

**Identifizierung eines adaptiven
antibakteriellen Abwehrmechanismus
des marinen Schwammes *Suberites domuncula***

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Pharmazie und Chemie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Malte Klemt
geboren in Wiesbaden

Mainz, 2004

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 05.01.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Bedeutung von Naturstoffen in der Arzneimitteltherapie	7
1.2	Pflanzen, Mikroorganismen und marine Wirkstoffquellen	7
1.3	Bioaktive Substanzen aus Meeresschwämmen.....	9
1.4	Etherphospholipide aus <i>Suberites domuncula</i>	11
1.5	Problematik der nachhaltigen Verfügbarkeit mariner Wirkstoffe	12
1.6	Die Rolle assoziierter Bakterien bei der Wirkstoffsynthese	13
1.7	LPS-induzierte Reaktionen in Vertebraten und Invertebraten.....	14
1.8	Struktur und Erkennung von Lipopolysacchariden	16
1.9	Identifizierung differentieller Genexpression durch Differential Display.....	18
1.10	Biologie der Schwämme	20
1.11	Schwämme als Modellorganismen des Studiums biochemischer Abwehr	23
2	Zielsetzung der Arbeit.....	25
3	Material	27
3.1	Chemikalien.....	27
3.2	Verbrauchsmaterialien	28
3.3	Geräte.....	29
3.4	Enzyme.....	31
3.5	Kits.....	31
3.6	Bakterienstamm	32
3.7	Molekulargewichtsmarker	32
3.8	cDNA-Bibliothek	32
3.9	Primer.....	33
3.10	Nährmedien und Lösungen	35
3.11	Lösungen für RNA-Arbeiten und Northern Blotting.....	37
3.12	Computerprogramme und <i>Online</i> -Dienste zur Datenauswertung	39
4	Methoden.....	41
4.1	Hälterung der Meeresschwämme	41
4.2	Inkubation der Schwämme mit Lipopolysacchariden.....	41

4.3	RNA-Präparation	42
4.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	42
4.3.2	Bestimmung der Reinheit von RNA.....	43
4.3.3	Bestimmung der Konzentration von RNA	43
4.4	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
4.4.1	Standard-PCR	45
4.4.2	Checking-PCR	47
4.4.3	Nested-PCR	47
4.4.4	Touchdown-PCR	47
4.4.5	Labeling-PCR	48
4.4.6	Herstellung genspezifischer Primer	48
4.4.7	Berechnung der Schmelztemperatur von PCR-Primern.....	49
4.5	Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	49
4.5.1	Aufreinigung durch die Ethanol-Präzipitationsmethode.....	49
4.5.2	Aufreinigung mittels Extraktions- und Reinigungs-Kits	50
4.5.3	Extraktion aus Agarosegelen	51
4.5.4	Extraktion und Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	51
4.6	Elektrophoretische Auftrennung und Detektion von Nukleinsäuren.....	52
4.6.1	Elektrophorese von DNA	52
4.6.2	Detektion von DNA in Agarosegelen.....	53
4.6.3	Elektrophorese von RNA	54
4.6.4	Detektion von RNA in Agarosegelen	55
4.7	T/A-Ligation	55
4.8	Checking-Restriktion	56
4.9	Transformation	57
4.9.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	57
4.9.2	Überprüfung der Transformationseffizienz	58
4.9.3	Selektion positiv-transformierter Klone	58
4.9.4	Herstellung von Selektionsplatten	59
4.9.5	Transformationsvorgang.....	59
4.10	Bakterienkultur.....	59
4.10.1	Ansetzen einer Suspensionskultur	59
4.10.2	Bestimmung der Zellzahl.....	60
4.10.3	Ansetzen einer Dauerkultur	60

4.11	DNA-Sequenzierung nach der Sanger-Methode	61
4.11.1	Vorbereitung des Polyacrylamidgels.....	62
4.11.2	Durchführung der Sequenzierreaktion.....	62
4.11.3	Denaturierung von PCR-Fragmenten.....	63
4.11.4	Durchführung der Sequenzier-Elektrophorese	63
4.12	Analyse differentieller Genexpression mittels Differential Display	64
4.12.1	Reverse Transkription	68
4.12.2	Modifizierte PCR-Amplifikation der cDNA	68
4.12.3	Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Transfer	69
4.12.4	Isolierung von cDNA-Banden nach Infrarot-Detektion.....	69
4.12.5	Reamplifikation isolierter DNA-Fragmente.....	70
4.13	Quantifizierung von RNA durch Northern Blotting.....	70
4.13.1	RNA-Transfer und UV-Fixierung	70
4.13.2	Prähybridisierung und Hybridisierung.....	71
4.13.3	Waschen der Membran und Detektion.....	71
4.14	Rechnergestützte Sequenzanalyse mit bioinformatischen Mitteln.....	72
4.14.1	Datenbankanalyse und Homologiesuche mit BLAST	72
4.14.2	Erstellung von Sequenz-Alignments.....	74
4.14.3	Erstellung phylogenetischer Stammbäume	75
4.15	Quantifizierung von Etherphospholipiden	76
4.15.1	Extraktion der Schwämme und Isolierung von lyso-PAF-Derivaten	76
4.15.2	Erstellung der Eichgeraden	77
4.15.3	Quantifizierung mittels LC-MS.....	77
5	Ergebnisse	78
5.1	Identifizierung differentieller Genexpression mittels Differential Display	78
5.2	Klonierung und Charakterisierung der Alkyl-DHAP-Synthase.....	83
5.2.1	Analyse der Nukleotidsequenz.....	83
5.2.2	Analyse der prädiktiven Proteinsequenz.....	86
5.2.3	Phylogenetischer Vergleich mit verwandten Genprodukten	90
5.3	Klonierung und Charakterisierung des Lissenzephalie 1-Gens	93
5.3.1	Analyse der Nukleotidsequenz.....	93
5.3.2	Analyse der prädiktiven Aminosäuresequenz	94
5.3.3	Phylogenetische Analyse mit verwandten Genprodukten.....	98

5.4	Quantifizierung von Transkriptionsraten durch Northern-Blotting-Analyse..	100
5.4.1	Transkriptionsrate des β -Tubulins	101
5.4.2	Transkriptionsrate der Alkyl-DHAP-Synthase	102
5.4.3	Transkriptionsrate des Lissenzephalie 1-Proteins	102
5.4.4	Transkriptionsrate des β -(1,3)-Glucan-Bindeproteins	103
5.5	Quantifizierung von Etherphospholipid-Derivaten in <i>S. domuncula</i>	105
5.5.1	Extraktion der Schwämme und Isolierung von lyso-PAF-Derivaten.....	106
5.5.2	Erstellung der Eichgeraden mittels FIA-MS	106
5.5.3	Quantifizierung mittels LC-MS.....	107
6	Diskussion	110
6.1	Bedeutung adaptiver Abwehrmechanismen für marine Invertebraten	110
6.2	Pharmakologisches Potential von lyso-Etherlipiden	111
6.3	Identifikation differentieller Genexpression durch Differential Display.....	113
6.4	Biosynthese von Etherphospholipiden.....	114
6.5	Reaktionsmechanismus der Schlüsselreaktion	118
6.6	Analyse der Alkyl-DHAP-Synthase aus <i>S. domuncula</i>	119
6.7	Funktion und Analyse des Lissenzephalie 1-Proteins	122
6.8	Analyse und Funktion des β -(1,3)-Glucan-Bindeproteins	125
7	Zusammenfassung.....	128
8	Ausblick.....	130
9	Abkürzungsverzeichnis.....	131
10	Literaturverzeichnis.....	135

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Naturstoffen in der Arzneimitteltherapie

Seit Jahrtausenden ist die Natur eine der wichtigsten Quellen pharmakologisch aktiver Substanzen, und etwa 40 % der heute weltweit eingesetzten Arzneimittel basieren auf Naturstoffen oder Naturstoff-Derivaten (Zeeck *et al.*, 2001). Auch wenn Fortschritte in den Bereichen der Gentechnologie, der kombinatorischen Chemie sowie des prädiktiven, computergestützten Wirkstoffdesigns weitreichende Möglichkeiten eröffnen, neue Arzneistoffe zu entwickeln, so ist das Potential dieser Methoden in aller Regel deutlich geringer als die außergewöhnlichen Syntheseleistungen biologischer Systeme. Die Natur produziert im Allgemeinen wirksame, verträgliche und gut bioverfügbare Substanzen, was sich in hoher Akzeptanz und guter Compliance naturstoffbasierender Arzneimittel widerspiegelt (Grabley und Thiericke, 1999). Darüber hinaus kann die Erforschung sowohl der Biosynthese von Naturstoffen als auch der molekularen Mechanismen ihrer Wirkungen dazu beitragen, neue pharmakologische Angriffspunkte aufzudecken, um dadurch innovative Wege in der Therapie von Krankheiten zu eröffnen.

1.2 Pflanzen, Mikroorganismen und marine Wirkstoffquellen

Historisch gesehen wurden vor allem Pflanzen sowie deren Drogen und Extrakte zur Behandlung von Krankheiten angewandt. Dies lag vor allem in der einfachen Zugänglichkeit pflanzlichen Materials begründet; das empirische Wissen um die Heilkräfte der Pflanzen wurde dabei über Generationen in der Lehre der Volksmedizin (Ethnopharmakologie) weitergegeben (Zeeck *et al.*, 2001). Anfang des 20. Jahrhunderts eröffnete sich dann mit der Entdeckung des Penicillins durch Alexander Fleming im Jahre 1929 ein neues Feld auf der Suche nach Arzneistoffen. Die Tatsache, dass von Mikroorganismen produzierte Substanzen in der Lage sind, das Wachstum anderer Mikroorganismen zu hemmen, war eine der bedeutsamsten Erkenntnisse der Medizin und gründete im Wesentlichen auf den Verbesserungen der Mikroskopiertechnik sowie den Erkenntnissen Robert Kochs. In der Folgezeit standen nun verstärkt terrestrische Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze im Mittelpunkt der Natur- und Wirkstoffforschung. Neben vielen Antibiotika konnte eine Vielzahl weiterer wichtiger Arzneistoffe wie Ciclosporin A oder Lovastatin in der Folgezeit aus ihnen isoliert werden. Die Entwicklung nahm ihren Lauf, als zu Beginn der fünfziger Jahre des

zwanzigsten Jahrhunderts plötzlich die Entdeckung außergewöhnlicher Nucleoside in dem Meeresschwamm *Cryptotethya crypta* (Bergmann und Feeney, 1951) das Augenmerk auf den marinen Lebensraum lenkte. Diese als Spongo-Thymidin und Spongo-Uridin bezeichneten Substanzen dienten als Leitsubstanzen für die spätere Entwicklung von Antimetaboliten, die heute bei Herpesvirus-Infektion (Ara-A; INN: Vidarabin) und bei akuter lymphatischer Leukämie (Ara-C; INN: Cytarabin) eingesetzt werden (Müller *et al.*, 1977a, 1977b; Chabot *et al.*, 1983). Verbunden mit der technischen Weiterentwicklung des Gerätetauchens ergaben sich Möglichkeiten, Organismen nun auch aus Wassertiefen zu sammeln, die vorher durch einfaches Schnorcheln nicht oder nur schwer erreichbar gewesen waren. Den maßgeblichen Impuls, die Biosphäre des Meeres eingehender nach potentiellen Wirkstoffen zu durchsuchen, gab jedoch erst 15 Jahre später die Entdeckung von Prostaglandinen in der Hornkoralle *Plexaura homomalla* im Jahr 1969 (Weinheimer und Spraggins, 1969).

