gerichteten Klonierungen wurde die T4 DNA Ligase der Firma New England Biolabs (Frankfurt) nach folgendem Schema verwendet. Das Verhältnis der DNA-Menge von Vektor zu Insert sollte bei der Reaktion ca. 1:3 betragen.

Ligationsreaktion	
25 ng	Plasmid-DNA
10 ng	Insert-DNA
2 µl	T4 Ligase Puffer (10x)
1 µl	T4 Ligase
x µl	DEPC H ₂ O
Gesamtvolumen 20 µl	

5.7.5 Transformation kompetenter Bakterien

Nach der Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Plasmidvektor, muss diese rekombinante DNA zur Vervielfältigung in kompetente *E. coli* Bakterien (Wirtsorganismus) eingebracht werden. Die rekombinanten Plasmide werden dann von den Bakterien neben ihrer eigenen DNA repliziert. *E. coli* Bakterien sind nicht von Natur aus kompetent, d. h. sie können keine in ihrem umgebenden Medium vorkommende Fremd-DNA aufnehmen. Diese Kompetenz bzw. Transformierbarkeit wird durch eine bestimmte Behandlung der Bakterien, z.B. nach der Calciumchlorid-Methode, erreicht. Je nach Art der Vorbehandlung werden sie dann als chemisch- oder elektrokompotent bezeichnet. Die Transformation der Bakterienzellen kann nun entweder nach der Hitzeschock-Methode oder via Elektroporation erfolgen.

5.7.5.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien durch Hitzeschock

Zur Durchführung der Transformation chemisch kompetenter Zellen, müssen die Zellmembranen der Bakterien durch CaCl₂ vorgeschädigt werden, so dass sie kurzzeitig für Fremd-DNA durchlässig werden. Aufgrund des nachfolgenden Hitzeschocks bzw. des starken Temperaturwechsels gelangen die Plasmide dann in Bakterienzellen. Für die vorliegende Arbeit

wurden die chemisch-kompetenten Bakterien „One Shot® TOP 10 Chemically Competent *E. coli*“ der Firma Invitrogen (Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Die Transformation der Bakterienzellen erfolgte nach der Hitzeschock-Methode. Dazu wurden die Bakterien kurz auf Eis aufgetaut, 2 µl der Ligationsreaktion (Kapitel B 5.7.4) zu 25 – 50 µl der Bakteriensuspension pipettiert und durch sehr vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze gemischt. Die in der Bakteriensuspension vorhandenen Ca^{2+} Ionen bewirken eine Präzipitation der Plasmid-DNA als mikrokristallines Polyanion auf der Oberfläche der Bakterienzellen (Dingermann et al., 2010). Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wird der Reaktionsansatz für 45 Sekunden bei 42 °C im Heizblock oder Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen, und anschließend sofort für 2 min auf Eis inkubiert. Zur Regeneration der Bakterien wurden dann 250 µl vorgewärmtes S.O.C.-Medium zum Reaktionsansatz pipettiert, dieser dann für 1 Stunde bei 37 °C und 250 rpm geschüttelt (Schüttelinkubator) und in verschiedenen Konzentrationen auf einem Selektionsagar ausplattiert. Zur anschließenden Identifizierung positiver Klone wurde der Agar zuvor mit dem jeweiligen Antibiotikum, entsprechend zur Resistenz des Vektors, versetzt. Im Falle einer gewünschten Blau-Weiss-Selektion wurde der Agar zusätzlich mit X-Gal versehen (Kapitel B 5.7.6).

5.7.6 Blau-Weiss-Selektion

Die Identifizierung transgener Bakterienklone, also Bakterien welche einen Plasmid-Vektor mit Insert tragen, erfolgte mit Hilfe der Blau-Weiss-Selektion. Hierbei nutzt man die sogenannte α -Komplementation in *E. coli*-Zellen, wodurch zwei nichtfunktionale Genabschnitte der β -Galaktosidase wieder zu einem funktionsfähigen Enzym fusioniert werden können. Das für die β -Galaktosidase codierende *lacZ*-Gen des *lac*-Operons trägt in einigen *E. Coli*-Stämmen eine Mutation (*lacZ* Δ M15) welche im Polypeptid zu der Deletion der Aminosäuren 11-41 führt, und somit zu einem enzymatisch inaktiven Protein. Einige Plasmid-Vektoren dagegen, tragen ebenfalls eine Mutation des *lacZ*-Gens (*lacZ'*), welches ausgehend vom Amino-Terminus für die ersten 146 Aminosäuren der β -Galaktosidase codiert, und als α -Peptid bezeichnet wird. Nimmt ein Bakterium nun ein Plasmid auf, dann werden beide Gene in der Zelle exprimiert, beide Proteine werden zusammengelagert (fusionieren) und es entsteht ein funktionelles Enzym. Die β -Galaktosidase ist jetzt in der Lage, dass künstliche Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-indolyl- β -D-Galaktosid) zu hydrolysieren. Das entstehende Produkt 5-Brom-4-Chlor-Indigo ist für die Blaufärbung der Bakterien verantwortlich (Sambrook & Russel, 2000).

Für die weiteren Untersuchungen wurden ausschließlich weiße Bakterienkolonien mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze vorsichtig von der Agarplatte aufgenommen und zum Ansetzen einer Flüssigkultur in entsprechendes Nährmedium überführt (Kapitel B 4.4.2).

5.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des *High Pure Plasmid Isolation Kit* der Firma Roche (Mannheim) oder dem *NucleoSpin Plasmid Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) aus den Bakterien isoliert. Bei dieser Methode der DNA-Isolierung handelt es sich um eine Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction) bei der als feste Phase (Sorbens) eine Silikat-Membran zum Einsatz kommt (Kapitel B 5.6). Diese Membran ist in sogenannten *Spin columns* oder Mikrozentrifugen-Säulen verarbeitet. Mit Hilfe des Reagens SDS, welches Bestandteil der in den Kits verwendeten Puffer ist, wird eine alkalische Lyse der Bakterien durchgeführt und die DNA mittels der Mikrozentrifugen-Säulen von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Anschließend erfolgt die Reinigung und Konzentration der DNA an der Säule mittels Ethanol haltiger Hochsalzpuffer. Durch Zugabe eines Niedrigsalzpuffers, hier wurde DEPC-H₂O verwendet, kann die DNA wieder von der Säule eluiert werden. Die Durchführung der einzelnen Schritte erfolgte laut den Vorgaben der Hersteller.

5.9 DNA-Sequenzierung

Um die Nukleotid-Abfolge (Sequenz) eines DNA-Moleküls zu bestimmen, führt man eine sogenannte DNA-Sequenzierung durch. Die hierzu verwendete Methode des *Cycle sequencing* beruht auf der von Frederick Sanger entwickelten Didesoxymethode (Sanger et al., 1977), auch Kettenabbruch-Synthese genannt. Bei dieser enzymatischen Methode erfolgt eine lineare Amplifizierung einer einzelsträngigen DNA (Template) ausgehend von nur einem fluoreszenzmarkierten Primer. Die Synthese der DNA verläuft parallel in 4 Reaktionsansätzen in denen sich der Primer, DNA-Polymerase, alle vier 2'-Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) und zusätzlich jeweils eines der 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) oder Ketten-Terminatoren befindet. Diese Ketten-Terminatoren unterscheiden sich von den dNTPs durch das Fehlen der 2'-OH- und 3'-OH-Gruppe der Ribose. Sie werden zu irgendeinem Zeitpunkt zufällig in den DNA-Strang eingebaut und führen aufgrund ihrer fehlenden 3' Hydroxygruppe zu einem Kettenabbruch. Da diese OH-Gruppe essentiell für die Verknüpfung des Nukleotids mit der Phosphatgruppe des folgenden Nukleotids ist, kann der DNA-Strang durch die DNA-Polymerase nicht weiter verlängert werden. So entstehen unterschiedliche lange DNA-Fragmente, welche

innerhalb eines Reaktionsansatzes alle mit der gleichen ddNTP-Variante enden und ausgehend vom einzigen Primer alle den gleichen Anfang besitzen. Trennt man nun diese Fragmente in einer Gelmatrix ihrer Länge nach auf, erhält man die Sequenzinformation anhand der Laufstrecke bzw. der Reihenfolge der Banden im Gel. Der Kettenabbruch kann praktisch nach jeder Nukleotidposition erfolgen, so dass sich die neu synthetisierten DNA-Fragmente in Ihrer Länge um jeweils ein Nukleotid unterscheiden. Zur Auftrennung dieser Fragmente wird daher ein hochauflösendes Polyacrylamidgel verwendet, um den geringen Größenunterschied detektieren zu können. Zur Vermeidung von intramolekularen Basenpaarungen bei den einzelsträngigen DNA-Strängen, werden die Gele mit harnstoffhaltigen Puffern hergestellt. Die Sequenzierungsreaktion verläuft unter ähnlichen Bedingungen wie eine Standard-PCR. Im ersten Schritt findet die Denaturierung der doppelsträngigen Template DNA statt, die meist in Form von Plasmid-DNA zum Einsatz kommt. Während des zweiten Schrittes hybridisiert der fluoreszenzmarkierte Primer an den DNA-Einzelstrang und im anschließenden dritten Schritt kommt es zu einer linearen Amplifizierung von Fragmenten, welche am 5'-Ende aus dem fluoreszenzmarkierten Primer und am 3'-Ende aus dem jeweiligen ddNTP bestehen. Für die Sequenzierungsreaktion wurde das *SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kit –LC* der Firma Epicentre (Madison, USA) und das *DNA Cycle Sequencing Kit* der Firma Jena Bioscience (Jena) verwendet. Die exakte Durchführung erfolgte laut den Angaben der Hersteller, mit Ausnahme einiger Änderungen bei der Anwendung des *SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kits* welche nachfolgend aufgeführt sind. Da bei der anschließenden Elektrophorese der sogenannte *two-dye run* genutzt wurde, befinden sich im Reaktionsansatz zwei Primer mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen, die aber kein Primerpaar darstellen. Die DNA-Synthese verläuft linear.

Ansatz des Mastermix: Sequenzierungsreaktion	
600 ng	Plasmid DNA
1 µl	IRDye 700 gelabelter Primer (1-2 pmol)
1 µl	IRDye 800 gelabelter Primer (1-2 pmol)
7,2 µl	3,5 x Sequenzierungspuffer
1 µl	DNA Polymerase
x µl	DEPC H ₂ O
17 µl Reaktionsvolumen	

→ Für jede ddNTP Variante wurden 2 µl in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und jeweils mit 4 µl des Mastermixes (siehe Reaktionsansatz) versetzt.

Thermocycler-Programm: Cycle sequencing

Initiale Denaturierung 95 °C für 5 min

Denaturierung I 95 °C für 30 s

Annealing II 50 °C für 15 s

Extension III 70 °C 1 min/1 kb DNA

Schritt I-III: 30 Zyklen

—→ Im Anschluss an das Programm wurden 3 µl Stop- bzw. Ladepuffer zu jedem Reaktionsansatz pipettiert und diese erneut für 3 - 5 min bei 70 °C inkubiert. Die Proben können nach dem Abkühlen entweder sofort für die Gelelektrophorese verwendet oder bei -20 °C zunächst gelagert werden.

5.9.1 Herstellung des Sequenzierungsgels

Für die Präparation des Sequenzierungsgels wurden spezielle Glasplatten aus Borofloat® Glas (H 41cm/B 25 cm/T 0,5 cm) verwendet. Hierbei handelt es sich um gefloatetes Borosilikatglas, dessen besondere Oberflächenqualität für die Herstellung des nur 0,2 mm dicken Polyacrylamidgels unabdingbar ist. Darüber hinaus erlaubt es eine streuungsfreie Laserabtastung im gewünschten Wellenlängenbereich von 700 bzw. 800 nm.

Die Glasplatten wurden zunächst mit VE-H₂O und Isopropanol so lange gereinigt, bis sie absolut staubfrei waren. Dann wurden sie vorsichtig übereinandergelegt, und die beiden Spacer mit einer Schichtdicke von ca 0,25 mm jeweils am äußeren Rand der Platten platziert. Die weitere Vorbereitung und der exakte Aufbau der Glasplatten wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (NEN® Model 4300 DNA Analyzer; LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg vor der Höhe). Für die Herstellung der Gelmatrix wurde das SequaGel XR (EC-842) System der Firma National Diagnostics (Atlanta, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Zweikomponentensystem, zum einen die SequaGel XR Monomer Solution bestehend aus Harnstoff, Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid, und zum anderen der SequaGel Complete Buffer bestehend aus 5 x TBE und TEMED. Die Komponenten wurden nach Vorgaben des Herstellers gemischt und mit der entsprechenden Menge Ammoniumperoxodisulfat (APS) versetzt. Nach dem Mischen dieser Komponenten wurde die Lösung so schnell wie möglich verarbeitet. Dazu wurde mit Hilfe einer 25 ml Einwegpipette die Lösung zügig zwischen die Glasplatten gegossen. Bei dem Gießvorgang muss die Bildung von Luftblasen unbedingt verhindert werden, da ansonsten die entsprechende Spur anschließend nicht mehr verwendet

werden kann. Direkt nach dem Gießvorgang wird ein Kamm am oberen Ende in das Gel eingeführt, der während der zweistündigen Ruhephase zur Polymerisation des Gels sozusagen als Platzhalter für den späteren Einsatz der Taschen dient.

Ansatz der Gelmatrix	
6 ml	SequaGel XR Monomer Solution
24 ml	SequaGel Complete Buffer
350 µl	APS (10 %)
Gesamtvolumen ca. 30 ml	

5.9.2 Gelelektrophorese des Sequenzierungsgels

Nach dem vollständigen Auspolymerisieren des Gels wird der Kamm entfernt, die entstandene breite Tasche von Gelstücken befreit und intensiv mit VE-H₂O gespült. Die Glasplatten werden vor dem Einsatz im Gerät ggf. nochmals gereinigt. Der weitere Aufbau der Apparatur erfolgte dann wieder laut den Angaben des Herstellers (NEN[®] Model 4300 DNA Analyzer; LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg vor der Höhe). Anschließend wird 1x TBE-Laufpuffer in die vorgesehenen Tanks gefüllt und der Vorlauf (Pre-run) gestartet. Während dieses Schritts wird der Laser im Gel fokussiert und die Detektionsbedingungen optimiert. Das Gel wird auf ca. 50 °C erhitzt und mit dem Laufpuffer äquilibriert. Im Anschluss an den Vorlauf wurde der Probenkamm (Sharktooth, 48 well, 0.25 mm) vorsichtig in die breite Aussparung am oberen Gelrand in das Gel eingesetzt. Dabei sollten die Spitzen der Kammzinken nur max. 1 mm in die Gelmatrix hineinreichen, da sonst das Volumen der Geltaschen minimiert wird. Die Geltaschen wurden dann mit ca. 1,3 µl der Sequenzierungsreaktionen beladen, wobei immer die gleiche Reihenfolge (z.B. GATC) beibehalten wurde. Nach dem vollständigen Beladen des Gels wurde die Elektrophorese (Run) unter den gleichen Bedingungen, wie zuvor während des Pre-runs gestartet und dauerte ca. 9 Stunden. Die Auswertung bzw. Analyse des Gels und der Rohdaten erfolgte anschließend mittels der Geräte-Software (e-Seq[™] DNA Sequencing Software; LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg vor der Höhe). So wurden u.a. fehlerhafte Nukleotidpositionen manuell editiert.

6. Bioinformatische Methoden

6.1 Sequenzanalyse

6.1.1 Computergestützte Sequenzanalyse

Nach Auswertung und Analyse des Sequenzierungsgels mit der entsprechenden Geräte-Software wurden die Sequenzdaten zur weiteren Analyse im FASTA-Format gespeichert. Für die Identifizierung von Vektorsequenzen wurde das Online-Tool VecScreen verwendet. Um die vorliegende Sequenz von Vektoranteilen und anderen nichtcodierenden Bereichen zu bereinigen, kamen die Programme Geneious und BioEdit zum Einsatz. Zur Identifizierung der Teilsequenz bzw. um erste nähere Informationen über diese zu erhalten, wurde mit dem Suchalgorithmus BLAST (engl.: Basic Local Alignment Search Tool) ein Datenvergleich mit der Nukleotid-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) durchgeführt, welche auf Quellen wie GenBank, RefSeq, TPA und PDB zurückgreift. Wurden auf diesem Weg Informationen zu der vorliegenden Teilsequenz gewonnen, konnte mit der Anwendung der sogenannten Primer-Walking-Strategie die Sequenz weiter vervollständigt werden (Kapitel B 6.1.2). Die so gewonnenen einzelnen Sequenzabschnitte wurden mit Hilfe der Programme Geneious und BioEdit zu sogenannten Contigs (engl.: „*contiguous*“, durchgehende Sequenzen) assembliert. Mit Hilfe des Online-Tools *Translate* des *ExPASy* (Expert Protein Analysis System) Portals wurde die Nukleotidsequenz dann in die drei möglichen Leseraster einer Aminosäuresequenz übersetzt, und anhand der bereits gewonnenen Daten, der richtige Leseraster festgelegt. Dazu wurde die unbekannte Sequenz mit Sequenzen von Genen aligniert, die in der BLAST-Suche die höchstmögliche Ähnlichkeit mit der Suchanfrage aufwiesen. In den resultierenden Alignments betrachtet man dann besonders Bereiche der Gene, welche selbst speziesübergreifend konserviert sind, und somit als Anhaltspunkt für die Struktur und den Aufbau des unbekannten Gens dienen. Die Alignments wurden mit dem Programm ClustalW erstellt und mit dem Programm GeneDoc graphisch bearbeitet.

6.1.2 Primer-Walking-Strategie

Die Primer-Walking-Strategie ist eine Sequenzierungsmethode für längere DNA-Fragmente mit einer Größe von etwa 1 bis 7 Kilobasen, da diese nicht während einer Cycle-Sequencing-Reaktion mit einem Primerpaar vollständig erfasst bzw. sequenziert werden können. Da sowohl die Position als auch die Laufrichtung der Sequenz jederzeit bekannt sind, handelt es sich hierbei um eine zielgerichtete Sequenzierungsmethode.

Ausgehend von einem bekannten kurzen DNA-Fragment (EST-Sequenz) wurde zunächst am 5'-Ende ein Reverse-Primer und am 3'-Ende ein Forward-Primer generiert um die unbekannten Sequenzabschnitte des DNA-Fragmentes zu amplifizieren. Die neu gewonnenen DNA-Fragmente wurden anschließend kloniert und sequenziert, so dass anhand der neuen Sequenzinformationen ggf. erneut Primer generiert werden konnten. Dabei sollte immer auf einen ausreichend großen Überlappungsbereich mit den bekannten Sequenzabschnitten geachtet werden. Dies ist notwendig, da bedingt durch die Sequenzierungstechnik des verwendeten Sequencers, die ersten 20 - 40 sequenzierten Nukleotidpositionen oft nicht eindeutig lesbar sind. Durch diese Vorgehensweise kann Schritt für Schritt die das gesamte DNA-Fragment sequenziert werden. Um das Risiko von Sequenzierungsfehlern auszuschließen, wurden die Teilabschnitte der DNA immer mehrfach/redundant sequenziert.

6.1.3 Sequenzierung mit vektorspezifischen Primern

Bei dieser Methode, wurden die DNA-Fragmente zunächst via TOPO-TA-Klonierung in einen Plasmidvektor ligiert (Kapitel B 5.7.2). Mit den beiden vektorspezifischen Primern (M13-forward und M13-reverse) konnte die Insert-DNA nun gleichzeitig von beiden Enden ausgehend, sequenziert werden. Neben der enormen Zeitersparnis, hat diese Methode auch den Vorteil, dass die DNA-Fragmente in großer Menge mit einem hohen Reinheitsgrad zur Verfügung stehen.

6.1.4 Verwendete Programme und Datenbanken

Für die Auswertung und Analyse der Sequenzdaten sowie für das Design und die Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Primer, wurden im Internet frei erhältliche Programme, Dienste und Datenbanken verwendet. Diese sind mit Name und Internet-Adresse im Anhang aufgelistet.

7. Rekombinante Expression

7.1 Rekombinante Expression von Fusionsproteinen in Prokaryoten

Mit Hilfe der rekombinanten Genexpression kann man gezielt große Mengen eines gewünschten Proteins *in vivo* synthetisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu das Bakterium *Escherichia coli* als Expressionsorganismus verwendet. Das für das entsprechende Protein codierende Gen wurde in einen Expressionsvektor ligiert und dieser via Transformation in das gewünschte Expressionsbakterium eingebracht. Die Bakterien wurden anschließend kultiviert und die Expression des Gens erfolgte abhängig vom verwendeten Kulturmedium entweder während der gesamten Kultivierungszeit oder manuell induziert ab einem bestimmten Zeitpunkt. Neben dem im Überschuss synthetisierten rekombinanten Protein, werden oft auch kontaminierende Proteine der Wirtszelle exprimiert. Daher erfolgte nach der Expression eine Aufreinigung des gewünschten Proteins mittels einer Affinitätschromatographie.

7.1.1 Expression mit dem pTrcHis2A Vektor

Der pTrcHis2A Vektor ist ein Expressionsvektor für die High-Level Expression von Proteinen in *E. coli* Bakterien. Er besitzt einen C-terminalen Polyhistidin-Tag (6 x His), der zum einen die Aufreinigung mittels einer geeigneten Ni-NTA Matrix erlaubt, und zum anderen anschließend über einen anti-His (C-term) Antikörper detektiert werden kann. Darüber hinaus verfügt der Vektor u.a. über einen trc (*trp-lac*) Promotor (Amann et al., 1983) mit einer sehr hohen Transkriptions-Initiationsaktivität. Dieser Hybridpromotor ist zusammengesetzt aus der -35 Region des *trp* Promotors und der -10 Region des *lac* Promotors und kann über den *lac*-Repressor reguliert werden. Er besitzt zudem ein Start Methionin, ein pBR322 ori, ein Myc-Epitop-Taq und eine Ampicillin-Resistenz.

Expressionsprotokoll

Der pTrcHis2A Vektor wurde in geschlossener oder zirkulärer Form vom Hersteller bezogen und wurde vor der Klonierungsreaktion mittels Restriktionsverdau geöffnet (Kapitel B 5.7.3.1). Die verwendeten Restriktionsschnittstellen richteten sich dabei nach der Beschaffenheit der Insert-DNA. Vor der Wahl der Schnittstellen wurde das Insert zuvor auf diese Schnittstellen geprüft, da es sonst nach einem Restriktionsverdau nicht mehr intakt wäre.

Von den drei zur Verfügung stehenden Leserahmen wurde die Multiple Cloning Site A des pTrcHis2A gewählt. Um die Insert-DNA nun im richtigen Leserahmen (engl. in frame) mit dem Vektor zu ligieren, musste zuvor ein entsprechendes DNA-Konstrukt hergestellt werden (Kapitel B 5.7.3.1). Dazu wurden die beiden Schnittstellen *Nco I* und *Hind III* gewählt. Anschließend wurde das Ligationsprodukt in die kompetenten Bakterienstämme BL21 (DE3) pLysS und Rosetta™ 2 (DE3) pLysS transformiert. Dabei wurde exakt nach Angaben der Hersteller verfahren. Die Transformationsansätze wurden dann auf einem mit Carbenicillin versetzten Selektionsagar ausplattiert. Für die Durchführung einer Pilotexpression wurden positive Klone von der Agarplatte gepickt, in 2 ml LB-Medium (versetzt mit Carbenicillin) überführt und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Parallel können die ursprünglichen Bakterienklone von der Agarplatte immer wieder auf frische Agarplatten übertragen werden, um sie am Leben zu erhalten. So stehen diese jederzeit zum Start einer Expressionskultur zur Verfügung.

Mit ca. 0,4 ml der Über-Nacht-Kultur wurden anschließend 20 ml LB-Medium (versetzt mit Carbenicillin) beimpft und erneut bei 37 °C inkubiert, bis ein OD₆₀₀-Wert von etwa 0,6 erreicht war. Bei diesem Wert befinden sich die Bakterien in der sogenannten „mid-log Phase“, welche als Startpunkt für die Induktion der Expression genutzt wird. Von der Bakterienkultur wird nun ein Aliquot von 1 ml entnommen, bei maximaler Geschwindigkeit für ca. 30 s abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterien-Pellet bei -20 °C gelagert. Es repräsentiert den Proteingehalt der Zellen vor der Induktion der Expression und dient in der SDS-PAGE als Vergleichswert. Zur Induktion der Expression wurde nun die übrige Bakterienkultur mit 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) versetzt und bei 37 °C weiter im Schüttelinkubator inkubiert. Jede Stunde wurden dann aus dieser Kultur weitere 1 ml Aliquots entnommen, und anschließend via SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Nach Beendigung der Expression wurden die Bakteriensuspension bei 5000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und die Bakterien-Pellets bei -20 °C gelagert. Für die Synthese größerer Proteinmengen wurde analog Verfahren und das Volumen der Expressionskultur auf bis zu 1 Liter erweitert.

7.1.2 Expression mit dem pET-51b(+) Vektor

Das pET System wird über einen T7 Promotor gesteuert und ist in Kombination mit der T7 Polymerase ein sehr effektives Expressionssystem für die rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli*. Der pET-51b(+) Vektor besitzt u.a. einen N-terminalen Strep•Tag® II, einem aus acht Aminosäuren bestehenden Peptid (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys). Dieser Strep•Tag® II bindet mit sehr hoher Spezifität an Strep•Tactin®, welches auf dem tetrameren Protein Streptavidin basiert. Mit Strep•Tactin® Superflow™ Agarose als Matrixbestandteil bei der Affinitätschromatographie, kann eine sehr spezifische Proteinaufreinigung erfolgen, und damit ein sehr reines Protein gewonnen werden. Darüber hinaus erfolgt die Aufreinigung über einen Strep-Tag unter physiologischen Bedingungen, und ist damit besonders zur Synthese nativer Proteine geeignet. Zusätzlich verfügt dieser Vektor im Anschluss an den Strep-Tag über eine Enterokinase-Schnittstelle, die eine Entfernung des Tags nach der Proteinaufreinigung erlaubt, sowie einen Polyhistidin-Tag (10 x His) am C-Terminus, welcher eine duale Aufreinigungsstrategie ermöglicht. Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgt über den Strep•Tag® II mit einem spezifischen monoklonalen Strep•Tag® II Antikörper.

Expressionsprotokoll

Der pET-51b(+) Vektor wurde ebenfalls in geschlossener Form vom Hersteller bezogen. Die zu treffenden Vorbereitungen für die Verwendung des Vektors und der Insert-DNA sind im Kapitel B 5.7 detailliert beschrieben. Im Anschluss an die Ligation wurde die Plasmid-DNA exakt nach Angaben des Herstellers in die kompetenten Bakterien BL21 (DE3) pLysS transformiert. Die Expression erfolgte dann analog der Vorgehensweise im vorherigen Kapitel B 7.1.1, mit dem Unterschied, dass hier das Konstrukt 2 und die Restriktionsenzyme Not I und BamH I verwendet wurden.

8. Proteinbiochemische Methoden

8.1 Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie

Mit dem Trennprinzip der Affinitätschromatographie, soll das rekombinante Protein (Fusionsprotein) über den Hexahistidin-Taq oder den Strep-Tag in größtmöglicher Menge und Homogenität aufgereinigt werden. Das grundlegende Funktionsprinzip der hier angewendeten Säulenchromatographie beruht im Fall der His-Tag Proteine auf der Verwendung von Nitrilotriessigsäure (NTA) welche kovalent an das Matrixmaterial Agarose gebunden ist. Der Chelatbildner NTA bildet Komplexe mit dem zweiwertigen Metallion Nickel. Die rekombinanten Proteine werden über ihre Polyhistidin-Sequenz selektiv an die komplexierten Metallionen gebunden, während die natürlichen Proteine der Wirtsorganismen, in denen diese Histidinreste eher selten vorkommen, nur schwach an die Ni-NTA-Agarose Matrix binden (Porath et al., 1975; Hochuli et al., 1988). Sie können sehr leicht mit imidazolhaltigen Waschpuffern (bis 50 mM) entfernt werden. Bei Imidazol-Konzentrationen zwischen 50 und 250 mM eluieren dann auch die rekombinanten Proteine von der Matrix.

Prokaryotische Wirtsorganismen wie die hier verwendeten *E. coli* Stämme sezernieren die überexprimierten rekombinanten Proteine nicht in ihr umgebendes Kulturmedium. Sie werden im Zytosol der Bakterien angereichert, bis sie als sogenannte Inklusionskörper oder Einschlusskörper (engl. inclusion bodies) präzipitieren. Dies geschieht zum einen aufgrund der möglichen Toxizität des Proteins für die Bakterien, und zum anderen aufgrund des Anstiegs der intrazellulären Konzentration an Proteinen bis zur Überschreitung des Löslichkeitsproduktes (Kutz & Wolff, 2007). Daher ist es bei der Lyse der Bakterien in einigen Fällen notwendig, diese Inklusionskörper aufzubrechen. Im folgenden Text wird an entsprechender Stelle darauf hingewiesen.

8.1.1 Säulenchromatographie

8.1.1.1 Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit His-Tag unter denaturierenden Bedingungen

Vorbereitung der Säule:

Bei der hier angewendeten Säulenchromatographie (engl. gravity-flow chromatography) wurde zur Vorbereitung der stationären Phase eine 5 ml Polypropylen-Säule (Thermo Scientific™ Pierce, Bonn) mit 2 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) befüllt und diese nach Vorgaben des Herstellers präpariert. Das Endvolumen der Matrix betrug ca. 1 ml. Für die weitere Verwendung wurde die Säule auf Eis gelagert.

Zellaufschluss und Herstellung der klaren Zelllysate:

Nach Lagerung der Bakterienpellets über Nacht bei -20 °C wurden sie 15 min auf Eis aufgetaut. Den Zellpellets wurden dann pro g Nassgewicht ca. 5 ml Lysispuffer hinzugefügt, und diese dann bei Raumtemperatur für 60 min vorsichtig gerührt. Um die evtl. noch vorhandenen Inklusionskörper (inclusion bodies) vollständig aufzubrechen, wurde das Homogenisat nach der chemischen Lyse noch zusätzlich einer mechanischen Zelllyse via Sonifikation unterzogen. Dazu wurde ein ultraschallleitender Metallstab direkt in die Suspension getaucht und diese mehrmals 30 s lang beschallt. Da bei diesem Vorgang hohe Temperaturen entstehen, wurde die Suspension während dieser Behandlung permanent auf Eis gehalten.

Zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wurde die Suspension bei 5000 x g und Raumtemperatur ca. 20 - 30 min zentrifugiert, und anschließend das klare Zelllysate vorsichtig entnommen. Für die Analyse in der SDS-PAGE wurde eine Probe davon aufbewahrt.

Aufreinigung:

Nach dem Zellaufschluss wurde das klare Zelllysate (engl. cleared lysates) auf die vorbereiteten Säulen geladen und eine Probe des Durchflusses für die SDS-PAGE aufbewahrt. Die an das Matrixmaterial gebundenen rekombinanten Proteine wurden nun mit Waschpuffern unterschiedlicher Imidazolkonzentration gewaschen und unter Pufferbedingungen von 50 bis 250 mM Imidazol von der Säule eluiert. Die verwendeten Puffer sind jeweils in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Pufferkomponenten	NaH₂PO₄	Tris / HCl	Urea	Imidazol	pH
Lysispuffer	100 mM	10 mM	8 M	10 mM	8,0
Waschpuffer A	100 mM	10 mM	8 M	10 mM	8,0
Waschpuffer B	100 mM	10 mM	8 M	20 mM	8,0
Waschpuffer C	100 mM	10 mM	8 M	30 mM	8,0
Waschpuffer D	100 mM	10 mM	8 M	40 mM	8,0
Wasch-/Elutionspuffer E	100 mM	10 mM	8 M	50 mM	8,0
Elutionspuffer F	100 mM	10 mM	8 M	100 mM	8,0
Elutionspuffer G	100 mM	10 mM	8 M	200 mM	8,0
Elutionspuffer H	100 mM	10 mM	8 M	250 mM	8,0

8.1.1.2 Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit His-Tag unter nativen Bedingungen

Vorbereitung der Säule:

Die Vorbereitung der Säule wurde analog der Vorgehensweise in Kapitel B 8.1.1.1 durchgeführt.

Zellaufschluss und Herstellung der klaren Zelllysate:

Die über Nacht bei -20 °C gelagerten Bakterienpellets wurden 15 min auf Eis aufgetaut und pro g Nassgewicht 5 ml Lysispuffer hinzugefügt. Die Bakteriensuspension wurde dann über Nacht bei 4 °C vorsichtig gerührt. Nach der vollständigen Lyse wurde zur Entfernung der unlöslichen Bestandteile die Suspension bei 5000 x g ca. 20-30 min und 4 °C in einer kühlbaren Zentrifuge zentrifugiert. Das klare Zelllysate wurde anschließend vorsichtig entnommen. Zur Analyse in der SDS-PAGE wurde auch hier eine Probe aufbewahrt.

Aufreinigung:

Im Anschluss an den Zellaufschluss wurde das klare Zelllysate auf die vorbereiteten, gekühlten Säulen geladen und eine Probe des Durchflusses für die SDS-PAGE aufbewahrt. Die weiteren Schritte der Aufreinigung erfolgten analog der Vorgehensweise in Kapitel B 8.1.1.1. Abweichend davon wurden hier zur Vermeidung von Aktivitätsverlusten der nativen Proteine alle Arbeitsschritte mit gekühlten Puffern auf Eis durchgeführt. Die verwendeten Puffer sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Lysispuffer: Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen

10 ml	BugBuster® Protein Extraction Reagent (Novagen; Merck Millipore, Darmstadt)
1 Tablette	Protease Inhibitor Cocktail: complete, Mini, EDTA-free (Roche, Mannheim)
3 - 5 KU /g Zellpellet	rLysozym (Novagen; Merck Millipore, Darmstadt)
25 U / ml Lysispuffer	Benzonase (Novagen; Merck Millipore, Darmstadt)

Bsp. für ein Gesamtvolumen von 10 ml Lysispuffer

Pufferkomponenten	NaH₂PO₄	NaCl	Imidazol	pH
Waschpuffer A	50 mM	300 mM	10 mM	8,0
Waschpuffer B	50 mM	300 mM	20 mM	8,0
Waschpuffer C	50 mM	300 mM	30 mM	8,0
Waschpuffer D	50 mM	300 mM	40 mM	8,0
Wasch-/Elutionspuffer E	50 mM	300 mM	50 mM	8,0
Elutionspuffer F	50 mM	300 mM	80 mM	8,0
Elutionspuffer G	50 mM	300 mM	100 mM	8,0
Elutionspuffer H	50 mM	300 mM	150 mM	8,0
Elutionspuffer I	50 mM	300 mM	200 mM	8,0
Elutionspuffer J	50 mM	300 mM	250 mM	8,0

8.1.1.3 IMAC (Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie) mit dem Profinia™ - Protein Purification System

Bei dieser Methode der Proteinaufreinigung handelt es sich um ein automatisiertes Säulensystem der Firma Bio-Rad (München). Sie beruht auf der Anwendung des IMAC-Verfahrens zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit Polyhistidin-Sequenz (Porath et al., 1975; Hochuli, 1988). Dieses System wurde sowohl für die Aufreinigung unter denaturierenden als auch unter nativen Bedingungen eingesetzt. Dazu wurden jeweils Bio-Scale Mini Profinity IMAC Säulen (Bio-Rad, München) mit dem Volumen von 1 ml verwendet. Die Vorbereitung der klaren Zelllysate für die denaturierende IMAC ist in Kapitel B 8.1.1.1, und für die native IMAC in Kapitel B 8.1.1.2 detailliert dargestellt. Abweichend davon wurden für die Lyse der Zellpellets und die anschließende Aufreinigung der Proteine, jeweils die in den folgenden Tabellen aufgeführten Puffer verwendet. Sämtliche Puffer wurden vor der Verwendung im Gerät

mittels Rotilabo®-Spritzenfiltern mit CME Membran (Roth, Karlsruhe) und einer Porengröße von 2 µm filtriert. Zudem mussten auch die klaren Lysate vor dem Beladen der Säulen filtriert werden. Dazu wurden zunächst Rotilabo®-Spritzenfilter mit einer Porengröße von 8 µm, und anschließend einer Porengröße von 0,45 µm verwendet. Die exakte Vorbereitung des Gerätes und die Durchführung der Aufreinigung erfolgten nach Angaben des Herstellers.

IMAC unter denaturierenden Bedingungen:

Pufferkomponenten	KH₂PO₄	KCl	Urea	Imidazol	pH
Lysispuffer	50 mM	300 mM	6 M	5 mM	8,0
Waschpuffer I	50 mM	300 mM	6 M	5 mM	8,0
Waschpuffer II	50 mM	300 mM	6 M	10 mM	8,0
Elutionspuffer H	50 mM	300 mM	6 M	250 mM	8,0

IMAC unter nativen Bedingungen:

Pufferkomponenten	KH₂PO₄	KCl	Imidazol	pH
Lysispuffer	50 mM	300 mM	5 mM	8,0
Waschpuffer I	50 mM	300 mM	5 mM	8,0
Waschpuffer II	50 mM	300 mM	10 mM	8,0
Elutionspuffer H	50 mM	300 mM	250 mM	8,0

8.2 Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels Strep•Tactin® Chromatographie

Das Funktionsprinzip der Aufreinigung von Strep-Tag Proteinen ist in Kapitel B 7.1.2 detailliert beschrieben. Für diese Anwendung wurde die Strep•Tactin® Superflow™ Agarose sowie das dazugehörige Puffer Kit der Firma Novagen (Merck Millipore, Darmstadt) nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

8.2.1 Aufreinigung des Expressionsproduktes mit Strep-Tag unter nativen Bedingungen

Die Herstellung der klaren Zelllysate für die Strep•Tactin® Chromatographie erfolgte analog zu der Vorgehensweise in Kapitel B 8.1.1.2. Die für die Aufreinigung der Proteine notwendigen Puffer sind in der folgenden Tabellen aufgeführt. Als Lysispuffer wurde der Strep•Tactin® Wasch Puffer verwendet.

Vorbereitung der Säule:

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde mittels einer herkömmlichen Säulenchromatographie durchgeführt. Dazu wurde eine 5 ml Polypropylen-Säule (Thermo Scientific™ Pierce, Bonn) mit 2 ml Strep•Tactin® Superflow™ Agarose befüllt und nach den Vorgaben des Herstellers weiter behandelt. Das Endvolumen der Agarosematrix betrug nach der Vorbereitung ca. 1 ml. Für die weitere Verwendung wurde die Säule auf Eis gelagert. Da es sich um eine native Aufreinigung handelt wurden alle Puffer vorgekühlt und alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

Aufreinigung:

Das klare Zelllysate (cleared lysates) wurde zu Beginn in einem 15 ml Amicon Zentrifugenfilter mit einer 10 kDa Membran der Firma Merck Millipore (Darmstadt) bis auf ca. 1/3 des Ausgangsvolumens reduziert. So sollte die Proteinkonzentration erhöht werden um eine adäquate Bindung der rekombinanten Proteine an die Agarosematrix zu gewährleisten. Nach dem Beladen der Säule mit dem Zelllysate wurde eine Probe des Durchflusses für die SDS-PAGE aufbewahrt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten nach Vorgaben des Herstellers.

Puffer Strep•Tactin® Chromatographie

10 x Strep•Tactin® Wash Buffer

10 x Strep•Tactin® Elution Buffer

8.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Konzentration der Proteinlösungen wurden zwei Methoden verwendet, zum einen wurde ein Bradford-Test mit anschließender photometrischer Analyse durchgeführt und zum anderen wurde die Proteinkonzentration direkt mit dem UV-Vis-Spektralphotometer NanoDrop™ 2000c der Firma Thermo Scientific (Schwerte) gemessen.

Für den Bradford-Test wurde das Roti® - Quant Reagenz der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet, welches den blauen Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 beinhaltet. Das Funktionsprinzip dieser Protein Quantifizierung beruht auf der Eigenschaft dieses Farbstoffes, durch die Komplexbildung mit Proteinen sein Absorptionsverhalten zu verändern. Im ungebundenen (kationischen) Zustand ist der Farbstoff rot und absorbiert bei einer Wellenlänge von 470 nm. Bindet der Farbstoff Proteine, wird er in einen anionischen Zustand überführt, und absorbiert nun bei 595 nm. Diese Änderungen der Wellenlängen und somit der Absorption verhält sich proportional zur gebundenen Proteinmenge. Sie kann photometrisch gemessen werden, und wird daher zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen verwendet. Da der Farbstoff eine höhere Affinität für basische Aminosäuren hat, absorbieren jeweilige Proteine unterschiedlich stark, so dass eine Referenzmessung mit einem Standard-Protein durchgeführt werden sollte. Dazu wurde hier eine Eichgerade mit dem Standard des Rinderalbumins BSA (engl. bovine serum albumin) erstellt. Für die photometrische Messung wurden 25 µl der Proteinproben sowie 25 µl der einzelnen Albuminkonzentrationen mit jeweils 925 µl der Roti® - Quant Lösung versetzt. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 5 min wurden 100 µl jeder Probe in eine Vertiefung einer Mikroplatte pipettiert und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Messung der Proteinkonzentration mit dem UV-Vis-Spektralphotometer NanoDrop™ wurde exakt nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Die Analyse und Dokumentation der Messergebnisse erfolgte mit der geräteeigenen Software.

8.4 Konzentrierung von Proteinlösungen und Dialyse durch Ultrafiltration

Mit Hilfe einer Ultrafiltration lassen sich Substanzen und Partikel, deren Größe sich im makromolekularen Bereich befindet, durch den Einsatz spezieller Membranen aus Lösungen entfernen. Dies kann zur Abtrennung bzw. Aufkonzentrierung gewünschter Partikel dienen. Niedermolekulare Substanzen dagegen verbleiben in der Lösung, so dass diese Methode auch zum Austausch von Pufferlösungen, hier als Dialyse bezeichnet, verwendet werden kann (Kapitel B 8.5). Für die Konzentrierung von Proteinen in Lösungen oder für die Durchführung

einer Dialyse wurden u.a. Amicon® Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten (Merck Millipore, Darmstadt) verwendet. Je nach Verwendungszweck wurden diese in verschiedenen Volumina und Molekulargewichtsabscheidungen (Ausschlussgrößen) eingesetzt. Die Anwendung dieser Filter erfolgte exakt nach den Angaben und Empfehlungen des Herstellers.

8.5 Dialyse

Die Dialyse dient ähnlich wie die Ultrafiltration der Abtrennung makromolekularer Substanzen aus Lösungen, während niedermolekulare Teilchen wie z.B. Ionen in dieser verbleiben. Diese Methode basiert auf dem Einsatz spezieller Filtermembranen und wurde zum einen zur Aufkonzentrierung der Proteine in Lösungen und zum anderen zum Austausch der entsprechenden Pufferlösungen durchgeführt. Dazu wurden u.a. die Slide-A-Lyzer® Dialyse Kassetten der Firma Thermo Scientific™ Pierce (Bonn) in unterschiedlichen Volumina und Ausschlussgrenzen verwendet (Abb. 15). Darüber hinaus wurden für diese Methode ZelluTrans Dialysiermembranen der Firma Roth (Karlsruhe), ebenfalls in verschiedenen Volumina und Ausschlussgrenzen verwendet. Bei der Durchführung wurde exakt nach den Angaben der Hersteller verfahren. Die Dialyse wurde in Gefäßen mit einem Fassungsvermögen von 2 Liter und einer Temperatur von 4 °C durchgeführt, um einen möglichst optimalen Pufferaustausch zu erreichen. Bei einem Probenvolumen von ca. 12 ml wurden jeweils 2 Liter Pufferlösung verwendet. Nach 2 Stunden Inkubation wurden 2 Liter Dialysepuffer ausgetauscht und dieser dann nach weiteren 2 Stunden Inkubation ein zweites Mal ausgetauscht. Anschließend wurde die Dialyse über Nacht weitergeführt.

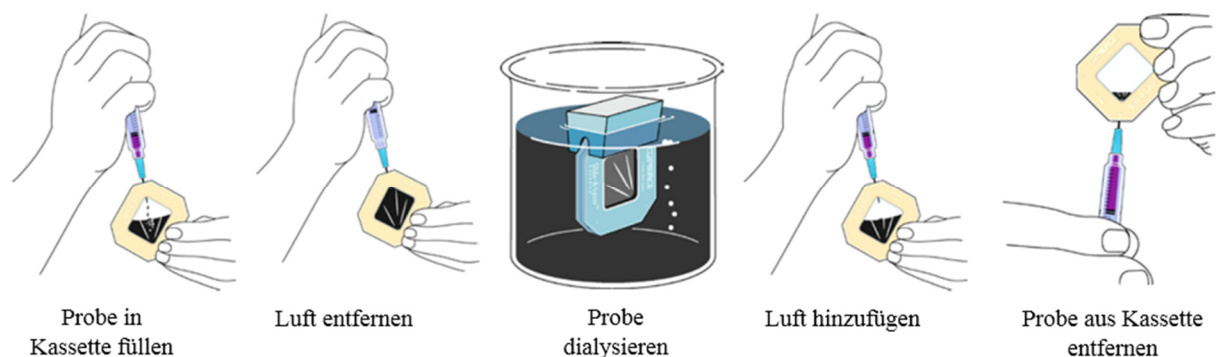


Abb. 15: Schema zur Verwendung der Slide-A-Lyzer™ Dialyse Kassetten
Verändert nach Thermo Scientific™ Pierce (<http://www.piercenet.com/instructions/2160729.pdf>).

8.6 Polyacrylamidgelelektrophorese

8.6.1 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ist eine Form der Gelelektrophorese (Kapitel B 5.5), bei der die elektrophoretische Trennung von DNA- oder Proteinmolekülen in einer gitterartigen Matrix aus Polyacrylamid unter dem Einfluss von Natriumdodecylsulfat stattfindet. Der Durchmesser der Gitter- bzw. Porenstruktur der Matrix, lässt sich über den Polyacrylamidanteil im Gel individuell an die Größe der aufzutrennenden Moleküle anpassen. Das Detergens SDS ist in der Lage, die Eigenladungen von Proteinen zu überdecken, so dass die Auftrennung nur nach Größe der Moleküle und nicht nach deren Ladung erfolgt. Dieses Analyseverfahren wurde angewendet um die vorliegenden Proteine näher zu charakterisieren und erfolgte nach dem von Ulrich K. Laemmli entwickelten denaturierenden und diskontinuierlichen System (Laemmli, 1970). Mit Hilfe dieser Methode konnten Rückschlüsse auf die Qualität bzw. Integrität, die Quantität, sowie die Größe und Zusammensetzung der Proteine gezogen werden.

Vorbereitung der Proben:

Zur Vorbereitung der Proben wurden 30 µl Proteinlösung mit 10 µl Roti®-Load 1 (4 fach Konz.) der Firma Roth (Karlsruhe) versetzt, welches als reduzierender Ladepuffer den Abbau der Proteine während der Hitzedenaturierung verhindert. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 10 min im Heizblock inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Durchführung:

Für die Durchführung wurden die vorgefertigten NuPAGE® Novex® Bis-Tris 1,0 mm Polyacrylamidgele und das zugehörige XCell Sure Lock™ Mini-Cell Electrophoresis System der Firma Life Technologies (Darmstadt) verwendet. Je nach Verwendungszweck kamen dabei Gele unterschiedliche Spurengrößen (10 well bis 15 well) und Polyacrylamid-Anteile (10 %, 12% und 4-12%) zum Einsatz. Als Laufpuffer wurde je nach Bedarf der NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20 x) oder der NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20 x) (Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Um die Größe der Proteine im Gel bestimmen zu können wurde als Größenstandard der Precision Plus Protein™ Dual Color (Bio-Rad, München) verwendet. Welche Kombination von Spurengröße, Polyacrylamid-Anteil und Laufpuffer jeweils verwendet wurde ist an entsprechender Stelle im Text näher erläutert. Die Vorbereitung der Gele, der Laufpuffer sowie der Elektrophorese-Apparatur erfolgte dabei exakt nach den Vorgaben des Herstellers.

Anschließend wurden die vorbereiteten Proben vorsichtig mit runden MultiFlex Pipettenspitzen der Firma Sorenson BioScience (Salt Lake City, USA) in die Geltaschen pipettiert und die Kammer mit dem entsprechenden Laufpuffer gefüllt. Die zu Beginn angelegte Spannung betrug 80 V und wurde nach ca. 10 min Laufzeit auf 100 V erhöht.

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele aus den vorgefertigten Kassetten herausgelöst und für einige Minuten zur Entfernung des SDS-haltigen Laufpuffers in VE-H₂O gewässert. Dies ist erforderlich, da SDS die nachfolgenden Reaktionen stören kann. Nach der Entfernung des Laufpuffers konnten die Gele gefärbt werden (Kapitel B 8.6.2) oder für einen Western Blot (Kapitel B 8.7) verwendet werden.

8.6.2 Färbung der SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie-Brillantblau

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden mit SimplyBlue™

SafeStain (Life Technologies, Darmstadt), einem auf der kolloidalen Färbelösung Coomassie® G-250 basierenden Systems, gefärbt. Dazu wurden die Gele nach der Entfernung des Laufpuffers in eine adäquate Menge der Färbelösung getaucht, und über Nacht bei Raumtemperatur und leichter Bewegung auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und die Gele in VE-H₂O ca. 1 Stunde entfärbt, um eine Störung der Proteindetektion durch die Hintergrundfärbung zu verhindern. Dabei wurden die Gele auf einem Schüttler leicht bewegt und das VE-H₂O mehrmals gewechselt.

8.7 Western Blot

8.7.1 Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen

Um die mit Hilfe der SDS-PAGE (Kapitel B 8.6.1) aufgetrennten Proteine immunologisch zu detektieren wurden diese auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Dazu wurde das iBlot™ Gel Transfer System mit den dazugehörigen iBlot® Gel Transfer Stacks aus Nitrocellulose (Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Die Durchführung des Transfers erfolgte exakt nach Angaben des Herstellers, dabei wurde eine Transferzeit von 6 min bei 20 Volt gewählt.

8.7.2 Antikörper für die Immunodetektion

Die via Western Blot auf Nitrocellulose-Membranen übertragenen Proteine konnten nun mit verschiedenen Antikörpern immunologisch detektiert werden. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Protein-Tags, Hexahistidin-Tag (His₆) und Strep•Tag® II dienten nicht nur der Aufreinigung der Proteine, sondern konnten zusätzlich mit Hilfe Tag-spezifischer Antikörper zum Nachweis der Proteine in anschließenden Analysen verwendet werden. Zusätzlich wurde für das Protein Sd_nrp ein spezifischer polyklonaler Antikörper hergestellt, welcher ebenfalls für immunologische Nachweisreaktionen des Proteins zum Einsatz kam.

8.7.2.1 Anti-His (C-term) Antikörper

Für die immunologische Detektion des Sd_nrp (Konstrukt 1) auf einer Nitrocellulose-Membran wurde der Anti-His (C-term) Antikörper der Firma Invitrogen (Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Er erlaubt den Nachweis rekombinanter Proteine, welche C-terminal über einen His-Tag verfügen. Als sekundärer Antikörper wurde der Anti-Maus IgG Alkalische Phosphatase der Firma Sigma-Aldrich (Hamburg) verwendet. Die jeweils eingesetzten Verdünnungen der Antikörper sind an entsprechender Stelle im Text erläutert.

8.7.2.2 Anti-Sd_nrp Antikörper

Für den immunologischen Nachweis des rekombinanten Proteins Sd_nrp wurde ein spezifischer polyklonaler Antikörper hergestellt. Die Gewinnung des Immunserums bzw. des polyklonalen Antikörpers Anti-Sd_nrp ist in Kapitel B 8.8 detailliert beschrieben. Aufgrund der Immunisierung im Kaninchen, wurde hier als sekundärer Antikörper der Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Alkalische Phosphatase (hergestellt in der Ziege; Firma Sigma-Aldrich, Hamburg) verwendet. In welchen Verdünnungen die Antikörper jeweils eingesetzt wurden, ist an entsprechender Stelle im Text näher erläutert.

8.7.2.3 Strep•Tag® II Monoklonaler Antikörper

Zur Detektion des rekombinanten Proteins Sd_nrp (Konstrukt 2) über den Strep•Tag® II wurde der spezifische monoklonale Strep•Tag® II Antikörper der Firma Novagen (Merck Millipore, Darmstadt) verwendet. Vor der Verwendung auf der Nitrocellulose-Membran wurde der Antikörper mit einer 0,5 prozentige Lösung aus Western Blocking Reagent (Roche, Mannheim) und TBS Puffer im Verhältnis 1 : 5000 verdünnt. Für die Färbereaktion mit dem sekundären Antikörper wurde der Anti-Maus IgG Antikörper Alkalische Phosphatase (Sigma-Aldrich, Hamburg) verwendet.

8.7.3 Immunodetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen wurden diese für die Immunodetektion vorbereitet. Dazu wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen zunächst 1 Std bei RT in Blockierungslösung inkubiert. Zur Herstellung der Blockierungslösung wurde das Western Blocking Reagent der Firma Roche (Mannheim) in einer 1%igen Verdünnung mit TBS Puffer verwendet. Anschließend wurde die Membran 2 mal 5 min mit TBST Puffer gewaschen und mit dem primären Antikörper versetzt. Der primäre Antikörper wurde zuvor mit einer 0,5 prozentige Lösung aus Western Blocking Reagent und TBS Puffer verdünnt. Dabei wurden unterschiedliche Verdünnungen von z.B. 1 : 1000 bis zu 1 : 3000 eingesetzt (Kapitel B 8.8.2.1, 8.8.2.2 und 8.8.2.3). Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper wurde entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Membran 3 mal 5 min mit TBST Puffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper versetzt, der zuvor mit einer 0,5%igen Lösung aus Western Blocking Reagent und TBS Puffer verdünnt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei RT unter leichter Bewegung wurde die Membran 3 mal 5 min mit TBST Puffer und 2 mal 5 min mit TBS Puffer gewaschen. Zur Äquilibration der Membran, wurde diese 5 min mit dem Reaktionspuffer bei RT inkubiert und die Puffer-Lösung anschließend entfernt. Für die Detektion bzw. Farbreaktion der alkalischen Phosphatase wurde die NBT / BCIP Stock Solution der Firma Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers angesetzt und verwendet. Dazu wurden 200 µl der NBT / BCIP Stock Solution zu 10 ml Reaktionspuffer pipettiert und die Lösung dann auf die Membran gegeben. Die Farbreaktion zeigte sich meist unter leichter Bewegung der Membran schon nach wenigen Minuten, und wurde dann durch intensives Waschen der Membran mit VE-H₂O gestoppt. Anschließend wurden die Membranen zwischen zwei Papiertüchern vorsichtig getrocknet und dokumentiert (Kapitel B 8.8.4). Die hier verwendeten Lösungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

Verwendete Lösungen	Reaktionspuffer zur Verwendung der NBT / BCIP Stock Solution	
Western Blocking Reagent (Roche)	Tris-HCl	0.1 M (pH 9 ; 20 °C)
NBT / BCIP Stock Solution (Roche)	NaCl	0.1 M
TBS (20 x) - Pulver (AppliChem, Darmstadt)	MgCl ₂	10 mM
TBST Roti® - Stock (10 x)		
Alle Lösungen und Puffer wurden nach Angaben des Herstellers angesetzt.		

8.7.4 Dokumentation der SDS-Gele und Western Blots

Nach der Färbung der SDS-Gele mit Coomassie-Brillantblau (Kapitel B 8.6.2) wurden diese mit dem Odyssey[®] Infrared Imaging System (LI-COR[®] Biosciences; Nebraska, USA) dokumentiert und digitalisiert. Die Nitrocellulose-Membranen der Western Blots wurden nach der Immunodetektion (Kapitel B 8.7.3) zunächst zwischen Papiertüchern getrocknet und anschließend mit einem Flachbettscanner Perfection 1250 der Firma Epson (Meerbusch) eingescannt und digitalisiert.

8.8 Herstellung polyklonaler Antikörper

Um das Nanos-verwandte Protein Sd_nrp aus dem marinen Schwamm *Suberites domuncula* im Gewebe bzw. in den Zellkompartimenten identifizieren zu können, wurde ein für dieses Protein spezifischer polyklonaler Antikörper hergestellt. Zur Gewinnung dieser Antikörper werden Versuchstiere mit einem Antigen immunisiert, für welches man anschließend die Nachweisreaktion benötigt. Nach erneuter Immunisierung können die Antikörper aus dem Serum der Tiere isoliert werden. Bei dieser Art Antikörper handelt es sich um ein Gemisch von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität und Affinität, welche verschiedene Stellen der Antigenoberfläche erkennen. Jeder einzelne Antikörper in diesem Gemisch, erkennt ein spezifisches Epitop und wird jeweils nur von einem einzigen B-Lymphozyten-Klon im Blut gebildet. Die Immunantwort basiert auf einer Vervielfältigung mehrerer unterschiedlicher Zellklone, weshalb sie auch als polyklonal bezeichnet werden (Renneberg et al., 2012).

Die Immunisierung und Serumgewinnung sowie die Bestimmung des Antikörpertiters via ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) wurden von Frau Dr. Diehl-Seifert durchgeführt. Mit Hilfe der ELISA-Analyse wurde der Antikörper auf seine Funktion und Eigenschaften hin getestet. Im Anschluss an die Herstellung des Immunserrums, wurde dessen Spezifität zusätzlich via Immunblot überprüft. So konnten weitere Informationen für das geeignete Verdünnungsverhältnis des Antikörpers und der einzusetzenden Proteinkonzentration gewonnen werden.

8.8.1 Immunisierung und Serumgewinnung

Zunächst wurde einem jungen weiblichen Kaninchen der Rasse Weiße Neuseeländer zur Herstellung des Prä-Immunsersums Blut entnommen, bevor es mit dem rekombinant hergestellten Nanos-verwandten Protein Sd_nrp (Kapitel C 1.4) drei Mal immunisiert wurde. Dabei lagen zwischen der ersten und zweiten Immunisierung ca. 5 Wochen, und zwischen der zweiten und dritten ca. 3 Monate. Jeweils nach der zweiten und der dritten Immunisierung erfolgten dann die Blutentnahmen zur Serumgewinnung. Die Blutproben nach der Immunisierung (1,9 und 3,9 ml) sowie die Blutprobe vor der Immunisierung wurden zur Serumgewinnung zunächst 1 h bei 37 °C und dann 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei ca. 13.000 x g für 10 min zentrifugiert, um das Serum von den geronnenen Blutbestandteilen zu trennen. Das Serum wurde dann aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

8.8.2 Bestimmung des Antikörpertiters via ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Um die höchstmögliche Verdünnungsstufe des Antikörpers zu ermitteln, bei der noch eine Reaktion mit dem gewünschten/entsprechenden Antigen nachweisbar ist, also noch genügend Antikörper vorhanden ist, wurde ein antikörperbasierendes Nachweisverfahren, ein sogenannter ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) durchgeführt. Dazu wurden ELISA Mikrotiterplatten (Falcon®, Pro-Bind™ 96-Well Plates; Becton, Dickinson and Company; Heidelberg) mit dem entsprechenden Antigen beschichtet und anschließend mit Serum bzw. Prä-Immunsersum als Negativkontrolle inkubiert. Nun wurde der primäre Antikörper durch den Einsatz eines sekundären Antikörpers detektiert und die Komplexbildung mit Hilfe einer Farbstoffreaktion sichtbar gemacht. Dies wird durch das an den sekundären Antikörper gebundene Enzym Peroxidase ermöglicht.

In die Vertiefungen der 96-Well ELISA-Mikrotiterplatten wurden jeweils 100 µl Antigenlösung (10 µg/ml in PBS) pipettiert und 3 Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten drei Mal mit PBS gewaschen um die nichtgebundenen Komponenten zu entfernen. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Vertiefungen jeweils mit 150 µl 3%iger PBS/BSA-Lösung 3 h bei RT inkubiert und erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Zur Analyse der Antikörper Reaktion wurde mit einer 0,3%iger PBS/BSA-Lösung wie folgt eine Verdünnungsreihe des Serums und Prä-Immunsersums angesetzt.

Begonnen wurde mit einer 1 : 100 Verdünnung, die dann durch weitere 1 : 1 Verdünnungen bis zu einer 1 : 200.000 Verdünnung fortgeführt wurde. Von den Verdünnungen wurden jeweils 100

μl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert, 1 h bei RT inkubiert und drei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der mit einer Peroxidase gekoppelte sekundäre Anti-Rabbit Antikörper mit 0,3 prozentige PBS/BSA-Lösung 1 : 2000 verdünnt und je Vertiefung 100 μl davon eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurden die Vertiefungen drei Mal mit PBS gewaschen und 100 μl der gebrauchsfertigen Substratlösung SureBlue Reserve™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component) der Firma KPL (Gaithersburg, USA) in die Vertiefungen pipettiert. Nach wenigen Minuten entwickelte sich eine deutliche Farbreaktion, die durch das Enzym katalysiert wurde. Durch die Zugabe von 25 μl H_2SO_4 (1 M) wurde die Reaktion abgestoppt und die Mikrotiterplatten in einem Multifunktions-Spektralreader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und ausgewertet.

8.9 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Immunfluoreszenz ist eine analytische Methode zum Nachweis bestimmter Proteine mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern. So können Hinweise zum Expressionsort und zur Lokalisation eines bestimmten Proteins im Gewebe und in Zellkompartimenten gewonnen werden. Dazu wird zunächst ein primärer Antikörper zur Erkennung des Antigens im Gewebe eingesetzt. Anschließend kommt ein sekundärer Antikörper zum Einsatz, welcher in der Lage ist den primären Antikörper zu erkennen. Dieser sekundäre Antikörper ist mit Markern oder Konjugaten gekoppelt, deren Signal detektiert werden kann. Über dieses Signal, im Fall eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers die Lichtemission, kann der primäre Antikörper erkannt werden. Mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopen können dann die Fluoreszenzfarbstoffe, auch Fluorochrome genannt, mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt werden. Das wiederum als Resonanz auf die Anregung von diesen Farbstoffen abgestrahlte Licht hat eine abweichende Wellenlänge und kann mit speziellen Filtern der Mikroskope beobachtet und dargestellt werden (Pawley, 2010). Die Auswahl der Filter erfolgte je nach verwendetem Farbstoff und ist u.a. abhängig vom jeweiligen Mikroskop.

8.9.1 Fixierung des Gewebes und Anfertigung der histologischen Schnitte

Zur Anfertigung histologischer Schnitte ist es notwendig die Gewebeproben zunächst in Kunststoff zu fixieren. Dazu wurde das Technovit® 8100 2-Komponenten-Kunststoff System der Firma Heraeus Kulzer (Wehrheim) verwendet. Für den anschließenden Nachweis des Proteins Sd_nrp via Immunfluoreszenz wurden drei verschiedene Gewebetypen des Schwammes *Suberites domuncula* verwendet und analysiert:

1. Pinacoderm und assoziierte Zellschichten
2. Primmorphe (4 Tage alt, Kapitel C 3)
3. Gemmulae (Dauerstadien der Schwämme, Kapitel A 1.2)

Gewinnung der verschiedenen Gewebeproben:

Für die Entnahme der Gewebeprobe wurde mit Hilfe eines sterilen Skalpells das Pinacoderm des Schwammes wenige Millimeter tief eingeschnitten und ein Teil davon abgetrennt, so dass man einen guten Querschnitt durch die oberen Zellschichten erhält. Die Primmorphe wurden 4 Tage kultiviert und ausschließlich unbeschädigte Exemplare für die Fixierung verwendet. Zur Gewinnung der Gemmulae, wurden diese vorsichtig mit Hilfe eines sterilen Skalpells und einem Teil der darunterliegenden Schneckenschale entnommen, um diese möglichst unversehrt zu erhalten. Die Gemmulae waren sehr fragil und wurden daher samt der darunterliegenden dünnen Schalenschicht fixiert.

Fixierung:

Für die Fixierung wurden die ca. 1-2 mm großen Gewebeproben zunächst in etwas VE-H₂O gespült und in kleine Glasgefäße mit Verschluss überführt. Das Gewebe wurde dann mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) und 2 prozentiger PFA-Lösung (Paraformaldehyd) in einem Mischungsverhältnis von 1:1 versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zum Auswaschen der Fixierungslösung wurden die Proben anschließend in 6,8%ige Saccharose in PBS erneut über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Entwässerung:

Zur Entwässerung der Proben wurden diese sehr vorsichtig in 100 prozentigen Aceton überführt. In den ersten Minuten wurde die Acetonlösung zunächst so lange gewechselt, bis keine Trübung mehr zu erkennen war. Danach erfolgte eine Inkubation für 60 min bei 4 °C.

Infiltration:

Zunächst wurde die Infiltrationslösung aus den in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Komponenten angesetzt und die Gewebeproben vorsichtig in die Lösung überführt. Die Inkubation der Proben erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Infiltrationslösung	
100 ml	Basisflüssigkeit Technovit 8100
0,6 g	Härter I (1 Beutel)

Einbettung:

Das Einbettmittel wurde aus den in der weiter unten aufgeführten Tabelle angesetzt und die Gewebeproben vorsichtig in diese überführt. Während der 5 minütigen Inkubation wurden die Mulden der vorgekühlten Einbettform, die Histoform S der Firma Heraeus Kulzer (Wehrheim), etwa zur Hälfte mit Einbettmittel gefüllt, und die Proben im Anschluss an die Inkubationszeit darin positioniert. Nun wurden die Mulden vollständig mit dem Einbettmittel gefüllt bis eine deutliche Wölbung der Oberfläche zu erkennen war. Die Flüssigkeit wird nun möglichst luftblasenfrei und luftdicht mit den an die Muldengröße angepassten Folien abgedeckt. Zur Polymerisation wurde die Einbettform über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Einbettmittel	
15 ml	Infiltrationslösung (siehe Tabelle oben)
0,5 ml	Härter II

Aufblocken:

Nach der vollständigen Polymerisation wurden die Folien vollständig von den Mulden entfernt und die Histoblocs in die vorgesehenen Aussparungen der Einbettform (Histoform S) gelegt. Zur Befestigung der Histoblocs an dem auspolymerisierten Kunststoff, wird das Technovit 3040 System verwendet. Der 2-Komponenten-Kunststoff auf Methylmethacrylat-Basis wurde im Mischungsverhältnis 2:1 (2 Teile Pulver + 1 Teil Lösung) angesetzt und in die vorgesehenen Vertiefungen der Histoblocs gegossen. Nach ca. 10 min konnten die Proben aus der Form gelöst werden. Anschließend wurden die Blöcke noch ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Alle hier verwendeten Komponenten stammen von der Firma Heraeus Kulzer (Wehrheim) und sind in der nachfolgenden Tabelle nochmal einzeln aufgeführt:

Verwendete Lösungen und Materialien

Technovit® 8100 (2-Komponenten-Kunststoff System)

Histoform® S (Einbettform)

Technovit® 3040 gelb (schnellhärtender 2-Komponenten- Kunststoff)

Histobloc®-Trägereile

8.9.2 Anfertigung der Schnitte mit dem Mikrotom

Für die Anfertigung der Schnitte wurde mit einem Mikrotom Schneidegerät RM 2145 der Firma Leica (Wetzlar) gearbeitet. Aufgrund der Beschaffenheit und der besonderen Härte der Schwamm-Spiculae, welche auch Teil der Probe waren, wurde mit einem Edelmessmesser gearbeitet. Zu Beginn wurde eine Schichtdicke von 10 µm gewählt, um bis zu einer gewissen Tiefe in die Probe vorzudringen. Anschließend wurden einige stabile Schnitte mit einer Schichtdicke von ca. 5 µm angefertigt. Im optimalen Probenbereich wurden dann Schnitte mit einer endgültigen Schichtdicke von 3 µm angefertigt. Direkt nach dem Schneidevorgang wurden die Schnitte vorsichtig mit einer Mikropinzette in ein Streckbad aus destilliertem Wasser überführt. Nach dem Entspannen und Ausbreiten der Schnitte wurden diese mit speziell beschichteten Objektträgern (Silane-Prep Slides; Sigma-Aldrich™, Hamburg) aus dem Wasserbad aufgenommen, und auf einem temperierten (ca. 37 °C) Paraffinstrecktisch über Nacht getrocknet. Anschließend wurden sie bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

8.9.3 Inkubation der histologischen Schnitte mit primärem Antikörper

Die histologischen Schnitte wurden zunächst nach der Lagerung bei 4 °C auf Raumtemperatur gebracht. Um dem Antikörper den Zugang zum Antigen zu ermöglichen, erfolgte ein weiterer Fixierungsschritt zur Permeabilisierung der Zellmembranen. Zu diesem Zweck wurde die Triton X-100 Detergent Solution der Firma Thermo Scientific (Schwerte) verwendet und diese zuvor mit VE-H₂O zu einer 0,1 prozentigen Lösung verdünnt. Die Schnitte wurden dann ca. 30 min mit dieser Lösung in einem Färbetrog für Objektträger der Firma Roth (Karlsruhe) inkubiert und anschließend in PBS Lösung pH 7,4 4-5-mal für ca. 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Dabei wurde nach jedem Waschschriff die Pufferlösung erneuert. Die überschüssige Pufferlösung wurde nun kurz von den Schnitten abgetropft und dann zum Blockieren eine 1:100 Verdünnung von Eselserum in PBS/BSA 0,3 prozentige Lösung aufgetragen. Die Schnitte

wurden nun 30 min bei RT mit dem Eselserum inkubiert. Dann wurde das überschüssige Serum abgetropft und die Schnitte mit dem primären polyklonalen Anti-Sd_nrp Antikörper gefärbt. Dazu wurden mit 0,3 prozentige PBS/BSA-Lösung zunächst verschiedene Antikörperverdünnungen (z.B. 1:50, 1:100, 1:200, 1:500) hergestellt und die Schnitte über Nacht in einer feuchten Kammer (Färbekammer Stain TrayTM; Firma Simport, Kanada) bei 4 °C mit den verschiedenen Antikörperkonzentrationen inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper durch 4 - 5 Waschschrte mit PBS für jeweils 10 min bei RT, wieder entfernt. Als Negativkontrolle für die Färbung mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte parallel mit Prä-Immunserum auf die gleiche Weise gefärbt.

8.9.4 Inkubation der histologischen Schnitte mit sekundärem Antikörper

Nach der Entfernung des primären Antikörpers bzw. im Fall der Negativkontrolle, nach der Entfernung des Prä-Immunserums, wurden die Schnitte mit dem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3 der Firma Dianova (Hamburg) gefärbt. Der Antikörper wurde in lyophilisierter Form bezogen und nach den Empfehlungen des Herstellers angesetzt. Dazu wurde er in 0,25 ml destilliertem Wasser und 0,25 ml Glycerin aufgenommen, vorsichtig gelöst und in aliquotierter Form bei -20 °C gelagert. Die Lagerung und der Umgang mit dem Antikörper erfolgten stets lichtgeschützt. Für die Färbung wurde der Antikörper mit 0,3 prozentige PBS/BSA-Lösung 1 : 100 verdünnt und die Schnitte darin für 1½ Stunden bei RT in einer feuchten und dunklen Kammer inkubiert. Anschließend wurde der Antikörper durch 4 - 5 Waschschrte mit PBS für jeweils 10 min bei RT wieder entfernt, und überschüssiges PBS von den Schnitten kurz abgetropft.

8.9.5 Färbung der histologischen Schnitte mit DAPI

Für die Färbung der Zellkerne in den histologischen Präparaten wurde der die DNA markierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) eingesetzt. Die Färbung der Zellkerne sowie die Eindeckung der Präparate erfolgten hier in einem Schritt mit Roti®-Mount FluorCare DAPI (Roth, Karlsruhe). Zunächst wurde die Probe auf dem Objektträger mit der Lösung bedeckt und diese dann vorsichtig ohne den Einschluss von Luftblasen mit einem Deckglas verschlossen. Nach einer kurzen Trocknungszeit wurden die Ränder der Deckgläser auf den Objektträgern mit klarem Nagellack abgedichtet. Die Präparate konnten anschließend direkt für die mikroskopischen Analysen verwendet werden.

8.9.6 Mikroskopie und Dokumentation der histologischen Schnitte

Die mikroskopischen Untersuchungen der gefärbten Schnitte wurden mit dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 710 der Firma Zeiss (Göttingen) durchgeführt. Zur Anregung des Cy3 Fluoreszenzfarbstoffes wurde der Helium-Neon-Laser mit einer Wellenlänge von 543 nm und zur Anregung des DAPI Fluoreszenzfarbstoffes wurde der Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 405 nm verwendet. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit der Software ZEN der Firma Zeiss. Darüber hinaus wurden die Präparate auch mit einem Vanox AHB T3 Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus (Hamburg) analysiert und mit der geräteeigenen Software dokumentiert.

8.10 Extraktion von Proteinen aus Schwammgewebe

Neben der rekombinanten Expression und der anschließenden Aufreinigungsverfahren zur Gewinnung des Nanos-verwandten Proteins Sd_nrp wurde auch eine Extraktion dieses Proteins direkt aus dem Gewebe von *Suberites domuncula* durchgeführt. Dazu wurden zunächst unterschiedliche Puffer zur Extraktion des Proteins hergestellt, sowie unterschiedliche Gewebeproben präpariert, aus denen das Protein isoliert werden sollte. Die Zusammensetzung der einzelnen Extraktionspuffer ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Komponenten der Extraktionspuffer			
Puffer a / pH 7.5		Puffer b / pH 8.0	
Tris – HCl	50 mM	Tris – HCl	50 mM
NaCl	100 mM	NaCl	500 mM
EDTA	1 mM	Na ₂ SO ₄	7 mM
Urea	2 M	NaHCO ₃	0.4 mM
		EDTA	20 mM
Puffer c / pH 9.0		Puffer d / pH 7.5	
Tris – HCl	50 mM	Tris – HCl	50 mM
NaCl	150 mM	EDTA	1 mM
Na ₂ SO ₄	7 mM		
NaHCO ₃	0.4 mM		
EDTA	1 mM		
Puffer e / pH 8.0		Puffer f / pH 7.5	
Tris – HCl	50 mM	Tris – HCl	50 mM
NaCl	150 mM		
Na ₂ SO ₄	7 mM	Puffer g / pH 7.0	
NaHCO ₃	0.4 mM	PBS – Puffer	20 mM
EDTA	20 mM	NaCl	150 mM

8.10.1 Isolierung des Nanos-verwandten Proteins Sd_nrp aus dem Gewebe von *Suberites domuncula*

Mit Hilfe eines sterilen Skalpells wurde ein 1 - 2 cm großes Gewebestück vom Schwamm abgetrennt, zerkleinert und zur Entfernung des Wassers vorsichtig in einem Papiertuch gepresst. Für die vollständige Zerkleinerung des Gewebes wurde ein Reaktionsgefäß des Precellys Keramik-Kit 1.4 mm der Firma Peggab (Erlangen) mit 1 ml PBS Puffer bzw. einem in der Tabelle (Kapitel B 8.11) aufgeführten Puffer und Protease-Inhibitor versetzt.

Dann wurden ca. 0,5 bis 1 g Gewebe in das Reaktionsgefäß gefüllt und in einem Precellys® Homogenisator zwei mal 15 s homogenisiert. Während der Pausierungen und während aller weiteren Arbeitsschritte, wurden die Proben stets auf Eis gekühlt, um eine Degradierung der Proteine zu verhindern. Im Anschluss an die Homogenisierung wurden die Proben bei 17.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 4 mal 10 s mit einem Ultraschallgerät sonifiziert. Dabei wurde die Probe auch während der Sonifizierung auf Eis gekühlt. Im Anschluss wurde das Homogenisat erneut bei 17.000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der das Proteinextrakt enthaltende Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und eine Probe davon für die Analyse in einer SDS-PAGE separiert. Der übrige Extrakt wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die verwendeten Lösungen und Materialien sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt, und wurden den Angaben und Empfehlungen der Hersteller entsprechend eingesetzt. Von dem Protease Inhibitor wurde eine 10 x konzentrierte Lösung hergestellt und diese dann in der erforderlichen Menge zu den jeweiligen Extraktionspuffern pipettiert.

Verwendete Lösungen und Materialien

Tabletten	Protease Inhibitor Cocktail: complete, Mini, EDTA-free (Roche, Mannheim)
Reaktionsgefäße	Precellys Keramik-Kit 1.4 mm (Peggab, Erlangen)

9. Zellkultur

9.1 Dissoziation von Schwammzellen und Kultivierung von Primmorphen

Primmorphe sind eine spezielle Form von 3D-Zellaggregaten bei Schwämmen. Löst man Schwammzellen aus ihrem Zellverband im Gewebe, dann bilden diese solitären Schwammzellen spontan neue Zellkontakte aus, nachdem sie in ein geeignetes Kulturmedium überführt wurden. Nach einigen Tagen kann man die Neubildung kleiner, schwammartiger Gebilde beobachten, die dann als Primmorphe bezeichnet werden.

Durchführung:

Mit Hilfe eines Skalpells wurde ein ca. 1 cm² großes Stück aus dem Pinacoderm des Schwammes *Suberites domuncula* herausgeschnitten und in eine Petrischale mit calcium- und magnesiumfreien Meerwasser (nachfolgend als CMFSW bezeichnet), versetzt mit EDTA (CMFSW + EDTA), überführt. Das Schwammstück wurde dann in ca. 1 mm² große Stücke geschnitten, ohne das Meerwasser in ein Zentrifugengefäß (PP Greiner bio-one, Frickenhausen) mit 50 ml CMFSW + EDTA überführt und für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Rollschüttler bewegt. Anschließend wurde die Lösung über Gaze gefiltert und in einem neuen Gefäß für 5 min bei 1800-5000 x g abzentrifugiert. Die restlichen Schwammstücke wurden in 50 ml CMFSW + EDTA + DTT überführt, und für 30 min auf dem Rollschüttler bewegt. Diese Lösung wurde nun ebenfalls über Gaze gefiltert und anschließend in einem neuen Gefäß für 5 min bei 1800 - 5000 x g abzentrifugiert.

Die beiden Pellets wurden jeweils direkt nach dem Zentrifugationsschritt von dem Überstand getrennt, in 25 ml CMFSW aufgenommen und vereinigt. Dann erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 1800 - 5000 x g. Das Pellet wurde nun in 2 ml Kulturmedium aufgenommen und zur Entfernung der Spiculae mit einer Tischzentrifuge kurz anzentrifugiert. Mit einer 200 µl Pipette wurde nun nur die Zellsuspension aufgenommen und mit dem restlichen Kulturmedium in ein neues Gefäß überführt, ohne die pelletierten Spiculae mit aufzunehmen. Durch vorsichtiges auf- und abpipettieren wurde dann die Zellsuspension etwas gelöst und in eine Vertiefung einer 12-Well Zellkulturplatte überführt. Die Zellkulturplatte wurde nun bei 16 °C unter leichter Bewegung inkubiert. Alle ein bis zwei Tage wurde das Medium mit Hilfe einer Pipette vorsichtig gewechselt. Nach vier Tagen wurde der Primmorph unter dem Mikroskop fotografisch dokumentiert und anschließend für die Einbettung in Kunststoff vorbereitet (Kapitel B 8.9.1).