Seither wurden mehr als 13.000 neue Substanzen aus verschiedenen marinen Lebensformen isoliert, und von jährlich etwa 800 neu entdeckten Substanzen gelangen viele wegen ihrer ausgeprägten Bioaktivität in die vorklinischen und klinischen Studien (Munro, 1999; Faulkner 2000a; 2000b; 2002; Proksch *et al.*, 2002).

Einen Überblick über einige, derzeit kurz vor der Markteinführung stehende und auf marinen Sekundärmetaboliten basierende Arzneistoffe, gibt die folgende Tabelle (nach Kube und Waller, 2003):

Wirkstoff	Anwendung	Entwicklungsstand (Klinische Phase)	Produzent
Didemnin B	Zytostatikum	II	<i>Trididemnum solidum</i> (Tunicata)
Ecteinasclidin 743 (ET 743)	Zytostatikum	II/III	<i>Ecteinasclidia turbinata</i> (Tunicata)
Ziconotide (ω -Contoxin)	Analgetikum	III	<i>Conus magnus</i> (Mollusca)
Bryostatin I	Zytostatikum	II	<i>Bugula neritina</i> (Bryozoa)

1.3 Bioaktive Substanzen aus Meeresschwämmen

Bereits im Altertum wusste man um die heilende Wirkung des Badeschwammes *Spongia officinalis*. Getrocknet, geröstet und zerrieben wurde er in verschiedenen galenischen Zubereitungen angewandt. Seine Indikationsgebiete waren neben Blutstillung und Wunddesinfektion vor allem die Behandlung des Iodmangelstrumas, was auf dem besonders hohen Gehalt an Iodid beruhte (Esper, 1794; Ebermeier, 1815; Richter, 1907).

Heute zählen unter den marinen Lebewesen die Schwämme zu einer der ergiebigsten Quellen für bioaktive Naturstoffe, da sie ein riesiges Arsenal an niedermolekularen, toxischen Sekundärmetaboliten synthetisieren, welche als chemische Abwehrstoffe pathogene Mikroorganismen oder Fraßfeinde (Predatoren) effektiv abwehren können. Die ökologische Funktion dieser, in ihrer Struktur oft ausserordentlich diversen Substanzen, stellt die Grundlage ihrer pharmakologischen Anwendbarkeit dar. Bisher konnten antimikrobielle, anthelmintische, antiinflammatorische, immunsuppressive, cytotoxische und antivirale Substanzen aus Schwämmen isoliert werden (Capon, 2001; Faulkner, 2002).

Die folgende Abbildung verdeutlicht, dass von allen im Jahr 2002 aus marinen Lebewesen isolierten und in ihrer Struktur aufgeklärten Substanzen mit 37 % die meisten aus Schwämmen gewonnen wurden (Blunt *et al.*, 2004; Abbildung 1):

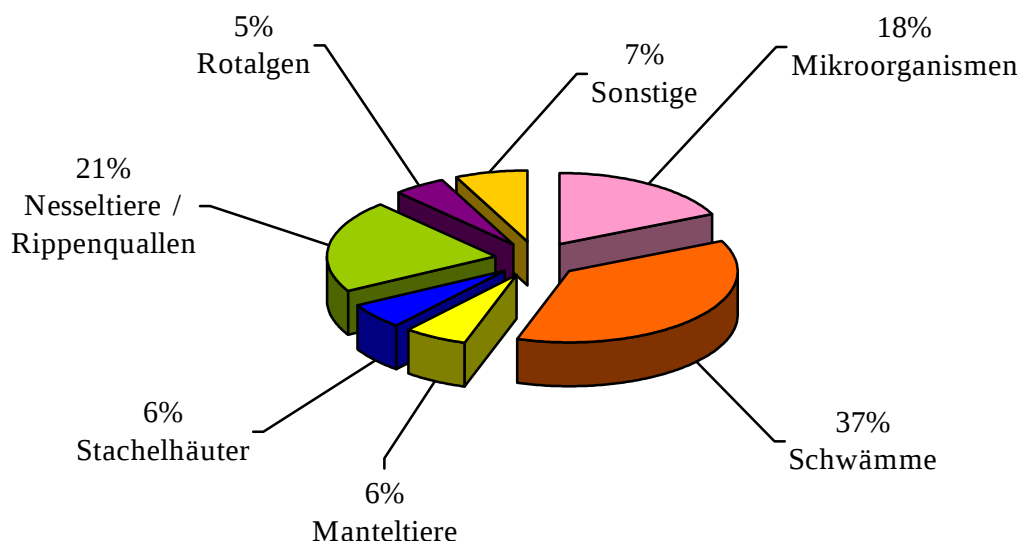


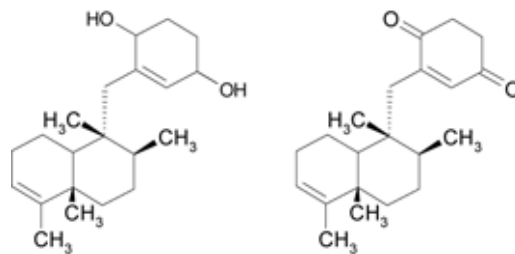
Abbildung 1: Verteilung der im Jahr 2002 neuentdeckten marinen Naturstoffe

Der mit „Sonstige“ bezeichnete Anteil setzt sich zu je 2 % aus Meeresschnecken, Grün- und Braunalgen sowie 1 % Moostierchen zusammen (verändert nach Blunt *et al.*, 2004)

Einige der repräsentativsten, pharmakologisch-relevanten Sekundärmetaboliten aus Meeresschwämmen werden im Folgenden näher beschrieben:

Avarol und Avaron

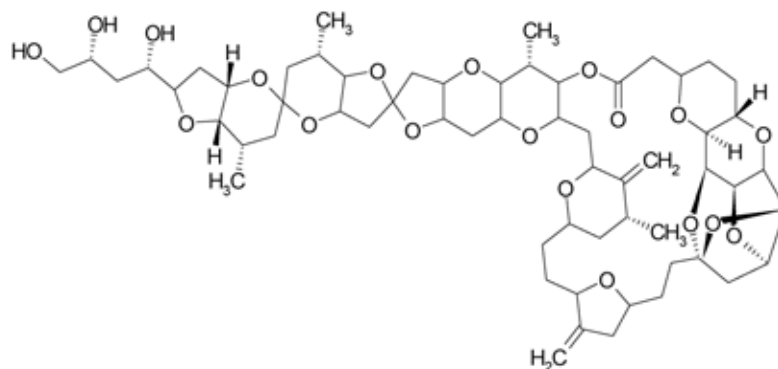
Aus dem Mittelmeerschwamm *Dysidea avara* stammen die Sesquiterpenderivate Avarol und seine Oxidationsform Avaron, welche die Hauptkomponenten eines Gemisches aus über 40 natürlichen Strukturanaloga darstellen. Neben cytotoxischer Wirkung konnte ihnen auch antivirale Aktivität nachgewiesen werden. So hemmen sie die Reverse Transkriptase des HI-Virus 1 (Müller *et al.*, 1987a; 1987b; Sarin *et al.*, 1987; Sarma *et al.*, 1993) und befinden sich derzeit als vielversprechende Anti-HIV-Wirkstoffe in der klinischen Prüfung (Sarma, 2004).



Avarol und Avaron

Halichondrin B

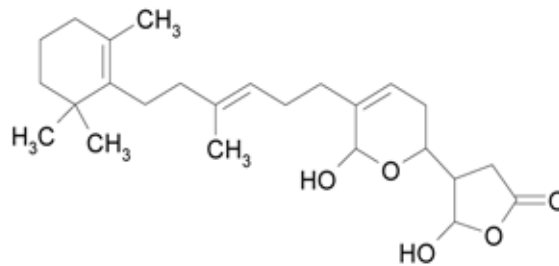
Das aus *Halichondria okadai* isolierte, makrozyklische Lacton Halichondrin B, befindet sich derzeit in der Phase II der klinischen Prüfung. Die Substanz soll einmal als antimitotischer Wirkstoff gegen Leukämie zum Einsatz kommen (Lambert und Burke, 2002).



Halichondrin B

Manoalid

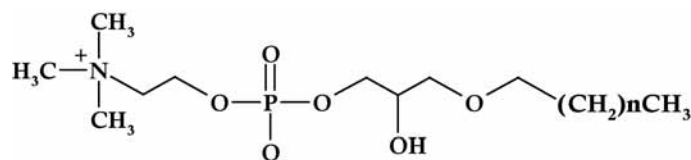
Ein antibakterieller, antiinflammatorischer und analgetischer Wirkstoff ist das Sesterterpenoid Manoalid, welches aus *Lufariella variabilis* stammt. Es wird derzeit in der ersten klinischen Prüfungsphase auf seine Wirkung am Menschen untersucht (da Silva und Scheurer, 1980; Glaser und Jacobs, 1986; Sim, 2001).



Manoalid

1.4 Etherphospholipide aus *Suberites domuncula*

Diese dem Lipidstoffwechsel entstammenden Etherphospholipide sind eng mit dem aus Säugetieren bekannten plättchenaktivierenden Faktor (PAF), einem Entzündungsmediator des septischen Schocks, verwandt. In dem für die vorliegende Arbeit verwendeten Schwamm *Suberites domuncula* wurden 1-O-Hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso-PAF I) und 1-O-Octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso-PAF II) in relativ hohen Konzentrationen von bis zu 4,5 mg pro Gramm Trockengewicht identifiziert (Abbildung 3). Für diese bioaktiven Sekundärmetaboliten wurden ausgeprägte antibakterielle Eigenschaften gegenüber gramnegativen und grampositiven Bakterien festgestellt (Steel *et al.*, 2002; Thakur *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte für lyso-PAF I auch eine neurotoxische Aktivität über eine Hemmung des Calcium-Influxes in foetale Rattenneuronen nachgewiesen werden (Schröder *et al.*, 2003).



lyso-PAF I (n = 14)

lyso-PAF II (n = 16)

Etherphospholipide aus *S. domuncula*

Auch in anderen Schwämmen wurden äußerst bioaktive lyso-Etherlipide identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass die aus dem Meeresschwamm *Spirastrella abata* isolierten lyso-PAF-Derivate die Cholesterolsynthese hemmen und cytotoxische Effekte gegenüber menschlichen Krebszell-Linien besitzen (Shin *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 2001).

1.5 Problematik der nachhaltigen Verfügbarkeit mariner Wirkstoffe

Ein großes Problem der Erforschung mariner Naturstoffe mit dem Ziel ihrer Vermarktung als Arzneimittel liegt darin, dass marine Rohstoffquellen oft nicht nachhaltig verfügbar sind. Werden für vorklinische und klinische Tests noch Gramm-Mengen einer bioaktiven Substanz benötigt, so muss nach erfolgreichem Abschluss der Untersuchungen nachweislich sichergestellt sein, dass die Reinsubstanz bei Marktreife in aller Regel in Kilogramm-Mengen zur Verfügung steht.

Dies ist oftmals nicht möglich und lässt sich eindrucksvoll an nachfolgendem Beispiel verdeutlichen: um wenige Hundert Milligramm einer Mischung aus Halichondrin B und Isohalochondrin für erste klinische Studien zu gewinnen, mussten 1 Tonne des Schwammes *Lissodendoryx spp.* gesammelt werden. Aus dem angenommenen Jahresbedarf von bis zu 5 kg für diese Substanzen hätten im Falle einer Zulassung jährlich bis zu 16.000 Tonnen der Tiere dem natürlichen Lebensraum entnommen werden müssen (Hart *et al.*, 2000). Zum einen hätte dies einen unvorhersehbaren Einfluss auf die benthische Lebensgemeinschaft gehabt, zum anderen wäre eine Versorgung mit Rohmaterial aus Wildbeständen durch Ernte ohnehin nicht realisierbar gewesen, da die Gesamtbiomasse dieses Schwammes weltweit nur auf etwa 300 Tonnen geschätzt wurde (Kube und Waller, 2003). Diese Problematik führte 1999 dazu, dass die zweite Phase der klinischen Studie unterbrochen werden musste, da nicht genügend Wirksubstanz zur Verfügung stand, um mit den Experimenten fortzufahren (Osinga *et al.*, 1999).

Alternativen zur Entnahme der Tiere aus ihrem natürlichen Habitat sind neben der chemischen Wirkstoffsynthese, die in vielen Fällen aufwendig oder unverhältnismäßig teuer ist, vor allem die Züchtung von Schwämmen in Marikulturen oder die Kultivierung von Schwammzellen in Bioreaktoren. Das Verlustrisiko durch eine hohe Anfälligkeit der Tiere gegenüber Pathogenen in offenen Kulturen (Battershill und Page, 1996) oder die Abgabe autotoxisch wirkender Sekundärmetabolite in geschlossene Systeme hinein, kann jedoch die Langzeithälterung gefährden (Osinga *et al.*, 1999).

Obwohl sich derzeit einige vielversprechende Substanzen bereits in klinischen Studien befinden (siehe Tabelle Seite 8), werden aufgrund der Knappheit der Ressourcen mit hoher Wahrscheinlichkeit nur wenige als Fertigarzneimittel zugelassen. Es ist davon auszugehen, dass sich die Nutzung dieser bioaktiven Sekundärmetaboliten dann auf eine Vermarktung in Kleinstmengen als molekulare Sonden für Forschungszwecke beschränken wird (Kube und Waller, 2003).

1.6 Die Rolle assoziierter Bakterien bei der Wirkstoffsynthese

Um Nahrung aufnehmen zu können, pumpen und filtrieren Schwämme je nach Filtrationsaktivität und Größe bis zu mehrere Tonnen Wasser pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag durch ihren Körper (Bergquist 1978; Westheide und Rieger, 1996). Dadurch gelangen große Mengen im Wasser enthaltener Bakterien in die Kanalsysteme und werden, sofern sie nicht als Nahrungsquelle dienen, temporär oder permanent in ihrem Wirt zurückgehalten (Vacelet und Donadey, 1977; Wilkinson, 1987, 1992; Santavy *et al.*, 1990). Etwa 40 % der Biomasse eines Schwammes kann so aus assoziierten Bakterien bestehen (Vacelet, 1975; Friedrich *et al.*, 1999). Da deren Bedeutung noch nicht vollständig verstanden ist, wird einerseits angenommen, dass assoziierte Bakterien der Ernährung und der Bereicherung des Nahrungsangebotes durch Stickstoff- oder Kohlenstofffixierung dienen (Wilkinson und Fay, 1979; Lee, 2001). Andererseits sind sie maßgeblich an der Biosynthese der aus Schwämmen extrahierbaren, pharmakologisch-relevanten Sekundärmetabolite beteiligt oder sogar die eigentlichen Produzenten (Proksch, 1994; Unson *et al.*, 1994; Bewley *et al.*, 1996). Diese biosynthetische Fremdbeteiligung spricht für die außergewöhnliche, strukturelle Diversität der aus Schwämmen isolierbaren Substanzen (Kobayashi und Ishibashi, 1993; Bewley und Faulkner, 1998; Proksch *et al.*, 2002).

Bei vielversprechenden, aus Schwämmen isolierten Substanzen, stellt sich deshalb immer die Frage nach dem eigentlichen Produzenten des begehrten Naturstoffs. Die Klärung der Frage, ob der Schwamm selbst oder ein assoziierter Bakterienstamm die biologische Syntheseleistung erbringt, kann im Vorfeld der Weiterentwicklung der betreffenden Substanz auf ihrem Weg zu kommerzieller Nutzung das weitere Vorgehen erleichtern. Gelänge es, eindeutig assoziierte Bakterien als Wirkstoffproduzenten zu identifizieren, so müssten Anstrengungen unternommen werden, diese isoliert zu kultivieren und zu züchten. Die gezielte Einzelfermentation eines symbiontischen Bakterienstammes

gestaltet sich jedoch oft problematisch, da das gewünschte Stoffwechselprodukt in vielen Fällen nur innerhalb der symbiontischen Lebensgemeinschaft in ausreichender Konzentration produziert wird (Zeeck, 2004; persönliche Mitteilung).

1.7 LPS-induzierte Reaktionen in Vertebraten und Invertebraten

Fremdstoffe oder lebende Krankheitskeime, die in einen Organismus eindringen, müssen rasch eliminiert werden, um bleibende Schäden zu vermeiden. Nach ihrer Erkennung durch den Wirt erfolgt deshalb die Initiierung von Abwehrreaktionen mit dem Ziel, eingedrungenes Fremdmaterial zu eliminieren.

Ein Molekül, welches in besonderer Weise entzündliche Abwehrreaktionen hervorzurufen vermag, ist das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS), dessen ausgelöste Reaktionen in Vertebraten gut charakterisiert sind. In den Körper des Menschen gelangtes LPS, beispielsweise durch eine Infektion mit gramnegativen Bakterien, induziert die Sekretion von Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) aus mononukleären Makrophagen. Einerseits fungieren diese inflammatorischen Zytokine als endogene Pyrogene, die in der Lage sind, Fieber hervorzurufen, andererseits führen sie zu einer Autoaktivierung der sie produzierenden Zellen, stimulieren die Proliferation und Differenzierung von B- und T-Lymphocyten und induzieren die Beteiligung von Gewebezellen und Zellen des Gefäßendothels an der Abwehrreaktion (Gemsa *et al.*, 1997). Die verstärkte Neusynthese und Freisetzung von Lipidmediatoren wie plättchenaktivierendem Faktor (PAF), Prostaglandinen und Leukotrienen verursacht die Auslösung einer Entzündung, die mit den 5 Kardinalsymptomen Schmerz (*dolor*), Rötung (*rubor*), lokale Erwärmung (*calor*), Schwellung (*tumor*) und Funktionsverlust (*functio laesia*) beschrieben werden kann. Sie stellt eine essentielle Abwehrreaktion gegenüber dem eingedrungenen Antigen dar (Forth *et al.*, 2001). Freigesetzte terminale Mediatoren wie Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (z.B. $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2 , NO) oder proinflammatorische Enzyme (z.B. Lysozym, Elastase und Kollagenase) helfen darüber hinaus, eingedrungene Bakterien wirkungsvoll abzutöten (Silverman und Ostro, 1997; Glauser *et al.*, 1991; Remick, 1995; Ulevitch und Tobias, 1995). Kommt es jedoch im Falle abwehrgeschwächter Patienten oder nach großen, operativen Eingriffen zu einer unkontrollierten Vermehrung gramnegativer Bakterien und einer bakteriellen Sepsis, so kann eine massive Freisetzung des Zellwandbestandteiles LPS zu einer ungezügelten Sekretion der genannten

Entzündungsmediatoren führen. Ein lebensgefährlicher septischer Schock, welcher als sehr schwer therapierbare Notfallsituation gefürchtet wird, ist die Folge (Rietschel *et al.*, 1996). Peripheres Kreislaufversagen, hypoxische Gewebeschädigung, Hyperaktivierung des intravasalen Gerinnungssystems sowie multiples Organversagen (*multiple organ dysfunction syndrome*) führen dann in den meisten Fällen zum Tode der betroffenen Patienten (Silverman und Ostro, 1997).