Sämtliche der hier verwendeten speziellen Lösungen, Medien und Materialien sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

CMFSW		Antibiotika Lösung	
NaCl	460 mM	Penicillin G Kaliumsalz	4,26 g
Na ₂ SO ₄	7 mM	Streptomycin Sulfat	2 g
KCl	10 mM	NaCl	522 mg
Hepes	10 mM	VE-H ₂ O	ca. 58 ml
Antibiotika Lösung	1 ml (siehe rechts)		
Mit VE-H ₂ O auf 1 l auffüllen.		Mit VE-H ₂ O auf 58 ml auffüllen und vor Gebrauch mit einem 2 µm Spritzenfilter filtrieren.	

Kulturmedium für Primmorphe		CMFSW (+ EDTA + DTT)	
Meerwasser, steril	1 L	CMFSW	50 ml
filtriert	10 mM	EDTA Lösung 0,5 M	250 µl
Hepes	10 µM	DTT Lösung 1 M	50 µl
Eisencitrat	5 mg		
Seesand	0,2 g / ml		
GlutaMAX™	(= 5 ml)		
Pyruvat	1 g / L		
Antibiotika Lösung	2 ml (siehe oben)		
Vor der Zugabe des Seesandes den pH-Wert auf 8,0 einstellen und anschließend die Lösung autoklavieren. Dann erst GlutaMAX™, Pyruvat und Antibiotika Lösung zusetzen.		Die Lösung wird jeweils frisch in der benötigten Menge angesetzt.	

Verwendete Lösungen und Materialien

Meerwasser, steril filtriert	(Sigma-Aldrich, Hamburg)
Seesand, gereinigt	(Merck Millipore, Darmstadt)
Streptomycinsulfat	(Sigma-Aldrich, Hamburg)
Penicillin G – Kaliumsalz	(Sigma-Aldrich, Hamburg)
GlutaMAX™	(Gibco®, Life Technologies, Darmstadt)
DL-Dithiothreitol (DTT) 1 M Lösung	(Sigma-Aldrich, Hamburg)
Eisen(III)-citrat	(Sigma-Aldrich, Hamburg)
Natriumpyruvat 100 mM	(Merck Millipore, Darmstadt)
EDTA 0,5 M Lösung	(AppliChem, Darmstadt)
Nylon-Gaze 20 µm	(z.B. Partec GmbH, Münster)

C Ergebnisse

1. Expression und proteinbiochemische Analyse des rekombinanten *Sd_nrp* (*Suberites domuncula* Nanos-verwandtes Protein)

1.1 Identifizierung, Amplifizierung und Klonierung der cDNA von *Sd_nrp*

Zu Beginn des Projektes wurde bei einer Datenbankrecherche der EST-Datenbank von *Suberites domuncula* (Eigentum der AG von Prof. W.E.G. Müller) ein EST-Klon entdeckt, der bei einer anschließenden BLAST-Suche der NCBI Protein-Datenbank (Kapitel B 6.1) eine hohe Sequenzidentität zu Nanos-homologen Proteinen aufwies und als Nanos-verwandtes RNA-Bindeprotein identifiziert werden konnte. Bei der durchgeführten BLASTx-Suche wurde die Proteindatenbank mithilfe einer translatierten Nukleotidsequenz als Suchanfrage durchsucht. Um die vollständige kodierende Sequenz des Gens inklusive der beiden untranslatierten Bereiche, 5'- und 3'-UTR zu amplifizieren, wurden jeweils ausgehend vom N- und C-Terminus des EST-Klons, genspezifische Primer generiert (Abb. 16). Dabei wurde sowohl am N-Terminus als auch am C-Terminus für einen ausreichend großen Überlappungsbereich gesorgt.

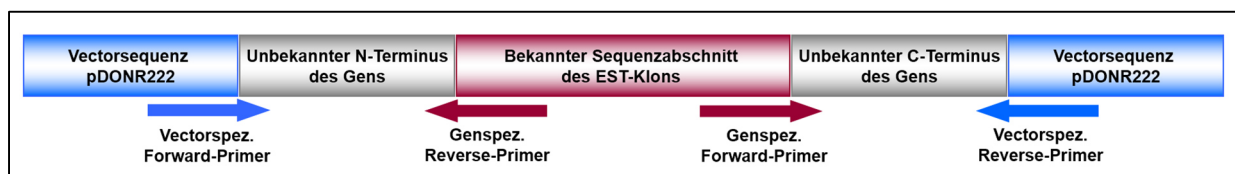


Abb. 16: Schema zur vollständigen Amplifizierung und Sequenzierung des EST-Klons

Mit Hilfe des bekannten Sequenzabschnitts des EST-Klons wurden genspezifische forward und reverse Primer (rote Pfeile) generiert. In Kombination mit den vectorspezifischen Primern (blaue Pfeile) wurden sie zur Amplifizierung der unbekannten Genabschnitte in der PCR-Reaktion eingesetzt.

Die cDNA-Bank von *S. domuncula* lag bereits einkloniert im Plasmidvektor pDONR222 (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt), in Form einer Glycerinkultur transformierter Bakterien (ElectroMAX™ DH10B™ Phage-Resistant Competent Cells; Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt) vor. Diese wurden bei - 80°C gelagert und konnten für die weitere Genanalyse verwendet werden. Dazu wurde eine kleine Menge dieser Glycerinkultur mit einer sterilen Spatelspitze in 10 ml LB-Medium überführt und mit dem Antibiotikum Kanamycin

versetzt. Die hier eingesetzte Konzentration des Antibiotikums lag bei 20 µg/ml. Die Kultur wurde anschließend für ca. 4 - 5 Std. bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Mittels einer Plasmidisolierung (Kapitel B 5.8) wurde die cDNA aus den Bakterien isoliert und konnte nun als Template für die folgenden PCR-Reaktionen eingesetzt werden. Ausgehend von den generierten genspezifischen Primern, den vektorspezifischen Primern von pDONR222 und der cDNA-Bank als DNA-Template, wurde nun eine PCR durchgeführt (Kapitel B 5.3) und die generierten PCR-Produkte mit Hilfe einer Gelelektrophorese (Kapitel B 5.5) aufgetrennt und analysiert. Die DNA-Banden, mit den Größen von ca. 900, 1000 und 1400 bp (Abb. 17 A) wurden jeweils aus dem Agarosegel ausgeschnitten, und die DNA anschließend extrahiert und kloniert (Kapitel B 5.6 und 5.7).

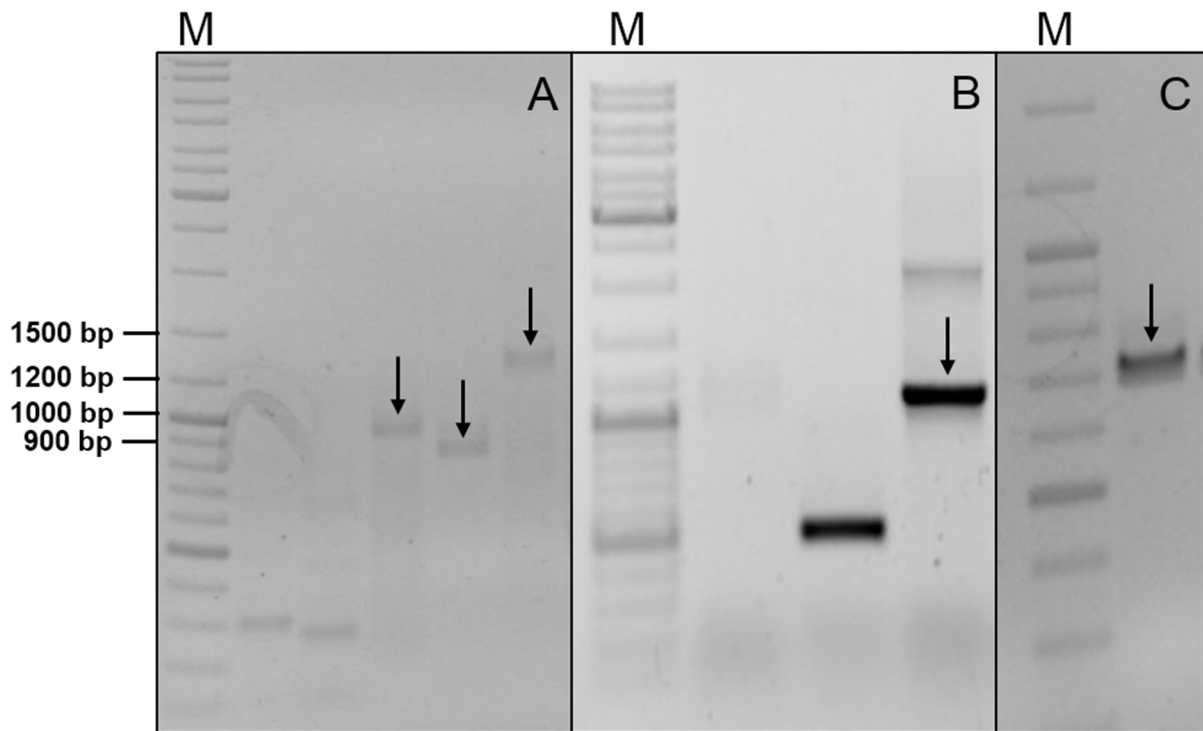


Abb. 17: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte von *Sd_nrp*

A) Die verschiedenen DNA-Banden, unterschiedlicher Größe (Pfeile), wurden ausgeschnitten und nach der Extraktion aus dem Gel kloniert. B) Positive Klone im Größenbereich von 1 kb (Pfeil) wurden sequenziert und analysiert. C) Für die anschließende Expressionsanalyse wurden neue Primer generiert, welche den kodierenden Bereich von *Sd_nrp* flankieren. Dieser wurde amplifiziert und für die PCR-Reaktion zur Herstellung der Expressionskonstrukte eingesetzt (Pfeil). Gel: Agarose 1%; TBE, M = Marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix; Fermentas, Thermo Scientific, Schwerte)

1.2 Sequenzierung und Sequenzanalyse von *Sd_nrp*

Im Anschluss an die Sequenzierung (Kapitel B 5.9) der positiven Klonen (Abb. 17 B), wurden die generierten Sequenzabschnitte mit dem bereits vorhandenen EST-Klon zu einem Contig von insgesamt 1283 Basenpaaren zusammengefügt und auf spezifische Sequenzmotive hin untersucht. Die Analyse der Sequenzdaten (Kapitel B 6.1) führte zur Identifizierung der vollständigen kodierenden Sequenz des potentiellen Gens *Sd_nrp* mit einer Länge von 693 Basenpaaren, sowie der Sequenzen, der beiden angrenzenden untranslatierten Regionen (UTR) am 5'- bzw. 3'-Ende des Gens, sowie des Poly (A)-Bereichs (Abb. 18).

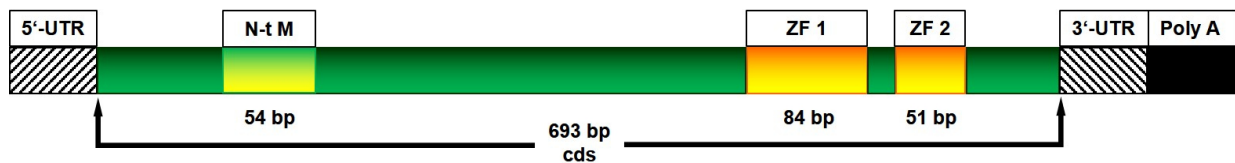


Abb. 18: Schematische Darstellung der Genstruktur von *Sd_nrp*.

Abgebildet sind die sequenzierten Bereiche von *Sd_nrp*, mit dessen vollständiger, kodierender Sequenz (dunkelgrün; 693 bp), den beiden am 3'-Ende gelegenen Zinkfingerdomänen (orange; ZF1 mit 84 und ZF2 mit 51 bp), einem N-terminalen konservierten Sequenzmotiv (grünlichgelb; 54 bp), sowie den beiden angrenzenden untranslatierten Regionen (5'- und 3'-UTR) inklusive des Poly (A)-Bereichs. Abkürzungen: bp (Basenpaare; engl. base pairs); ZF (Zinkfinger), cds (engl.: coding sequence; kodierende Sequenz).

Der sequenzierte 5'-UTR von *Sd_nrp* umfasst 60 Basenpaare, an den sich beginnend mit dem Startcodon, welches für die Aminosäure Methionin codiert, der offene Leserahmen von 231 Aminosäuren (693bp; nt 61-63 bis nt 751-753) anschließt. Dieser enthält am 5'-Ende ein 18 Aminosäuren langes, konserviertes Sequenzmotiv (54 bp; nt 133-135 bis nt 184-186), welches nachfolgend als N-terminales Motiv (N-t M) bezeichnet wird. Weiter befinden sich am 3'-Ende zwei Zinkfingerdomänen, den Zinkfinger 1 mit einer Länge von 28 Aminosäuren (84 bp; nt 529-531 bis 610-612) und den Zinkfinger 2 mit 17 Aminosäuren (51 bp; nt 634-636 bis nt 682-684). Die beiden Zinkfingerdomänen sind über eine 7 Aminosäuren (21 bp; nt 613-615 bis nt 631-633) lange Linkersequenz verbunden. Der offene Leserahmen endet mit dem Stopcodon TAG, an das sich der 530 Basenpaare (inklusive des Stopcodons) umfassende 3'-UTR anschließt. Er enthält ein Polyadenylierungssignal mit der hoch-konservierten Sequenz 5'-AAUAAA-3', und den sogenannten Poly (A)-Bereich (Proudfoot und Brownlee, 1976). Die von der als *Sd_nrp* bezeichneten cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz, kodiert für ein potentielles Protein bestehend aus 231 Aminosäuren, welches nachfolgend als *Sd_nrp* bezeichnet wird. Mit Hilfe des Online-Tools ExPASy Compute pI/Mw (Bjellqvist et al., 1993, 1994; Gasteiger et al., 2005) wurde für das Protein eine theoretische Molekülmasse von 25.8 kDa berechnet und gleichzeitig ein theoretischer isoelektrischer Punkt von 5.9 ermittelt.

Für eine weitere Überprüfung des 5'-Bereichs wurde eine Online-Analyse mit dem SignalP 4.1 Server durchgeführt (Bendtsen et al., 2004), welche keine Hinweise auf ein Signalpeptid in diesem Bereich der kodierenden Sequenz von Sd_nrp lieferte (Abb.19).

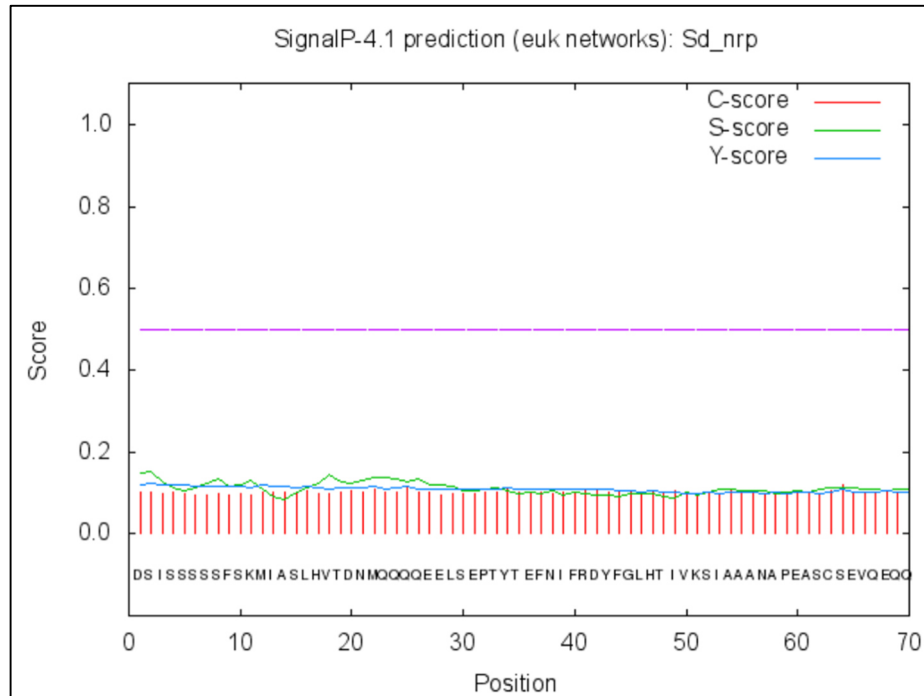


Abb. 19: Screening des 5'-Bereichs von Sd_nrp nach einem möglichen Signalpeptid
Die vorliegende Analyse wurde mit dem SignalP 4.1 Server durchgeführt (Bendtsen et al., 2004).

1.3 Analyse des Nanos-spezifischen Zinkfingers von Sd_nrp

1.3.1 Sequenzanalyse des Nanos-spezifischen Zinkfingers von Sd_nrp

Mit der vollständigen kodierenden Sequenz von Sd_nrp wurden nun weitere Recherchen mit drei verschiedenen Onlinedatenbanken (EMBL InterProScan, Expasy PROSITE Scan, My Hits Motif Scan) durchgeführt, mit deren Hilfe besonders die Zinkfingerdomäne des Proteins analysiert werden sollten. Dabei konnte in allen drei Datenbanken dieser Sequenzbereich als Nanos-spezifischer Zinkfinger identifiziert werden. Dieser enthält die für Nanos-Proteine typischen, hochkonservierten Zinkfinger-Motive mit einer bestimmten Abfolge der Aminosäuren Cys-Cys-His-Cys. Sie werden daher auch als Zinkfinger des CCHC-Typs bezeichnet und sind über eine ebenfalls konservierte Linkersequenz von sieben Aminosäuren (PVLRAYT) miteinander verbunden (Hashimoto et al., 2010). Das Sequenzmotiv folgt einem immer wiederkehrenden Muster ($C \times_2 C \times_{12} H \times_{10} C \times_7 C \times_2 C \times_7 H \times_4 C$) von konservierten Cysteinen (C), Histidinen (H) und den dazwischen liegenden variablen Aminosäuren, welche in der Formel mit x gekennzeichnet sind (Abb. 20 C).

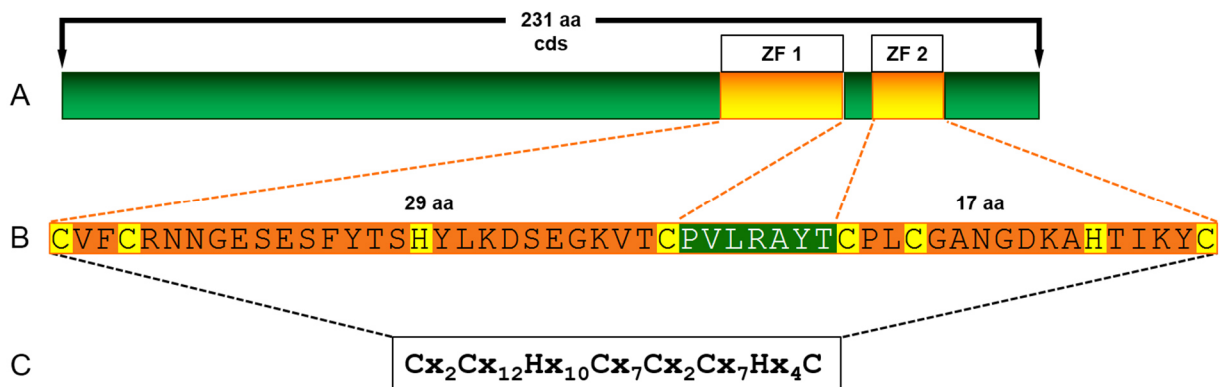


Abb. 20: Schematischer Aufbau des Nanos-spezifischen Zinkfingers vom CCHC-Typ

A) Dargestellt ist die kodierende Sequenz von Sd_nrp mit der relativen Position der Zinkfinger-Domäne im 3'-Bereich des Gens. B) Die erste Vergrößerung zeigt die vollständige Sequenz der beiden Zinkfinger und der dazwischen liegenden Linkersequenz (PVLRAYT). Die charakteristischen Cysteine und Histidine sind jeweils gelb markiert. C) Der Aufbau des immer wiederkehrenden, charakteristischen Musters, wird in der Ausschnittsvergrößerung anhand der dort abgebildeten Formel nochmals verdeutlicht. Abkürzungen: aa (Aminosäuren; engl. amino acids); ZF (Zinkfinger), cds (engl. coding sequence; kodierende Sequenz).

1.3.2 Homologiemodell des Nanos-spezifischen Zinkfingers von Sd_nrp

Für eine genauere Analyse des Zinkfingerbereichs von Sd_nrp, wurde mit Hilfe der ersten, zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Proteinkristallstruktur eines Nanos-Proteins, eine Strukturanalyse durchgeführt. Dazu wurde auf Grundlage der von Hashimoto et al., 2010 veröffentlichten Proteinkristallstruktur der Zinkfingerdomäne des Nanos-Proteins des Zebrafischs *Danio rerio*, ein Homologiemodell mit der Zinkfingerdomäne des rekombinanten Sd_nrp erstellt (Abb. 21). Zuvor wurde zum Vergleich der beiden Sequenzen mit Hilfe des Programms ClustalW (Larkin et al., 2007) ein paarweises Alignment erstellt. Demnach lag die Sequenzidentität zwischen den beiden Proteinen beim Vergleich der Gesamtsequenz bei 23 % (Similarity: 36 %) und beim Vergleich ausschließlich der Zinkfingerbereiche bei 63 % (Similarity: 79 %). Aufgrund des hohen Konservierungsgrades der Zinkfingerbereiche der beiden Proteine konnte die Kristallstruktur der Zinkfingerdomäne von *Danio rerio*, mit einer Auflösung von 2.10 Å, hier als Template verwendet werden. In Abb. 21 sind deutlich die beiden Zinkfingerdomänen mit dem Sequenzmotiv Cys-Cys-His-Cys (CCHC) zu erkennen, welche über eine Linkerregion miteinander verbunden sind (Kapitel C 1.3.3). Bei den beiden Zinkfingerdomänen handelt es sich um zwei potentielle Bindungsstellen für jeweils ein Zinkatom (Hashimoto et al., 2010), welches über drei Cysteine und ein Histidin des jeweiligen Zentrums koordiniert ist.

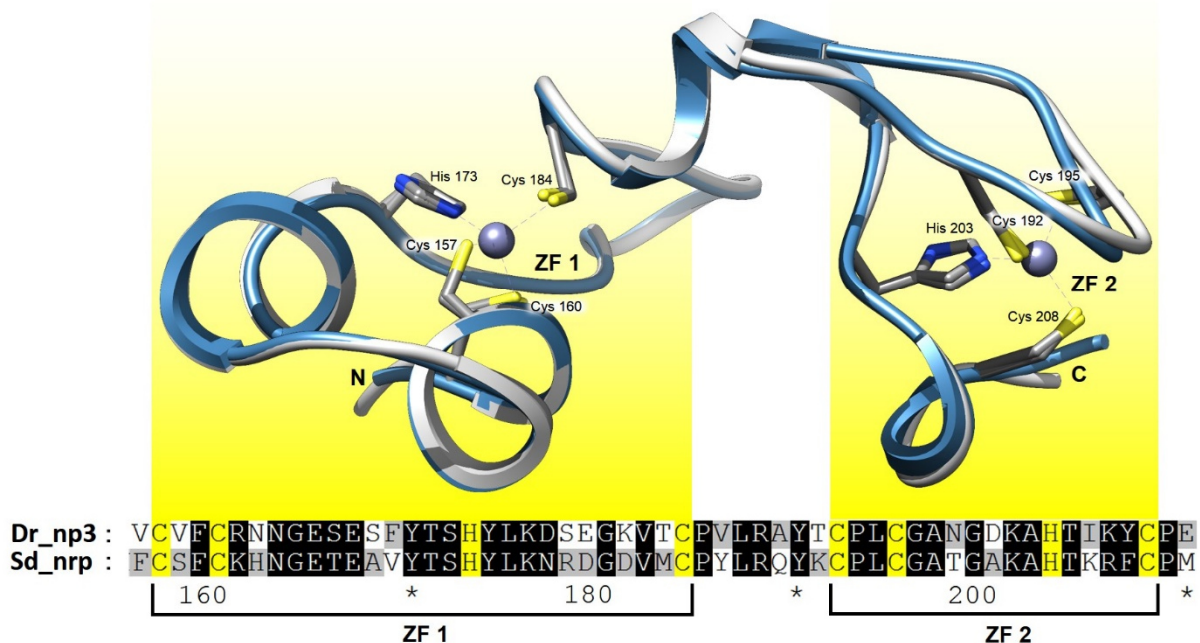


Abb. 21: Homologiemodell der Zinkfinger-Domäne von Sd_nrp

Dargestellt sind die superpositionierten Zinkfingerdomänen von *Danio rerio* (Dr_np3) und *Suberites domuncula* (Sd_nrp) im Bändermodell. Die blau gekennzeichneten Bereiche des Proteinrückgrats zeigen dabei die Aminosäurepositionen 91 bis 144 von Dr_np3, und graue Bereiche die Aminosäurepositionen 155 bis 209 von Sd_nrp. Aufgrund der hohen Konservierung in diesen Sequenzabschnitten, zeigen die C- α -Atome des Proteinrückgrats mit einem durchschnittlichen RMSD von 0,18 Å, eine sehr geringe strukturelle Abweichung. Die

konservierten Cysteine sind sowohl im Alignment als auch im Homologiemodell gelb dargestellt. Die ebenfalls hochkonservierten Histidine sind im Alignment gelb und im Homologiemodell dunkelblau dargestellt. Die in den jeweiligen Zinkfingerdomänen gebundenen Zinkatome sind violett gekennzeichnet. Die Homologiemodellierung wurde mittels der Software Modeller 9.13 (Webb & Sali, 2014; Eswar et al., 2007) erstellt. Als Template für die Modellierung wurde Kette A (Chain A) der Kristallstruktur der Zinkfingerdomäne von *Danio rerio* verwendet (Dr_np3; PDB-ID: 3ALR).

Für die Validierung des Homologiemodells wurde anschließend ein Ramachandran-Plot erstellt (Ramachandran et al., 1963). Diese Methode erlaubt u.a. eine Aussage über die Qualität eines Strukturmodells. Das Diagramm gibt dabei Auskunft über die möglichen Konformationen der Diederwinkel Psi (Ψ) und Phi (Φ) eines Aminosäurerestes in einem Proteinrückgrat.

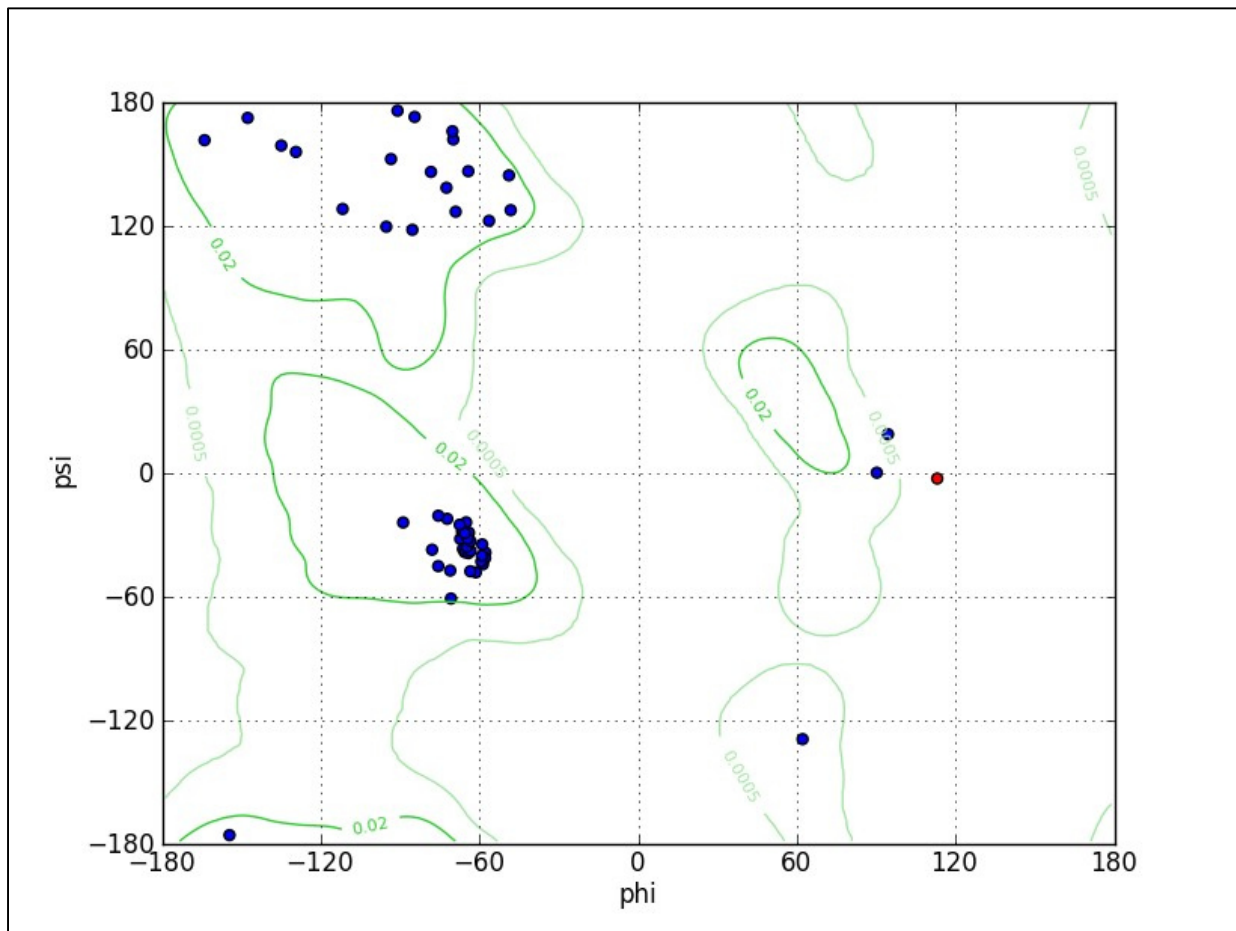


Abb. 22: Ramachandran-Plot für das Homologiemodell der Zinkfinger-Domäne Sd_nrp

Die favorisierten Bereiche sind im Plot dunkelgrün, die erlaubten Bereiche hellgrün umrandet. Die blauen Markierungen repräsentieren Wertepaare für Phi und Psi der einzelnen Aminosäuren. Das Glycin an Position 26 der Aminosäuresequenz des Modells, ist in der Abbildung rot markiert und ist aufgrund der hohen Flexibilität des Aminosäurerestes und des daraus resultierenden großen Wertebereiches für Phi und Psi, in der Analyse zu vernachlässigen. Der Plot wurde mit Hilfe der Software-Plattform UCSF Chimera erstellt (Pettersen et al., 2004).

In Abb. 22 ist der Ramachandran-Plot für das vorliegende Homologiemodell dargestellt. Dieser zeigt, dass sich mit Ausnahme eines einzelnen Glycins (Gly26, rot), 98 % der Aminosäurereste favorisierte Winkel für Ψ und Φ einnehmen und somit die Seitenketten der meisten im

Homologiemodell repräsentierten Aminosäuren energetisch günstige Konformationen besitzen. Da es sich bei der Aminosäure Glycin um ein sogenanntes achirales Molekül handelt und sie keine Seitenketten besitzt, welche die Rotation um die Winkel Ψ und Φ beeinflussen, kann sie mehrere mögliche Konformationen einnehmen. Dadurch erlangt das Molekül eine sehr hohe Beweglichkeit und erhält damit auch bei der Ramachandran-Konformationsanalyse einen großen Wertebereich. Im Gegensatz dazu zeigt die Aminosäure Prolin aufgrund ihres Pyrrolidin-Systems eine stark eingeschränkte Beweglichkeit und erhält damit einen sehr geringen Wertebereich. Die übrigen Aminosäuren nehmen abhängig von ihrer jeweiligen Seitenkette, Werte zwischen diesen beiden Extremen ein. Aus diesem Grund werden die Aminosäuren Glycin und Prolin, die beide Extremzustände repräsentieren, bei vielen Programmen nicht mehr in die Analyse miteinbezogen. Daher ist die im Ramachandran-Plot außerhalb des erlaubten Bereichs liegende Aminosäure Glycin des vorliegenden Modells, bei der Validierung nicht zu berücksichtigen bzw. zu vernachlässigen.

1.3.3 Sequenzvergleich der beiden Nanos-verwandten Proteine von *Suberites domuncula* (Sd_nrp) und *Ephydatia fluviatilis* (Efl_nrp)

Für eine weitere Analyse der Zinkfingerdomäne wurden die Nanos-verwandten Proteine der beiden Schwammspezies *Suberites domuncula* (Sd_nrp) und *Ephydatia fluviatilis* (Efl_nrp) mit Hilfe des Programms ClustalW (Larkin et al., 2007) aligniert und die konservierten Aminosäurepositionen mit der Software GeneDoc (Nicholas et al., 1997) graphisch bearbeitet. Für die vorliegende Analyse wurde das Protein aus der Schwammspezies *E. fluviatilis* gewählt, da es im Zinkfingerbereich eine höhere Sequenzidentität zu dem Protein Sd_nrp zeigt, als das Protein der Spezies *A. queenslandica* (Abb. 39). Das resultierende Sequenzalignment ist in Abb. 23 dargestellt, und zeigt die beiden für Nanos-Proteine typischen, hochkonservierten Zinkfinger-Motive des CCHC-Typs. Diese sind im Alignment orange und gelb hinterlegt. Im Bereich der Zinkfinger-Domäne, inklusive der 7 Aminosäuren langen Linkersequenz, liegt die Sequenzidentität der beiden Proteine bei 96,2 %. Während bei einem Vergleich über den gesamten Sequenzbereich, die beiden Proteine nur einen geringen Konservierungsgrad und eine Sequenzidentität von 46 % (Similarity: 59 %) aufweisen. Hohe Sequenzidentitäten sind innerhalb des Alignments nur vereinzelt zu beobachten, wie z.B. im N-terminalen Bereich die Aminosäurepositionen 31 bis 48.

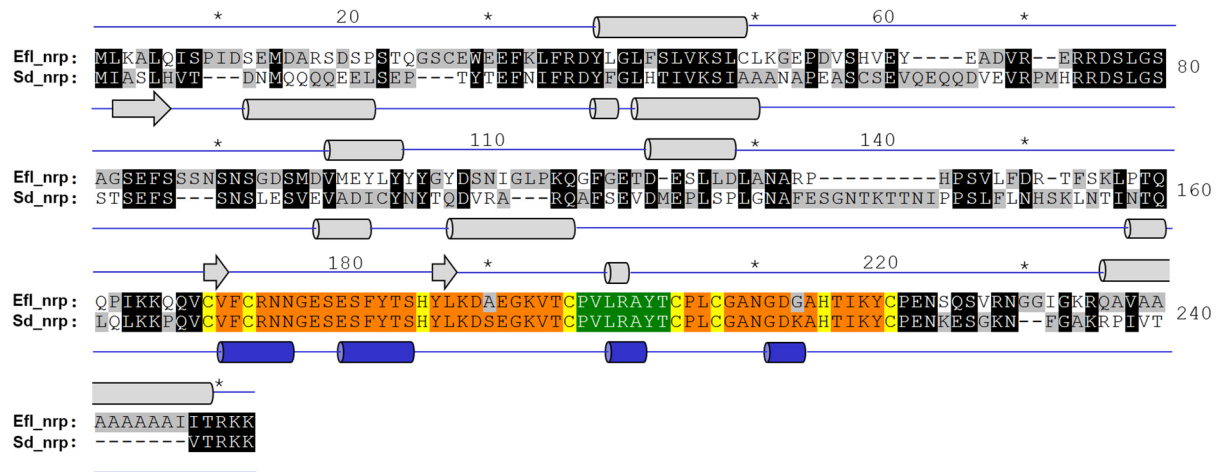


Abb. 23: Sequenzvergleich der Nanos-verwandten Proteine von *S. domuncula* und *E. fluviatilis*

Die hoch konservierten Zinkfinger sind in beiden Sequenzen orange und gelb markiert, dabei sind die typischen Sequenzmotive CCHC jeweils gelb hervorgehoben. Durch die grün hervorgehobene, ebenfalls hoch konservierte Linkersequenz, sind die beiden Zinkfinger miteinander verbunden. Die identischen Bereiche (100%) außerhalb der Zinkfingerdomäne sind im Alignment schwarz und gering konservierte Bereiche grau hinterlegt. Die Positionen für mögliche β -Faltblätter sind durch graue Pfeile, und die Positionen für mögliche α -Helices durch graue Zylinder dargestellt. Die vorhergesagten Sekundärstrukturen für das Protein von *Suberites domuncula* (Sd_nrp) sind unter dem Alignment, die für das Protein von *Ephydatia fluviatilis* (Efl_nrp) über dem Alignment abgebildet. Die anhand der Kristallstruktur der Zinkfingerdomäne des Zebrafischs *Danio rerio* (Hashimoto et al., 2010) ermittelten Positionen der α -Helices von Sd_nrp sind durch blaue Zylinder dargestellt.

Für eine genauere Betrachtung dieser Bereiche und um zu klären, ob diese Sequenzidentitäten außerhalb der Zinkfingerdomäne mit evtl. dort vorhandenen Sekundärstrukturen korreliert, wurde zunächst eine Sekundärstrukturvorhersage für die Proteine Sd_nrp und Efl_nrp mit dem PSIPRED Server (Buchan et al., 2013) auf der Grundlage von positions-spezifischen Substitutions-Matrizen (engl. position-specific scoring matrices) durchgeführt (Jones D.T. et al., 1999). Die Positionen für mögliche β -Faltblätter sind durch graue Pfeile, und die Positionen für mögliche α -Helices durch graue Zylinder im Alignment (Abb. 23) dargestellt. Die vorhergesagten Sekundärstrukturen für das Protein Sd_nrp sind unter, die für Efl_nrp sind über dem Alignment abgebildet. Darüber hinaus konnten aufgrund der von Hashimoto et al., 2010 veröffentlichten Proteinkristallstruktur der Zinkfingerdomäne des Nanos-Proteins des Zebrafischs *Danio rerio*, die Sekundärstrukturelemente von Sd_nrp innerhalb dieser Domäne nachvollzogen werden (Kapitel C 1.3.3). Die so gewonnenen Informationen über die Sekundärstrukturen, hier die Positionen der α -Helices, sind in der Abb. 23 durch blaue Zylinder dargestellt. Dabei konnte auch bestätigt werden, dass die Linkersequenz, welche beide Zinkfinger miteinander verbindet, in der Sekundärstruktur eine α -Helix ausbildet.

1.3.3 Multiples Alignment typischer Nanos-Proteine

Um festzustellen, ob die Nanos-verwandten Proteine der Schwämme zu den Nanos-Proteinen anderer Spezies, Sequenzähnlichkeiten aufweisen, wurden diese mit den vollständigen kodierenden Sequenzen einiger bereits bekannter Nanos-Proteine verglichen. Dazu wurden die jeweiligen Aminosäuresequenzen von der Protein-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) bezogen und mit der Software ClustalW (Larkin et al., 2007) aligniert. Die Illustration des Alignments erfolgte mit dem Programm GeneDoc (Nicholas et al., 1997). Ein Ausschnitt aus dem multiplen Sequenzalignment ist in Abb. 24 dargestellt, und zeigt nur den Bereich der Zinkfingerdomäne, der einzelnen Nanos-Proteine. Wie auch bereits im Alignment der beiden Nanos-verwandten Proteine der Schwämme (Abb. 23), verfügt die Zinkfingerdomäne auch speziesübergreifend über konservierte Aminosäurepositionen und zeigt bei allen Vertretern das typische CCHC-Motiv der Nanos-Zinkfinger.

				*						20				*																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							</
--	--	--	--	---	--	--	--	--	--	----	--	--	--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Abb. 24: Ausschnitt eines multiplen Alignments der Zinkfingerdomäne typischer Nanos-Proteine

Die Aminosäuresequenzen der Nanos-Proteine und Nanos-homologen Proteine unterschiedlicher Spezies wurden miteinander aligniert und analysiert. Der Ausschnitt hier zeigt dabei nur den Bereich der Zinkfingerdomäne. Die in den Nanos-Zinkfingern identischen Histidine und Cysteine, welche das CCHC-Motiv bilden, sind gelb hervorgehoben. Die übrigen zu 100% identischen Bereiche sind schwarz, hoch konservierte dunkelgrau, und die Positionen mit ungleichen aber in ihren physikochemischen Eigenschaften ähnlichen Aminosäuren sind hellgrau hinterlegt. Das Alignment wurde mit der Software Muscle des MEGA 6 Software-Pakets (Tamura et al., 2013) erstellt und mit der Software GeneDoc (Nicholas et al., 1997) graphisch bearbeitet.

1.4 Rekombinante Expression von Sd_nrp in *E. coli*

1.4.1 Generierung der DNA-Konstrukte (1+2) für die rekombinante Expression in den Vektoren pTrcHis2A und pET-51b(+)

Mit Hilfe der rekombinanten Expression von Sd_nrp sollte das Protein in einer ausreichenden Konzentration und Reinheit gewonnen werden, um damit anschließend einen spezifischen polyklonalen Antikörper herzustellen. Dieser diente dem Nachweis des nativen Proteins in Schnitten verschiedener Schwammgewebe und Extrakten, mittels Immunofluoreszenz.

Der für die Expression verwendete pTrcHis2A Vektor besitzt einen C-terminalen Polyhistidin-Tag (6 x His), der die Aufreinigung des rekombinanten Proteins mittels einer geeigneten Ni-NTA Matrix ermöglicht, und in anschließenden Analysen über einen Anti-His (C-term) Antikörper detektiert werden kann. Der ebenfalls verwendete pET-51b(+) Vektor dagegen besitzt einen N-terminalen Strep•Tag® II, einem aus acht Aminosäuren bestehenden Peptid (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys). Dieses bindet mit sehr hoher Spezifität an auf Streptavidin basierendes Strep•Tactin®. So kann mit Hilfe einer anschließenden Affinitätschromatographie, eine sehr spezifische Proteinaufreinigung unter nativen Bedingungen erfolgen.

Für die Rekombinante Expression von Sd_nrp in den beiden Vektoren pTrcHis2A und pET-51b(+), mussten zunächst DNA-Konstrukte mit spezifischen 5'- und 3'- Enden generiert werden. Dazu wurde das bereits mit den beiden Primern Exnoslike_SD_fwd und Exnoslike_SD_rev amplifizierte DNA-Fragment des kodierenden Bereichs von Sd_nrp (Abb. 13c) in der folgenden PCR als Template eingesetzt. Die Konstruktion der entsprechenden Primer wird in Kapitel B 5.2.3 näher erläutert. Zur Generierung des Konstrukts 1, für die Klonierung in den Vektor pTrcHis2A, wurden die Primer exnl_SD_Res_F und exnl_SD_Res_R eingesetzt. Und zur Herstellung des Konstrukts 2, für die Klonierung in den pET-51b(+), wurde das Primerpaar nos_BamHI_fwd und nos_NotI_rev verwendet. Nach der PCR wurden 15 µl der PCR-Produkte auf ein Agarosegel geladen und DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese auf ihre Größe und Reinheit hin überprüft. Die Banden im DNA-Gel für das Konstrukt 1 (Abb. 25 A) entsprachen mit ihrer Größe, die etwas über 700 bp lag, der erwarteten Länge von 714 bp. Auch die DNA-Bande für das Konstrukt 2 entsprach der berechneten Länge von 722 bp (Abb. 25 B).

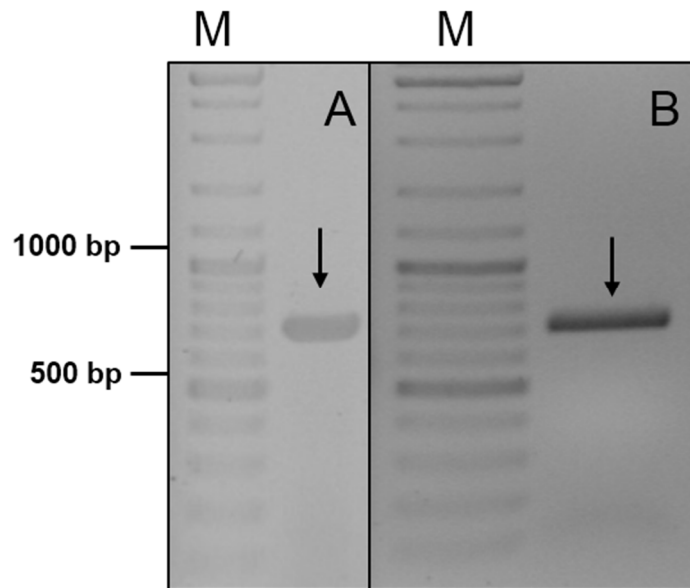


Abb. 25: Gelelektrophorese der DNA-Konstrukte (1+2) für die rekombinante Expression von Sd_nrp

A) Die DNA-Bande hat eine Größe von ca. 700 bp (Pfeil), und entspricht der berechneten Länge für das Konstrukt 1. B) Auch die DNA-Bande des Konstrukts 2 (Pfeil) weist eine Größe von ca. 700 bp auf und liegt damit im zuvor kalkulierten Größenbereich. Gel: Agarose 1%; TBE, M = Marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix; Fermentas, Thermo Scientific, Schwerte).

Nun wurden die übrigen 85 µl der PCR-Produkte aufgereinigt, ein Restriktionsverdau (Kapitel B 5.7.3.1) durchgeführt und die resultierende Insert-DNA mit dem entsprechenden Vektor ligiert. Die Ligationsprodukte wurden nun für die Transformation in chemisch kompetenten Expressionsbakterien verwendet (BL21(DE3) pLysS, Rosetta™ 2 (DE3) pLysS), welche auf einem Selektionsagar ausplattiert wurden. Von den gepickten Bakterienkolonien wurden Über-Nachtkulturen angesetzt und die anschließend isolierten Plasmide erneut durch eine Sequenzierung kontrolliert. Dieser Schritt diente zur Überprüfung der korrekten Ligation des Konstrukts mit dem Expressionsvektor. Für die Expression wurden ausschließlich Bakterienklone verwendet, in deren Plasmide der offene Leserahmen und die anschließenden Sequenzabschnitte, welche die Affinitäts-Tags enthielten, absolut fehlerfrei waren (Abb. 26). Von den Kulturen dieser Bakterienklone wurden Glycerinkulturen (Kapitel B 4.4.3) hergestellt und bei -80 °C gelagert, so dass sie für die Beimpfung der Expressionskulturen sofort eingesetzt werden konnten.

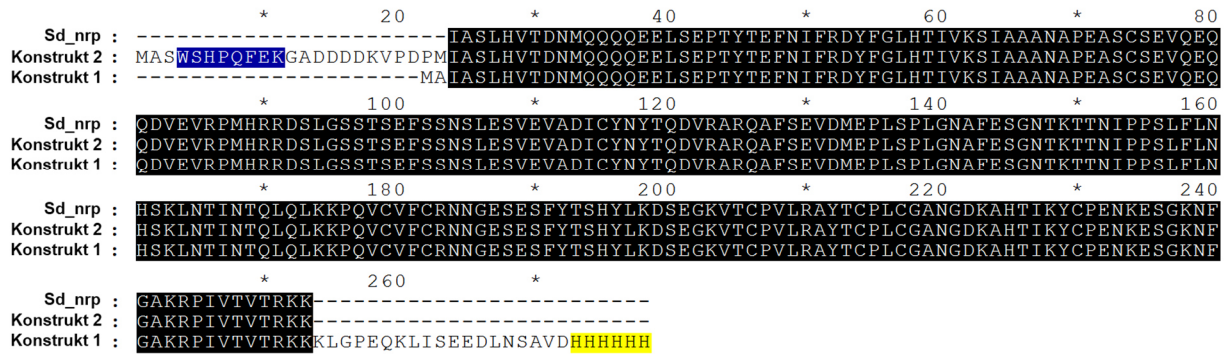


Abb. 26: Sequenzen der Konstrukte zur rekombinanten Expression von Sd_nrp

An erster Position im Alignment ist jeweils die kodierende Sequenz von Sd_nrp abgebildet. An zweiter Position befindet sich jeweils das Konstrukt 2 mit dem blau markierten N-terminalen Strep•Tag® II, einem aus acht Aminosäuren bestehenden Peptid (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) des pET-51b(+) Vektors. An letzter Position befindet sich jeweils das Konstrukt 1 mit dem gelb markierten C-terminalen Polyhistidin-Tag (6 x His) des pTrcHis2A Vektors. Das Alignment wurde mit ClustalW (Larkin et al., 2007) erstellt und mit der Software GeneDoc (Nicholas et al., 1997) graphisch bearbeitet.

1.4.2 Expressionsanalyse des rekombinanten Sd_nrp

Um die geeigneten Expressionsbedingungen zu ermitteln, wurde zuerst eine sogenannte Pilotexpression durchgeführt (Kapitel B 7.1) und die Ergebnisse via SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

Für den Start der Expression wurde dann das geeignete Nährmedium in dem gewünschten Volumen, hier 200 ml, vorbereitet. Dieses wurde nun entweder direkt mit einem Glaskügelchen aus einer Glycerinkultur beimpft (Kapitel B 4.4.3), oder es wurde zuvor mit diesem eine Über-Nachtkultur von 4 ml (LB-Medium + entsprechendes Antibiotikum) hergestellt, mit der am folgenden Tag die Expressionskultur beimpft werden konnte. Nach Erreichen der gewünschten Bakterienanzahl, bestimmt durch den OD₆₀₀-Wert, wurde eine Probe als Negativkontrolle entnommen, und die übrige Kultur mit 1 mM IPTG induziert. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension abzentrifugiert, aufgereinigt und die rekombinante Expression von Sd_nrp in einer SDS-PAGE analysiert (Kapitel C 1.5). Die Expression beider Konstrukte von Sd_nrp (Konstrukt 1 und Konstrukt 2) wurde auf die gleiche, hier angegebene Weise durchgeführt und ist in den Kapiteln B 7.1.1 und 7.1.2 ausführlich beschrieben.

Zunächst wurde für Konstrukt 1 überprüft, welche der hier verwendeten Expressionsbakterien geeigneter sind, um das rekombinante Protein Sd_nrp möglichst rein und in entsprechender Menge zu synthetisieren (Abb. 27).

1.5 Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie

1.5.1 Proteinaufreinigung via IMAC und Säulenchromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Im Anschluss an die Expression wurde zuerst ein sogenannter Löslichkeitstest für das Protein durchgeführt. Dazu wurde eine kleine Menge pelletierter Bakterien aus einer 100 ml Kultur stammend, in 5 ml Lysispuffer (Kapitel B 8.1.1.2) unter nativen Bedingungen resuspendiert und bei -80 °C tiefgefroren. Anschließend 6 x 10 s auf Eis sonifiziert und das Lysat bei 10.000g und 4 °C ca. 20-30 min zentrifugiert. Der Überstand konnte nun direkt analysiert werden und das Pellet wurde zuvor noch in 5 ml Lysispuffer unter denaturierenden Bedingungen resuspendiert, um anschließend beide Proben in einer SDS-PAGE zu vergleichen. Da auf diese Weise keine eindeutigen Hinweise auf eine mögliche Löslichkeit des Proteins ermittelt werden konnten, wurde eine Aufreinigung via IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) Verfahren und mittels Säulenchromatographie unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Kapitel B 8.1.1.1). Zur Analyse der Expressionsergebnisse via SDS-PAGE und Western Blot, wurde dann mit dem Online-Tool ExPASy Compute pI/Mw (Bjellqvist et al., 1993, 1994; Gasteiger et al., 2005) die theoretische Molekülmasse des Proteins Sd_nrp inklusive des jeweiligen Affinitäts-Tags berechnet. Diese betrug für das Konstrukt 1 (Sd_nrp / His-Tag) ca. 28,8 kDa und für das Konstrukt 2 (Sd_nrp / Strep-Tag) ca. 28,3 kDa.

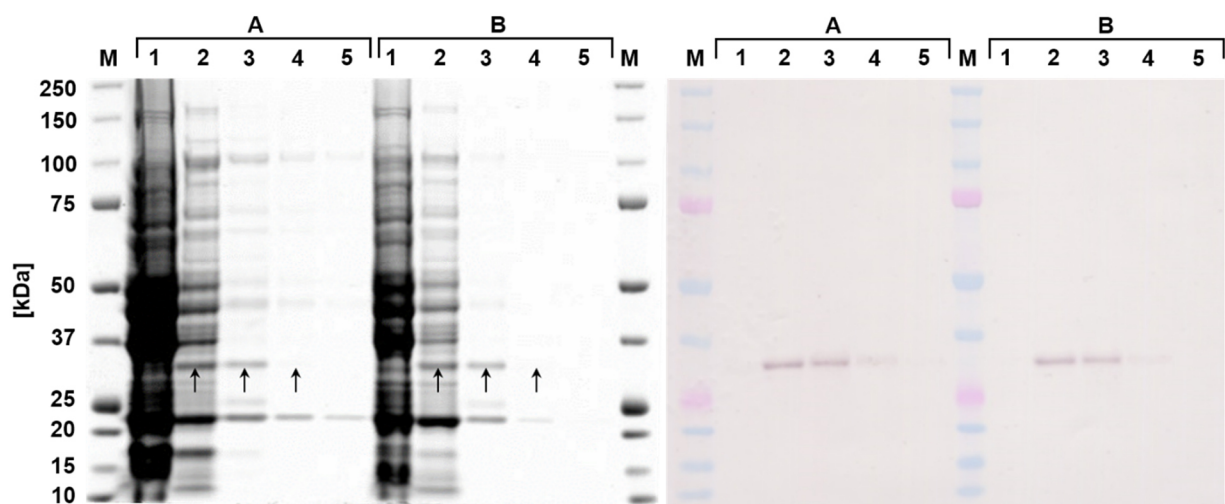


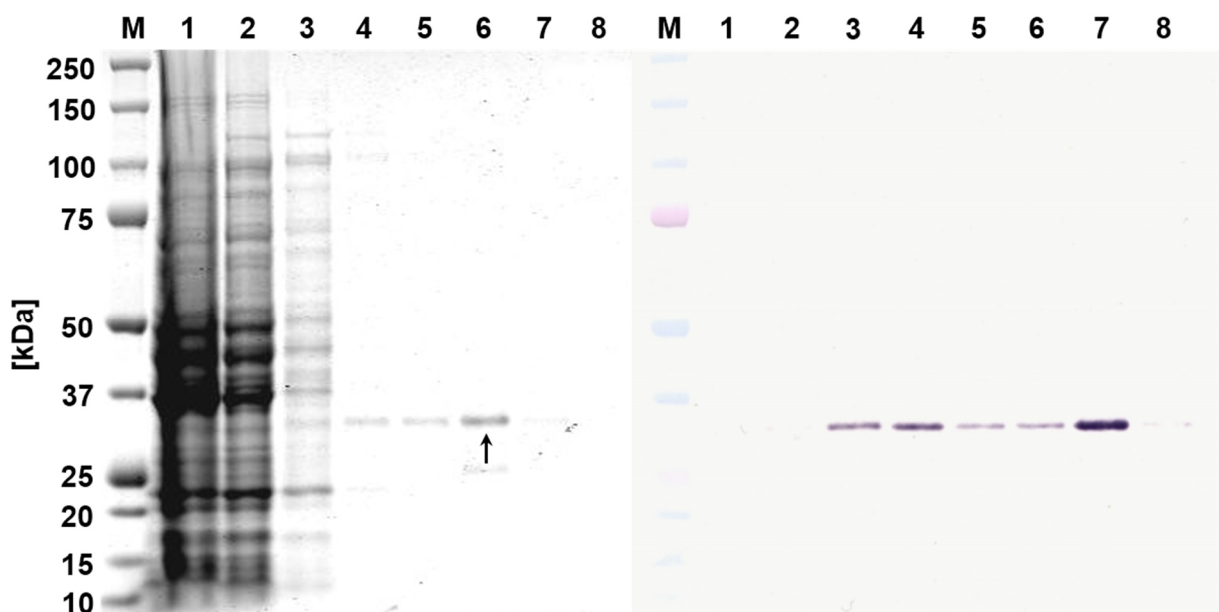
Abb. 27: Rekombinante Expression und Aufreinigung von Sd_nrp

Links: SDS-PAGE 4-12%; 12 well; MOPS-Puffer; Jeweils von links nach rechts: M: Marker (Precision Plus Protein™ Dual Color; Bio-Rad), 1: Durchfluss (10mM), 2: Waschfraktion 1 (50 mM), 3: Waschfraktion 2 (100 mM), 4: Eluat 1 (200 mM), 5: Eluat 2 (250 mM). Expressionsbakterien: A) BL21 (DE3) pLys, B) Rosetta™ 2 (DE3) pLys. Rechts: Western Blot, Primärantikörper: Anti-His (C-term) 1:3000, Sekundärantikörper: Anti-Rabbit IgG 1:5000. Es wurden 30 µl Proteinlösung mit 10 µl Rotiload 1 (Roth) versetzt und 20 µl auf das Gel aufgetragen. Die Pfeile kennzeichnen die Proteinbanden, welche das rekombinante Sd_nrp repräsentieren. Die Konzentrationsangaben in

Ergebnisse

Klammern entsprechen den Imidazolkonzentrationen des jeweiligen Puffers. Über der Abb. ist jeweils das verwendete Expressionsbakterium mit A) BL21 (DE3) pLys bzw. B) Rosetta™ 2 (DE3) pLys angegeben.

Die unterschiedlichen Fraktionen der Aufreinigung wie der Durchfluss-, die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden zunächst auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Proteinbande von Sd_nrp in der Abb. 27 deutlich zwischen der 25 kDa und der 37 kDa Bande des Markers zu sehen, und entspricht damit der erwarteten, theoretisch ermittelten Größe von ca. 29 kDa. Das Protein eluiert hier bereits bei einer Imidazolkonzentration von 50 mM von der Ni-NTA Säule und ist in den Waschfraktionen 1 und 2, sowie in der Elutionsfraktion 1 vorhanden (Pfeile, Abb. 27). Darüber hinaus konnte es in beiden verwendeten Stämmen von Expressionsbakterien, den BL21 (DE3) pLys (Abb. 27 A) und den Rosetta™ 2 (DE3) pLys (Abb. 27 B) exprimiert werden. Dass es sich tatsächlich um das rekombinante Sd_nrp inklusive des His-Tags handelt, wurde durch eine Western Blot-Analyse mit dem Primärantikörper Anti-His (C-term) und dem Sekundärantikörper Anti-Rabbit IgG in Verbindung mit der alkalischen Phosphatase Reaktion bestätigt. Auch hier befindet sich die Proteinbande auf exakt der gleichen Höhe zwischen der 25 kDa und der 37 kDa Bande des Markers. Da bei der hier verwendeten Anzahl der Waschschrte und der entsprechenden Imidazolkonzentrationen, das Protein nicht in der gewünschten Reinheit von der Ni-NTA Säule eluiert werden konnte, wurden noch weitere Waschschrte integriert um kontaminierende Proteine vor den Elutionsschrten von der Säule zu entfernen (Abb. 28). Bei der folgenden und allen weiteren gezeigten Aufreinigungen wurde das Protein Sd_nrp jeweils zuvor in dem Expressionsbakterium BL21 (DE3) pLys exprimiert.



(Beschriftung der Abb. 28 siehe S.98)

Abb. 28: Aufreinigung von Sd_nrp unter denaturierenden Bedingungen

Links: SDS-PAGE 4-12%; 12 well; MOPS-Puffer. Es wurden 30 µl Proteinlösung mit 10 µl Rotiload 1 (Roth) versetzt und dann 20 µl auf das Gel aufgetragen. Von links nach rechts: M: Marker (Precision Plus Protein™ Dual Color; Bio-Rad), 1: Durchfluss (10mM), 2: Waschfraktion 1 (20 mM), 3: Waschfraktion 2 (30 mM), 4: Waschfraktion 3 (40 mM), 5: Elution 1 (50 mM), 6: Elution 2 (100 mM), 7: Elution 3 (200 mM), 8: Elution 4 (250 mM). Rechts: Western Blot mit dem Primärantikörper Anti-His (C-term) 1:3000 und dem Sekundärantikörper Anti-Rabbit IgG 1:5000. Der Pfeil kennzeichnet die Proteinbande von Sd_nrp mit der größten Proteinmenge. Die Konzentrationsangaben in Klammern entsprechen den Imidazolkonzentrationen des jeweiligen Puffers.

In Abb. 28 wird deutlich, dass durch die zusätzlichen Waschschrte bei Imidazolkonzentrationen von 10 mM bis 50 mM, die kontaminierenden Proteine entfernt, und das Protein Sd_nrp in ausreichender Menge und Reinheit gewonnen werden konnte. Die größte Proteinkonzentration enthielt demnach Eluat 2 bei einer Imidazolkonzentration von 100 mM. Die Konzentration des Proteins wurde über ein Bradford-Assay bestimmt und betrug 135 µg/ml. So konnte diese Probe für die Immunisierung und die anschließende Serumgewinnung zur Herstellung des primären, polyklonalen Antikörpers Anti-Sd_nrp verwendet werden. Zusätzlich wurden die Fraktionen sämtlicher, unter diesen Bedingungen durchgeführten Aufreinigungen via Western-Blot überprüft. Dabei konnte hier ebenfalls mit Hilfe des Primärantikörpers Anti-His (C-term) und des Sekundärantikörpers Anti-Rabbit IgG nachgewiesen werden, dass das rekombinante Sd_nrp unter diesen Bedingungen bereits bei einer Imidazolkonzentration von 30 mM von der Ni-NTA-Säule eluiert. Die Proteinbande befindet sich in dieser und in allen nachfolgenden Fraktionen zwischen der 25 kDa und 37 kDa Bande, und entspricht der erwarteten Größe des Proteins von 29 kDa.

1.5.1 Proteinaufreinigung via IMAC mit dem Profinia™ - Protein Purification System

Parallel zur Proteinaufreinigung via Säulenchromatographie wurde auch die Aufreinigung des rekombinanten Sd_nrp mittels des IMAC (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) Verfahrens mit dem Profinia™ - Protein Purification System der Firma Bio-Rad (München) durchgeführt. Um für dieses System eine ausreichende Proteinmenge von Sd_nrp zu exprimieren, wurde das Volumen der Expressionskultur auf 1 Liter erhöht und zusätzlich das Autoinduktionsmedium *Overnight Express™ Instant TB Medium* der Firma Novagen (Merck Millipore, Darmstadt) verwendet. Die Vorgehensweise bei der Expression ist in Kapitel B 7.1.1, die Vorbereitung der Proteinlösung sowie die Durchführung der Aufreinigung, in Kapitel B 8.1.1.3 exakt beschrieben.

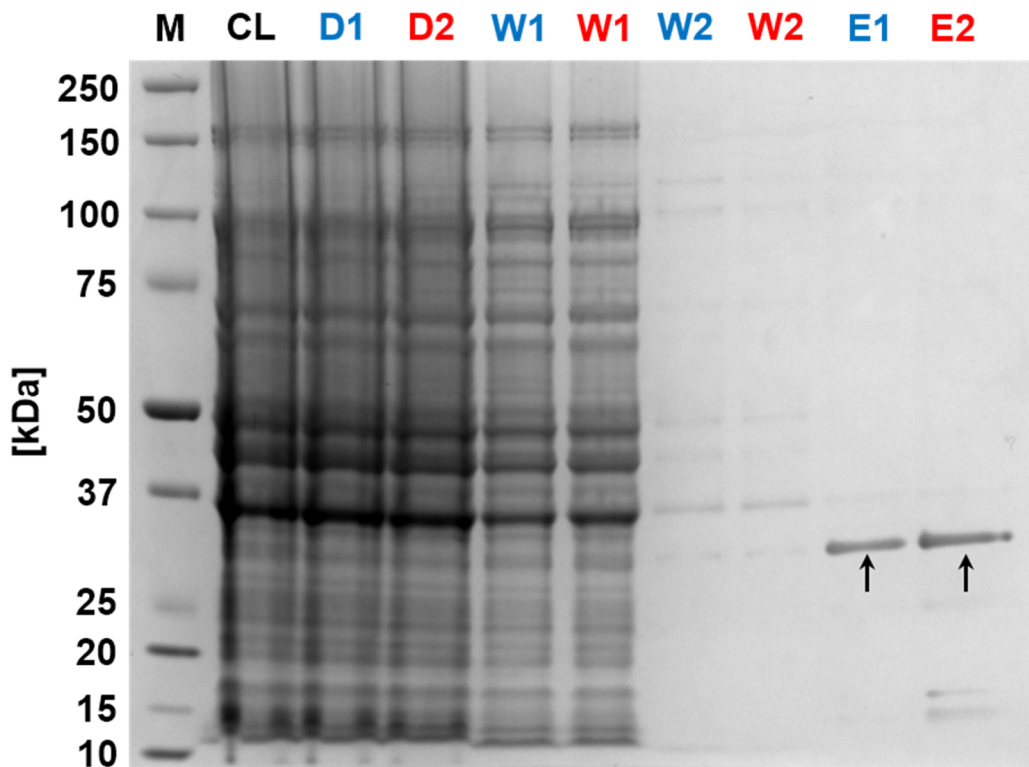


Abb. 29: Aufreinigung von Sd_nrp mit dem Profinia™ - Protein Purification System unter denaturierenden Bedingungen

SDS-PAGE 4-12%; 10 well; MOPS-Puffer. Das Gesamtvolumen des klaren Zelllysats betrug 100 ml und musste in 2 Durchläufen von jeweils 50 ml auf die automatisierte Säule geladen werden. Diese Durchläufe sind hier mit I und II bezeichnet. Die zum Durchlauf I gehörenden Fraktionen sind blau, und die zum Durchlauf II gehörenden Fraktionen sind rot gekennzeichnet. Es wurden 30 µl Proteinlösung mit 10 µl Rotiload 1 (Roth) versetzt und 20 µl auf das Gel aufgetragen. Von links nach rechts: M: Marker (Precision Plus Protein™ Dual Color; Bio-Rad), CL: Klares Zelllysate (engl. cleared lysate; 5 mM), **D1**: Durchfluss v. Durchlauf I (5 mM), **D2**: Durchfluss v. Durchlauf II (5 mM), **W1**: Waschfraktion 1 (I) (5 mM), **W1**: Waschfraktion 1 (II) (5 mM), **W2**: Waschfraktion 2 (I) (10 mM), **W2**: Waschfraktion 2 (II) (10 mM), **E1**: Elution I (250 mM), **E2**: Elution II (250 mM). Die Pfeile kennzeichnen die Proteinbanden von Sd_nrp. Die Konzentrationsangaben in Klammern entsprechen den Imidazolkonzentrationen des jeweiligen Puffers.

In der SDS-PAGE (Abb. 29) sind die beiden Proteinbanden von Sd_nrp deutlich auf der Höhe zwischen der 25 kDa und der 37 kDa Bande des Markers zu erkennen. Die Elution des rekombinanten Proteins von der Ni-NTA Matrix erfolgte hier bei einer Imidazolkonzentration von 250 mM. Mit Hilfe dieser Methode, welche automatisiert und mit höherem Druck die Aufreinigung der Proteine erlaubt, war es möglich, das rekombinante Sd_nrp in hoher Konzentration und Reinheit zu gewinnen. Auf diese Weise konnten daher für nachfolgende Versuche ausreichende Mengen des Proteins exprimiert und aufgereinigt werden.

2. Nachweis des nativen Sd_nrp in Proteinextrakten aus dem Gewebe von *Suberites domuncula*

Für den Nachweis des nativen Sd_nrp wurden zunächst Proteinextrakte aus dem Gewebe von *Suberites domuncula* mit Hilfe unterschiedlicher Extraktionspuffer hergestellt. Die Vorgehensweise hierbei sowie die Zusammensetzung der einzelnen Extraktionspuffer sind in Kapitel B 8.11 ausführlich erläutert. Die anschließende immunologische Detektion des nativen Sd_nrp erfolgte via Western-Blot mit dem Nanos-spezifischen polyklonalen Primärantikörper Anti-Sd_nrp und dem Anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper, in Verbindung mit der Farbreaktion der alkalischen Phosphatase. Zunächst wurden der Nanos-spezifische polyklonale Primärantikörper Anti-Sd_nrp, sowie das Prä-Immunserum via Western-Blot auf ihre Spezifität hin getestet (Abb. 30 A).

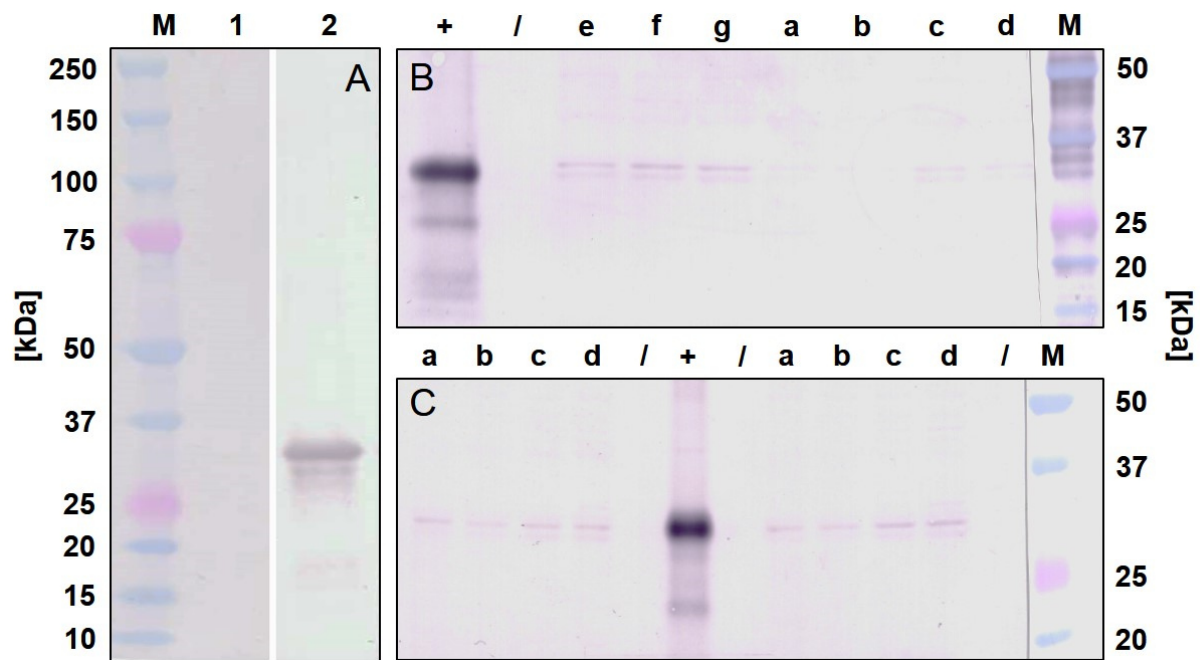


Abb. 30: Nachweis des nativen Proteins Sd_nrp in Proteinextrakten aus dem Gewebe von *S. domuncula*

A) Western Blot (SDS-PAGE 4-12%; 15 well; MOPS-Puffer): Von links nach rechts: M: Marker (Precision Plus Protein™ Dual Color; Bio-Rad); 1: Prä-Immun-Serum 1 : 1000, 2: Anti-Sd_nrp (polyklonaler Antikörper) 1 : 5000; als sekundärer Antikörper wurde hier der Anti-Rabbit IgG im Verhältnis 1 : 5000 eingesetzt ; B) Western Blot (10 well, 12 %): +) Positivkontrolle, rekombinantes Sd_nrp; E), F), G), A), B), C), D): Proteinextrakte, hergestellt mit unterschiedlichen Extraktionspuffern (Kapitel B 8.11); M: Marker; C) Western Blot (15 well, 12 %): A), B), C), D) Proteinextrakte, hergestellt mit unterschiedlichen Extraktionspuffern (Kapitel B 8.11); Es wurden jeweils 30 µl Proteinlösung mit 10 µl Rotiload 1 (Roth) versetzt und dann bei den 10 well Blots 20 µl, und bei den 15 well Blots 10 µl aufgetragen.

Dazu wurden ca. 6 µg des rekombinanten Proteins Sd_nrp auf ein SDS-Gel (4-12 %) aufgetragen, anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit dem Primärantikörper Anti-Sd_nrp im Verhältnis 1 : 5000, sowie dem Prä-Immunserum im Verhältnis 1 : 1000 inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde der Anti-Rabbit IgG im Verhältnis 1 : 5000 eingesetzt.

In Abb. 30 A ist in Spur 1 deutlich zu erkennen, dass das Prä-Immunserum nicht mit dem rekombinant hergestellten Sd_nrp reagiert. Es ist somit geeignet, um bei den anschließenden Immunfluoreszenz-Analysen als Negativkontrolle zu fungieren. In Spur 2 dagegen, ist eine deutliche Reaktion des polyklonalen Anti-Sd_nrp Antikörpers mit dem rekombinant hergestellten Protein Sd_nrp zu beobachten. Bei der hier verwendeten Verdünnung von 1 : 5000 zeigt der Anti-Sd_nrp eine spezifische Reaktion mit dem Zielprotein. Er wurde daher in nachfolgenden Versuchen für die immunologische Detektion des nativen Sd_nrp eingesetzt. Wie Abb. 30 B zeigt, sind die Proteinbanden von Sd_nrp in allen verwendeten Proteinextrakten deutlich auf der Höhe zwischen der 25 kDa und der 37 kDa Bande des Markers zu erkennen. Zusätzlich kann die korrekte Position der Proteinbanden des nativen Sd_nrp noch über die eingesetzte Positivkontrolle mit dem rekombinanten Sd_nrp bestätigt werden.

3. Zellkultivierung von Schwamm-Primmorphen

Bei Primmorphen handelt es sich um eine spezielle Form von 3D-Zellaggregaten, welche sich aus zuvor dissoziierten Schwammzellen formen (Kapitel A 1.3). Diese dissoziierten Zellen formen nach ca. 1 Tag zunächst einen amorphen Belag in der Kultivierungsschale, welcher sich dann zu immer größer werdenden Aggregaten zusammenlagert.

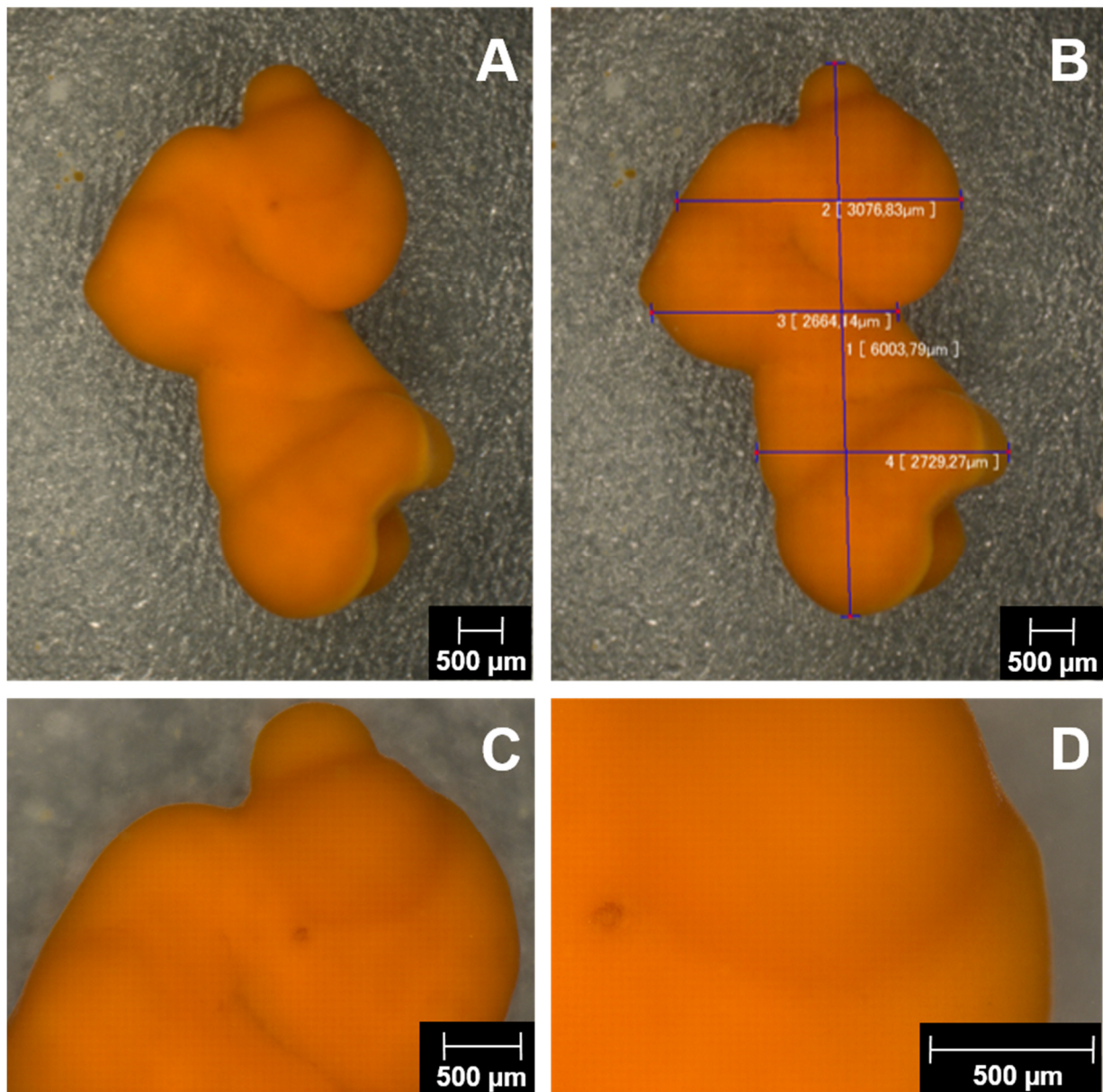


Abb. 31: Primmorph des marinen Schwamms *Suberites domuncula*

A) Primmorph von *Suberites domuncula*, 4 Tage nach der Dissoziation der Schwammzellen und ihrer anschließender Kultivierung in CMFSW versetzt mit Antibiotika (Vergrößerung 20 x; Zusammensetzung des Kulturmediums siehe Kapitel B 9.1. B) Echtzeitmessung zur exakten Größendarstellung des Primmorphs. C) Ausschnittsvergrößerungen des Primmorphs (50 x). D) Ausschnittsvergrößerung des Primmorphs (200 x). Alle Aufnahmen wurden mit einem Digitalmikroskop (VHX 1000; Keyence, Neu-Isenburg) unter Verwendung des Zoomobjektivs VH-Z20R (20-200x) angefertigt.

Die Oberfläche dieser Aggregate besitzt noch nicht die charakteristische Schicht aus Pinacocyten, sie ist in dieser Phase noch uneben und rau (Le Pennec et al., 2003).

Nach 2 bis 3 Tagen bekommen die Aggregate eine leicht kugelige Form und ihre Oberfläche wird zunehmend glatter. Die für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Exemplare, wurden ab dem Zeitpunkt der Dissoziation von Schwammgewebe 4 Tage kultiviert (Kapitel B 9.1). Sie verfügen in dieser Phase an ihrer Oberfläche über ein sogenanntes Plattenepithel, bestehend aus Pinacocyten, welche anhand ihrer morphologischen Merkmale identifiziert wurden (Müller et al., 1999; Le Pennec et al., 2003). Im Inneren befinden sich proliferierende und differenzierende Zellen (Müller et al., 2004), wobei es sich hierbei neben den zum größten Teil sphärischen Zellen, um Amöbocyten und Archaeocyten handelt (Le Pennec et al., 2003).