Im Gegensatz zu den beschriebenen Reaktionen in Vertebraten ist nur sehr wenig über die spezifischen Abwehrmechanismen in Invertebraten, insbesondere in Schwämmen nach einem Kontakt mit LPS, bekannt. Ursprünglich wurde angenommen, dass lediglich zelluläre Mechanismen wie Phagocytose und intrazelluläre Verdauung von mikrobiellen Krankheitserregern als Abwehrmöglichkeiten gegenüber Pathogenen existieren und dass eine Unterscheidung zwischen Nahrungsaufnahme und Elimination von Pathogenen bei Invertebraten nicht möglich sei (Gemsä *et al.*, 1997). Die Etablierung des Prophenoloxidase (pro-PO)-Aktivierungssystems als Mechanismus der Melanisierung stellte im Laufe der Evolution eine Weiterentwicklung der Pathogenabwehr dar. Eine Aktivierung dieser Reaktionskaskade wird dabei beispielsweise durch die Bindung von LPS an entsprechende Bindeproteine hervorgerufen; sowohl reaktive Intermediate der Melaninsynthese, wie Phenole oder Chinone, als auch das Endprodukt selbst besitzen dabei ausgeprägte antimikrobielle Aktivität (Johansson und Söderhäll, 1996). Auch eine Einkapselung des eingedrungenen Pathogens durch das gebildete Melanin kann beobachtet werden (Söderhäll und Cerenius, 1998). Auch übernehmen in Insekten und Krustaceen spezialisierte Zellen der Hämolymphe, die Hämocyten, die professionelle Phagocytose und Verdauung von Fremdpartikeln und Mikroorganismen (Gemsä *et al.*, 1997). Diese amöboid beweglichen Zellen erinnern in ihrer Morphologie bereits an mononukleäre Phagocyten der Vertebraten. Durch die Ausbildung mechanischer Schutzbarrieren wie Hüllen, Panzern oder Häuten wurden diese Arten der naturgemäß als primitiv zu bezeichnenden Abwehrmechanismen schließlich im Laufe der Evolution weiter ergänzt.

Speziell bei den Schwämmen gestaltet sich die Situation hinsichtlich der fehlenden Hämolymphe unterschiedlich, denn bisher wurden keine spezialisierten Hämocyten identifiziert. Dennoch konnten in den letzten Jahren einige Erkenntnisse über die Abwehrmechanismen dieser niedersten Metazoa gesammelt werden. Beispielsweise existieren Elemente des antimikrobiellen pro-PO-Aktivierungssystems sowie des

antiviralen 2',5'-Oligoadenylatsystems identifiziert (Müller *et al.*, 1999; Grebenjuk *et al.*, 2002). Auch sind Schwämme in der Lage, Bestandteile gramnegativer Bakterien zu erkennen und gezielt darauf zu reagieren. So erfolgt in *S. domuncula* nach Kontakt mit LPS eine Induktion des MAPK-Signaltransduktionsweges, was anhand der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) p38 sowie der *c-jun* N-terminalen Kinase (JNK) durch Phosphorylierung demonstriert wurde (Böhm *et al.*, 2001). Dieser Signalweg spielt eine besondere Rolle bei der Initiation immunologischer Abwehrreaktionen in Säugetieren und gilt als LPS-getriggerte Frühreaktion (Seger and Krebs, 1995; Ono und Han, 2000). Darüber hinaus wird in Schwämmen nach einem Kontakt mit hitzeinaktivierten, gramnegativen Bakterien (*E. coli*) der programmierte Zelltod (Apoptose) induziert (Wagner *et al.*, 1998). Diese Reaktion dient (z.B. in Pflanzen) der Verhinderung der Ausbreitung eines Pathogens, was auch für Schwämme angenommen wird.

1.8 Struktur und Erkennung von Lipopolysacchariden

Lipopolysaccharide (LPS) sind hochmolekulare, hitzestabile Molekülkomplexe und ein Hauptbestandteil der äußeren Zellwände gramnegativer Bakterien. Sie sind aus drei Teilstrukturen aufgebaut: dem Lipid A, der Kernregion und dem O-Antigen (Abbildung 2). Das Lipid A ist für die toxische Wirkung von LPS verantwortlich. Es besteht in aller Regel aus einem β -(1,6)-verknüpften D-Glucosamin-Disaccharid, an dessen freien OH- und NH-Gruppen eine unterschiedliche Anzahl von Fettsäuren mit variabler Kettenlänge zwischen 10 und 20 Kohlenstoffatomen sowie eine unterschiedliche Anzahl an Phosphatgruppen gebunden sein können (Glauser *et al.*, 1991; Ulevitch und Tobias, 1995; McCuskey *et al.*, 1996). Das Kernpolysaccharid, welches das endotoxische Potential von LPS modulieren kann, besteht aus Heptosen, Glucose, Galactose, N-Acetylglucosamin sowie der charakteristischen Zuckersäure 2-Keto-3-Desoxyoctonsäure (KDO). Über KDO ist die Lipid A-Teilstruktur mit der Kernregion verbunden. In das Umgebungsmedium ragt schließlich das O-Polysaccharid hinein. Es ist aus repetitiven Oligosaccharid-Einheiten aus vier oder fünf Monosacchariden aufgebaut und sowohl Galactose, Glucose, Rhamnose, Mannose sowie seltene Didesoxyzuckern wie Paratose oder Colitose sind die Bausteine dieses teilweise verzweigten Molekülteils (Rietschel *et al.*, 1986, 1987; Henderson 1996; Yang *et al.*, 1998). Bedingt durch seine enorme Variabilität kann dieser auch als O-Antigen bezeichnete Molekülteil zur Typisierung

bakterieller Serovaren (z.B. *Salmonella* spp.) herangezogen werden (Madigan *et al.*, 1997). Über den Lipidanteil ist der dreiteilige Lipopolysaccharid-Komplex in der äußeren Membran des Bakteriums verankert (Kayser *et al.*, 2001).

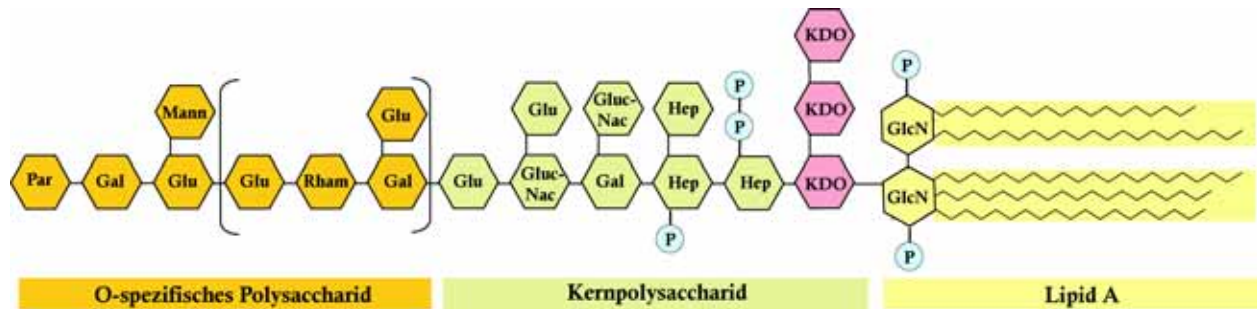


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lipopolysaccharid-Komplexes

Das hydrophobe Lipid A verankert den Komplex in der Zellmembran des Bakteriums. Diese Struktureinheit ist über KDO mit dem Kernpolysaccharid verbunden, dem das O-spezifische Polysaccharid folgt. Es setzt sich aus repetitiven Oligosaccharid-Einheiten zusammen und kann seltene Didesoxyzucker enthalten. (verändert nach Madigan *et al.*, 1997)

Lipopolysaccharide zählen neben Lipoproteinen, Peptidoglycanen, Lipoteichonsäure oder β -(1,3)-Glucan zu strukturell konservierten, pathogenassoziierten Molekülen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs). Hierunter versteht man Bestandteile pathogener Mikroorganismen, die nicht im Wirt vorkommen und deshalb von dessen Immunsystem als fremd erkannt werden; aufgrund der Erkennung werden spezifische Abwehrreaktionen initiiert (Henderson *et al.*, 1996; Medzhitov und Janeway, 1997a). In den Metazoa wird eine Erkennung von PAMPs sowohl durch membranständige als auch durch lösliche, sogenannte *pattern recognition*-Rezeptoren (PRRs), vermittelt (Medzhitov und Janeway, 1997b). Zu den LPS-spezifischen Erkennungsmolekülen der niederen Metazoa zählen beispielsweise LPS- und β -(1,3)-Glucan-Bindeproteine (LGBPs), wie sie im Flusskrebs *Pacifastacus leniusculus*, der Fliege *Drosophila melanogaster*, dem Seidenwurm *Bombyx mori*, dem Ringelwurm *Eisenia foetida*, oder der Krustazee *Penaeus stylirostris* identifiziert wurden (Bachman und McClay, 1996; Beschin *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000; Roux *et al.*, 2002). In höheren Organismen sind es vor allem das, sowohl in löslicher als auch in membranständiger Form vorkommende, *human leukocyte differentiation antigen* CD14 (Ulevitch und Tobias, 1994) sowie der zur Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren gehörige Toll-4-Rezeptor (Medzhitov *et al.*, 1997; Read and Wyllie, 2001; Schwartz, 2002).

Aufgrund einer mikrobiellen Infektion wird so sehr schnell durch Komplexierung eines PAMPs mit seinem PRR die unspezifische Immunabwehr des jeweiligen infizierten Organismus aktiviert. LGBPs aus Nematoden und Insekten werden in aller Regel nach einem Kontakt mit LPS sogar verstärkt exprimiert (Lee *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 1998; Roux *et al.*, 2002). Im Falle von Insekten, Ringelwürmern und Krustazeen resultiert die Produktion antibakterieller Peptide (Hoffmann *et al.*, 1998) und/oder die Aktivierung des pro-PO-Aktivierungssystems (Iwanaga *et al.*, 1994; Sritunyaluksana und Söderhäll, 2000). Da bisher weder CD14-homologe Protein noch Toll-ähnliche Rezeptoren in Meeresschwämmen identifiziert wurden, LGBPs von Invertebraten jedoch in vielen Fällen pleiotrope Bindefähigkeiten sowohl für β -(1,3)-Glucane in Pilzzellwänden als auch für LPS gramnegativer Bakterien besitzen, könnte das kürzlich in dem für die vorliegende Arbeit verwendeten Meeresschwamm *S. domuncula* identifizierte β -(1,3)-Glucan-Bindeprotein (Perovic-Ottstadt *et al.*, 2004) möglicherweise an der Erkennung von LPS sowie der Signaltransduktion des LPS-Stimulus beteiligt sein.