In Abb. 31 ist ein 4 Tage alter Primmorph zu sehen, welcher direkt im Anschluss an die Kultivierungszeit für die Anfertigung histologischer Schnitte fixiert wurde (Kapitel B 8.9). In den Ausschnittsvergrößerungen der Abb. 31 C und D ist deutlich die samtige und glatte Oberfläche zu erkennen, wie sie auch bei adulten Schwammexemplaren zu beobachten ist.

Zur Feststellung der exakten Größe des Primmorphs, wurde eine Echtzeitmessung mit einem Digitalmikroskop (VHX 1000; Keyence, Neu-Isenburg) unter Verwendung des Zoomobjektivs VH-Z20R (20-200x) angefertigt. Sie betrug bei diesem Exemplar ca. 6 mm in der Länge und durchschnittlich an drei gemessenen Positionen ca. 3 mm in der Breite (Abb. 31 B). Nach der Fixierung des Primmorphs und der Anfertigung der histologischen Schnitte wurden diese für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Dazu wurden die Schnitte zunächst mit dem primären, polyklonalen Anti-Sd_nrp Antikörper inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3 der Firma Dianova (Hamburg) und dem die DNA markierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol). Die exakte Durchführung der Vorbereitung und Färbung der Schnitte ist in Kapitel B 8.9 beschrieben.

4. Immunfluoreszenz-Analysen des rekombinanten Sd_nrp

Zur Durchführung der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie, wurden zuvor Mikrotomschnitte unterschiedlicher Gewebetypen von *Suberites domuncula* angefertigt (Kapitel B 8.9.1 und B 8.9.2). Dazu gehören 1. Die epithelartige Schicht bzw. das Pinacoderm und die angrenzenden Zellschichten eines adulten Schwammes, 2. Ein 4 Tage alter Primmorph und 3. Gemmulae, welche dem Substrat entnommen wurden, dem der Schwamm zuvor aufsass. Anschließend wurde die Expression von Sd_nrp mit Hilfe des polyklonalen Anti-Sd_nrp Antikörpers (Kapitel B 8.8) sowie einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper (Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3) in den unterschiedlichen Gewebeschnitten untersucht. Dabei konnten die Antikörper im angrenzenden Gewebe des Epithels, des Primmorphen und in den Gemmulae detektiert werden. Die Negativkontrollen wurden jeweils mit dem Prä-Immuns serum (Kapitel 8.9.3) und dem Cy3 konjugierten Sekundären Antikörper angefertigt.

4.1 Expression von Sd_nrp im Pinacoderm und angrenzenden Zellschichten

Der polyklonale Anti-Sd_nrp färbte die direkt unterhalb des Pinacoderms liegende Zellschichten, vorwiegend das Mesohyl und Teile des Choanoderms, nur leicht an. Dort zeigte sich das Signal punktförmig und gleichmäßig in granulösen Zellstrukturen des Gewebes verteilt. Im Gegensatz dazu zeigte die dünne Schicht des Pinacoderms, welches aus epithelartigen Zellen besteht (Müller et al., 1999; Le Pennec et al., 2003), ein etwas stärkeres Signal des Antikörpers (siehe Abb. 32). Die Detektion der Zellkerne bzw. der Nukleinsäuren erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, und ist in der Abbildung an den blau angefärbten Zellstrukturen zu erkennen.

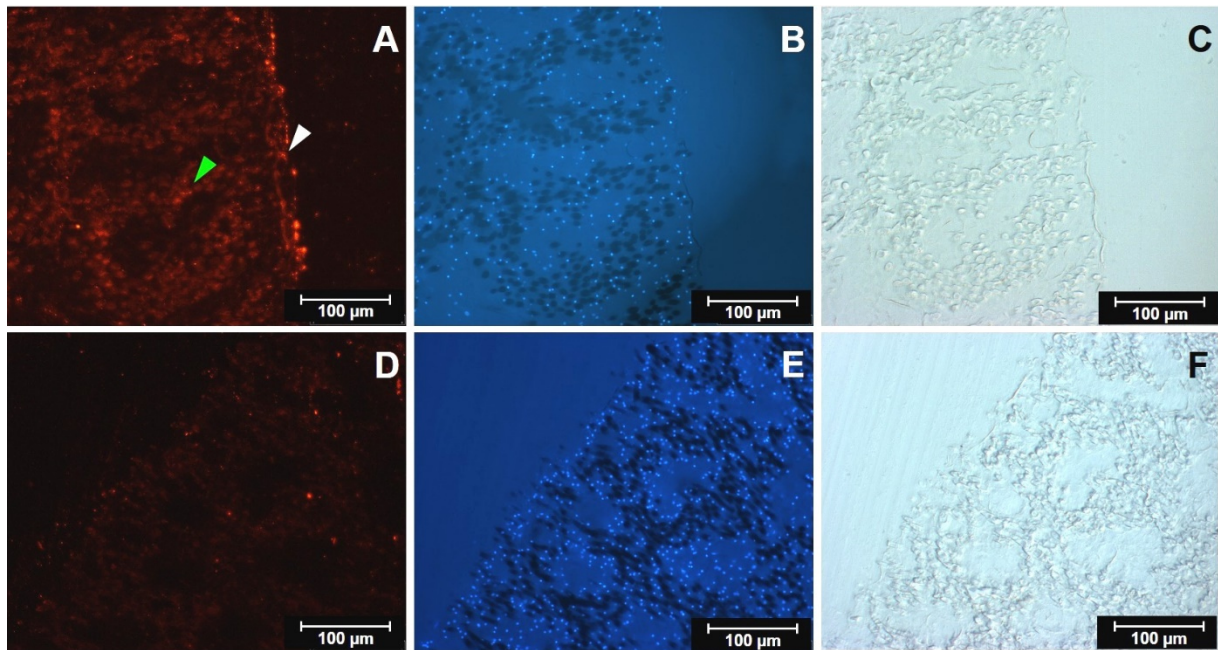


Abb. 32: Sd_nrp Expression in Gewebeschnitten von *Suberites domuncula*

Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten mit dem polyklonalen Antikörper Anti-Sd_nrp in der Verdünnung 1 : 100 (Vergrößerung 20 x). A) Innerhalb der granulösen Zellstrukturen des Gewebes ist eine schwache, punktförmige Färbung des Antikörpers zu beobachten (grüne Pfeilspitze) und eine etwas stärkere Detektion im Bereich der epithelartigen Zellen an der Oberfläche des Schwammes (weisse Pfeilspitze). B) und E) Fluoreszenzaufnahmen mit dem Farbstoff DAPI zur Lokalisation der Zellkerne. C) und F) Nomarski-Aufnahmen zur visuellen Kontrolle der zellulären Strukturen. D) Immunfluoreszenzanalyse der Negativkontrolle nach Inkubation mit dem Prä-Immunserum (Kapitel B 8.9.3). Das Schwammgewebe zeigt kein Fluoreszenzsignal. Die Aufnahmen wurden mit einem Vanox AHB3 Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus (Hamburg) angefertigt.

4.2 Expression von Sd_nrp in einem 4 Tage alten Primmorphen

Die Antikörperfärbung des polyklonalen Anti-Sd_nrp zeigt ein eher punktförmiges Muster, welches gleichmäßig im Gewebe des Primmorphen verteilt ist (Abb. 33). Dieses vorwiegend aus amöboiden Zellen und Archaeocyten bestehende Gewebe des Primmorphen (Müller et al., 1999; Le Pennec et al., 2003; Müller et al., 2004), enthält u.a. bedingt durch die Präparationsmethode (Kapitel B 9.1) Bruchstücke der Spiculae von *Suberites domuncula* bzw. auch teilweise noch intakte Spiculae (Abb. 34). Darüberhinaus konnte das Antikörpersignal auch an einigen Zellkernen detektiert werden (Abb. 33 u. 34, weiße Pfeilspitzen), welche hier zur Identifikation mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gegengefärbt wurden. Auffällig dabei ist, dass meist die etwas größeren Zellkerne mit dem Antikörper reagieren. Die in der Bildmitte von Abb. 34 liegende Spicula, zeigt dagegen keine Reaktion mit den hier verwendeten Antikörpern Anti-Sd_nrp, dem sekundären Antikörper (Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3) oder dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI.

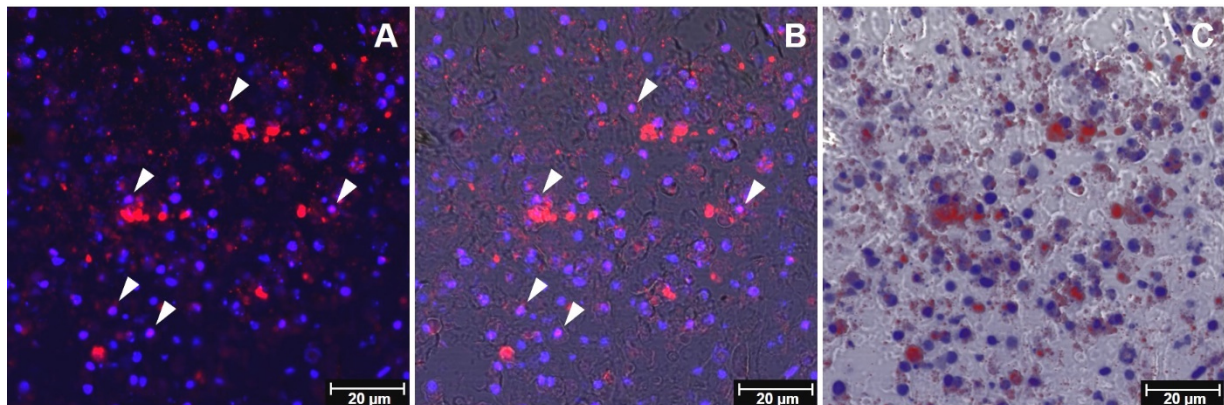


Abb. 33: Übersicht der Expression von Sd_nrp in Primmorphengewebe von *S. domuncula*

Immunfluoreszenzfärbung des Gewebeschnittes eines 4 Tage alten Primmorphen mit dem polyklonalen Antikörper Anti-Sd_nrp (Verdünnung 1 : 100) und dem Cy3 konjugierten, sekundären Antikörper (Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3, rote Färbung). Die Detektion der Nukleinsäuren bzw. der Zellkerne erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blaue Färbung). A) Überlagerung des Signals des Cy3 konjugierten, sekundären Antikörpers (rot, punktförmig und gleichmäßig im Gewebe des Primmorphen verteilt) und der Fluoreszenz der Zellkernmarkierung (blau). B) Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme mit der LM-Aufnahme zur visuellen Kontrolle der zellulären Strukturen. C) 3D-Aufnahme durch die Überlagerung vieler Einzelaufnahmen, zur plastischen Darstellung der Zellstrukturen (angefertigt mit der Software ZEN der Firma Zeiss). A) u. B) Perinukleäre Antikörperfärbung (weisse Pfeilspitzen). Alle mikroskopischen Aufnahmen der Gewebeschnitte wurden mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop LSM 710 der Firma Zeiss (Göttingen) durchgeführt. Die Anregung des Cy3 Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte mit dem Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 543 nm und zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI wurde der Diodenlaser mit der Wellenlänge 405 nm verwendet. Die grundsätzliche Vergrößerung der Bilder ist 40 x und wurde mit den unterschiedlichen Zoomoptionen des Mikroskops entsprechend erweitert. Die exakte Größe der Objekte ist anhand der Maßstäbe nachzuvollziehen.

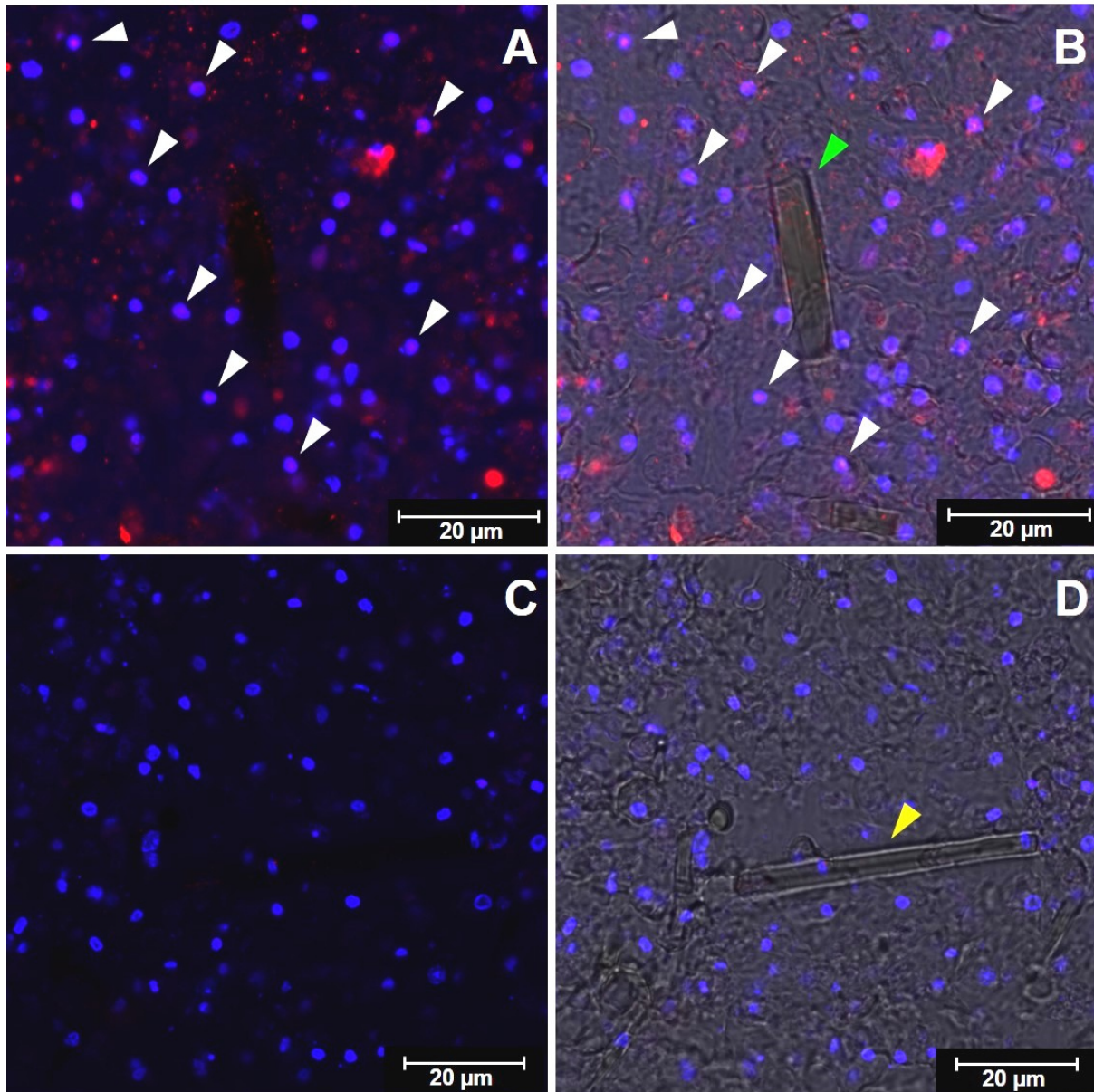


Abb. 34: Ausschnittsvergrößerung der Expression von Sd_nrp in Primmorphengewebe von *S. domuncula*

Immunfluoreszenzfärbung des Gewebeschnittes eines 4 Tage alten Primmorphen mit dem polyklonalen Antikörper Anti-Sd_nrp (Verdünnung 1 : 200) und dem Cy3 konjugierten, sekundären Antikörper (Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3, rote Färbung). Die Detektion der Zellkerne bzw. der Nukleinsäuren erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blaue Färbung). A) Überlagerung des Signals des Cy3 konjugierten, sekundären Antikörpers (rote Färbung, punktförmig und gleichmäßig im Gewebe des Primmorphen verteilt) und der Fluoreszenz der Zellkernmarkierung (blaue Färbung). B) Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme mit der LM-Aufnahme zur visuellen Kontrolle der zellulären Strukturen. Die mittig in der Aufnahme gelegene Spicula (grüne Pfeilspitze) zeigt keine Reaktion mit den Antikörpern. A) u. B) Perinukleäre Antikörperfärbung (weisse Pfeilspitzen). C) Immunfluoreszenzanalyse der Negativkontrolle nach Inkubation mit dem Prä-Immunsereum (Kapitel B 8.9.3). Das Primmorphengewebe zeigt kein Fluoreszenzsignal. D) Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme mit der LM-Aufnahme. Auch die in der Mitte der Aufnahme gelegene Spicula (gelbe Pfeilspitze) zeigt keine Reaktion mit den Antikörpern. Geräte und Methode siehe Abb. 33.

4.3 Expression von Sd_nrp in Gemmulae von *S. domuncula*

Die Antikörperfärbung des polyklonalen Anti-Sd_nrp lässt sich in Gemmulae von *Suberites domuncula* vorwiegend gleichmäßig im mit granulären Reservesubstanzen gefüllten Cytoplasma der größeren Zellen der Gemmulae beobachten (Abb. 35 A, weiße Pfeilspitzen). Bei diesen granulösen Zellstrukturen handelt es sich meist um amöboiden Archaeocyten, Trophocyten und Thesocyten (Borojevic, 1966; Weissenfels, 1989). Je nach Entwicklungsphase sind in der frühen Gemmula-Anlage ein- oder zweikernige Archaeocyten und Thesocyten zu beobachten (Abb. 3). Bei den Thesocyten handelt es sich sozusagen um ruhende Archaeocyten, welche einen hohen Anteil an Reservestoffen enthalten, wie z.B. Vitellin, und mikroskopisch als granuläre Strukturen zu erkennen sind (Funayama, 2010). Während der späteren Reifungsphase bzw. der Phase des Schlüpfens durchlaufen die zweikernigen Thesocyten dann die Phase der Cytokinese und aus ihnen entstehen die zuvor beschriebenen einkernigen Archaeocyten (Simpson, 1984; Weissenfels, 1989).

Am äußeren Rand der Abbildung 35 lässt sich auch sehr gut die Schalenschicht der Gemmula erkennen (rote Pfeilspitze). Die Detektion der Schale ist hier nicht auf eine unspezifische Reaktion mit den Antikörpern zurückzuführen, sondern ist eher eine Folge der fluoreszierenden Eigenschaft von Bestandteilen der Gemmulaschalen. Dieses Phänomen wurde bereits 1968 von Read et al., beschrieben. Hier konnte die Fluoreszenz in den lamellenartigen Anteilen der Sponginfasern beobachtet werden, welche ein wesentlicher Bestandteil der Gemmulaschalen sind (Ereskovsky, 2010). Des Weiteren konnte ein schwaches Antikörpersignal auch im Bereich der Zellkerne detektiert werden (Abb. 35 A, grüne Pfeilspitze). Sie wurden hier mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gegengefärbt. Auffällig ist auch hier, dass ähnlich dem Fluoreszenzsignal im Primmorphengewebe, häufig größere Zellkerne mit dem Antikörper reagieren. Die Immunfluoreszenzanalyse der Negativkontrolle erfolgte nach Inkubation mit dem Prä-Immunserum (Kapitel B 8.9.3) sowie dem Cy3 konjugierten, sekundären Antikörper. Dabei konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 35 B).

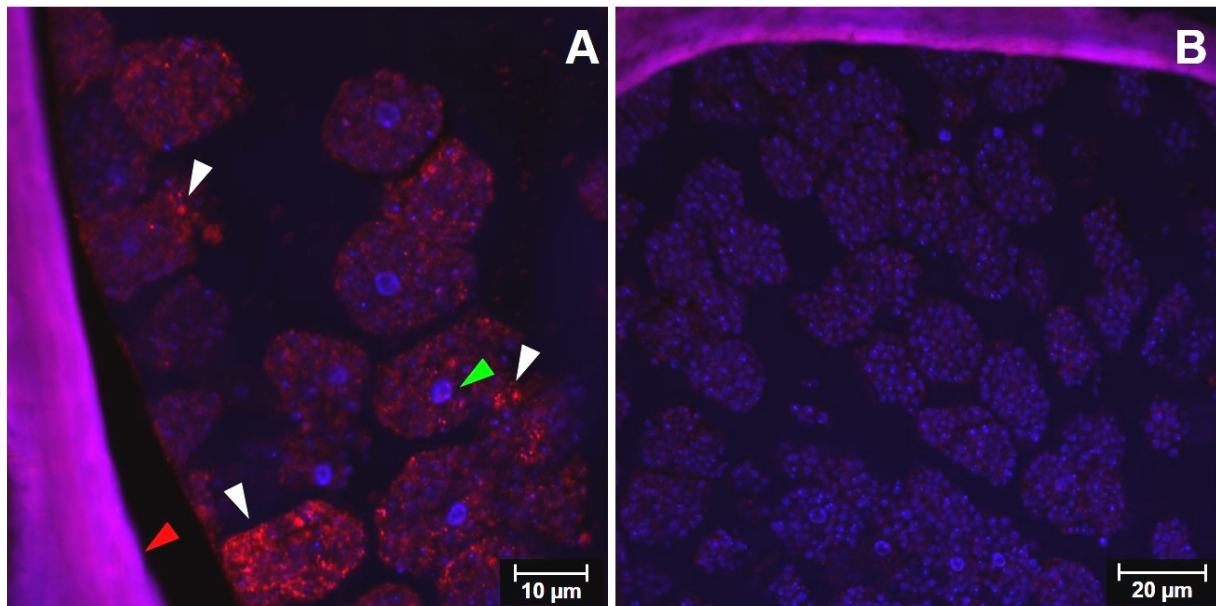


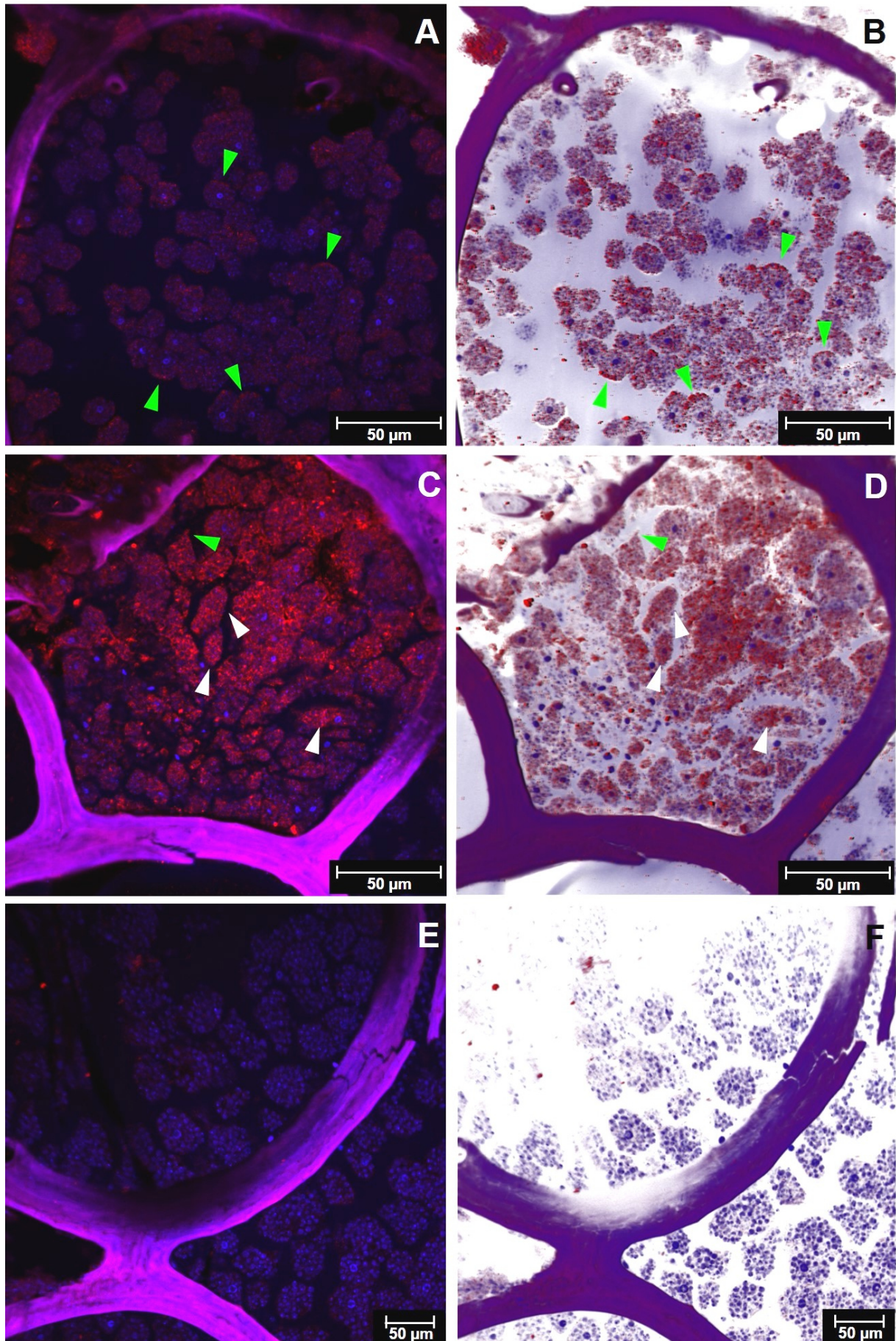
Abb. 35: Sd_nrp Expression in Gemmulae von *S. domuncula*

Immunfluoreszenzfärbung der Gemmulae von *S. domuncula* mit dem polyklonalen Antikörper Anti-Sd_nrp (Verdünnung 1 : 100) und dem Cy3 konjugierten, sekundären Antikörper (Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3, rote Färbung). Die Detektion der Zellkerne bzw der Nukleinsäuren erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blaue Färbung). A) Überlagerung der Fluoreszenzfärbung der granulösen Zellstrukturen innerhalb der Gemmula-Anlage (rote Färbung, weisse Pfeilspitzen) und der Fluoreszenz der Zellkernmarkierung (blaue Färbung), Autofluoreszenz der Schalenschicht der Gemmula (magentafarbene Struktur, rote Pfeilspitze). Schwache Antikörperfärbung auch im Bereich der Zellkerne (grüne Pfeilspitze). B) Die Immunfluoreszenzanalyse der Negativkontrolle nach Inkubation mit dem Prä-Immunserum zeigt kein Fluoreszenzsignal mit den Zellstrukturen der Gemmulae. Geräte und Methode siehe Abb. 33.

In der Abb. 36 A und B ist zu beobachten, dass hier in einigen, der abgerundeten Zellstrukturen das Antikörpersignal deutlich im Bereich der Zellmembran liegt (grüne Pfeilspitzen). Dies wird besonders in der 3D-Aufnahme (Abb. 36 B, grüne Pfeilspitzen) deutlich, da hier durch die Überlagerung der vielen Einzelaufnahmen die Zelle eine plastische Gestalt bekommt (angefertigt mit der Software ZEN der Firma Zeiss). In Abb. 36 C und D dagegen zeigen die Zellstrukturen vorwiegend eine eher amöboide Form mit einem starken Antikörper-Signal im Cytoplasma dieser Zellen (weisse Pfeilspitzen). Teilweise sind bei diesen Zellen auch feine Ausläufer zu beobachten (grüne Pfeile). Die Negativkontrolle der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte auch hier nach Inkubation mit dem Prä-Immunserum (Kapitel B 8.9.3) sowie dem Cy3 konjugierten, sekundären Antikörper. Dabei konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 36 E u. F).

Abb. 36: Übersicht der Expression von Sd_nrp in Gemmulae von *S. domuncula*

Immunfluoreszenzfärbung der Gemmulae von *S. domuncula* mit dem polyklonalen Antikörper Anti-Sd_nrp (Verdünnung 1 : 200) und dem Cy3 konjugierten, sekundären Antikörper (Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3, rote Färbung). Die Detektion der Zellkerne bzw der Nukleinsäuren erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blaue Färbung). A) Überlagerung der Fluoreszenzfärbung der Zellstrukturen mit dem Cy3 konjugierten, sekundären Antikörper (rote Färbung) im Bereich der Zellmembran (grüne Pfeilspitzen) und der Fluoreszenz der Zellkernmarkierung (blaue Färbung). B) 3D-Aufnahme (ident. zu A) durch die Überlagerung vieler Einzelaufnahmen, zur plastischen Darstellung der Zellstrukturen (angefertigt mit der Software ZEN, Firma Zeiss). C) Fluoreszenzfärbung größerer u. teilweise amöboider Zellstrukturen (weisse Pfeilspitzen). E) Die Immunfluoreszenzanalyse der Negativkontrolle nach Inkubation mit dem Prä-Immunserum zeigt kein Fluoreszenzsignal mit den Zellstrukturen der Gemmulae. F) 3D-Aufnahme (ident. zu E); Geräte und Methode siehe Abb. 33.



(Beschriftung der Abb. 36 siehe S. 109)

D Diskussion

Bei der Aufklärung von Entwicklungsvorgängen bei den Metazoa (vielzellige Tiere), insbesondere bei den höheren Vertebraten, zu denen auch der Mensch gehört, betrachtet man heute in erster Linie die mit diesen Vorgängen assoziierten, regulatorischen Gene sowie deren Genprodukte. Verfolgt man nun die Entwicklungswege dieser Gene bis zu ihrem evolutionären Ursprung zurück, ermöglicht dies ein besseres Verständnis über ihre heutigen Funktionen sowie die Funktion und Struktur der Proteine, für die sie codieren. Da das Phylum Porifera eine sehr basale Stellung innerhalb Metazoa einnimmt (Müller, 2001; Müller et al., 2001), ist die Analyse des genetischen Repertoires des Schwammgenoms, von enormer Bedeutung.

Heutige molekulare Analysemethoden ermöglichten die Identifizierung und Charakterisierung von Genen innerhalb der Schwämme, welche eine entscheidende Rolle bei der evolutionären Entwicklung der Metazoa und speziell der Entwicklung des sogenannten Bauplan spielten. Dazu gehören z.B. die charakteristischen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsmoleküle (Müller, 1997) oder die mit ihnen assoziierten Transkriptionsfaktoren wie z.B. Proteine der Homöodomäne (Homöobox-Gene) (Wiens et al. 2003). In zahlreichen Studien konnten bisher sieben Zell-Zell-Signalwege identifiziert werden, welche bei der Regulation der Entwicklungsvorgänge bei höheren Metazoen (Bilateria) hauptsächlich beteiligt sind. Dazu gehören die Gene von Wnt, TGF- β , Hedgehog, Rezeptor-Tyrosinkinase, nukleären Rezeptoren, Notch und JAK/STAT (Barolo & Posakony, 2002; Leys & Hill, 2012).

Das man bereits auch in den Genomen der Porifera, Liganden und Rezeptoren für einen Großteil dieser Gene identifizieren konnte (Müller, 2003; Wiens et al., 2003; Larroux et al., 2006; Nichols et al., 2006; Adamska et al., 2007; Adamska et al., 2011), stützt die Annahme, dass die Schwämme, bereits über alle grundlegenden Eigenschaften des charakteristischen Bauplans der Metazoen verfügen, und dieser sogar für die höheren Taxa gültig ist (Müller et al., 2003; Wiens et al., 2003).

Die Eigenschaften dieses Bauplans sind durch das genetische Repertoire der Metazoen determiniert und sind bereits bei einem ihrer basalsten Vertreter, den Schwämmen präsent (Müller et al., 2004). Dies konnte auch anhand der Daten, welche durch die erste vollständige Entschlüsselung des kompletten Genoms eines Schwammes gewonnen wurden, bestätigt werden (Srivastava et al., 2010). In dieser Studie wurden die gesamten genomischen Daten der Schwammspezies *Amphimedon queenslandica* (Klasse Demospongiae) nach Hinweisen auf RNA-bindende Proteine untersucht.

Des Weiteren konnte mit diesen Daten bestätigt werden, dass diese spezielle genetische Ausstattung der Schwämme, welche für die Organisation der Schwammentwicklung verantwortlich ist, in Vertretern der Nicht-Metazoen weitestgehend fehlt. Und das dieses Erkenntnis die Annahme stützt, dass die ontogenetische Entwicklung ihren Ursprung an der Basis der Metazoen hat (Leys & Hill, 2012; Srivastava et al., 2010). Daher ist die Analyse der genetischen Konstitution der Schwämme zum einen unerlässlich für die Aufklärung und das Verständnis der Entwicklungsvorgänge der Metazoen, sowie deren evolutionären Ursprungs, und zum anderen sollen diese Analysen natürlich auch weitere Einblicke in die Entwicklungsprozesse der Schwämme ermöglichen.

Ein weiterer wichtiger Schritt in diesem Zusammenhang, war die Beantwortung der Frage, ob neben diesen charakteristischen Genen auch die für die Musterbildung und Achsendeterminierung verantwortlichen Morphogene und Transkriptionsfaktoren der Metazoen im Genom der Schwämme zu finden sind. So konnte z.B. in dem marinen Schwamm *Geodia cydonium* ein potentiell Morphogen, das endothelial monocyte-activating polypeptide (EMAP) identifiziert werden, welches u.a. in Prozesse der Zellaktivierung und Migration von Zellen involviert ist (Pahler et al., 1998). Auch zwei T-Box Gene aus dem marinen Schwamm *Suberites domuncula* (Adell et al., 2003a), von denen eines der Brachyury- und eines der Tbx2-Unterfamilie zugeordnet werden konnte, wurden in diesem Zusammenhang identifiziert. Diese für die Musterbildung und die Differenzierungswege (Zellschicksal) der Zellen verantwortlichen Transkriptionsfaktoren konnten dort im Gewebe von Primmorphen (3D-Zellaggregate) nachgewiesen werden. Weiter konnte hier gezeigt werden, dass es in den sich differenzierenden Schwammzellen, während der Bildung kanalähnlicher Strukturen, zu einer Hochregulierung des Gens Brachyury kommt (Adell et al., 2003a). Aufgrund dieser Beobachtung nimmt man an, dass in den Schwämmen eine ursprüngliche Achsendeterminierung genetisch etabliert ist (Müller et al., 2004).

Die Entwicklung der als Primmorphe bezeichneten 3D-Zellaggregate, welche durch die Kultivierung von zuvor dissoziierten Schwammzellen entstehen und damit als ein System wachsender Zellen anzusehen sind (Müller et al., 1999), führte dabei zu einem enormen Fortschritt bei der Beantwortung der Frage nach der Existenz einer Musterbildung bzw. Achsenbildung bei Schwämmen (Müller, 2006b). In diesen vorwiegend aus proliferierenden und zum Teil differenzierenden Zellen bestehenden Primmorphen (Müller et al., 1999), konnten noch weitere an der Morphogenese beteiligte Gene untersucht werden. Im Jahr 2000 konnte dann ein Myotrophin-verwandtes und ebenfalls zu den Morphogenen zählendes Protein in Primmorphen von *S. domuncula* identifiziert werden (Schröder et al., 2000). Darauf folgte die Entdeckung eines epidermalen Wachstumsfaktors (engl.: epidermal growth factor, EGF) (Perovic-Ottstadt et

al., 2004b), eines an der Achsendeterminierung beteiligten Rezeptors, Frizzled (Adell et al., 2003b), sowie dem an der Musterbildung und Differenzierung beteiligten Polaritätsgen, das LIM Homöobox Protein (Wiens et al., 2003) und dem Transkriptionsfaktor Forkhead (Adell & Müller, 2004). Eine weitere wichtige Entdeckung in diesem Zusammenhang war der Nachweis der Expression von Proteinen des Wnt-Signalweges in den Schwammspezies *Amphimedon queenslandica* (Ereskovsky & Dondua, 2006) und *Ephydatia muelleri* (Windsor & Leys, 2010). Dabei konnten in *A. queenslandica* Wnt-Signalproteine in Embryos bzw. in den diese schon ab den ersten Teilungsphasen umspannenden Follikelschichten nachgewiesen werden, aber zunächst ohne Polarität (Adamska et al., 2010). Erste Hinweise auf eine Polarität lieferte in dieser Studie die Expression von WntA, in den entlang der anterior-posterioren Achse asymmetrisch angeordneten Zellen. Wobei die Bereiche, in denen die Expression nicht zu beobachten war, als der zukünftige posteriore Pol beschrieben wurden. (Adamska et al., 2007). Des Weiteren konnte eine Beteiligung von Wnt-Signalproteinen bei der Achsenbildung juveniler Schwämme, welche aus keimenden Gemmulae stammten, beobachtet werden (Windsor & Leys, 2010). Mit Glykogensynthase-Kinase-3 (GSK-3) Inhibitoren wie LiCL und Alsterpaullone gelang dort die Simulierung des Wnt-Signalweges, was ein vielfaches Entstehen der Oskula zur Folge hatte, und als eine vielfache Entstehung der Körperachse interpretiert wurde. Bereits im Jahr 2006 wurde die Bildung einer oskularen/apikal-basalen Achse bei den Schwämmen beschrieben (Müller, 2006b). Dort wurde aufgrund der Expression von homologen Proteinen der Vertebraten-Organisatoren in diesem Bereich, eine Art Organisatoren-Funktion (embryonales Signalzentrum) des Oskulums vermutet. Ob auch die Nanos-verwandten Proteine der Schwämme, ähnlich wie in *Drosophila* eine funktionelle Aufgabe bei der embryonalen Achsenbildung dieser Tiere übernehmen, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Während die Funktion des Nanos-Proteins bei der Etablierung der anterior-posterioren Achse (Längsachse) des frühen Embryos der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (St. Johnston und Nüsslein-Volhard, 1992) auch bei vielen anderen Dipteren beschrieben wurde, und daher dort als konserviert gilt (Curtis et al., 1995a), ist über diese spezielle Funktion von Nanos außerhalb dieser Ordnung wenig bekannt. In einer Studie von Lall et al., 2003 konnte ein Nanos-Homolog in der Feldheuschreckenspezies *Schistocerca americana* identifiziert werden. Dort konnte via In-situ-Hybridisierung und Immunfluoreszenz-Analyse die mRNA und das Protein des Nanos-Homologs innerhalb des Cytoplasmas des posterioren Bereichs embryonaler Zellen beobachtet werden. Parallel wurde speziell in diesen Bereichen keine Expression des Hunchback Proteins detektiert. Zahlreiche Studien dagegen beschreiben die funktionelle Konservierung Nanos-homologer Proteine innerhalb der Invertebraten und Vertebraten eher in der Keimbahn bzw. den Keimzellen und Stammzellen dieser Organismen (Mochizuki et al., 2000; Kang et al., 2002;

Subramaniam & Seydoux, 1999; Köprunner et al., 2001; Mosquera et al., 1993; Tsuda et al., 2003; Jaruzelska et al., 2003).

Lange Zeit standen für die Analyse entwicklungsgenetischer und embryonaler Vorgänge in den Schwämmen wie z.B. Gametogenese, Befruchtung und frühe Embryogenese (Larvalentwicklung), meist nur morphologische Untersuchungsmethoden bzw. cytologische Marker zur Verfügung (Simpson, 1984; Bergquist, 1978; Weissenfels, 1989; Boury-Esnault und Rützler, 1997). Neben der Problematik der eindeutigen Identifizierung spezifischer Zellen und Strukturen mit der Hilfe von Lichtmikroskopen, gibt es aufgrund der fehlenden Gonaden auch keinen definierten Bereich, in dem die mit diesen Zellen assoziierten Vorgänge zu beobachten sind. Darüber hinaus existieren viele unterschiedliche Reproduktionstypen und auch eine damit verbundene hohe Variabilität an Reproduktionszeiten (Bergquist, 1978).

Aus diesen Gründen sind Untersuchungen, welche z.B. die Stammzellen oder Keimzellen und der mit diesen Zellen verbundenen Differenzierungsvorgänge betreffen, sowie der Nachweis beteiligter Entwicklungsgene, welche Hinweise auf die Existenz einer Keimbahn bei Schwämmen liefern könnten, bisher kaum vorhanden. Nach allgemein anerkannten Studien gelten Archaeocyten als die totipotenten Stammzellen (Simpson, 1984; Müller et al., 2004). Sie stellen demnach den Ursprung für alle folgenden Differenzierungsprozesse dar bis hin zu endgültig ausdifferenzierten Zellen (Borojevic, 1966; 1977; Müller, 2006a), und gelten damit auch als Ursprung der Keimzellen. Aber auch Choanocyten werden in diesem Zusammenhang genannt. Nach Diaz (1977) sollen sie über die Fähigkeit verfügen, sich zu Archaeocyten zu differenzieren. Darüberhinaus sollen sie ihren pluripotenten Charakter auch dann noch besitzen, wenn sie bereits ausdifferenziert sind, zu erkennen an ihrem typischen Kragen, dem Flagellum und ihrer phagozytierenden Funktion (Funayama et al., 2010; Funayama, 2008; Leys & Hill, 2012). Auch die Bildung von Gameten aus diesen Zellen konnte bereits in zahlreichen Studien belegt werden. In einer Arbeit von Witte & Barthel (1994) konnte die Bildung von Oocyten aus Archaeocyten nachgewiesen werden. Als Ursprung der Spermatocyten dagegen gelten die zuvor erwähnten Choanocyten (Funayama et al., 2010). Diese Erkenntnisse unterstützen die Annahmen, dass sowohl die Archaeocyten als auch die Keimzellen über den gleichen Stammzellcharakter verfügen, und als totipotente Stammzellen zu betrachten sind (Müller, 2006a).

Mit Hilfe molekulargenetischer Methoden konnten im Jahr 2004 in einer Studie von Perovic-Ottstadt et al. bestimmte Gene, deren Expression im Zusammenhang mit der sexuellen Fortpflanzung stehen, als sogenannte genetische Marker zur Identifizierung von Oocyten und Larven in der Schwammspezies *Suberites domuncula* etabliert werden (Perovic-Ottstadt et al., 2004a). Dazu zählen eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), welche u.a. am Zellwachstum beteiligt

ist, das an der Geschlechtsdeterminierung beteiligte Protein FEM1, und das Spermatozoen-Antigen SAA der Triploblasten. Durch den Einsatz von Antikörpern, welche gegen die extrazelluläre Domäne der RTK gerichtet sind, konnten in dieser Studie anschließend die Oocyten und Larven in Gewebsschnitten von *Suberites domuncula* nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Fluoreszenz-In-situ-Hybridisierungen, konnte dabei auch gezeigt werden, dass FEM1 und SAA in den Bereichen exprimiert wird, in welchen höchstwahrscheinlich die Gametogenese beginnt.

Auch das RNA-bindende Protein Nanos ist an wichtigen entwicklungsgenetischen Prozessen beteiligt. Neben der Rolle als Translationsrepressor bei der Determinierung der Anterior-posterior-Achse bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Hülskamp et al., 1989), ist es auch an der Regulation der Keimbahn dieses Organismus beteiligt (Lin & Spradling, 1997). Homologe des Nanos-Proteins konnten bisher in diversen Organismen wie Hydra (Mochizuki et al., 2000), Blutegel (Kang et al., 2002), Fadenwurm (Subramaniam & Seydoux, 1999), Zebrafisch (Köprunner et al., 2001), Frosch (Mosquera et al., 1993), Maus (Tsuda et al., 2003) und dem Menschen (Jaruzelska et al., 2003) identifiziert werden (Lai et al., 2011).

Diese zahlreichen Studien über die Funktionen der Nanos-Proteine in den unterschiedlichsten und evolutionär gesehen, weit voneinander entfernten Invertebraten- und Vertebraten-Klassen (Metazoa), sind zudem ein Hinweis für die evolutionäre Konservierung bestimmter Funktionen dieser Proteine. Dazu gehören z.B. die Regulation der frühen Keimzellentwicklung (Tsuda et al., 2003), die Aufrechterhaltung bzw. Selbsterneuerung der Stammzellen der Keimbahn (Wang & Lin, 2004) und die Sicherstellung der korrekten Migration, sowie das Überleben der Urkeimzellen (engl.: primordial germ cells, PGCs) (Köprunner et al., 2001).

Die Konservierung der Funktionen der Nanos-Proteine ist vermutlich auch auf die Konservierung der Sequenz ihrer funktionalen Zinkfinger-Domäne zurückzuführen. So wurden z.B. bei *C. elegans* drei Gene entdeckt, welche über eine ähnliche Zinkfingerdomäne verfügen, wie sie auch bei den Nanos-Proteinen identifiziert wurde (Subramaniam & Seydoux, 1999). Für zwei dieser Gene, als nos-1 und nos-2 bezeichnet, konnte dort eine Beteiligung bei der Entwicklung der Urkeimzellen (PGCs) dieser Organismen nachgewiesen werden. Die in diesen Studien beobachtete Expression dieser Proteine in Polzellen, Stammzellen, Urkeimzellen, Keimzellen und pluripotenten Zellen, sind ein klarer Hinweis darauf, dass es sich bei dem Nanos-Protein, ähnlich dem Protein Vasa (Mochizuki et al., 2001), um eine Keimzell-Determinante handelt (Extavour & Akam, 2003), und dass es daher für die in dieser Arbeit vorgesehenen Untersuchungen ein geeigneter molekularer Marker sein könnte.

Innerhalb der Metazoa, sind ausschließlich die Zellen der Keimbahn zur Bildung von Gameten (Spermien und Eizellen) in der Lage. Sie verfügen über zwei charakteristische Eigenschaften,

zum einen gelten sie als totipotent, und können daher in geeigneter Umgebung noch zu vollständigen Organismen heranwachsen, und zum anderen werden sie als potentiell unsterbliche Zellen bezeichnet (Lai und King, 2013).

Bei den beiden Tierstämmen Porifera und Cnidaria z.B., welche als basale Vertreter der Metazoen gelten, entstehen die Keimzellen aus einer sogenannten Stammzell-Population, aus der aber auch andere Zelltypen hervorgehen können. Daher ist bei diesen Tieren der Übergang von der Keimbahn zum Soma fließend (Extavour & Akam, 2003). Die Beobachtung, dass Schwämme aber in der Lage sind, haploide Gameten zu produzieren (Perovic-Ottstadt et al., 2004a; Ereskovsky, 2010) und sich sexuell fortpflanzen können (Simpson, 1984), ist ein klarer Hinweis dafür, dass ihre Keimbahn zumindest ähnliche Funktionen, wie die der höheren Metazoen aufweist (Extavour & Akam, 2003).

Aufgrund der Problematik, dass bisher eine klare Trennung zwischen totipotenten Zellen und pluripotenten embryonalen Stammzellen bei Schwämmen nicht möglich ist, werden Schwammzellen meist nur in totipotente bzw. multipotente embryonale Zellen, und in bereits ausdifferenzierte somatische Zellen unterteilt (Schröder et al., 2004). Diese Ansicht konnte in Studien, in denen aus Gewebe-Explantationen die Neubildung von Schwammembryos beobachtet wurde, bestätigt werden (Maldonado & Uriz, 1999). Die dort als Fragmentierung bezeichnete Fortpflanzung wird der sexuellen Fortpflanzung gegenübergestellt (Maldonado & Uriz, 1999). Wie bereits zuvor beschrieben, segregieren Vertreter des Phylums Porifera ihre Keimbahnzellen kontinuierlich aus adulten Stammzellen (Funayama, 2010). Bei diesen Zellen handelt es sich um Archaeocyten, welche auch als die totipotenten Stammzellen der Schwämme bezeichnet werden (Simpson, 1984; Müller et al., 2004). Diese Annahme konnte auch durch die Identifizierung einer Piwi-homologen mRNA als Stammzellmarker in den Archaeocyten bestätigt werden (Funayama et al., 2010). Dabei handelt es sich um ein vorwiegend in den Keimzellen der Vertebraten (Deng & Lin, 2002) und in den Keim- und Somazellen der Keimbahn von *Drosophila* (Cox et al., 1998) exprimiertes, hochkonserviertes Protein, welches auch bereits in den Stammzellen basaler Metazoen, wie Cnidaria nachgewiesen werden konnte (Seipel et al., 2004; Bosch, 2008). Gene der Piwi-Familie sind in diversen Organismen u.a. am RNA-Silencing und der Regulation der Translation beteiligt (Deng & Lin, 2002), und gelten zusammen mit dem Gen Nanos als essentiell für die Aufrechterhaltung der Keimbahn-Stammzellen (Seipel et al., 2004).

Die Archaeocyten wurden bereits sehr früh in histologischen Studien von Borojevic 1966 und 1977 beschrieben, der sie ebenfalls mit den Entwicklungsvorgängen der Schwämme in Verbindung brachte. Da die Funktionen der Nanos-Proteine, wie oben im Text bereits erläutert, innerhalb der Metazoa teilweise sehr konserviert sind, stellte sich die Frage, ob diese in den

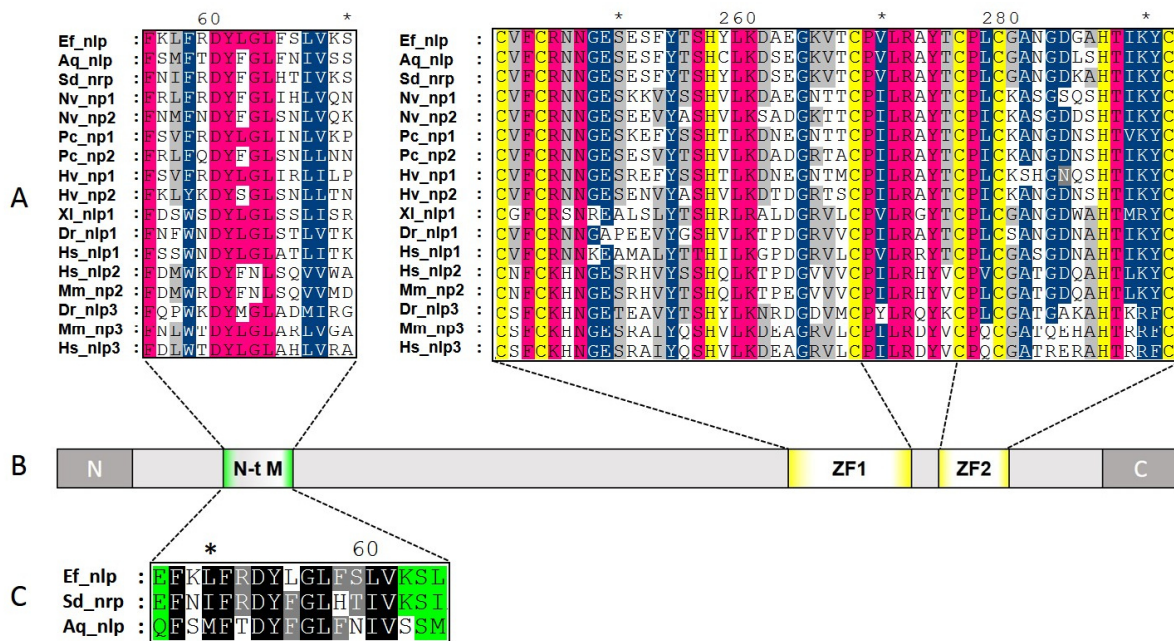
Schwämmen evtl. ähnliche Funktionen aufweisen bzw. dort in den entsprechenden Strukturen als Stammzell- bzw. Keimzellmarker nachzuweisen sind. Obwohl die Nanos-Proteine bereits in zahlreichen Organismen nachgewiesen und funktionell untersucht wurden (Mochizuki et al., 2000; Kang et al., 2002; Subramaniam & Seydoux, 1999; Köprunner et al., 2001; Mosquera et al., 1993; Tsuda et al., 2003; Jaruzelska et al., 2003), ist über ein entsprechendes Gen bzw. Protein in Schwämmen bisher nur wenig bekannt. Lediglich die vollständigen kodierenden Sequenzen Nanos-verwandter Proteine zum einen von dem Süßwasserschwamm *Ephydatia fluviatilis* und zum anderen von dem marinen Schwamm *Amphimedon queenslandica* konnten über die Proteindatenbank des NCBI bezogen werden. Darüber hinaus konnte auch bis heute kein biochemischer Beweis für deren Vorkommen innerhalb der Porifera erbracht werden. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit, das Nanos-verwandte Protein im marinen Schwamm *Suberites domuncula* zunächst identifiziert, und nach anschließender Expression auch biochemisch charakterisiert werden. Darüberhinaus sollte das Protein als molekularer Marker eingesetzt und immunologisch im Gewebe dieser Tiere nachgewiesen werden.

1. Sequenzanalyse und rekombinante Expression von *Sd_nrp*

Nach der erfolgreichen Generierung der vollständigen cDNA von *Sd_nrp* wurde mit dieser Sequenz eine Datenbankrecherche mit der NCBI Protein-Datenbank durchgeführt. Auf diese Weise konnten zahlreiche homologe der Nanos-Protein-Familie identifiziert und zum Vergleich mit der vorliegenden Sequenz aligniert werden. Im resultierenden Alignment welches die unterschiedlichen Mitglieder von Invertebraten- und Vertebratenfamilien repräsentiert, konnte neben der bereits bekannten hochkonservierten Region der Zinkfingerdomäne im C-terminalen Bereich (Hashimoto et al., 2009), eine zusätzliches konserviertes Sequenzmotiv (N-t M) in der N-terminalen Region der Proteine entdeckt werden (N-t M Abb. 37 B und C).

Diese konservierte Region wurde bereits für das Nanos1 Protein des Krallenfroschs *Xenopus laevis* beschrieben (Lai et al., 2011). Es handelt sich dabei um eine 14 Aminosäuren lange Sequenz, welche auch in den meisten hier untersuchten Nanos-Homologen identifiziert werden konnte (Abb. 37). In den vorliegenden Analysen konnte bei den folgenden Invertebraten wie der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*), des Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*), der Schlauchascidie (*Ciona intestinalis*), den beiden Echinodermaten (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Hemicentrotus pulcherrimus*), sowie dem Nanos-Homolog 1 eines Vertreters der Vertebraten, der Maus (*Mus musculus*), diese konservierte Region nicht oder nur in abgewandelter Form beobachtet werden. Über Deletions und Substitutionsversuche konnte

gezeigt werden, dass diese Region für die Funktion des Proteins als Translationsrepressor unerlässlich ist (Lai et al., 2011). Die Repression der Expression der Ziel-mRNAs erfolgt z.B. im Fall der drei humanen Nanos-Proteine (Nanos 1-3) durch das Rekrutieren eines sogenannten Effektorkomplexes, dem CCR4-NOT Deadenylase Komplex. Die Nanos-Proteine 1-3 interagieren dabei über ihre kurzen CNOT1-interagierenden-Motive (NIM) mit der CNOT1 C-terminalen Domäne des CCR4-NOT Komplexes. Dieses als NIM bezeichnetes Sequenzmotiv im N-terminalen Bereich der Nanos-Proteine gilt in allen Vertebraten und einigen Invertebraten als konserviert und liefert die strukturelle Basis für die spezifische molekulare Erkennung sowie die Interaktion mit dem CCR4-NOT Deadenylase Komplex (Bhandari et al., 2014). Auch in den 3 Nanos-verwandten Proteinen der Schwammspezies *Ephydatia fluviatilis*, *Amphimedon queenslandica* und *Suberites domuncula* konnte dieses konservierte Sequenzmotiv identifiziert werden. In Abb. 38 C ist ein Ausschnitt des Alignments der Nanos-verwandten Proteine der Schwämme zu sehen, welches deutlich zeigt, dass bei diesen Spezies zusätzlich zu den 14 hochkonservierten Aminosäurepositionen noch weitere Aminosäuren innerhalb dieser Region hoch konserviert sind (Aminosäureposition 47 und 62-64 im multiplen Alignment, Abb. 38 und Abb. 39). Bis auf diese beiden, funktionell untersuchten konservierten Regionen (Hashimoto et al., 2009, 2010; Lai et al., 2011) sind innerhalb des multiplen Alignments nur vereinzelt weitere konservierte Bereiche zu beobachten, welche bisher aber noch mit keinen spezifischen Funktionen in Zusammenhang gebracht wurden. Daher handelt es sich bei diesen Bereichen wahrscheinlich um eine, die Proteinstruktur betreffende Konservierung von Aminosäuren.



(Beschriftung der Abb. 37 siehe S.119)

Anschließend wurde die Sequenz von Sd_nrp auf weitere besondere Eigenschaften hin untersucht. Dabei wurde die spezifische Zinkfingerdomäne des Proteins näher betrachtet (Kapitel C 1.3). Dieser aus insgesamt 52 Aminosäuren bestehende Bereich, enthält zwei durch einen Linkerbereich miteinander verbundene Zinkfinger vom Typ CCHC. Dabei handelt es sich um ein spezifisches, hochkonserviertes Sequenzmotiv Cys-Cys-His-Cys, welches eine sogenannte „zinc knuckle“ Struktur aufweist und bisher ausschließlich den Zinkfingern der Nanos-Proteinfamilie zugeordnet werden konnte (Hashimoto et al., 2009). Dies konnte belegt werden durch die Beobachtung, dass die entsprechenden Abstände (X) zwischen den konservierten Cysteinen und Histidinen der Nanos-Zinkfinger [C-(X)₂-C-(X)₁₂-H-(X)₁₀-C und C-(X)₂-C-(X)₇-H-(X)₄-C], welche zufällige Abfolgen von Aminosäuren repräsentieren, auch nicht mit der ähnlich aufgebauten Motivformel der „zinc knuckle“ Struktur des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) [C-(X)₂-C-(X)₄-H-(X)₄-C vergleichbar ist (Hashimoto et al., 2009). Daher ist das asymmetrische Zinkfingermotiv von Nanos, von dem eher symmetrischen Motiv des HIV Nukleokapsidproteins zu unterscheiden, und repräsentiert vermutlich eine neuartige Struktur eines Zinkfingers (Hashimoto et al., 2010).

Weitere Studien belegen, dass es sich bei diesem konservierten CCHC-Sequenz-Motiv um eine Zink-bindende Domäne handelt, welche für die Funktion des Nanos-Proteins bei der Regulation der Translation, unerlässlich ist (Curtis et al., 1997). Darüber hinaus konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass es sich bei dieser metallbindenden Domäne, repräsentiert durch die beiden Zinkfingerstrukturen, um zwei potentielle Bindungsstellen für jeweils ein Zinkatom (Zn(II)) handelt. Diese werden über die drei konservierten Cysteine und das ebenfalls konservierte Histidin des jeweiligen Zentrums koordiniert (Hashimoto et al., 2010).

Bei Zinkfingerproteinen vom Typ CCHC handelt es sich meist um DNA- oder RNA-bindende Proteine. Dabei kann die Bindung sowohl auf sequenzspezifische als auch sequenzunspezifische Weise stattfinden (Darlix et al., 1995). Zu diesen Proteinen gehören z.B. Mitglieder der CNBP-Proteinfamilie (engl.: Cellular nucleic acid binding protein), welche wie das Nanos-Protein eine sogenannte Tandem-CCHC-Domäne aufweisen, und sequenz-spezifisch einzelsträngige DNA binden können (Rajavashisth et al., 1989). So konnte auch durch in vitro Versuche bestätigt werden, dass Nanos mit hoher Affinität an RNA bindet, und die RNA-bindende Funktion über die C-terminale Zinkfingerdomäne vermittelt wird. Gleichzeitig zeigte Nanos in diesen Versuchen eine sehr geringe Spezifität bei der Bindung von RNA, sowie ein nur leicht vermindertes Bindeverhalten, nach der Entfernung des Additivs Zink, bei der Synthese des Proteins (Curtis et al., 1997). Aufgrund dieser Beobachtung mußte man davon ausgehen, dass das Nanos Protein nicht allein für die Regulation der Genexpression des hunchback-Proteins von *Drosophila melanogaster* verantwortlich sein kann (Kapitel A 2). Sondern dass hierbei noch

weitere Proteine beteiligt sein müssen, welche das sogenannte Nanos-Response-Element in der mRNA von hunchback erkennen, und so die Funktion von Nanos als Translationsrepressor in diesem Organismus ermöglichen (Murata & Wharton, 1995).

Eine weitere Auffälligkeit innerhalb der Genstruktur von *Sd_nrp* ist, dass sich neben dem klassischen Polyadenylierungssignal mit der hochkonservierten Sequenz 5'-AAUAAA-3' (Proudfoot und Brownlee, 1976), welches sich 497 bp stromaufwärts des Poly (A)-Bereichs befindet, noch weitere, alternative Polyadenylierungssignale identifiziert wurden (Abb. 39). Dabei handelt es sich zum einen um die Signalsequenz 5'-AACAAA-3', welche sich 378 bp stromaufwärts des Poly (A)-Bereichs befindet, und zum anderen um die Signalsequenz 5'-AATATA-3' welche an zwei Positionen, 384 bp und 139 bp vor dem Poly (A)-Bereich liegt. Neben diesen Signalsequenzen, konnte auch das für die Bindung des sogenannten „cleavage factor I“ (CFI) an RNA verantwortliche Motiv UGUAN redundant im 3'-UTR von *Sd_nrp* identifiziert werden. In Studien zu den Genstrukturen von Vertebraten konnte gezeigt werden, dass auch die alternativen Polyadenylierungssignale zu einer erfolgreichen Adenylierung von RNA führen (Venkataraman et al., 2005).

```

5'-TAGACAATAAACTCTTATTCACATTAAGTCCCAAACACAAGTAGACCTATACCCCTCTC
CCCCTAACTGAATTTATACTATAGATATATCTTATACAAGAGAAAGTATGGTTTGAAAATATA
AACAAATCACAGGTTTTTACCACAATATTCTTTTTTGTGTTGTTGTTTGTCTATTGTATTTT
ACTTTAGACGGTTCTTTGTAGTACATTAATCATACTAGCAACACTGTATCTCTTATTTGTTTG
TATACCCACCTTGTGGGACTCATTCATTCACATATTGGAGCATTGAGATATCTCTCCAACAT
TATCACTTTGTATTGTGTATCCCATTAGCAACACCTTTTTCATTATGAAATATCATGTATCACT
TTATAATAGTAATCATTGCTTTTTATCATAAGCACATCTACTCTACCCCCTCTCACAGAGAGGT
ACACATGTCCCCCACCACAGTGTATTTTTTCAGATGACCAAAGTTTGTGTCAGTCTGTAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'
    
```

Abb. 39: 3'-UTR der cDNA von *Sd_nrp* (*Suberites domuncula*)

Abgebildet ist die vollständige Sequenz der 3'-UTR von *Sd_nrp*, beginnend mit dem Stop-Codon TAG (rot) und dem abschließenden Poly (A)-Bereich. Das typische Polyadenylierungssignal 5'-AAUAAA-3' ist orange dargestellt und befindet sich 497 bp stromaufwärts des Poly (A)-Bereichs. Die alternative Signalsequenz 5'-AACAAA-3' ist in grün dargestellt und befindet sich 378 bp vor dem Poly (A)-Bereich. Die ebenfalls alternative Signalsequenz 5'-AATATA-3' ist in magenta dargestellt und kommt an den Positionen 384 und 139 im 3'-UTR vor. Das spezifische Motiv 5'-UGUAN-3' ist in blau abgebildet.

Für die proteinbiochemische und immunologische Charakterisierung des Proteins *Sd_nrp* wurde dieses rekombinant exprimiert und anschließend in denaturierter Form aufgereinigt. Dazu wurden mit der zuvor generierten cDNA von *Sd_nrp* zwei DNA-Konstrukte mit unterschiedlichen Affinitäts-Tags konstruiert und synthetisiert. Es handelt sich dabei zum einen um einen C-terminalen Polyhistidin-Tag für die Expression im pTrcHis2A Vektor (Konstrukt 1),

und zum anderen um einen N-terminalen Strep•Tag® II des pET-51b(+) Vektors (Konstrukt 2). Nach der Integration der beiden Konstrukte in die Expressionsvektoren, wurden die Sequenzen zunächst via DNA-Sequenzierung überprüft. Da das Konstrukt 2 im pET-51b(+) Vektor zwar zu einer erfolgreichen Expression des Proteins geführt hat, aber im Anschluss nicht in nativer Form aufgereinigt werden konnte, konzentriert sich die Diskussion hier auf das Konstrukt 1 im pTrcHis2A Vektor.

Im Anschluss an die erfolgreiche Expression in diesem System wurde das rekombinante Protein über eine Ni-NTA-Affinitätsmatrix aufgereinigt. Bei der biochemischen Analyse des Proteins via SDS-PAGE, konnte für Sd_nrp eine Molekülmasse von ca. 29-30 kDa ermittelt werden, welche mit der zuvor errechneten Molekülmasse von 28,8 kDa übereinstimmt. Für einen Vergleich des rekombinanten Proteins mit dem nativen Sd_nrp Protein wurden Proteinextrakte aus dem Gewebe von *S. domuncula* mit Hilfe unterschiedlicher Extraktionspuffer hergestellt (Kapitel C 2). In diesen konnte das native Sd_nrp dann mit dem polyklonalen Anti-Sd_nrp Antikörper und dem Anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Die Proteinbande des nativen Sd_nrp war in allen verwendeten Proteinextrakten deutlich zu erkennen und wies eine Molekülmasse von ca. 29-30 kDa auf. Dies entspricht auch der Molekülmasse des rekombinanten Proteins. Auffallend hierbei war, dass das native Sd_nrp im Western-Blot eine Doppelbande zeigt, bei der die beiden Proteinbanden leicht versetzt laufen, also ein fast identisches Molekulargewicht aufweisen. Dies konnte in den Western-Blot-Analysen des rekombinanten Proteins nicht beobachtet werden. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die Möglichkeit sein, daß das native Nanos-verwandte Protein hier in zwei unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen bzw. zum einen in phosphorylierter, und zum anderen in unphosphorylierter Form vorliegt. Bei dieser Phosphorylierung handelt es sich um eine posttranslationalen Modifikation der Proteine, bei der die Phosphogruppe über Serin, Threonin und Tyrosin im Verhältnis 1800:200:1 gebunden sein kann. Darüber hinaus kann die Phosphogruppe in seltenen Fällen auch über die Asparaginsäure oder Glutaminsäure gebunden sein (Walsh, 2005). Da das rekombinante Protein Sd_nrp in *E. coli* Bakterien exprimiert wurde, und in diesen Organismen keine posttranslationalen Modifikationen stattfinden, zeigen die SDS-Gele bzw. Western-Blots des aufgereinigten rekombinanten Proteins keine dieser Doppelbanden.

2. Immunologische Analyse

Im Anschluss an die Expression und die Aufreinigung des Proteins Sd_nrp, konnte dieses zur Herstellung eines Sd_nrp-spezifischen Antiserums verwendet werden. Mit Hilfe dieses polyklonalen Anti-Sd_nrp Antikörpers, sowie einem sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper (Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3) konnte die Expression des nativen Nanos- verwandten Proteins in den unterschiedlichen Gewebeschnitten von *Suberites domuncula* untersucht werden. Dabei konnte der Antikörper im angrenzenden Gewebe der epithelartigen Zellschicht, dem Pinacoderm eines adulten Tieres detektiert werden. Das Antikörper-Signal zeigte sich dort teilweise punktförmig in den granulösen Zellstrukturen, welche diffus im Gewebe verteilt lokalisiert sind. Es handelt sich aufgrund morphologischer Merkmale bei diesen Zellen wahrscheinlich um Archaeocyten, da diese Zellen aufgrund ihrer Funktion als amöboide Stammzellen der Schwämme einen hohen Anteil an granulären Reservestoffen enthalten (Borojevic, 1966; Weissenfels, 1989). Die Archaeocyten konnten in diesen Zell- bzw. Gewebeschichten bereits nachgewiesen werden (Schröder et al., 2004). In Abb. 40 ist eine schematische Zeichnung eines Querschnitts durch diesen Bereich des Pinacoderms dargestellt. Die Ausschnittsvergrößerung (Abb. 40, grün) zeigt dabei deutlich die granulären Zellbestandteile eines Archaeocyten.

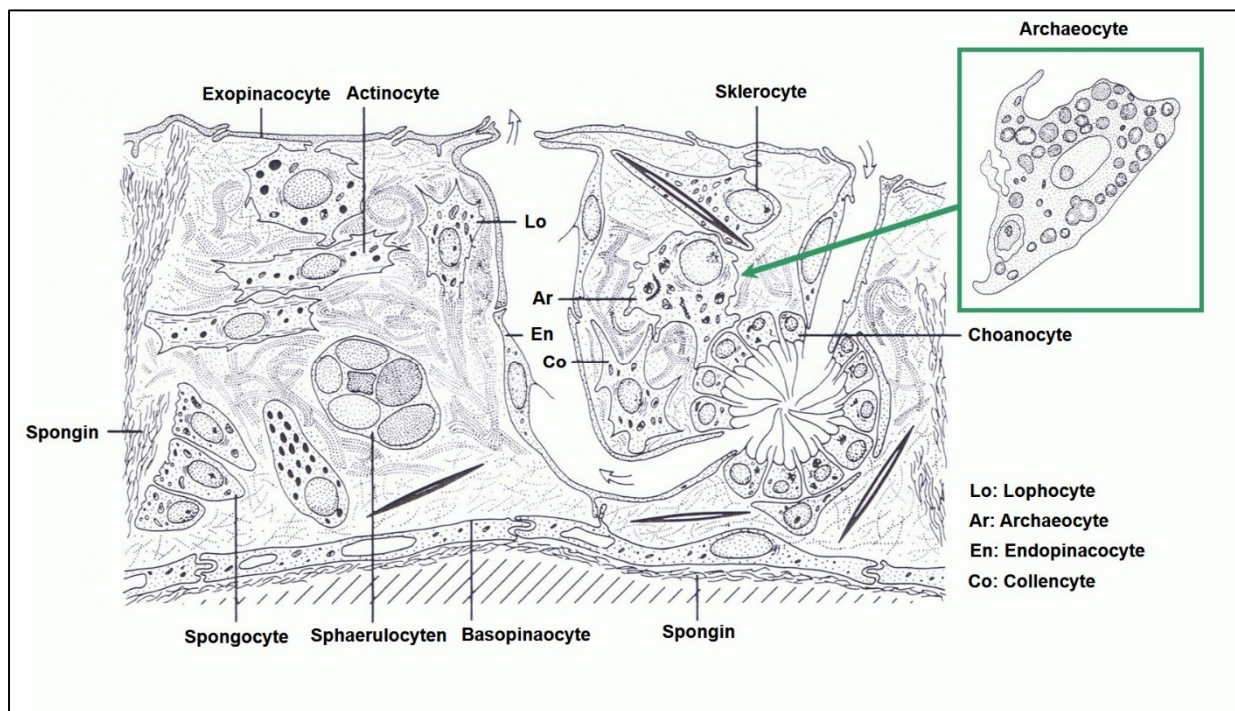


Abb. 40: Schematische Zeichnung eines Querschnitts durch das Pinacoderm und die angrenzenden Zellschichten

Die Ausschnittsvergrößerung zeigt die Lokalisation eines Archaeocyten im Gewebe an (grüner Pfeil). Verändert nach Boury-Esnault & Rützler, 1997.

Des Weiteren konnte das Antikörper-Signal in den inneren Gewebeschichten eines 4 Tage alten Primmorphen detektiert werden. Dort liegt es gleichmäßig im Gewebe vor (Abb. 41). Mit Hilfe mikroskopischer Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass diese im Inneren der Primmorphe liegenden Zellen von einer fast vollständigen, einzelligen und epithelartigen Schicht umschlossen sind (Müller et al., 1999). Aufgrund der morphologischen Merkmale dieser Zellen, wie z.B. ihre abgeflachte Form, ihre spindelförmigen Anhänge und der markante Nukleus, wurden sie als Pinacocyten identifiziert (Müller et al., 2003). In den inneren Gewebeschichten dagegen, befinden sich hauptsächlich proliferierende und differenzierende Zellen (Müller et al., 2004), wobei es sich hierbei neben den zum größten Teil sphärischen Zellen, um Amöbocyten und Archaeocyten handelt (Le Pennec et al., 2003; Müller et al., 1999). Die Detektion des Nanos-verwandten Proteins in diesen Zellstrukturen des Primmorphengewebes ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei den angefärbten Zellen wahrscheinlich um die zuvor beschriebenen Archaeocyten handelt. Die gleichmäßige Lokalisation dieser Zellen in den Primmorphen könnte mit der Entstehungsweise dieser 3D-Zellaggregate zusammenhängen. Diese entstehen aus zuvor vereinzelter Zellen und sind in der Lage im Anschluss an die Dissoziation wieder neue Zellkontakte auszubilden (Custodio et al., 1998; Müller et al., 1999). In molekularen Studien mit Primmorphen aus *S. domuncula* konnte bereits die Expression einiger als Stammzellmarker geltender Gene, während der Differenzierung der Archaeocyten nachgewiesen werden (Müller, 2006a). Dazu gehört u.a. das Glycoprotein Noggin, welches an der Entwicklung vieler Gewebe, wie Nerven-, Muskel-, und Knochengewebe beteiligt ist, oder der an der Entwicklung des Nerven- und Immunsystems beteiligte Nervenwachstumsfaktor (engl.: glia maturation factor). Darüber hinaus konnte das Antikörpersignal auch im Bereich einiger Zellkerne detektiert werden. Besonders größere Zellen mit großen Zellkernen zeigten eine Expression des Proteins Sd_nrp (Abb. 41, grüne Pfeilspitzen). Diese Beobachtung ist vergleichbar mit den Ergebnissen der Arbeit von Ginter-Matuszewska et al., 2011. Dort wurde die Lokalisation bzw. die Expression des humanen Nanos1 Proteins in einzelnen Aggregaten beobachtet, welche sich im Cytoplasma in direktem Kontakt zum Nukleus befanden. Dieses Ergebnis konnte dort in den verschiedenen Entwicklungsstadien der humanen Keimzellen beobachtet werden, angefangen von dem Stadium der sekundären Spermatozyten bis hin zu den Spermatisiden. Diese perinukleäre Struktur wurde dort mit dem Chromatoid-Körper verglichen, einem für die Keimzellen der Mammalia typischen, kompakten Aggregat und interpretiert als evolutionäres Relikt oder Überbleibsel des Nuage (franz. für Wolke). Es handelt sich hierbei um eine Struktur des Keimzellplasmas, kennzeichnend für Keimzellen niederer Metazoen, welche auch als Polgranula (engl.: polar granules) in *D. melanogaster*, als Chromatoid-Körper bei Planarien oder Balbiani-Körper vieler Vertebraten und Invertebraten bekannt ist (Solana, 2013).

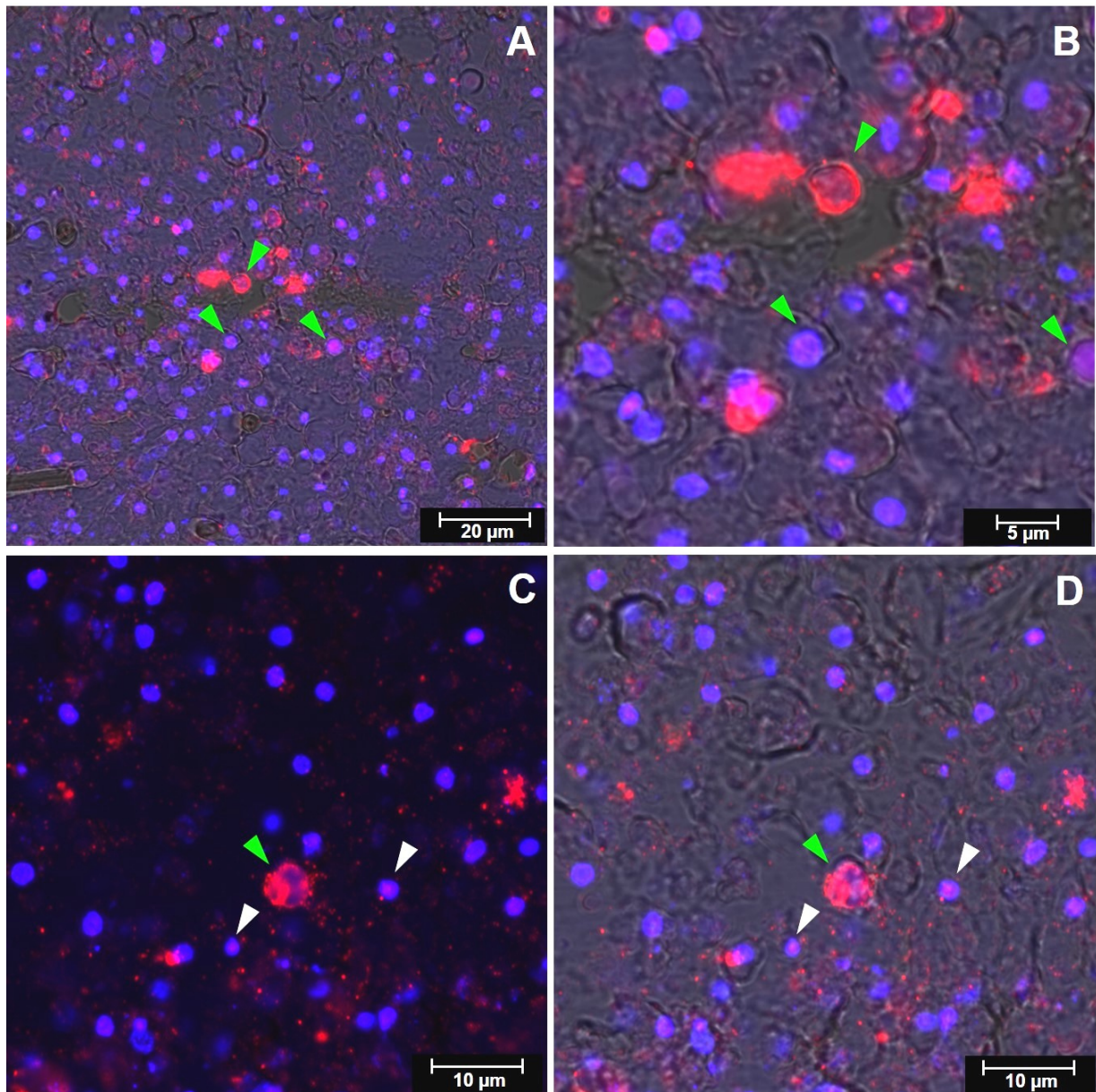


Abb. 41: Sd_nrp Expression in einem 4 Tage alten Primmorphen von *S. domuncula*

Immunfluoreszenzfärbung des Gewebeschnittes eines 4 Tage alten Primmorphen mit dem polyklonalen Antikörper Anti-Sd_nrp (Verdünnung 1 : 100) und dem Cy3 konjugierten, sekundären Antikörper (Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3, rote Färbung). Die Detektion der Zellkerne erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blaue Färbung). A) Überlagerung des Signals des Cy3 konjugierten, sekundären Antikörpers (rot, punktförmig und gleichmäßig im Gewebe des Primmorphen verteilt) und der Fluoreszenz der Zellkernmarkierung (blau). B) Ausschnittsvergrößerung von Bild A: Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme mit der LM-Aufnahme zur visuellen Kontrolle der zellulären Strukturen. Die Expression von Sd_nrp ist hier besonders deutlich an größeren Zellkernen zu beobachten (grüne Pfeilspitzen) (siehe dazu auch Bild C) und D); grüne Pfeilspitze). C) Vergrößerte Darstellung der perinukleären Antikörperfärbung (weisse Pfeilspitzen). D) Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme mit der LM-Aufnahme. Geräte und Methode siehe Abb. 33.