1.9 Identifizierung differentieller Genexpression durch Differential Display

Sequenzanalysen höherer Eukaryoten belegen, dass der größte Teil des Genoms aus nicht-proteincodierenden DNA-Sequenzen besteht. Diese als extragenisch bezeichneten Regionen können bis zu 95 % eines Genoms ausmachen. Sie werden häufig salopp als *junk*-DNA bezeichnet, da ihnen teilweise noch keine eindeutige Funktion nachgewiesen werden konnte. Ein Teil der verbliebenen Bereiche wiederum codiert für tRNA, rRNA, Histonproteine oder Haushaltsgene, so dass letztendlich zu einem gegebenen Zeitpunkt nur ein Bruchteil der genomischen DNA sichtbar differentiell exprimiert wird (Knippers, 2001; Lewin, 2002; Liang, 2002). Diese temporäre Variation der Genexpression steuert alle biologischen Lebensprozesse der Zellen wie Stoffwechsel, Entwicklung und Differenzierung, Alterung, Regulation des Zellzyklus oder programmierter Zelltod (Apoptose). Auch als Antwort auf veränderte Umweltbedingungen, Krankheit oder Infektion kann sich das Expressionsmuster von Genen verändern.

Molekularbiologische Methoden, die für die Identifizierung der an physiologischen und pathologischen Vorgängen in Zellen, Geweben und Organen beteiligten Genen eine Rolle spielen, sind deshalb von enormer Wichtigkeit für das Verständnis der molekularen Entstehungsmechanismen von Krankheiten. Um die Gesamtheit der in biologischen Proben vorhandenen Transkripte zu analysieren, wurden deshalb in den letzten 15

Jahren eine Reihe von Techniken, die diesem Zweck dienen, entwickelt. Einige Methoden wie die DNA-Microarrays beruhen dabei auf der Hybridisierung von DNA-Sonden an bereits bekannte Nukleotidsequenzen (Schena *et al.*, 1995; De Risi *et al.*, 1997), andere Methoden hingegen wie RDA (*representational difference analysis*), SAGE (*serial analysis of gene expression*) oder Differential Display sind Technologien, die auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) basieren (Velculesco *et al.*, 1995; Lisitsyn, 1993).

Um sowohl eine exogen als auch endogen verursachte Veränderung der Genexpression auf mRNA-Ebene sichtbar zu machen, wurde von P. Liang und A. B. Pardee (1992) die auch in der vorliegenden Arbeit erfolgreich angewandte Methode des Differential Display entwickelt. Als PCR-basierende Methode übertrifft sie in Anbetracht ihrer erfolgreichen Anwendung die Effektivität vieler anderer bekannter Methoden. So ergab eine im Jahr 2002 durchgeführte Recherche in der PubMed-Datenbank auf der NCBI-Webseite (www.ncbi.nlm.nih.gov) mit beschreibenden Schlüsselwörtern über 3800 Publikationen für Differential Display (Liang, 2002). In einer eigenen Datenbankanalyse im September 2004 wurden bereits über 5000 Einträge identifiziert (siehe Abbildung 3):

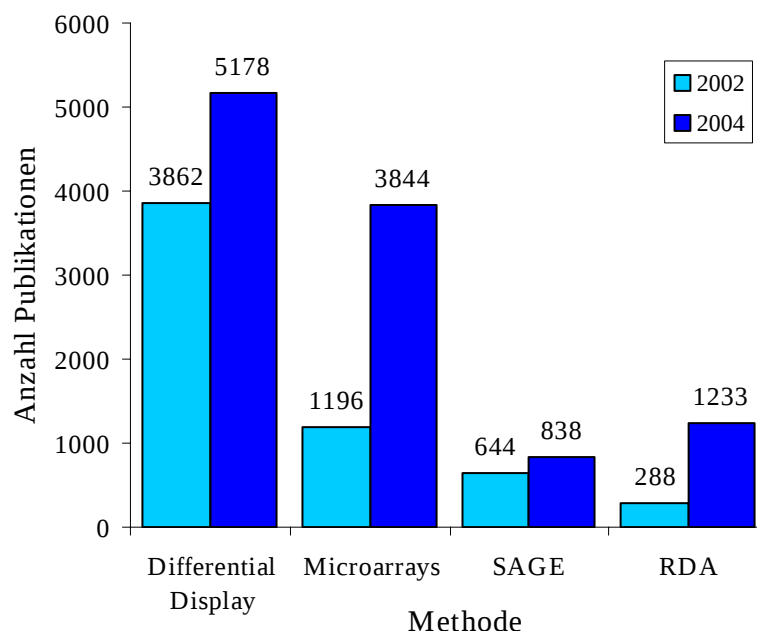


Abbildung 3: Methodenvergleich zur Identifizierung differentieller Genexpression

Die Graphik verdeutlicht, dass die Such-Resultate für Differential Display im Gegensatz zu den andere Methoden jeweils etwa doppelt so hoch waren. Somit zählt diese Methode zu den leistungsfähigsten und am weitesten verbreiteten, molekularbiologischen Techniken zur Identifizierung der differentiellen Genexpression in Eukaryoten.

1.10 Biologie der Schwämme

Schwämme (Porifera) gehören zu den ältesten vielzelligen Organismen des Tierreichs und entwickelten sich bereits in der erdgeschichtlich außerordentlich frühen Phase des Präkambriums. Während ihr phylogenetisches Alter bis vor kurzem aufgrund paläontologischer Daten auf etwa 550 Millionen Jahren geschätzt wurde, so datiert man aufgrund neuerer molekularbiologischer Untersuchungen heute das Alter dieser Tiergruppe auf einen Zeitpunkt, der etwa 250 Millionen Jahre davor liegt (Müller, 1995; Müller *et al.*, 1998). Schwämme unterscheiden sich von allen anderen Metazoa durch das Fehlen von Organen, Geweben und spezialisierten Zellen wie Muskelzellen, Blutgefäßen und Nervenzellen, weshalb sie lange Zeit nicht eindeutig einer taxonomischen Klasse zugeordnet werden konnten. Erst 1896 gelang dies E. Haeckel aufgrund ontogenetischer und histologischer Daten.

Etwa 8000 Arten sind bisher beschrieben worden, doch existiert möglicherweise eine etwa doppelt so große Anzahl bisher noch nicht beschriebener Spezies (Hooper und Van Soest, 2002). Während der Großteil der rezenten Arten im marinen Benthos siedelt, so ist nur ein kleiner Teil von etwa 2 % in limnischen Gewässern sesshaft (Westheide und Rieger, 1996).

Schwämme sind sessile, aquatische Tiere, die sowohl in lichtdurchfluteten Flachwasserbereichen als auch in lichtarmen Zonen sowie in großen Meerestiefen anzutreffen sind (Storch und Welsch, 1991; Göthel 1997). Ihre Größe reicht je nach Art von wenigen Millimetern bis zu mehreren Metern und sie zeigen neben aufrechtem, flaschenförmigem, verästeltem oder klumpigem auch krustenförmiges Wachstum. Neben unauffälligen Grau- oder Braunfärbungen besitzen sie oft eine auffallende Farbe, die von gelb über rot bis zu violett, blau oder grün reichen kann (siehe Abbildung 4):

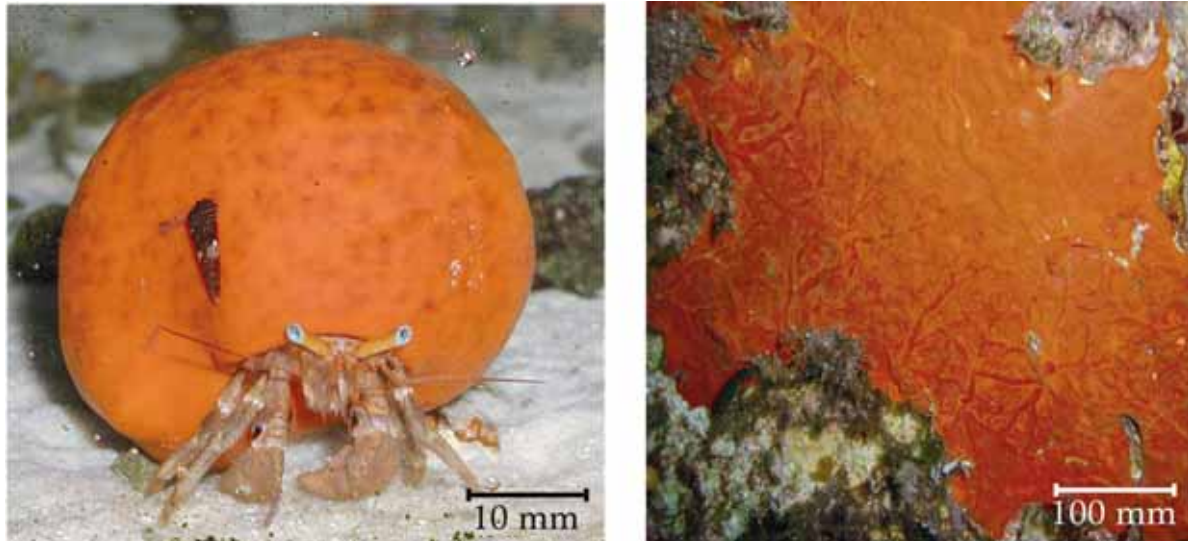


Abbildung 4: Vertreter der Porifera

Links ist der für die vorliegende Arbeit verwendete Meeresschwamm *Suberites domuncula* (Suberitidae, Demospongiae) abgebildet, der von Einsiedlerkrebsen (*Paguristes eretima*) bewohnte Schneckenhäuser besiedelt. Rechts ist der krustenbildende Mittelmeerschwamm *Spirastrella cunctatrix* (Spirastrellidae, Demospongiae) zu sehen, der in strömungsreichen Gebieten wenige Millimeter dicke, weiche Krusten bildet (Quelle: eigene Bilder).