Nach der Studie von Ginter-Matuszewska et al., 2011, dient der Chromatoid-Körper in diesen Zellen, im Zusammenhang mit der Entdeckung der beiden Proteine Nanos1 und Pumilio2 sowie der Koloalisation des Proteins Vasa in diesem Bereich, als Zentrum der Akkumulierung oder Speicherung von RNA, der RNA-Prozessierung sowie Regulierung der mRNA-Translation. Weiter ist das im Primmorphengewebe von *S. domuncula* beobachtete Expressionsverhalten von

Sd_nrp auch vergleichbar mit den Ergebnissen der Studie von Funayama et al., 2010. Dort konnte ein als Stammzellmarker bekanntes Piwi-homologes Protein aus dem Süßwasserschwamm *Ephydatia fluviatilis* ebenfalls in den großen Archaeocytenzellen beobachtet werden, welche einen größeren Nucleus enthielten. Diese Zellen wurden in dieser Studie über den Einsatz von Bromdesoxyuridin (BrdU) identifiziert, welches Hinweise auf neu synthetisierte DNA, und somit auf proliferierende Zellen liefert.

Die stärkste Expression des Nanos-verwandten Proteins Sd_nrp konnte im Rahmen dieser Arbeit aber in den Zellstrukturen der Gemmulae von *Suberites domuncula* detektiert werden (Abb. 42). Dabei konnten unterschiedliche Färbemuster des Antikörpers in den als Archaeocyten interpretierten Zellen der Gemmulae beobachtet werden. In den meisten eher rundlichen und kompakt wirkenden Zellen, konnte das Antikörper-Signal bevorzugt im Bereich der Zellmembran detektiert werden (Abb. 42 A, weisse Pfeilspitzen), was anhand der 3D-Aufnahme besonders deutlich wird (Abb. 42 B, schwarze Pfeilspitzen). Dagegen zeigten die größeren, amöboiden Zellen der Gemmulae, eine stärkere und eher im Cytoplasma konzentrierte Antikörperfärbung (Abb. 36 C u. D). Dies ist evtl. dadurch zu erklären, dass es sich hierbei um Gemmulae in unterschiedlichen Entwicklungsstadien handelt, deren Archaeocyten sich ebenfalls in unterschiedlichen Stadien befinden (Borojevic, 1966; Weissenfels, 1989) und das Protein in diesen Phasen unterschiedlich stark exprimiert wird. In der bereits erwähnten Studie von Funayama konnte ein vergleichbares Expressionsmuster des Stammzellmarkers Piwi in den als Archaeocyten der Gemmulae des Süßwasserschwamms *Ephydatia fluviatilis* identifizierten Zellen nachgewiesen werden (Funayama et al., 2010). Dort zeigte sich die Expression von Piwi bevorzugt in großen Zellen mit großem Nukleus und einzelner ebenfalls großen Nukleolus.

Bei der Schwammspezies *Ephydatia fluviatilis*, einem Vertreter der Klasse Demospongiae wurden die Entwicklungsstadien der Gemmulae eingehend untersucht (Weissenfels, 1989). Dort zeigten die Archaeocyten, der sich im Ruhestadium bzw. im frühen Entwicklungsstadium befindlichen Gemmulae, eine eher gleichmäßige runde Form mit einer Größe von 16 – 18 µm. Dies ist vergleichbar mit der Form der Zellen, wie sie auch bei den immunologischen Analysen im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden konnten (Abb. 36 A u. B und 42 A u. B). Eine vergrößerte Darstellung dieser Zellen ist auch in Abb. 42 C dargestellt. Des Weiteren lassen sich laut einer Studie von Weissenfels in späten Entwicklungsstadien auffallend große, mehrkernige und mit einer großen Anzahl an Reservestoffen gefüllte Archaeocyten beobachten (Weissenfels, 1989). Diese Form der Zellen konnte im Rahmen meiner Untersuchungen ebenfalls in den Gemmulae der Spezies *Suberites domuncula* beobachtet werden (Abb. 36 C u. D).

Basierend auf den vorliegenden Ergebnissen, dass die höchste Expression von Sd_nrp in den als die totipotenten Stammzellen der Schwämme bekannten Archaeocyten (Simpson, 1984; Müller

et al., 2004; Müller, 2006a) der Gemmulae des marinen Schwammes *Suberites domuncula* nachgewiesen wurde, und diese Zellen sich neben allen anderen Zelltypen auch zu Gameten differenzieren können (Witte & Barthel, 1994), ist eine Funktion dieses Proteins in der Keimbahn dieser Organismen wahrscheinlich. Diese Annahme stützt sich auch auf die Feststellung, dass die Expression der zahlreichen Nanos-Homologen unterschiedlicher Vertebraten- und Invertebratenvertretern bevorzugt in den Vorläuferzellen der Keimbahn (engl. germline precursor cells, PGCs), den Stammzellen der Keimbahn, sowie in multipotenten Stammzellen beobachtet wurde (Mochizuki et al., 2000).

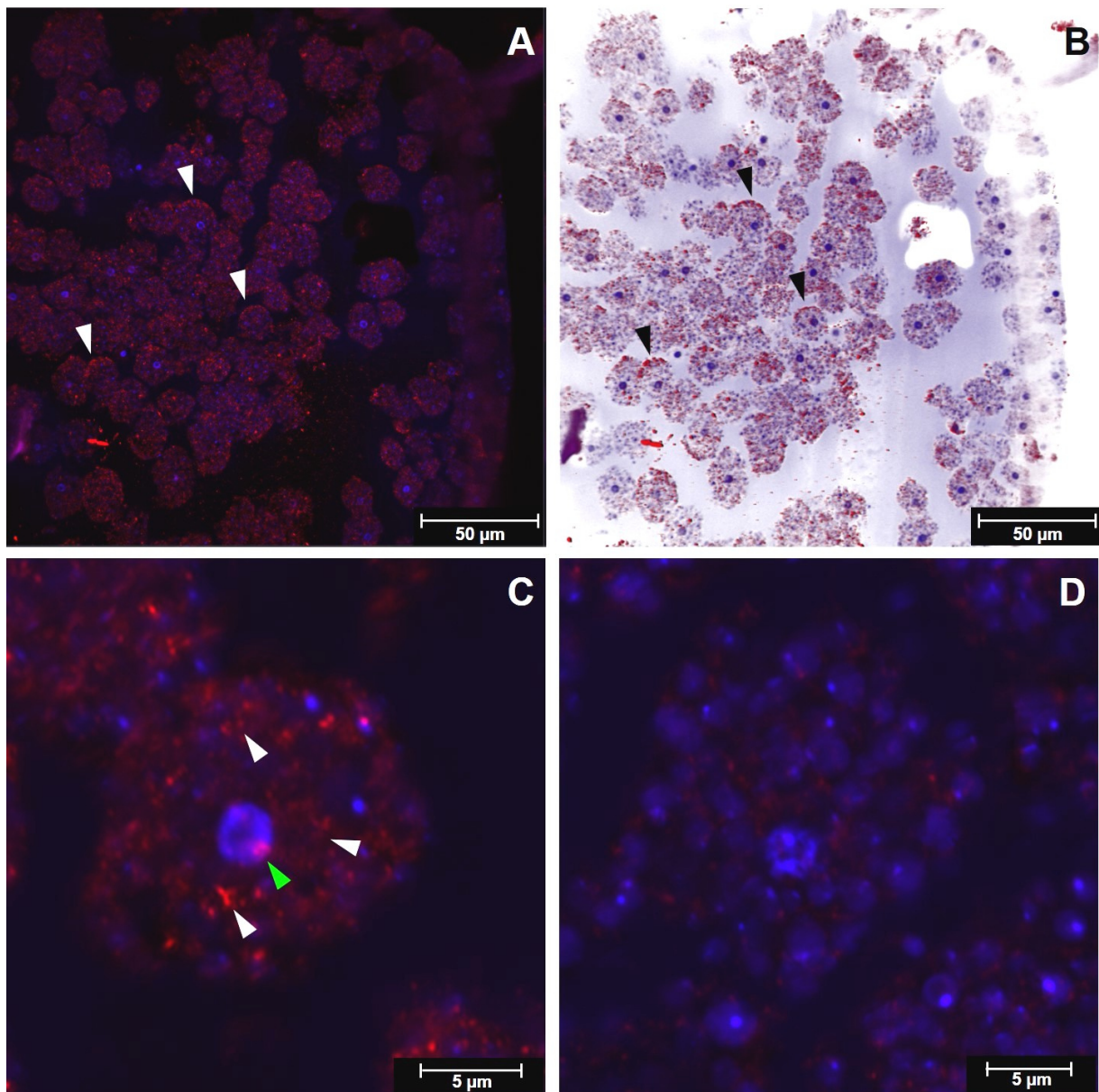


Abb. 42: Sd_nrp Expression in den Gemmulae von *Suberites domuncula*

Immunfluoreszenzfärbung der Gemmulae von *S. domuncula* mit dem polyklonalen Antikörper Anti-Sd_nrp (Verdünnung 1 : 100) und dem Cy3 konjugierten, sekundären Antikörper (Esel anti-Kaninchen IgG (H-L)-Cy3, rote Färbung). Die Detektion der Zellkerne bzw der Nukleinsäuren erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blaue Färbung). A) Überlagerung der Fluoreszenzfärbung der Zellstrukturen mit dem Cy3 konjugierten, sekundären

Antikörper (rot) im Bereich der Zellmembran (weisse Pfeilspitzen) und der Fluoreszenz der Zellkernmarkierung (blau). B) 3D-Aufnahme ident. zu Bild A (hier schwarze anstelle der weissen Pfeilspitzen in Bild A) C) Vergrößerte Darstellung der rundlichen Zellstrukturen mit großem Nukleus innerhalb der Gemmulae. Die Antikörperfärbung (rot) ist hier sowohl im granulären Cytoplasma (weisse Pfeilspitzen) als auch teilweise im Kernbereich (grüne Pfeilspitze) zu beobachten. D) Die Immunfluoreszenzanalyse der Negativkontrolle nach Inkubation mit dem Prä-Immunserum zeigt kein Fluoreszenzsignal mit den Zellstrukturen der Gemmulae. Geräte und Methode siehe Abb. 33.

Einen weiteren Hinweis für eine Funktion von Sd_nrp in der Keimbahn liefert die phylogenetische Analyse der einzelnen Isoformen der Nanos-Homologen (Kapitel D 3). Dort zeigt es die höchste Sequenzidentität zu den Nanos-Isoformen 1 der unterschiedlichen Vertreter der Invertebraten und Vertebraten, welche bisher ebenfalls in zahlreichen Studien stets im Zusammenhang mit Funktionen in der Keimbahn beschrieben wurden (Lai et al., 2011; Jaruzelska et al., 2003; Köprunner et al., 2001; Subramaniam & Seydoux, 1999).

Aufgrund der ebenfalls konservierten Funktion der Nanos-Proteine in der Aufrechterhaltung der Stammzellen der Keimbahn durch die Regulierung bzw. Suppression des somatischen Zellschicksals (Hayashi et al., 2004; Tsuda et al., 2003; Wang & Lin, 2004; Köprunner et al., 2001), wäre auch eine Beteiligung des Nanos-verwandten Proteins Sd_nrp (*S. domuncula*) an der Aufrechterhaltung des Stammzellstatus der Archaeocyten denkbar. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant, ob evtl. eine Beteiligung von Sd_nrp bei der schon in frühen Experimenten vielfach diskutierten Dedifferenzierung der Archaeocyten (Galtsoff, 1925; Huxley, 1921; Müller, 1911) oder Choanocyten vorliegt (Diaz, 1977). Jedoch konnte bis heute nicht zweifelsfrei belegt werden, ob und wie weit es sich bei den in diesen Studien beobachteten morphologischen und zytologischen Prozessen, tatsächlich um eine Dedifferenzierung handelt. Für eine abschließende Aufklärung der Funktion des Nanos-Homologen Proteins Sd_nrp aus dem marinen Schwamm *S. domuncula* sind weitere umfangreiche Studien in diesen Organismen notwendig.

3. Phylogenetische Analysen und Stammbaum

Für die phylogenetische Analyse des Nanos-verwandten Proteins Sd_nrp aus dem marinen Schwamm *S. domuncula* wurde ein radialer Stammbaum mit Nanos-Homologen von unterschiedlichen Invertebraten- und Vertebraten Vertretern berechnet. Von den beiden Schwammspezies *Ephydatia fluviatilis* (Ef_nrp) und *Amphimedon queenslandica* (Aq_nrp) konnten die vollständigen kodierenden Sequenzen Nanos-verwandter Proteine über die Proteindatenbank des NCBI bezogen werden, und anschließend in die phylogenetische Analyse homologer Nanos-Proteine mit einbezogen werden. Diese zeigt, dass das Nanos-verwandte

Protein Sd_nrp der marinen Schwammspezies *Suberites domuncula* mit den Nanos-Homologen der beiden anderen Schwammspezies *Ephydatia fluviatilis* (Ef_nrp) und *Amphimedon queenslandica* (Aq_nlp) gruppiert (Abb. 43). Bei diesen drei Schwammspezies handelt es sich um Vertreter der Klasse Demospongiae (Hooper & van Soest, 2002). Dabei zeigt das Nanos-Homolog der marinen Spezies *S. domuncula* die höchste Verwandtschaft zu der ebenfalls marinen Art *Amphimedon queenslandica*. Dieses Verwandtschaftsverhältnis wird aber aufgrund des niedrigen Bootstrap-Wertes (49) eher schwach unterstützt. Dies ist evtl. auch bedingt durch die Möglichkeit, dass es sich bei diesen beiden Nanos-Homologen um unterschiedliche Isoformen bzw. Nanos-Formen handeln könnte, und somit eine gut abgesicherte Aufklärung der Phylogenie innerhalb dieser Proteine erschwert wird. Jedoch konnten bisher keine Nanos-Isoformen bei den Poriferen nachgewiesen werden. Für eine genauere Betrachtung der Verwandtschaftsverhältnisse der Nanos-Homologen innerhalb der drei Schwammspezies, wurde mit diesen jeweils ein „Pairwise alignment“ berechnet und die Sequenzidentitäten verglichen. Dazu wurde das Alignment mit der Software ClustalW (Larkin et al., 2007) berechnet und die Sequenzidentitätsmatrix mit dem Programm Bioedit (Hall, 1999) erstellt. Auffallend war hierbei, dass im Bereich der Zinkfinger-Domäne, inklusive der 7 Aminosäuren langen Linkersequenz, das Protein Sd_nrp eine höhere Sequenzidentität zu dem Protein Ef_nrp der Süßwasserschwämme zeigt. Dort liegt die Sequenzidentität der beiden Proteine bei 96,2 % (Similarity: 98 %), während bei einem Vergleich über den gesamten Sequenzbereich, die beiden Proteine nur eine Sequenzidentität von 44,4 % (Similarity: 57 %) aufweisen. Dagegen zeigen die beiden marinen Arten im Zinkfingerbereich eine Sequenzidentität von 94,2 % (Similarity: 96,2 %) und bei einem Vergleich über den gesamten Sequenzbereich eine Identität von 33 % (Similarity: 43,7 %) zueinander.

Der Vertreter der Süßwasserschwämme aus der Familie der Spongillidae (Ef_nrp), bildet im Stammbaum die Schwestergruppe zu den beiden marinen Schwämmen (Sd_nrp, Aq_nlp). Diese Gruppierung wird durch den Bootstrap-Wert (89) gut unterstützt. Weiter entspricht die vorliegende Topologie weitestgehend der erwarteten Aufspaltung der einzelnen Spezies. Auffallend dabei ist, dass eine deutliche speziesübergreifende Gruppierung der einzelnen Isoformen (Nanos 1, 2 und 3) untereinander erkennbar ist. In diesem Zusammenhang ist im Kladogramm jeweils eine Gruppierung der Isoformen der Vertebraten-Spezies untereinander, sowie der Isoformen der Invertebraten-Spezies untereinander zu erkennen.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei den Nanos-Isoformen wahrscheinlich um orthologe Sequenzen handelt, deren evolutionärer Ursprung noch vor der Abspaltung der einzelnen Spezies innerhalb der Vertebraten und Invertebraten liegt. Eine solche speziesübergreifende Gruppierung zu den einzelnen Nanos-Isoformen lässt sich für die Nanos-

Homologen der Porifera nicht erkennen, obwohl auch andere basale Vertreter der Metazoen wie die Seeanemone (*Nematostella vectensis*; Nv_np1/2), die Meduse (*Podocoryna carnea*; Pc_np1/2) und der Süßwasserpoly (Hydra vulgaris; Hv_np1/2) dies hier deutlich zeigen (Abb. 43).

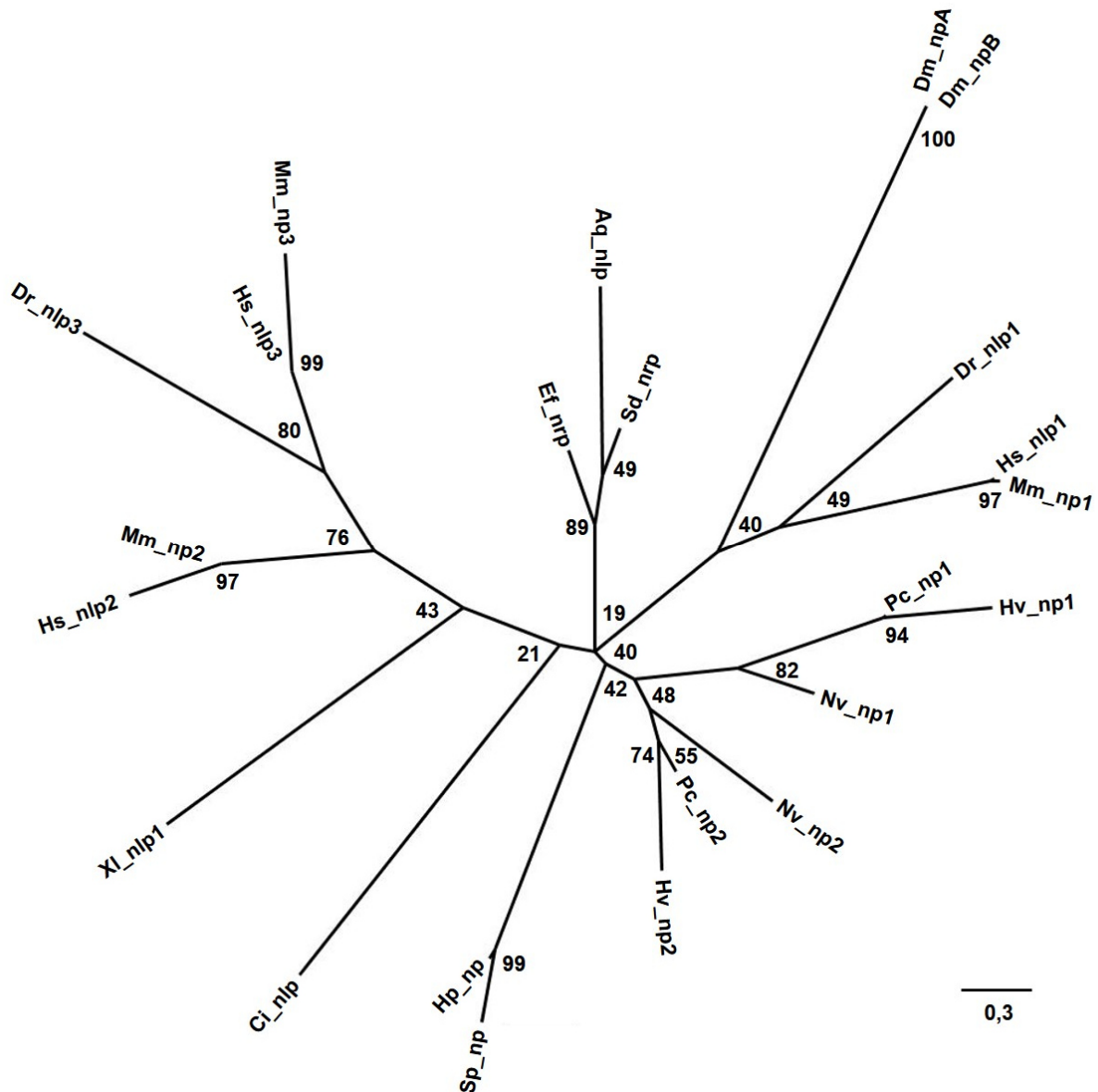


Abb. 43: Phylogenetische Analyse des Nanos-verwandten Proteins Sd_nrp von *Suberites domuncula*

Die Abbildung zeigt den radialen Stammbaum, welcher mittels der *Maximum-Likelihood*-Methode des MEGA 6 Software-Pakets (Tamura et al., 2013) und auf der Basis eines multiplen Aminosäure-Alignments (Kapitel F 7.1) berechnet wurde. Im Alignment wurden die folgenden Spezies miteinander verglichen: *Amphimedon queenslandica* (Aq_nlp; Accession-No 340371525); *Ciona intestinalis* (Ci_nlp; 198414188); *Danio rerio* (Dr_nlp1; 326673436; Dr_nlp3; 18859057); *Drosophila melanogaster* (Dm_npA; 7300486; Dm_npB; 442619897); *Ephydatia fluviatilis* (Ef_nrp; 11761358); *Hemicentrotus pulcherrimus* (Hp_np; 83319203); *Homo sapiens* (Hs_nlp1; 40804761; Hs_nlp2; 71143121; Hs_nlp3; 41688563); *Hydra vulgaris* (Hv_np1; 9279811; Hv_np2; 9279813); *Mus musculus* (Mm_np1; 30268650; Mm_np2; 363548445; Mm_np3; 41688564); *Nematostella vectensis* (Nv_np1; 67468572; Nv_np2; 67468584); *Podocoryna carnea* (Pc_np1; 51860778; Pc_np2; 51860780); *Strongylocentrotus purpuratus*

(Sp_np; 115728738); *Suberites domuncula* (Sd_nrp); *Xenopus laevis* (Xl_nlp1; 147907018). Die Berechnung des geeigneten Evolutionsmodells (WAG+G) erfolgte ebenfalls mit dem Software-Paket MEGA 6. Die statistische Unterstützung der Aufspaltungen erfolgte durch eine Bootstrap-Analyse mit 10.000 Bootstrap-Replikaten (Felsenstein, 1985). Der Stammbaum wurde nicht gewurzelt, da hier nur die Verwandtschaft der Nanos-Homologen der Schwämme untereinander, sowie deren mögliche Gruppierung zu den unterschiedlichen Nanos-Isoformen gezeigt werden sollte. Maßstab (evolutionäre Distanzen): Die Astlängen entsprechen der geschätzten Anzahl an Substitutionen je Aminosäureposition (Whelan & Goldman, 2001).

Des Weiteren wurde mit dem zuvor berechneten multiplen Alignment der Nanos-Homologen der unterschiedlichen Invertebraten- und Vertebraten Vertretern eine Identitätsmatrix berechnet (Abb. 44). Dazu wurden zum einen nur die hochkonservierte C-terminale Zinkfingerdomäne, und zum anderen die gesamte Sequenz dieser Proteine getrennt analysiert. Im Bereich der Zinkfingerdomäne zeigt das Nanos-verwandte Protein Sd_nrp (*S. domuncula*) eine Sequenzidentität von 59,6 % zu den beiden Isoformen der Nanos-Homologen von *Drosophila melanogaster*, während es über den gesamten Sequenzbereich nur eine Sequenzidentität von 12,4 % (Dm_npA) bzw. 13% (Dm_npB) zu diesen beiden Proteinen aufweist (Wang & Lehmann, 1991; Adams et al., 2000). Dagegen zeigt das Nanos-Homolog der marinen Spezies *S. domuncula* (Sd_nrp) mit 71,1 % (Hs_nlp1) bzw. 61,5 % (Hs_nlp2) innerhalb der Zinkfingerdomäne, eine höhere Sequenzidentität zu den beiden Isoformen der Nanos-Homologen von *Homo sapiens* (Kusz-Zamelczyk et al., 2013; Kusz et al., 2009). Zu der dritten Isoform (Hs_nlp3) zeigt Sd_nrp in diesem Bereich eine geringere Sequenzidentität von 55,7 % (Wu et al., 2013). Dagegen liegen bei einem Vergleich über den gesamten Sequenzbereich, die Sequenzidentitäten bei 15 % (Hs_nlp1), 18,7 % (Hs_nlp2) und 14,3 % (Hs_nlp3). Betrachtet man in der Analyse nur die Sequenzidentität von Sd_nrp zu den jeweiligen Isoformen der unterschiedlichen Nanos-Homologen im Zinkfingerbereich, dann zeigt dieses hier die größte Identität zu den Sequenzen der Isoform 1, der unterschiedlichen Nanos-Proteine.

Eine Ausnahme bilden hier die Nanos-Homologen der Invertebratenspezies *Nematostella vectensis* (Nv_np1/2), *Podocoryna carnea* (Pc_np1/2) und *Hydra vulgaris* (Hv_np1/2). Dort ist entweder kein Unterschied in der Sequenzidentität von Sd_nrp zu den Sequenzen der Isoformen zu beobachten, oder im Fall der Spezies Hydra liegt diese zur Isoform 2 (Hv_np2) mit 73 % höher als zur Isoform 1 (Hv_np1) mit 71,1 %. Betrachtet man jedoch bei diesen Gruppen die Sequenzidentität über den gesamten Sequenzbereich der Proteine, zeigt Sd_nrp auch hier jeweils eine höhere Identität zu den Isoformen 1 dieser Nanos-Homologen (Nv_np1 (27,4 %); Pc_np1 (27,1 %); Hv_np1 (24,9 %)).

						*																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				</
--	--	--	--	--	--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

Abb. 44: Alignment der Zinkfingerdomäne unterschiedlicher Nanos-homologer Proteine

Abgebildet ist ein Ausschnitt aus einem multiplen Alignment, welches nur den Bereich der Zinkfingerdomäne der Nanos-Proteine unterschiedlicher Spezies zeigt. Die in den Nanos-Zinkfingern identischen Histidine und Cysteine, welche das CCHC-Motiv bilden, sind gelb hervorgehoben. Die übrigen zu 100% identischen Bereiche sind schwarz, hoch konservierte dunkelgrau, und die Positionen mit ungleichen aber in ihren physikochemischen Eigenschaften ähnlichen Aminosäuren sind hellgrau hinterlegt. Weiter wurde mit dem Protein Sd_nrp und den hier abgebildeten Spezies eine Sequenzidentitätsmatrix berechnet. Dazu wurde zum einen nur die hochkonservierte C-terminale Zinkfingerdomäne, und zum anderen die gesamte Sequenz dieser Proteine getrennt analysiert. Die prozentualen Sequenzidentitäten sind jeweils neben dem Alignment abgebildet. Dabei repräsentieren die Werte ohne Klammer die Sequenzidentitäten im Zinkfingerbereich und die Werte in Klammern die Sequenzidentitäten über den gesamten Sequenzbereich der Proteine. Die Sequenzidentitätsmatrix wurde mit Hilfe der Software BioEdit erstellt (Hall, 1999). Das Alignment wurde mit der Software Muscle des MEGA 6 Software-Pakets (Tamura et al., 2013) erstellt und mit der Software GeneDoc (Nicholas et al., 1997) graphisch bearbeitet.

E Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in dem marinen Schwamm *Suberites domuncula* ein Gen identifiziert werden, dessen C-terminale konservierte Domäne eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den Zinkfingerdomänen der Nanos-Proteine aufweist. Weiter konnte ein N-terminales Sequenzmotiv identifiziert werden, das eine hohe Sequenzidentität zu den konservierten NIM Motiven (CNOT1-interagierendes-Motiv) von Nanos zeigt. Nach der Klonierung der cDNA erfolgte die Expression des als Sd_nrp bezeichneten Proteins in *E. coli* Bakterien, für dessen 231 Aminosäuren umfassende Polypeptidkette eine theoretische Molekülmasse von 25.8 kDa berechnet wurde. Anschließend gelang ein Nachweis des Proteins mithilfe eines polyklonalen, gegen Sd_nrp gerichteten Antikörpers in drei Gewebetypen, dem Pinacoderm, den Primmorphen (3D-Zellaggregate) und den Gemmulae (Dauerstadien der Schwämme). Dabei konnte die höchste Expression von Sd_nrp in den als totipotent geltenden Stammzellen der Schwämme, den Archaeocyten innerhalb der Gemmulae beobachtet werden. Die Identifizierung der Zellstrukturen, erfolgte dabei aufgrund morphologischer Vergleiche. Speziell die Merkmale der Zellen in den Gemmulae, der große Nukleus, die amöboide Form sowie die granulären Reservesubstanzen, entsprechen den typischen morphologischen Eigenschaften der Archaeocyten, und bestätigen die Interpretation der Ergebnisse. Weiter konnte mit Hilfe des Anti-Sd_nrp Antikörpers das native Protein in Proteinextrakten aus Gewebe adulter Tiere nachgewiesen werden. Die vergleichende Sequenzanalyse von Sd_nrp mit dem Nanos-verwandten Protein der Schwammspezies *Ephydatia fluviatilis* und die phylogenetische Stammbaum-Analyse mit Nanos-Homologen unterschiedlicher Invertebraten und Vertebraten lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei dem hier identifizierten Protein Sd_nrp um ein Nanos-verwandtes Protein handelt. Darüber hinaus konnte anhand eines Homologiemodells bestätigt werden, dass es sich bei der konservierten C-terminalen Domäne des Proteins Sd_nrp um die für Nanos-Proteine spezifische Zinkfingerstruktur mit dem konservierten Sequenzmotiv CCHC handelt. Dieses Ergebnis konnte auch bei einem Vergleich der Zinkfingerdomäne von Sd_nrp mit den Zinkfingerdomänen der Nanos-Homologen unterschiedlicher Invertebraten- und Vertebratenspezies bestätigt werden.

F Anhang

1. Abkürzungen

1.1 Allgemeine Abkürzungen

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
μ	mikro
AS	Aminosäure
bidest.	bidestilliert
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
cDNA	“copy” oder “complementary” DNA
CME	Cellulosemischester (Celluloseacetat und –nitrat)
Da	Dalton
dATP	Deoxyadenosin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Deoxyribonucleosid-5'-triphosphat
ds	downstream
dsDNA	doppelsträngige DNA (double strand DNA)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Deoxythymidin-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenantridiniumbromid)
fwd	forward
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bide}	Doppelt destilliertes Wasser
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobase (1000 Nukleotide)
kDa	kilodalton, 10 ³ Dalton
LB	engl.: Lysogeny broth
m	Milli-
M	Molar
MCS	Multiple Klonierungsstelle (engl.: multiple cloning site)
min	Minute(n)
mM	Milimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
Ori	Replikationsori (engl.: origin of replication)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: Polymerase chain reaction)
PGCs	Primordiale Keimzellen (engl.: primordial germ cells)
Pmol	Picomol
Poly A	Poly (A)-Bereich
RACE	Engl. rapid amplification of cDNA ends
rev	reverse

RMSD	Engl. root mean square deviation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde(n)
Sd_nrp	Bezeichnung des Proteins: <i>Suberites domuncula</i> Nanos related protein (Nanos-verwandtes Protein)
<i>Sd_nrp</i>	Bezeichnung der cDNA bzw. des Gens: <i>Suberites domuncula</i> nanos related protein (Nanos-verwandtes Protein)
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl.: single strand DNA)
ssRNA	einzelsträngige RNA (engl.: single strand RNA)
SH-Gruppe	Thiolgruppe
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE (Puffer)	TRIS-Borat-EDTA Puffer
TE (Puffer)	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	DNA-Schmelztemperatur
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten (Units)
us	upstream
UTR	Untranslatierter Bereich (untranslated region)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
ZF	Zinkfinger

1.2 Abkürzungen der Organismen und der entsprechenden Proteine

Abkürzung	Organismus	Protein	Accession No.
Aq_nlp	<i>Amphimedon queenslandica</i>	Nanos-verwandtes Protein	340371525
Ci_nlp	<i>Ciona intestinalis</i>	Nanos-verwandtes Protein	198414188
Dr_nlp1	<i>Danio rerio</i>	Nanos-verwandtes Protein	326673436
Dr_nlp3	<i>Danio rerio</i>	Nanos-verwandtes Protein	18859057
Dr_np3	<i>Danio rerio</i>	Kristallstruktur von Nanos (Chain A)	3ALR (PDB-ID)
Dm_npA	<i>Drosophila melanogaster</i>	Nanos Protein Isoform A	7300486
Dm_npB	<i>Drosophila melanogaster</i>	Nanos Protein Isoform B	442619897
Ef_nrp	<i>Ephydatia fluviatilis</i>	Nanos-verwandtes Protein	11761358
Hp_np	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	Nanos-verwandtes Protein	83319203
Hs_nlp1	<i>Homo sapiens</i>	Nanos Protein	40804761
Hs_nlp2	<i>Homo sapiens</i>	Nanos Protein	71143121
Hs_nlp3	<i>Homo sapiens</i>	Nanos Protein	41688563
Hv_np1	<i>Hydra vulgaris</i>	Nanos Protein	9279811
Hv_np2	<i>Hydra vulgaris</i>	Nanos Protein	9279813
Mm_np1	<i>Mus musculus</i>	Nanos Protein	30268650
Mm_np2	<i>Mus musculus</i>	Nanos Protein	363548445
Mm_np3	<i>Mus musculus</i>	Nanos Protein	41688564
Nv_np1	<i>Nematostella vectensis</i>	Nanos-verwandtes Protein	67468572
Nv_np2	<i>Nematostella vectensis</i>	Nanos-verwandtes Protein	67468584
Pc_np1	<i>Podocoryna carnea</i>	Nanos Protein	51860778
Pc_np2	<i>Podocoryna carnea</i>	Nanos Protein	51860780
Sp_np	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Nanos-verwandtes Protein	115728738
Sd_nrp	<i>Suberites domuncula</i>	Nanos-verwandtes Protein	-
Xl_nlp1	<i>Xenopus laevis</i>	Nanos-verwandtes Protein	147907018

1.3 Abkürzungen und IUPAC-Nomenklatur der Aminosäuren

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

2. IUPAC-Code der Nukleinsäuren

Code	Nukleobasen
G	Guanin
A	Adenin
T	Thymin
C	Cytosin
U	Uracil
R	Guanin oder Adenin (Purin)
Y	Cytosin oder Thymin (Pyrimidin)
M	Adenin oder Cytosin (Amino)
K	Guanin oder Thymin (Keto)
S	Guanin oder Cytosin (Starke Interaktionen 3 H-Brücken)
W	Adenin oder Thymin (Schwache Interaktionen 2 H-Brücken)
H	Adenin, Cytosin oder Thymin
B	Guanin, Thymin oder Cytosin
V	Guanin, Cytosin oder Adenin
D	Guanin, Adenin oder Thymin
N	Guanin, Adenin, Thymin oder Cytosin

3. Genetischer Standardcode

U			C		A		G		
U	UUU UUC	Phenylalanin F	UCU UCC UCA UCG	Serin S	UAU UAC	Tyrosin Y	UGU UGC	Cystein C	U
	UUA UUG	Leucin L			UAA UAG	STOP	UGA UGG	STOP Tryptophan W	C A
C	CUU CUC CUA CUG	Leucin L	CCU CCC CCA CCG	Prolin P	CAU CAC	Histidin H	CGU CGC CGA CGG	Arginin R	U
					CAA CAG	Glutamin Q			A
A	AUU AUC AUA	Isoleucin I	ACU ACC ACA ACG	Threonin T	AAU AAC	Asparagin N	AGU AGC	Serin S	U
	AUG	Methionin M (Start)			AAA AAG	Lysin K	AGA AGG	Arginin R	C A
G	GUU GUC GUA GUG	Valin V	GCU GCC GCA GCG	Alanin A	GAU GAC GAA GAG	Aspartat D	GGU GGC GGA GGG	Glycin G	U
						Glutamat E			A

Die farblich hinterlegten Felder ordnen die Aminosäuren nach ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften: orange (unpolar, hydrophob); blau (polar, neutral); gelb (basisch); grün (sauer); rot (Stop-Codons)

4. Primer

Bezeichnung	Orientierung	Primersequenz (5' - 3')
Vektorspezifische Primer		
M13 fwd	forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
T7 Promoter	forward	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminator	reverse	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
Genspezifische Primer		
SD_nanos147rev	reverse	AAGCCAAAGTAGTCGCGAAA
SD_nanos114rev	reverse	GTGTAGGTGGGCTCGCTAAG
SD_nanos130rev	reverse	AGGGGGAGAGGGGTATAGGT
SD_nanos227rev	reverse	TTGGCACCGAAATTCTTACC
SD_nanos114fwd	forward	CTTAGCGAGCCCACCTACAC
SD_nanos125fwd	forward	TACCCCTCTCCCCCTAACTG
SD_nanos208fwd	forward	AGAGGCCAATCGTCACTGTT
SD_nanos119fwd	forward	CGAGCCCACCTACACAGAAT
Exnoslike_SD_fwd	forward	ATAGCTTCATTGCACGTCACC
Exnoslike_SD_rev	reverse	CTTCTTGCGAGTAACAGTGAC
Primer zur Herstellung der Konstrukte (1 + 2)		
nos_BamHI_fwd	forward	CGCGGATCCGATGATAGCTTCA
nos_NotI_rev	reverse	ATAGTTTAGCGGCCGCTACTTCTTGCGAGT
exnl_SD_Res_F	forward	AGCAGCCATGGCAATAGCTTCA
exnl_SD_Res_R	reverse	GCTGCAAGCTTCTTCTTGCG

5. Programme und entsprechende Internetadressen

Programm	Internetadresse
BioEdit	www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ClustalW	www.clustal.org/
Compute pI/Mw ExPASy	www.expasy.org/compute_pi/
Double Digest Finder	www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder
EMBL InterProScan	www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/
Expaty PROSITE Scan	www.prosite.expasy.org/
GeneDoc	www.nrbsc.org/gfx/genedoc/
Geneious	www.geneious.com/
MEGA 6	www.megasoftware.net/
Modeller 9.13	www.salilab.org/archives/modeller_usage/2014/msg00023.html
My Hits Motif Scan	www.myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan
NCBI (National Center for Biotechnology Information)	www.ncbi.nlm.nih.gov/
NEBcutter V2.0	www.tools.neb.com/NEBcutter2/
Oligo Analyzer	www.eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/
Primer3	www.primer3.ut.ee/
Translate ExPASy (Expert Protein Analysis System)	www.expasy.org/translate/
UCSF Chimera	www.cgl.ucsf.edu/chimera
VecScreen	www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/

6. Sequenzen

6.1 Sd_nrp

5'-UTR

CTATTTTCTGTTGTGTGAGGCTAGTAAGATTCTATTAGCAGTTCGAGTAGCTTTTCAAAG

Codierender Bereich (offener Leserahmen) Sd_nrp

ATGATAGCTTCATTGCACGTCACCGACAATATGCAGCAACAACAAGAAGAGCTTAGCGAGCCC
ACCTACACAGAATTCAACATCTTTCGCGACTACTTTGGCTTACACACTATCGTGAAAAGCATT
GCAGCTGCTAATGCGCCAGAAGCCAGCTGTTCTGAAGTCCAAGAACAACAAGACGTCGAAGTT
CGCCCCATGCACAGGAGGGACAGCTTGGGGAGCTCAACATCCGAGTTTTTCATCCAACAGCCTA
GAGTCTGTGGAAGTAGCTGACATCTGTTACAACATAACACAAGACGTGCGTGCAAGGCAAGCC
TTTTCTGAAGTAGACATGGAACCTCTGAGCCCCCTTGGCAATGCCTTTGAGTCAGGCAACACC
AAGACCACCAACATTCCCCCTTCCCTATTTCCTGAATCATTCCAAGCTCAATACCATCAACACA
CAGTTACAACATAAAGAAGCCACAGGTATGTGTTTTCTGCCGAAATAATGGAGAATCGGAGAGT
TTCTACACATCACATTACCTCAAAGATTCAGAGGGCAAAGTGACTTGCCCCGTTCTCCGAGCC
TACACCTGTCCACTATGTGGTGCCAATGGAGACAAGGCCCATACCATCAAGTACTGCCCCGAA
AACAAAGAGAGTGGTAAAGAATTTCTGGTGCCAAGAGGCCAATCGTCACTGTTACTCGCAAGAAG

3'-UTR

TAGACAAATAAACTCTTATTCACATTAAGTACCTATAACCCCTCTCCC
CCTAACTGAATTTATACTATAGATATATCTTATACAAAGAGAAAGTATGGTTTGAAAAATATAA
ACAAATCACAGGTTTTTACCACAATATCTTTTTTGTGTTGTTGTTTTGCTATTTGTATTTT
ACTTTAGACGGTCTTTTGTAGTACATTAATCATACTAGCAACACTGTATCTCTTATTTGTTT
GTATACCCACCTTGTGGGACTCATTCAATCACATATTGGAGCATTTCAGATATCTCTTCCAACA
TTATCACTTTTGTATTGTGTATCCATTAGCAACACCTTTTTTCATTATGAATATACATGTATC
ACTTTATAATAGTAATCATTGCTTTTTTATCATAAGCACATCTACTCTACCCCCTCTCACAGAG
AGGTACACATGTCCCCCACCACAGTGTATTTTTTTCAGATGACCAAAGTTTGTGTCTAGTCTGTA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Aminosäuresequenz Sd_nrp

MIASLHVTDNMQQQQEELSEPTYTEFNIFRDYFGLHTIVKSI
RPMHRRDSLGSSTSEFSSNSLESVEVADICNYTQDVRARQAFSEVDMEPLSPLGNFESGNT
KTTNIPPSLFLNHSKLNINTQLQLKKPQVCVFCRNNGESESFYTSHYLKDSEGVKTCVPLRA
YTCPLCGANGDKAHTIKYCPENKESGKNFSAKRPIVTVTRKK

Aminosäuresequenz N-terminales konserviertes Sequenzmotiv (N-t M)

EFNIFRDYFGLHTIVKSI

Aminosäuresequenz Zinkfinger 1

CVFCRNNGESESFYTSHYLDSEGKVTC

Linkersequenz zwischen Zinkfinger 1 und Zinkfinger 2

PVLRAYT

Aminosäuresequenz Zinkfinger 2

CPLCGANGDKAHTIKYC

G Literaturverzeichnis

- Adamska, M., Degnan, B. M., Green, K., & Zwafink, C. (2011). What sponges can tell us about the evolution of developmental processes. *Zoology (Jena, Germany)*, *114*(1), 1–10.
- Adamska, M., Larroux, C., Adamski, M., Green, K., Lovas, E., Koop, D., Degnan, B. M. (2010). Structure and expression of conserved Wnt pathway components in the demosponge *Amphimedon queenslandica*. *Evolution & Development*, *12*(5), 494–518.
- Adamska, M., Matus, D. Q., Adamski, M., Green, K., Rokhsar, D. S., Martindale, M. Q., & Degnan, B. M. (2007). The evolutionary origin of hedgehog proteins. *Current Biology*, *17*(19), 836–837.
- Adamska, M., Degnan, S. M., Green, K. M., Adamski, M., Craigie, A., Larroux, C., & Degnan, B. M. (2007). Wnt and TGF- β Expression in the Sponge *Amphimedon queenslandica* and the Origin of Metazoan Embryonic Patterning. *PLoS ONE*, *2*(10), e1031.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Venter, J. C. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, *287*(5461), 2185–2195.
- Adell, T., Grebenjuk, V. A., Wiens, M., & Müller, W. E. G. (2003). Isolation and characterization of two T-box genes from sponges, the phylogenetically oldest metazoan taxon. *Development Genes and Evolution*, *213*(9), 421–434.
- Adell, T., & Müller, W. E. G. (2004). Isolation and characterization of five Fox (Forkhead) genes from the sponge *Suberites domuncula*. *Gene*, *334*, 35–46.
- Adell, T., Nefkens, I., & Müller, W. E. G. (2003). Polarity factor „Frizzled” in the Demosponge *Suberites domuncula*: identification, expression and localization of the receptor in the epithelium/pinacoderm. *FEBS Letters*, *554*(3), 363–368.