Die lateinischen Begriffe *porus* (= Pore) und *ferre* (= tragen) kennzeichnen die Porifera als porentragende Organismen und deuten auf ihre Ernährungsweise hin. Sie erfolgt durch Filtration von Wasser und die Aufnahme der darin enthaltenen Nahrungsbestandteile. Choanocyten (Kragengeißelzellen, *collar cells*), welche teilweise in organähnlichen Choanocytenkammern organisiert sind, besitzen am Ende eine dünne Geißel, um deren Basis ringförmig bis zu 40 Mikrovilli angeordnet sind. Durch ihren koordinierten Geißelschlag, unterstützt durch die Meeresströmung, wird Wasser durch einführende Poren über ein weitläufiges, den Schwammkörper durchziehendes Kanalsystem eingestrudelt, wobei Nahrungsbestandteile wie Detritus, Bakterien, Algen oder Plankton am Saum aus Mikrovilli hängen bleiben. Nahrungspartikel werden anschließend vom Zellkörper des Choanozyten phagocytiert, intrazellulär verdaut und das mit Exkreten und CO₂ angereicherte Wasser anschließend über abführende Kanäle und größere Ausströmöffnungen (Osculae) ausgeleitet (Westheide und Rieger, 1997). So werden je nach Größe und Filtrationsaktivität im Laufe eines Tages bis zu 1000 Liter Wasser durch den Schwammkörper gestrudelt (Vogel, 1977; Thuron, 1997).

Je nach Komplexizität des Kanalsystems werden drei Arten der morphologischen Organisation unterschieden (Wehner und Gehring, 1996):

(1) bei dem am einfachsten aufgebauten Ascon-Typ ist die Körperwand von einfachen Kanälen durchbrochen und der Zentralraum gleicht einer überdimensionierten Geißelkammer (siehe Abbildung 5, links)

(2) bei der nächsthöheren Organisationsform, dem Sycon-Typ, stülpen sich von einem choanocytenfreien Zentralraum becherförmige Taschen (Radialtuben) aus, deren Wände mit Choanozyten ausgekleidet sind (siehe Abbildung 5, mitte)

(3) bei der komplexesten Organisationsform, dem Leucon-Typ, treten aus dem Zentralraum eine große Zahl von Kanälen aus, von denen wiederum zahlreiche mit Choanocyten ausgekleidete Geißelkammern abzweigen. Diese Filtrationskammern sind über ein Netz zu- und abführender Kanäle miteinander verbunden und enden schließlich in einem bis mehreren Osculae (siehe Abbildung 5, rechts).

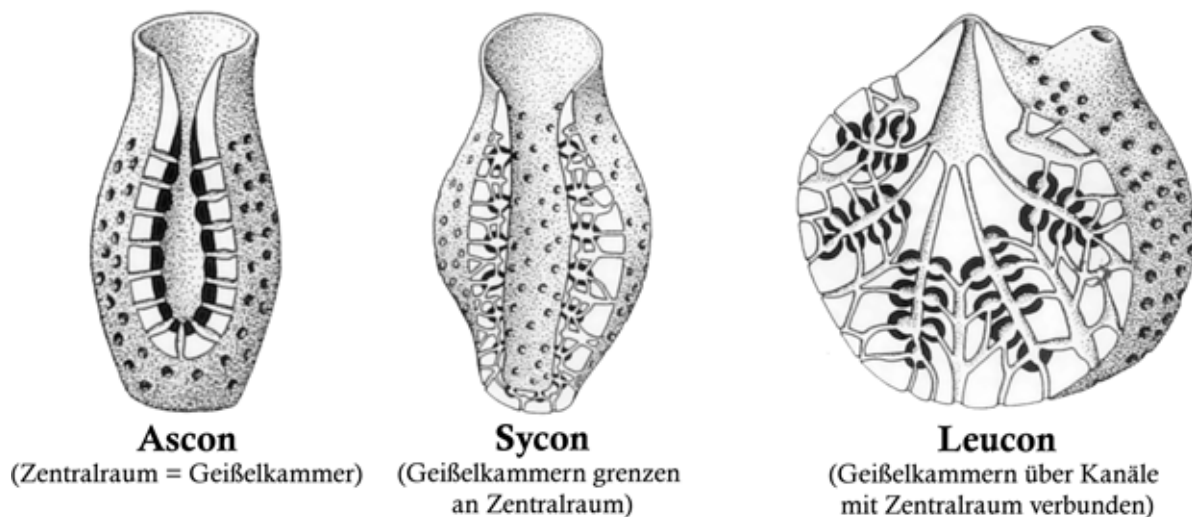


Abbildung 5: Morphologische Baupläne von Schwämmen

(verändert nach Wehner und Gehring, 1995)

Während die Choanocyten im epithelartigen Choanoderm, dem inneren Hohlraum des Schwammes (Spongocoel), lokalisiert sind, so bilden Pinacocyten eine den Schwamm nach außen abgrenzende Epithelschicht, das Pinacoderm. Zwischen Choanoderm und Pinacoderm liegt die bindegewebsartige extrazelluläre Matrix, welche auch als Mesohyl bezeichnet wird. Sie besteht aus einem Netz gequollener Proteoglycane sowie fibrillären Stützelementen wie Kollagenfasern, Chitin- und Cellulosederivaten, die dem Schwamm eine gewisse Zug- und Druckfestigkeit verleihen. In dieser Kollagen-Proteoglycan-Matrix eingebettet finden sich zahlreiche Zellen unterschiedlicher Morphologie und Funktion, deren Klassifikation und Genese noch nicht vollständig geklärt ist (Wehner und Gehring,

1995). Einige dieser Zellen, die Amöbocyten, sind amöboid beweglich, andere besitzen eine starke Umwandlungsfähigkeit (Archaeocyten) oder sezernieren die Stützelemente des Schwammskeletts (Sklerocyten). Dieses ist in aller Regel aus Hartkörpern (Spiculae) aufgebaut und besteht je nach Schwammart aus CaCO_3 (charakteristisch für Kalkschwämme/Calcarea) oder amorphem Polysilikat (charakteristisch für Hornschwämme/Demospongia und Kieselschwämme/Hexactinellida).

Werden in manchen Fällen keine Spiculae gebildet, so sorgt ein Gerüst aus Kollagenfibrillen für die nötige Festigkeit. So bedingt beispielsweise das elastische Gerüstkollagen Spongin des Badeschwammes *Spongia officinalis* dessen kosmetische Anwendung.

Der für die vorliegende Arbeit verwendete Schwamm ist der mediterrane Meeresschwamm *Suberites domuncula* (Einsiedler-Korkschwamm). Diese Spezies wächst auf Schalen bestimmter Molluskenarten (z.B. *Trunculariopsis trunculus*), welche von Einsiedlerkrebsen der Spezies *Paguristes eremita* (Augenfleck-Einsiedler) bewohnt werden (Göthel, 1997; siehe Abbildung 4). Es handelt sich hierbei um eine echte Symbiose, bei der beide Partner Vorteile genießen: während der Schwamm durch die Ernährungsweise des Einsiedlerkrebses ein erweitertes Nahrungsangebot erhält, so bietet als Gegenleistung der Schwamm dem Krebs Schutz, denn die von *S. domuncula* produzierten Giftstoffe vermögen auch die Fraßfeinde des Krebses abzuwehren.

1.11 Schwämme als Modellorganismen des Studiums biochemischer Abwehr

Schwämme erscheinen auf den ersten Blick aufgrund ihrer Morphologie zunächst als wehrlos, tatsächlich aber zählen sie zu den erfolgreichsten, vielzelligen Lebewesen unseres Planeten. Trotz ihrer weichen Körpergewebe, dem Fehlen morphologischer Abwehrmechanismen wie Zähnen, Krallen oder schützenden Gehäusen und der mangelnden Möglichkeit, bei Gefahr zu flüchten, existieren sie als „lebende Fossilien“ (Müller *et al.*, 1995). Schwämme zählen außerdem zu den am häufigsten anzutreffenden Lebewesen in allen marinen Lebensräumen. Im Laufe der Evolution haben sie sich optimal an ihre Lebensumgebung angepasst und ausgefeilte Abwehrstrategien entwickelt, um sich gegen eine Vielzahl von Predatoren, das Überwachsenwerden durch konkurrierende Riffbewohner, die Biofilmbildung, das Festsetzen von Epibionten-Larven

(*fowling*) oder den permanenten Kontakt mit großen Mengen im Meerwasser enthaltener, pathogener Mikroorganismen zu schützen.

Schwämme besitzen zum einen bioaktive Proteine, die eine Erkennung und Bekämpfung fremder Zellen bewerkstelligen, Schutz vor toxischen Sekundärmetaboliten anderer Meeresorganismen bieten oder Angreifer direkt unschädlich machen können (Müller und Schröder, 1997). Hierzu zählen beispielsweise Tachylektin, ein gegenüber *E. coli* und *S. aureus* wachstumshemmendes Protein, das Peptidoglycan-spaltende Lysozym (Muraminidase), welches in der Lage ist, den Mureinsack grampositiver Bakterien abzubauen (Thakur *et al.*, eingereicht) oder Tethya-Hämolysin, ein porenbildendes Protein, welches Poren von einem Durchmesser von 2-3 nm in Fremdzellen bildet und diese somit durch osmotisch bedingten Wassereinstrom zum Platzen bringt.

Zum anderen produzieren Schwämme ein riesiges Arsenal an niedermolekularen toxischen Abwehrstoffen. Diese „chemischen Kampfstoffe“ zeichnen sich neben ihrer außergewöhnlichen strukturellen Diversität oft durch eine besondere biologische Potenz aus, welche die Grundlage für ihre Anwendbarkeit als Arzneistoffe oder als Leitsubstanzen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe darstellt.

Diese Kombination der Abwehrmechanismen sicherte den Schwämmen das Überleben seit der Entstehung der Vielzelligkeit bis heute und macht sie zu interessanten Modellorganismen zur Untersuchung grundlegender Abwehrmechanismen der Metazoa. Des Weiteren kann das Studium der Porifera Aufschlüsse über den evolutionären Ursprung der Immunsysteme geben oder Hinweise auf bisher unbekannte Immunmechanismen des Menschen liefern.

2 Zielsetzung der Arbeit

Biologische Systeme wie Pflanzen, Mikroorganismen oder marine Lebewesen produzieren eine Vielzahl bioaktiver Sekundärmetabolite, um ihre individuelle Integrität und den Fortbestand der eigenen Art zu gewährleisten. Von den marinen Organismen sind es besonders die Schwämme, aus denen eine große Zahl potenter Wirkstoffe isoliert werden kann. Deshalb stellen gerade diese einen riesigen Fundus für pharmakologisch-aktive Substanzen dar, die ein hohes Potential besitzen als Arzneimittel an Mensch und Tier angewendet zu werden. Die Frage, warum gerade diese ursprünglichsten der vielzelligen Tiere so außergewöhnlich reich an cytotoxischen und antimikrobiellen Substanzen sind, ist nicht einfach zu beantworten. Ein Erklärungsansatz könnte jedoch ihr phylogenetisches Alter sein: seit ihrer Entstehung im Präkambrium standen sie unter einem enormen evolutionären Druck, in Wechselwirkung mit einer Vielzahl an Raum- und Nahrungskonkurrenten ausgeklügelte und in hohem Maße angepaßte Strategien für das Überleben zu entwickeln. Bisher war jedoch nicht eindeutig geklärt, inwiefern Schwämme in der Lage sind, Bestandteile pathogener Mikroorganismen zu erkennen oder ob sie aufgrund einer bakteriellen Infektion mit der adaptiven Steigerung der Produktion toxischer Sekundärmetabolite zu reagieren vermögen. Lediglich die gesteigerte Synthese der neurotoxischen Substanz Quinolinsäure, aufgrund eines Kontaktes mit 2,2'-Dipyridyl nach Hochregulation des biosynthetischen Schlüsselenzyms 3-Hydroxyanthranilat-3,4- Dioxygenase (Schröder *et al.*, 2002), existierte als Hinweis auf die Fähigkeit, angepasst auf ungünstige Umweltbedingungen zu reagieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob und inwiefern Schwämme in der Lage sind, auf definierte bakterielle Pathogene adaptiv zu reagieren. Hierzu wurde der Schwamm *Suberites domuncula* mit der antigenen Modellsubstanz Lipopolysaccharid (LPS) als einer der stärksten Induktoren der Pathogenabwehr, sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten, konfrontiert. Der Status der Abwehrreaktion sollte zunächst anhand der durch das Endotoxin ausgelösten differentiellen Genexpression dargestellt werden. Auf der Basis einer Analyse des funktionellen Transkriptoms durch Anwendung der Differential Display-Methode, sollten anschließend solche Gene näher untersucht werden, die mit einem biochemischen Mechanismus im Sinne der antibakteriellen Abwehr in Verbindung gebracht werden

konnten. Eine mögliche Variation der Genexpression sollte darüber hinaus durch Anwendung der Methode des Northern-Blotting auch quantitativ determiniert werden. Des Weiteren sollten nähere Erkenntnisse über die molekularen Erkennungsmechanismen des Schwammes gegenüber LPS erhalten und die Rolle des aus *S. domuncula* klonierten β -(1,3)-Glucan-Bindproteins diskutiert werden.

3 Material

3.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von den folgenden Firmen bezogen:

Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Hess.Oldendorf
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Anti-DIG-Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Blockierungs-Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Butanol für Extraktion	Carlo Erba, Mailand, ITA
5-Brom-4-chlor-indolyl- β -D-galactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
<i>CDP Star</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloroform für Extraktion	Carlo Erba, Mailand
<i>DIG Easy Hyb</i> Hybridisierungspuffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
dNTP-Mix	MB Enzymes, Münster
Essigsäure, konzentriert	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	Roth, Karlsruhe
Flüssigstickstoff	Linde, Wiesbaden
Formamid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe

Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
LiChroprep RP-18 (40-63 µm)	Merck Darmstadt
Magnesiumchlorid · 7 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat · 7 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Methanol für Extraktion	Carlo Erba, Mailand
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
<i>Repel Silan ES</i>	Pharmacia Biotech, Uppsala
<i>RNase Away</i>	MolecularBioProducts, San Diego
RNase Inhibitor	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Röntgenfilmentwickler LX24	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilmfixierer AL4	Kodak, Stuttgart
Salzsäure, konzentriert	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure, konzentriert	Roth, Karlsruhe
<i>Sequagel XR</i>	National Diagnostics, Atlanta
<i>Sequagel complete</i>	National Diagnostics, Atlanta
<i>SYBR green I</i> -Reagenz	Molecular Probes, Eugene, USA
<i>SYBR green II</i> -Reagenz	Molecular Probes, Eugene, USA
Toluidinblau	Sigma, Deisenhofen
tRNA von <i>E. coli</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>TRIzol</i> Reagenz	Gibco, Eggenstein

3.2 Verbrauchsmaterialien

DC-Platten (20 x 20; Kieselgel 60 F ₂₅₄)	Merck Darmstadt
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
Falcon-Reaktionsgefäße	Becton und Dickinson, NJ, USA
Filmkassette Hypercassette RPN 1643	Amersham, Freiburg

Filterpapier für Nukleinsäuretransfer	Roth, Karlsruhe
Latexhandschuhe	NS Unigloves, Serembau, Malaysia
Millimeterpapier (Ref. No. 662 582)	Schleicher und Schuell, Dassel
Mörser	Bender und Hohlbein, Bruchsal
Nylonmembran Hybond N ⁺	Amersham, Freiburg
Nitrilhandschuhe Rotiprotect	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße für PCR	Advanced Biotechnologies, Surrey, GB
Parafilm M	AmNatCan, Greenwich, USA
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pistill	Haldenwanger, Berlin
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,7 ml	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Röntgenfilm Fuji RX New	Bechthold, Kelkheim
Sterilfilter (0,20 µm)	Schleicher und Schuell, Dassel
Sterilfilter (0,45 µm)	Milipore, Bedford, USA
Videoprinterpapier	Rothhaar und Schröder, Heidelberg
Whatman 3MM-Papier	Whatman, über Fischer, Frankfurt

3.3 Geräte

Brutschrank BE 400	Memmert, Schwalbach
DNA-Sequenzierer Licor 4200	Licor über MWG Biotech, Ebersberg
Durchsicht-Lichtplatte	Desaga, Heidelberg
Elektrophoresekammer	Biorad, München
Geltrockner	Biorad, München
Geldokumentationssystem	UVP, Cambridge, GB
Geldokumentationssystem Gel Doc	BioRad, München
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Heizblock Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg

Hybridisierungsöfen HySt 1	Sauer, Reutlingen
Schüttelinkubator Certomat H	Braun, Melsungen
Schüttelinkubator Certomat R	Braun, Melsungen
Infrarot-Detektor Licor <i>Odyssey</i>	Licor über MWG Biotech, Ebersberg
Kolbenhubpipetten Pipetman	Gilson, Villieres-LeBel, F
Kolbenhubpipetten Research	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer Ikamag RCT MR 2002	IKA Labortechnik, Staufen
PH-Meter pH 330 Set 2	WTW, Weilheim
Spektralphotometer DU 64	Beckmann, München
Stromversorgungsgerät 200/2.0	Biorad, München
Stromversorgungsgerät Powerpac 200	Biorad, München
Sterilbank	Slee, Mainz
Thermocycler Hybaid Touchdown	Hybaid/ AGS, Heidelberg
Thermocycler Perkin Elmer Geneamp 9600	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler <i>Primus</i> 96+	MWG Ebersberg
Thermocycler <i>i-cycler</i>	Byroad, München
Thermocycler <i>MyCycler</i>	Biorad, München
RNA-Crosslinker Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Rotationsverdampfer R114, R 111	Büchi, Flawil, CH
Rotationsverdampfer Laborota 4000	Heidolph, Schwabach
Ultraschall-Homogenisator	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Vakuumpumpe 10324	Virtis Gardiner, NYC, USA
Vortexer	Heidolph, Kelheim
Waage PT 120	Sartorius, Göttingen
Waage R6	Mettler-Spoerhase, Gießen
Wasserbad 3047	Köttermann, Uetze-Hängingen
Wasserbad 2219 Multitemp II	LKB Bromma, Upsala, SWE
Zentrifuge <i>Biofuge fresco</i>	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge HF 120	Tomy Seiko, Tokyo, Nippon
Zentrifuge <i>Sorvall</i> RC 5B	Du Pont, Bad Nauheim

3.4 Enzyme

Biotherm DNA-Polymerase	Genecraft, Münster
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
MMLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Restriktionsendonuklease <i>Sph</i> I	Promega, Mannheim
Restriktionsendonuklease <i>Spe</i> I	Promega, Mannheim

3.5 Kits

Kits für die Aufreinigung von DNA

<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>NucleoSpin Extract DNA PCR clean up</i>	Macherey und Nagel, Düren

Kits für die Aufreinigung von Plasmid-DNA

<i>High Pure Plasmid Isolation Kit</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>NucleoSpin Plasmid DNA purification</i>	Macherey und Nagel, Düren

Kit für die Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden

<i>PCR DIG Probe Synthesis Kit</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
------------------------------------	-----------------------------

Vektorsystem

<i>pGEM- T Vector System I</i>	Promega, Mannheim
--------------------------------	-------------------

Kit für die DNA-Sequenzierung

<i>Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-GTP</i>	Amersham, Freiburg
--	--------------------

3.6 Bakterienstamm

Es wurde der folgende *E. coli*-Stamm von Stratagene (Amsterdam, NL) verwendet:

XL1-Blue MRF'

Genotyp: (mcrA)183 (mcrCBhdsSMRmrr)173 endA1 supE44 thi1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]

3.7 Molekulargewichtsmarker

DNA- Molekulargewichtsmarker (MBI Fermentas, St Leon-Roth)

Generuler 1kb DNA Ladder

(Fragmente der Längen: 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 Basenpaare)

Generuler 1kB DNA Ladder plus

(Fragmente der Längen 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031, 1200, 1500, 2000, 3000 Basenpaare)

DIG-gelabelte RNA-Molekulargewichtsmarker (Roche Diagnostics, Mannheim)

RNA-Molekulargewichtsmarker I

(Fragmente der Längen: 310, 438, 575, 1049, 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 Nukleotide)

RNA-Molekulargewichtsmarker II

(Fragmente der Längen: 1517, 1821, 2661, 4742, 6948 Nukleotide)

RNA-Molekulargewichtsmarker III

(Fragmente der Längen: 310, 438, 575, 1049, 1517 Nukleotide)

3.8 cDNA-Bibliothek

Die verwendete *S. domuncula*-cDNA-Bibliothek (λ ZAP Express) wurde durch Herrn Dr. M. Kruse und Herrn Dr. J. Seack im Arbeitskreis Prof. W. E. G. Müller im Institut für Physiologische Chemie der Universität Mainz hergestellt.