- Amann, E., Brosius, J., & Ptashne, M. (1983). Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene*, 25(2–3), 167–178.
- Arndt, W. (1930). *Schwämme: Porifera, Spongien*. Berlin: C. Oppenheimer und L. Pincusen.
- Arrizabalaga, G., & Lehmann, R. (1999). A Selective Screen Reveals Discrete Functional Domains in Drosophila Nanos. *Genetics*, 153(4), 1825–1838.
- Asaoka-Taguchi, M., Yamada, M., Nakamura, A., Hanyu, K., & Kobayashi, S. (1999). Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in Drosophila embryos. *Nature Cell Biology*, 1(7), 431–437.
- Baines, R. A. (2005). Neuronal homeostasis through translational control. *Molecular Neurobiology*, 32(2), 113–121.
- Barolo, S., & Posakony, J. W. (2002a). Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes & Development*, 16(10), 1167–1181.
- Barolo, S., & Posakony, J. W. (2002b). Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes & Development*, 16(10), 1167–1181.
- Becerro, M. A. (2012). *Advances in Sponge Science: Physiology, Chemical and Microbial Diversity, Biotechnology*. UK: Academic Press.
- Bell, J. J. (2008). The functional roles of marine sponges. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79(3), 341–353.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2009). *Stryer Biochemie*. (B. Häcker, A. Held, C. Lange, K. Mahlke, G. Maxam, L. Seidler, & N. Zellerhoff, Übers.). Heidelberg u.a.: Spektrum Akademischer Verlag.
- Bergquist, P. R. (1978). *Sponges*. University of California Press.

- Bhandari, D., Raisch, T., Weichenrieder, O., Jonas, S., & Izaurralde, E. (2014). Structural basis for the Nanos-mediated recruitment of the CCR4-NOT complex and translational repression. *Genes & Development*, 28(8), 888–901.
- Bjellqvist, B., Basse, B., Olsen, E., & Celis, J. E. (1994). Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. *ELECTROPHORESIS*, 15(1), 529–539.
- Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, C., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D. (1993). The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *ELECTROPHORESIS*, 14(1), 1023–1031.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., & Prinsep, M. R. (2005). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 22(1), 1-15.
- Borojevic, R. (1966). Etude experimentale de la differenciation des cellules de l'éponge au cours de son developpement. *Developmental Biology*, 14, 130–153.
- Bosch, T. C. G. (2008). *Stem Cells: From Hydra to Man*. New York: Springer.
- Bosch, T. C. G., & David, C. N. (1987). Stem cells of *Hydra magnipapillata* can differentiate into somatic cells and germ line cells. *Developmental Biology*, 121(1), 182–191.
- Boury-Esnault, N., & Rützler, K. (1997). *Thesaurus of sponge morphology*. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press.
- Brown, R. S. (2005). Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Current Opinion in Structural Biology*, 15(1), 94–98.
- Brown, R. S., Sander, C., & Argos, P. (1985). The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS Letters*, 186(2), 271–274.
- Brusca, R. C., & Brusca, G. J. (2003). *Invertebrates (Second Edition)*. Sunderland, Mass: Sinauer Associates.

- Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K., & Jones, D. T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research*, 41(W1), 349–357.
- Buscema, M., Sutter, D. D., & Vyver, G. V. de. (1980). Ultrastructural study of differentiation processes during aggregation of purified sponge archaeocytes. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 188(1), 45–53.
- Clemens, K. R., Wolf, V., McBryant, S. J., Zhang, P., Liao, X., Wright, P. E., & Gottesfeld, J. M. (1993). Molecular basis for specific recognition of both RNA and DNA by a zinc finger protein. *Science*, 260(5107), 530–533.
- Collart, M. A. (2003). Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene*, 313, 1–16.
- Collart, M. A., & Panasenko, O. O. (2012). The Ccr4–Not complex. *Gene*, 492(1), 42–53.
- Connes, R., Paris, J., & Artiges, J. (1974). L'origine des cellules blastogenetiques chez *Suberites domuncula* Nardo. L'équilibre choanocytes-archeocytes chez les spontiaries. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie*, 16, 111–118.
- Corneliussen, B., Holm, M., Waltersson, Y., Onions, J., Hallberg, B., Thornell, A., & Grundström, T. (1994). Calcium/calmodulin inhibition of basic-helix-loop-helix transcription factor domains. *Nature*, 368(6473), 760–764.
- Curtis, D., Apfeld, J., & Lehmann, R. (1995b). Nanos is an evolutionarily conserved organizer of anterior-posterior polarity. *Development*, 121(6), 1899–1910.
- Curtis, D., Lehmann, R., & Zamore, P. D. (1995a). Translational regulation in development. *Cell*, 81(2), 171–178.
- Curtis, D., Treiber, D. K., Tao, F., Zamore, P. D., Williamson, J. R., & Lehmann, R. (1997). A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation. *The EMBO Journal*, 16(4), 834–843.

- Custodio, M. R., Prokic, I., Steffen, R., Koziol, C., Borojevic, R., Brümmer, F., Müller, W. E. G. (1998). Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mechanisms of Ageing and Development*, 105(1–2), 45–59.
- Darlix, J.-L., Lapadat-Tapolsky, M., de Rocquigny, H., & Roques, B. P. (1995). First Glimpses at Structure-function Relationships of the Nucleocapsid Protein of Retroviruses. *Journal of Molecular Biology*, 254(4), 523–537.
- Daugeron, M.-C., Mauxion, F., & Séraphin, B. (2001). The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Research*, 29(12), 2448–2455.
- De Moor, C. H., & Richter, J. D. (1999). Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA. *The EMBO Journal*, 18(8), 2294–2303.
- Deng, W., & Lin, H. (2002). miwi, a Murine Homolog of piwi, Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Spermatogenesis. *Developmental Cell*, 2(6), 819–830.
- Diaz, J.-P. (1977). Transformation histologiques et cytologiques post-traumatiques chez la demosponge *Suberites massa* Nardo. *Muséum national d'histoire naturelle (Paris) 3rd Ser*, 445 (308), 375–396.
- Diaz, M. C., & Rützler, K. (2001). Sponges: An essential component of Caribbean coral reefs. *Bulletin of Marine Science*, 69(2), 535–546.
- Dingermann, T., Zündorf, I., Winckler, T., & Mahler, H.-C. (2010). *Gentechnik - Biotechnik: Lehrbuch und Kompendium für Studium und Praxis*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Donati, V. (1753). *Vitaliano Donati Auszug seiner Natur-Geschichte des Adriatischen Meers den Boden des Meers zu untersuchen, nebst Instrumenten in solcher Tiefe zu fischen; von Classen der Meerpflanzen, der Polyparen, der Thierpflanzen und Pflanzenthier, oder Uebergang der Natur vom Pflanztenreiche zum Thierreiche: Nebst Leonhard Seslers Anhang einer besonderen Bergpflanze, Vitaliana*. Francken.

- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., & Duran, C. (2011). Geneious v 5.4. Available from <http://www.geneious.com>, 2011.
- D. Sutter, M. B. (1977). Isolation of a highly pure archeocyte fraction from the fresh-water sponge *Ephydatia fluviatilis*. *Development Genes and Evolution*, 183(2), 149–153.
- Dyrlov Bendtsen, J., Nielsen, H., von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340(4), 783–795.
- Egel, R., & Lankenau, D.-H. (2008). *Recombination and Meiosis: Models, Means, and Evolution*. Springer Science & Business Media.
- Ereskovsky, A. V. (2010). *The Comparative Embryology of Sponges*. Dordrecht: Springer.
- Ereskovsky, A. V., & Tokina, D. B. (2007). Asexual reproduction in homoscleromorph sponges (Porifera; Homoscleromorpha). *Marine Biology*, 151(2), 425–434.
- Ereskovsky, A. V., & Dondua, A. K. (2006). The problem of germ layers in sponges (Porifera) and some issues concerning early metazoan evolution. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*, 245(2), 65–76.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M.-Y., Sali, A. (2007). Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board, John E. Coligan, Chapter 2*, Unit 2.9.
- Extavour, C. G., & Akam, M. (2003). Mechanisms of germ cell specification across the metazoans: epigenesis and preformation. *Development*, 130(24), 5869–5884.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783.
- Forbes, A., & Lehmann, R. (1998). Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of *Drosophila* germline stem cells. *Development*, 125(4), 679–690.
- Funayama, N. (2008). Stem Cell System of Sponge. Thomas C. G. Bosch (Hrsg.), *Stem Cells*, Springer Netherlands, 17–35.

- Funayama, N. (2010). The stem cell system in demosponges: insights into the origin of somatic stem cells. *Development, Growth & Differentiation*, 52(1), 1–14.
- Funayama, N., Nakatsukasa, M., Mohri, K., Masuda, Y., & Agata, K. (2010). Piwi expression in archeocytes and choanocytes in demosponges: insights into the stem cell system in demosponges. *Evolution & Development*, 12(3), 275–287.
- Galtsoff, P. S. (1925). Regeneration after dissociation (an experimental study on sponges). II. Histogenesis of microciona prolifera, verr. *Journal of Experimental Zoology*, 42(1), 223–255.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Hrsg.), *The Proteomics Protocols Handbook* (S. 571–607). Humana Press.
- Gavis, E. R., & Lehmann, R. (1994). Translational regulation of nanos by RNA localization. *Nature*, 369(6478), 315–318.
- Ginsberg, A. M., King, B. O., & Roeder, R. G. (1984). Xenopus 5S gene transcription factor, TFIIIA: Characterization of a cDNA clone and measurement of RNA levels throughout development. *Cell*, 39(3 Part 2), 479–489.
- Ginter-Matuszewska, B., Kusz, K., Spik, A., Grzeszkowiak, D., Rembiszewska, A., Kupryjanczyk, J., & Jaruzelska, J. (2011). NANOS1 and PUMILIO2 bind microRNA biogenesis factor GEMIN3, within chromatoid body in human germ cells. *Histochemistry and Cell Biology*, 136(3), 279–287.
- Haeckel, E. (1868). *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. Reimer, Berlin.
- Haeckel, E. (1872). *Atlas der Kalkschwämme*. Berlin: Georg Reimer.
- Haeckel, E. (1896). *Systematische Phylogenie der Wirbellosen Thiere*. Georg Reimer, Berlin.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, 95–98.

- Hanas, J. S., Hazuda, D. J., Bogenhagen, D. F., Wu, F. Y., & Wu, C. W. (1983). Xenopus transcription factor A requires zinc for binding to the 5 S RNA gene. *Journal of Biological Chemistry*, 258(23), 14120–14125.
- Harrison, F. W. (1974). Histology and histochemistry of developing outgrowths of *Corvomeyenia carolinensis* Harrison (Porifera: Spongillidae). *Journal of Morphology*, 144(2), 185–194.
- Hashimoto, H., Hara, K., Hishiki, A., Kawaguchi, S., Shichijo, N., Nakamura, K., Sato, M. (2010). Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional implications. *EMBO Reports*, 11(11), 848–853.
- Hashimoto, H., Kawaguchi, S., Hara, K., Nakamura, K., Shimizu, T., Tamaru, Y., & Sato, M. (2009). Purification, crystallization and initial X-ray diffraction study of the zinc-finger domain of zebrafish Nanos. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 65(Part 9), 959–961.
- Hayashi, Y., Hayashi, M., & Kobayashi, S. (2004). Nanos suppresses somatic cell fate in Drosophila germ line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(28), 10338–10342.
- Henkart, P., Humphreys, S., & Humphreys, T. (1973). Characterization of sponge aggregation factor. Unique proteoglycan complex. *Biochemistry*, 12(16), 3045–3050.
- Herland-Meewis, H. (1948). La gemmulation chez *Suberites domuncula* (Olivi) Nardo. *Archives d' anatomie microscopique*, 37, 289–322.
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., & Stüber, D. (1988). Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nature Biotechnology*, 6(11), 1321–1325.
- Höhr, D. (1977). Differenzierungsvorgänge in der keimenden Gemmula von *Ephydatia fluviatilis*. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*, 182(4), 329–346.

- Hooper, J., & Soest, R. W. M. van. (2002). *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. New York: Springer.
- Hülskamp, M., Schröder, C., Pfeifle, C., Jäckle, H., & Tautz, D. (1989). Posterior segmentation of the *Drosophila* embryo in the absence of a maternal posterior organizer gene. *Nature*, 338(6217), 629–632.
- Hülskamp, M., Pfeifle, C., & Tautz, D. (1990). A morphogenetic gradient of hunchback protein organizes the expression of the gap genes Krüppel and knirps in the early *Drosophila* embryo. *Nature*, 346(6284), 577–580.
- Humphreys, T. (1963). Chemical dissolution and in vitro reconstruction of sponge cell adhesions: I. Isolation and functional demonstration of the components involved. *Developmental Biology*, 8(1), 27–47.
- Huxley, J. S. (1921). Further Studies on Restitution-bodies and free Tissue-culture in *Sycon*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, s2-65(258), 293–322.
- Jaruzelska, J., Kotecki, M., Kusz, K., Spik, A., Firpo, M., & Pera, R. A. R. (2003). Conservation of a Pumilio-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells. *Development Genes and Evolution*, 213(3), 120–126.
- Joly, W., Chartier, A., Rojas-Rios, P., Busseau, I., & Simonelig, M. (2013). The CCR4 Deadenylase Acts with Nanos and Pumilio in the Fine-Tuning of Mei-P26 Expression to Promote Germline Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports*, 1(5), 411–424.
- Jones, D. T. (1999). Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *Journal of Molecular Biology*, 292(2), 195–202.
- Kadyrova, L. Y., Habara, Y., Lee, T. H., & Wharton, R. P. (2007). Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. *Development*, 134(8), 1519–1527.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., & Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39(3 Part 2), 499–509.

- Kang, D., Pilon, M., & Weisblat, D. A. (2002). Maternal and zygotic expression of a nanos-class gene in the leech *Helobdella robusta*: primordial germ cells arise from segmental mesoderm. *Developmental Biology*, 245(1), 28–41.
- Klug, A. (2010). The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 213–231.
- Kobayashi, S., Yamada, M., Asaoka, M., & Kitamura, T. (1996). Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature*, 380(6576), 708–711.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., & Raz, E. (2001). A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes & Development*, 15(21), 2877–2885.
- Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, 3(9), 1452–1456.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44(2), 283–292.
- Koziol, C., Borojevic, R., Steffen, R., & Müller, W. E. G. (1998). Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 100(2), 107–120.
- 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. *European Journal of Biochemistry*, 267(15), 4878–4887.
- Kugler, J.-M., & Lasko, P. (2009). Localization, anchoring and translational control of oskar, gurken, bicoid and nanos mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Fly*, 3(1), 15–28.
- Kusz, K. M., Tomczyk, L., Sajek, M., Spik, A., Latos-Bielenska, A., Jedrzejczak, P., Jaruzelska, J. (2009). The highly conserved NANOS2 protein: testis-specific expression and

- significance for the human male reproduction. *Molecular Human Reproduction*, 15(3), 165–171.
- Kusz-Zamelczyk, K., Sajek, M., Spik, A., Glazar, R., Jędrzejczak, P., Latos-Bieleńska, A., Jaruzelska, J. (2013). Mutations of NANOS1, a human homologue of the *Drosophila* morphogen, are associated with a lack of germ cells in testes or severe oligo-asthenoteratozoospermia. *Journal of Medical Genetics*, 50(3), 187–193.
- Kutz, G., & Wolff, A. (2007). *Pharmazeutische Produkte und Verfahren*. John Wiley & Sons.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lai, F., & King, M. L. (2013). Repressive translational control in germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, 80(8), 665–676.
- Lai, F., Zhou, Y., Luo, X., Fox, J., & King, M. L. (2011). Nanos1 functions as a translational repressor in the *Xenopus* germline. *Mechanisms of Development*, 128(1-2), 153–163.
- Lall, S., Ludwig, M. Z., & Patel, N. H. (2003). Nanos Plays a Conserved Role in Axial Patterning outside of the Diptera. *Current Biology*, 13(3), 224–229.
- Laport, M. S., Santos, O. C. S., & Muricy, G. (2009). Marine Sponges: Potential Sources of New Antimicrobial Drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10(1), 86–105.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948.
- Larroux, C., Fahey, B., Liubicich, D., Hinman, V. F., Gauthier, M., Gongora, M., Degnan, B. M. (2006). Developmental expression of transcription factor genes in a demosponge: insights into the origin of metazoan multicellularity. *Evolution & Development*, 8(2), 150–173.
- Larsen, P. S., & Riisgård, H. U. (1994). The Sponge Pump. *Journal of Theoretical Biology*, 168(1), 53–63.

- Lehmann, R., & Nüsslein-Volhard, C. (1991). The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development*, 112(3), 679–691.
- Lehnert, H., & Reitner, J. (1997). Lebensdauer und Regeneration bei *Ceratoporella nicholsoni* (Hickson, 1911) and *Spirastrella* (Acanthochaetetes) *wellsi* (Hartman & Goreau, 1975), Geologische Blätter für Nordost-Bayern, 47 (1-4), 265–273.
- Leith, A. (1979). Role of Aggregation Factor and Cell Type in Sponge Cell Adhesion. *The Biological Bulletin*, 156(2), 212–223.
- Le Pennec, G., Perovic, S., Ammar, M. S. A., Grebenjuk, V. A., Steffen, R., Brümmer, F., & Müller, W. E. G. (2003). Cultivation of primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*: morphogenetic potential of silicon and iron. *Journal of Biotechnology*, 100(2), 93–108.
- Lévi, C. (1953). Sur une nouvelle classification des Démosponges, *Comptes Rendu hebdomodaires des Séances de l'Académie Sciences*, 236(8), 853–855.
- Lévi, C. (1956). Embryologie et systématique des Démosponges, *Archives de zoologie expérimentale et générale*, 93, 1–184.
- Leys, S. P., & Hill, A. (2012). Chapter one - The Physiology and Molecular Biology of Sponge Tissues. In M. J. U., Manuel Maldonado and Xavier Turon Mikel A. Becerro (Hrsg.), *Advances in Marine Biology* (Volume 62). Academic Press, 1–56.
- Li, C.-W., Chen, J.-Y., & Hua, T.-E. (1998). Precambrian Sponges with Cellular Structures. *Science*, 279(5352), 879–882.
- Lin, H., & Spradling, A. C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 124(12), 2463–2476.
- Lottspeich, F., & Engels, J. W. (2008). *Bioanalytik. Methoden; Handbüg*: Spektrum Akademischer Verlag.
- Maldonado, M., & Uriz, M. J. (1999). Sexual propagation by sponge fragments. *Nature*, 398(6727), 476–476.

- Margulis, L., Schwartz, K. V., & Gould, S. J. (1998). *Five Kingdoms: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth*. New York: W. H. Freeman & Co Ltd.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., & Jones, D. T. (2000). The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16(4), 404–405.
- Mehlhorn, H. (1989). *Grundriß der Zoologie*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Miller, J., McLachlan, A. D., & Klug, A. (1985). Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal*, 4(6), 1609–1614.
- Miller, J. C., Holmes, M. C., Wang, J., Guschin, D. Y., Lee, Y.-L., Rupniewski, I., ... Rebar, E. J. (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 25(7), 778–785.
- Mochizuki, K., Nishimiya-Fujisawa, C., & Fujisawa, T. (2001). Universal occurrence of the vasa-related genes among metazoans and their germline expression in *Hydra*. *Development Genes and Evolution*, 211(6), 299–308.
- Mochizuki, K., Sano, H., Kobayashi, S., Nishimiya-Fujisawa, C., & Fujisawa, T. (2000). Expression and evolutionary conservation of nanos-related genes in *Hydra*. *Development Genes and Evolution*, 210(12), 591–602.
- Mosquera, L., Forristall, C., Zhou, Y., & King, M. L. (1993). A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger domain. *Development*, 117(1), 377–386.
- Müller, K. (1911). Das Regenerationsvermögen der Süßwasserschwämme, insbesondere. *Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen*, 32(3), 397–446.
- Müller, W. E. G. (1976). Endoribonuclease IV A Poly (A)-Specific Ribonuclease from Chick Oviduct. *European Journal of Biochemistry*, 70(1), 241–248.
- Müller, W. E. G., Wang, X., Grebenjuk, V. A., Korzhev, M., Wiens, M., Schlossmacher, U., & Schröder, H. C. (2012). Nocturnin in the demosponge *Suberites domuncula*: a potential

- circadian clock protein controlling glycogenin synthesis in sponges. *The Biochemical Journal*, 448(2), 233–242.
- Müller, W. E. G. (2006a). The stem cell concept in sponges (Porifera): Metazoan traits. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17(4), 481–491.
- Müller, W. E. G. (2006b). Spatial and Temporal Expression Patterns in Animals. In *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Müller, W. E. G. (2003). The origin of metazoan complexity: porifera as integrated animals. *Integrative and Comparative Biology*, 43(1), 3–10.
- Müller, W. E. G. (2001). Review: How was metazoan threshold crossed? The hypothetical Urmetazoa. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 129(2-3), 433–460.
- Müller, W. E. G. (1998a). Molecular Phylogeny of Eumetazoa: Genes in Sponges (Porifera) Give Evidence for Monophyly of Animals. In P. D. W. E. G. Müller (Hrsg.), *Molecular Evolution: Evidence for Monophyly of Metazoa*. Springer Berlin Heidelberg, 89–132
- Müller, W. E. G. (1998b). Origin of Metazoa: Sponges as Living Fossils. *Naturwissenschaften*, 85(1), 11–25.
- Müller, W. E. G. (1997). Origin of metazoan adhesion molecules and adhesion receptors as deduced from cDNA analyses in the marine sponge *Geodia cydonium*: a review. *Cell and Tissue Research*, 289(3), 383–395.
- Müller, W. E. G. (1982). Cell Membranes in Sponges. In G.H. Bourne and J.F. Danielli (Hrsg.), *International Review of Cytology* (Bd. Volume 77). Academic Press, 129–181.
- Müller, W. E. G., Wiens, M., Adell, T., Gamulin, V., Schröder, H. C., & Müller, I. M. (2004). Bauplan of Urmetazoa: Basis for Genetic Complexity of Metazoa. In *International Review of Cytology* (Bd. Volume 235). Academic Press, 53–92.

- Müller, W. E. G., & Müller, I. M. (2003). Analysis of the Sponge [Porifera] Gene Repertoire: Implications for the Evolution of the Metazoan Body Plan. In P. D. W. E. G. Müller (Hrsg.), *Sponges (Porifera)*. Springer Berlin Heidelberg, 1–33.
- Müller, W. E. G., Schröder, H. C., Skorokhod, A., Bünz, C., Müller, I. M., & Grebenjuk, V. A. (2001). Contribution of sponge genes to unravel the genome of the hypothetical ancestor of Metazoa (Urmatazoa). *Gene*, 276(1-2), 161–173.
- Müller, W. E. G., Wiens, M., Batel, R., Steffen, R., Schroder, H. C., Borojevic, R., & Custodio, M. R. (1999). Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. *Marine Ecology Progress Series*, 178, 205–219.
- Müller, W. E. G., Kruse, M., Koziol, C., Müller, J. M., & Leys, S. P. (1998). Evolution of Early Metazoa: Phylogenetic status of the hexactinellida within the phylum of Porifera (Sponges). In P. D. W. E. G. Müller (Hrsg.), *Molecular Evolution: Towards the Origin of Metazoa*. Springer Berlin Heidelberg, 141–156.
- Müller, W. E. G., Diehl-Seifert, B., Gramzow, M., Friese, U., Renneisen, K., & Schröder, H. C. (1988). Interrelation between extracellular adhesion proteins and extracellular matrix in reaggregation of dissociated sponge cells. *International Review of Cytology*, 111, 211–229.
- Müller, W. E. G., & Zahn, R. K. (1973). Purification and characterization of a species-specific aggregation factor in sponges. *Experimental Cell Research*, 80(1), 95–104.
- Murata, Y., & Wharton, R. P. (1995). Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell*, 80(5), 747–756.
- Newton, C. R., & Graham, A. (1994). *PCR*. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Nicholas, K. B., & Nicholas, H. B. J. (o. J.). Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments, (www.psc.edu/biomed/genedoc, 1997).

- Nichols, S. A., Dirks, W., Pearse, J. S., & King, N. (2006). Early evolution of animal cell signaling and adhesion genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12451–12456.
- Olivi, G. (1792). Zoologia Adriatica. *Reale Accademia Sc. Lettere Arti*, Bassano, 334.
- Pahler, S., Krasko, A., Schütze, J., Müller, I. M., & Müller, W. E. (1998). Isolation and characterization of a cDNA encoding a potential morphogen from the marine sponge *Geodia cydonium* that is conserved in higher metazoans. *Proceedings. Biological Sciences. The Royal Society*, 265(1394), 421–425.
- Pancer, Z., Kruse, M., Müller, I., & Müller, W. E. G. (1997). On the origin of Metazoan adhesion receptors: cloning of integrin alpha subunit from the sponge *Geodia cydonium*. *Molecular Biology and Evolution*, 14(4), 391–398.
- Pawley, J. (2010). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. New York: Springer.
- Perović-Ottstadt, S., Cetković, H., Gamulin, V., Schröder, H. C., Kropf, K., Moss, C., Müller, W. E. G. (2004a). Molecular markers for germ cell differentiation in the demosponge *Suberites domuncula*. *The International Journal of Developmental Biology*, 48(4), 293–305.
- Perović-Ottstadt, S., Adell, T., Proksch, P., Wiens, M., Korzhev, M., Gamulin, V., Müller, W. E. G. (2004b). A (1→3)-beta-D-glucan recognition protein from the sponge *Suberites domuncula*. Mediated activation of fibrinogen-like protein and epidermal growth factor gene expression. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 271(10), 1924–1937.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
- Pfeifer, K., Haasemann, M., Gamulin, V., Bretting, H., Fahrenholz, F., & Müller, W. E. G. (1993). S-type lectins occur also in invertebrates: High conservation of the carbohydrate

- recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiology*, 3(2), 179–184.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258(5536), 598–599.
- Proudfoot, N. J., & Brownlee, G. G. (1976). 3' Non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, 263(5574), 211–214.
- Rajavashisth, T. B., Taylor, A. K., Andalibi, A., Svenson, K. L., & Lusi, A. J. (1989). Identification of a zinc finger protein that binds to the sterol regulatory element. *Science*, 245(4918), 640–643.
- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C., & Sasisekharan, V. (1963). Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *Journal of Molecular Biology*, 7(1), 95–99.
- Rasmont, R. (1963). Le rôle de la taille et de la nutrition dans le déterminisme de la gemmulation chez les Spongillides. *Developmental Biology*, 8(3), 243–271.
- Read, K. R. H., Davidson, J. M., & Twarog, B. M. (1968). Fluorescence of sponges and coelenterates in blue light. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 25(3), 873–882.
- Renneberg, R., & Berkling, V. (2012). *Biotechnologie für Einsteiger*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Riedl, R. (1985). *Fauna und Flora des Mittelmeeres. Ein systematischer Meeresführer für Biologen und Naturfreunde*. Hamburg und Berlin: Paul Parey.
- Riedl, S., Schweder-Riedl, B., & Riedl, R. (2011). *Fauna und Flora des Mittelmeeres*. Wien: Seifert Verlag.
- Roux, K. H. (2009). Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(4), 1–6.
- Ruppert, E. E., Fox, R. S., & Barnes, R. D. (2003). *Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach (Seventh Edition)*. Belmont California: Brooks Cole.

- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol.*; Cold Spring Harbor. N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467.
- Sato, K., Hayashi, Y., Ninomiya, Y., Shigenobu, S., Arita, K., Mukai, M., & Kobayashi, S. (2007). Maternal Nanos represses hid / skl-dependent apoptosis to maintain the germ line in *Drosophila* embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(18), 7455–7460.
- Schröder, H. C., Perović-Ottstadt, S., Wiens, M., Batel, R., Müller, I. M., & Müller, W. E. G. (2004). Differentiation capacity of epithelial cells in the sponge *Suberites domuncula*. *Cell and Tissue Research*, 316(2), 271–280.
- Schröder, H. C., Krasko, A., Batel, R., Skorokhod, A., Pahler, S., Kruse, M., Müller, W. E. G. (2000). Stimulation of protein (collagen) synthesis in sponge cells by a cardiac myotrophin-related molecule from *Suberites domuncula*. *The FASEB Journal*, 14(13), 2022–2031.
- Schröder, H. C., Zahn, R. K., Dose, K., & Müller, W. E. (1980). Purification and characterization of a poly (A)-specific exoribonuclease from calf thymus. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(10), 4535–4538.
- Schütze, J. Skorokhod, A., Müller, I. M., & Müller, W. E. G. (2001). Molecular Evolution of the Metazoan Extracellular Matrix: Cloning and Expression of Structural Proteins from the Demosponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium*. *Journal of Molecular Evolution*, 53(4-5), 402–415.
- Seipel, K., Yanze, N., & Schmid, V. (2004). The germ line and somatic stem cell gene Cniwi in the jellyfish *Podocoryne carnea*. *The International Journal of Developmental Biology*, 48(1), 1–7.
- Semotok, J. L., Cooperstock, R. L., Pinder, B. D., Vari, H. K., Lipshitz, H. D., & Smibert, C. A. (2005). Smaug Recruits the CCR4/POP2/NOT Deadenylation Complex to Trigger

- Maternal Transcript Localization in the Early *Drosophila* Embryo. *Current Biology*, 15(4), 284–294.
- Simpson, T. L. (1984). *The cell biology of sponges*. New York: Springer-Verlag.
- Smibert, C. A., Wilson, J. E., Kerr, K., & Macdonald, P. M. (1996). Smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the *Drosophila* embryo. *Genes & Development*, 10(20), 2600–2609.
- Solana, J. (2013). Closing the circle of germline and stem cells: the Primordial Stem Cell hypothesis. *EvoDevo*, 4(1), 2.
- Sonoda, J., & Wharton, R. P. (1999). Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. *Genes & Development*, 13(20), 2704–2712.
- Srivastava, M., Simakov, O., Chapman, J., Fahey, B., Gauthier, M. E. A., Mitros, T., Rokhsar, D. S. (2010). The *Amphimedon queenslandica* genome and the evolution of animal complexity. *Nature*, 466(7307), 720–726.
- St. Johnston, D., & Nüsslein-Volhard, C. (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 68(2), 201–219.
- Subramaniam, K., & Seydoux, G. (1999). Nos-1 and nos-2, two genes related to *Drosophila* nanos, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 126(21), 4861–4871.
- Sulkowski, E. (1985). Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, 3(1), 1–7.
- Suzuki, A., Niimi, Y., & Saga, Y. (2014). Interaction of NANOS2 and NANOS3 with different components of the CNOT complex may contribute to the functional differences in mouse male germ cells. *Biology Open*, 000, 1–10.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729.

- Tautz, D., Lehmann, R., Schnürch, H., Schuh, R., Seifert, E., Kienlin, A., Jäckle, H. (1987). Finger protein of novel structure encoded by hunchback, a second member of the gap class of *Drosophila* segmentation genes. *Nature*, 327(6), 383–389.
- Technau, U., & Bode, H. R. (1999). HyBra1, a Brachyury homologue, acts during head formation in *Hydra*. *Development*, 126(5), 999–1010.
- Thacker, R. W., & Freeman, C. J. (2012). Sponge-microbe symbioses: recent advances and new directions. *Advances in Marine Biology*, 62, 57–111.
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., & Saga, Y. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science*, 301(5637), 1239–1241.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L., & Parker, R. (2001). The Transcription Factor Associated Ccr4 and Caf1 Proteins Are Components of the Major Cytoplasmic mRNA Deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 104(3), 377–386.
- Venkataraman, K., Brown, K. M., & Gilmartin, G. M. (2005). Analysis of a noncanonical poly (A) site reveals a tripartite mechanism for vertebrate poly (A) site recognition. *Genes & Development*, 19(11), 1315–1327.
- Vos, L. de, Rützler, Klaus, Boury-Esnault, N., Donadey, C. and Vacelet, J. (1991). *Atlas of sponge morphology*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press.
- Wagner, C., Steffen, R., Koziol, C., Batel, R., Lacorn, M., Steinhart, H., Müller, W. E. G. (1998). Apoptosis in marine sponges: a biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria). *Marine Biology*, 131(3), 411–421.
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., & Gatto, G. J. (2005). Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angewandte Chemie (International Edition)*, 44(45), 7342–7372.
- Wang, C., Dickinson, L. K., & Lehmann, R. (1994). Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Developmental Dynamics*, 199(2), 103–115.

- Wang, C., & Lehmann, R. (1991). Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell*, 66(4), 637–647.
- Wang, Z., & Lin, H. (2004). Nanos maintains germline stem cell self-renewal by preventing differentiation. *Science*, 303(5666), 2016–2019.
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2010). *Watson Molekularbiologie - Das molekulare Grundwissen der Biologie*. München: Pearson Studium.
- Webb, B., & Sali, A. (2014). Protein structure modeling with MODELLER. *Methods in Molecular Biology (Clifton, New York)*, 1137, 1–15.
- Weissenfels, N. (1989). *Biologie und Mikroskopische Anatomie der Süßwasserschwämme*. München: Urban & Fischer.
- Westheide, W., Rieger, G., & Rieger, R. (2013). *Spezielle Zoologie. Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere*. Stuttgart u.a.: Springer Spektrum.
- Westheide, W., & Rieger, R. (2003). *Spezielle Zoologie. Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere*. Heidelberg u.a.: Spektrum Akademischer Verlag.
- Wharton, R. P., & Struhl, G. (1991). RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen nanos. *Cell*, 67(5), 955–967.
- Whelan, S., & Goldman, N. (2001). A General Empirical Model of Protein Evolution Derived from Multiple Protein Families Using a Maximum-Likelihood Approach. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), 691–699.
- Wiederhold, K., & Passmore, L. A. (2010). Cytoplasmic deadenylation: Regulation of mRNA fate. *Biochemical Society transactions*, 38(6), 1531–1536.
- Wiens, M., Mangoni, A., D'Esposito, M., Fattorusso, E., Korchagina, N., Schröder, H. C., Müller, W. E. G. (2003). The molecular basis for the evolution of the metazoan bodyplan: extracellular matrix-mediated morphogenesis in marine demosponges. *Journal of Molecular Evolution*, 57 (Suppl 1), 60–75.

- Wilson, H. V. (1907). On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *Journal of Experimental Zoology*, 5(2), 245–258.
- Windsor, P. J., & Leys, S. P. (2010). Wnt signaling and induction in the sponge aquiferous system: evidence for an ancient origin of the organizer. *Evolution & Development*, 12(5), 484–493.
- Wink, M. (2011). *Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Witte, U., & Barthel, D. (1994). Reproductive cycle and oogenesis of *Halichondria panicea* (Pallas) in Kiel Bight. *Van Soest Rob W.M., Van Kempen Theo M.G., Braekman Jean-Claude (eds) Sponges in time and space*, 297–306.
- Wolfe, S. A., Nekludova, L., & Pabo, C. O. (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29, 183–212.
- Wu, X., Wang, B., Dong, Z., Zhou, S., Liu, Z., Shi, G., Xu, Y. (2013). A NANOS3 mutation linked to protein degradation causes premature ovarian insufficiency. *Cell Death & Disease*, 4(10), e825.
- Wulczyn, F. G., Cuevas, E., Franzoni, E., & Rybak, A. (2011). miRNAs Need a Trim : Regulation of miRNA Activity by Trim-NHL Proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 700, 85–105.
- Zamore, P. D., Williamson, J. R., & Lehmann, R. (1997). The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. *RNA*, 3(12), 1421–1433.

Danksagung

Erklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit selbständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Textstellen, Zeichnungen, Skizzen und bildliche Darstellungen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Nadine Leidecker