3.9 Primer

Die Synthese der hier verwendeten Primer wurde ausschließlich durch die Firma MWG Biotech in Ebersberg vorgenommen.

Ankerprimer für das Differential Display

T₁₁GN-Mix

```

5' TTTTTTTTTTTTGG3'
5' TTTTTTTTTTTTGA3'
5' TTTTTTTTTTTTGT3'
5' TTTTTTTTTTTTGC3'

```

T₁₁CN-Mix

```

5' TTTTTTTTTTTTCG3'
5' TTTTTTTTTTTTCA3'
5' TTTTTTTTTTTTCT3'
5' TTTTTTTTTTTTCC3'

```

T₁₁AN-Mix

```

5' TTTTTTTTTTTTAG3'
5' TTTTTTTTTTTTAA3'
5' TTTTTTTTTTTTAT3'
5' TTTTTTTTTTTTAC3'

```

Arbiträrprimer für das Differential Display

Arbiträrprimer 1: 5' CTTGATTGCC^{3'}
 Arbiträrprimer 2: 5' GTGATCGCAG^{3'}
 Arbiträrprimer 3: 5' GTAAGCGATG^{3'}

Vektorprimer für pGEM-T

T7: 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG^{3'} T_m = 56°C
 SP6: 5' TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C^{3'} T_m = 60°C
 M13(20): 5' GTA AAA CGA CGG CCA GT^{3'} T_m = 59 °C

Vektorprimer für pBK-CMV

BK: 5' ACA GGA AAC AGC TAT GAC CTT G^{3'} T_m = 64°C
 BK CMV: 5' GGT CTA TAT AAG CAG AGC TGG T^{3'} T_m = 64°C
 M13(20): 5' GTA AAA CGA CGG CCA GT^{3'} T_m = 59 °C
 T3: 5' CGG AAT TAA CCC TCA CTA AAG^{3'} T_m = 60°C
 T7: 5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C^{3'} T_m = 64°C

Sequenzierprimer (IRD₈₀₀- und IRD₇₀₀-markiert)

T3:	5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'	T _m = 56°C
T7:	5' GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG 3'	T _m = 56°C
SP6:	5' TTT AGG TGA CAC TAT AGA ATA C 3'	T _m = 56°C

Primer für die Alkyl-DHAP-Synthase (SDADS)

ADS Fwd:	5' CTG CAC TCA GAC ATG ACA T ³	T _m = 54,5°C
ADS Rev1:	5' GTT ATG TGG ATC AAT GCG ATC T ³	T _m = 58,7°C
ADS Rev2:	5' CTC TCA GCA TCT CCA CTC CA ³	T _m = 59,4°C

Primer für die β-Untereinheit der PAF-Acetylhydrolase I (LIS1)

LIS1 Fwd1:	5' CAG AGA CAA GAC CAT CAA GCT ³	T _m = 57,9°C
LIS1 Fwd2:	5' GCA CTC ACA GGA GTC TGT ³	T _m = 56,0°C
LIS1 Rev1:	5' GAC ATG TCT GCT GAG CAT ³	T _m = 53,7°C
LIS1 Rev2:	5' CAG TGT GAT CGA ATG CCA AGT ³	T _m = 57,9°C

Primer für die Digoxigenin-markierte Tubulin-Sonde

Tubulin Fwd:	5' GGA AGT CAT CTC AGA CGA A ³	T _m = 53°C
Tubulin Rev:	5' GGA TAT TCT TCA CGG ATC T ³	T _m = 50,9°C

Primer für die Digoxigenin-markierte SDADS-Sonde

ADS probe Fwd:	5' CAG AGT GCG GAG AGA ATG T ³	T _m = 56,7°C
ADS probe Rev:	5' CCA TAC ACA TCC TTC TTC AT ³	T _m = 53,3°C

Primer für die Digoxigenin-markierte SDLIS1-Sonde

LIS1 probe Fwd:	5' GGA TTA TGA GAC TGG AGA CT ³	T _m = 55,3°C
LIS1 probe Rev:	5' CCA CAT GCC TCT GCG ATA T ³	T _m = 56,7°C

Primer für die Digoxigenin-markierte SDGLUBP-Sonde

SDGLUBP Fwd:	5' GCA GCA GCA GGA GTT ATT	T _m = 53,4°C
SDGLUBP Rev :	5' GCC AAG AGC AAG ACTT ³	T _m = 52°C

3.10 Nährmedien und Lösungen

Alle wässrigen Lösungen wurden mit sterilisiertem *Aqua bidest.* hergestellt.

Ammoniumacetat-Lösung (7,5 M)

57,81 g Ammoniumacetat wurden in etwa 45 ml Wasser in sterilem Gefäß gelöst und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Die klare Lösung wurde durch einen 0,22 µm Sterilfilter filtriert. Die Lösung darf nicht erhitzt oder autoklaviert werden, da Ammoniumacetat zerfällt!

Ampicillin-Stammlösung (50 mg ml⁻¹)

5 g Ampicillin wurden in 5 ml Wasser gelöst, sterilfiltriert, zu je 1ml aliquotiert und bei 20°C gelagert

dNTP-Mix (100mM)

Jeweils 100 mmol/l dATP, dCTP, dGTP und dTTP wurden in PCR-Wasser gelöst und bei –20°C aufbewahrt

dNTP-Mix (5 mM)

Der dNTP-Mix (100mM) wurde 1/20 mit PCR-Wasser verdünnen und bei –20°C aufbewahrt

Ethidiumbromid-Lösung (2 µg ml⁻¹)

Ethidiumbromid-Stammlösung 0,5 mg/ml wurde mit Wasser auf eine Endkonzentration von 2 µg/ml verdünnt

IPTG-Stammlösung (100 mM)

100 mM Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG) wurden in Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert

Luria Bertani (LB)-Medium

10 g Caseinhydrolysat, 5 g Natriumchlorid und 5 g Hefeextrakt wurden in 1 Liter gereinigtem Wasser gelöst, der pH-Wert auf pH 7,5 eingestellt und autoklavieren

Luria Bertani (LB)-Agar

1,5 % (m/v) Agar-Agar wurden in LB-Medium eingerührt und autoklaviert

Natriumacetatlösung (3M)

18,46 g Natriumacetat wurden in 75 ml autoklaviertem Wasser gelöst und mit Eisessig der pH auf 5,5 eingestellt. Die Lösung wurde zu 100 ml mit Wasser aufgefüllt und autoklaviert

PCR-Puffer (10fach)

100 mmol/l Tris-HCl (pH 8,5), 15 mmol/l MgCl_2 , 500 mmol/l KCl und 1 mg ml^{-1} Gelatine wurden in Wasser gelöst

Sequenzier-Probepuffer

95 % (V/V) Formamid, 0,1 % (m/V) Xylencyanol, 0,1 % (m/V) Bromphenolblau und 10 mM EDTA wurden in Wasser gelöst

Transformationsmedium A

10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ und 0,2 g Glucose wurden mit sterilem LB-Medium auf 100 ml aufgefüllt

Transformationsmedium B

36 ml Glycerin und 12 ml Polyethylenglycol (PEG) 7500 wurden mit LB-Medium zu 100 ml aufgefüllt und sterilfiltriert

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50-fach)

1,99 M Tris wurde in 1 l Wasser gelöst, 57,1 ml Eisessig und EDTA-Lösung hinzupipettieren und auf pH = 8,0 eingestellt

TAE-Puffer (1-fach)

50-facher TAE-Puffer wurde mit Wasser verdünnt und der pH-Wert überprüft

Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10-fach)

0,89 M Tris Base, 0,89 M Borsäure und Dinatrium-EDTA $\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ wurden in Wasser gelöst und auf pH = 8,3 eingestellt

TBE-Puffer (0,8-fach)

10-facher TBE-Puffer wurden mit Wasser verdünnt und der pH-Wert überprüft

TBE-Puffer (1,2fach)

10-facher TBE-Puffer mit Wasser verdünnt und der pH-Wert überprüft

X-Gal-Stammlösung (20%)

1 g X-Gal wurde in 5 ml Dimethylformamid gelöst, zu 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert

3.11 Lösungen für RNA-Arbeiten und Northern Blotting

SYBR green II RNA-Färbelösung Lösung 1 : 5000

4 µl Reagenz wurden in 20 ml 1-fachem TBE-Puffer verdünnt

Blockierungslösung (5-fach)

5 g Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics) wurde in 100 ml DEPC-behandeltem 1-fachen P1-Puffer unter Erhitzen auf 60°C und Rühren gelöst

Blockierungslösung (1-fach)

5-fache Blockierungslösung wurde mit 1-fachem P1-Puffer verdünnt

Formaldehyd (deionisiert)

Formaldehyd wurde mit 5 % Ionenaustauscher (m/V) 30 min. gerührt und abfiltriert

Formamid (deionisiert)

Formamid wurde mit 5 % Ionenaustauscher (m/V) 30 min. gerührt und abfiltriert

[3-(N-morpholino)-Propansulfonsäure] (MOPS)-Puffer (10-fach)

0,2 M [3-(N-morpholino)-Propansulfonsäure], 0,5 M wasserfreies Natriumacetat und 0,01 M Dinatrium-EDTA · 2 H₂O wurden in DEPC-behandeltem Wasser gelöst und auf pH = 7 eingestellt

MOPS-Puffer (1-fach)

10-facher MOPS-Puffer wurde mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 2 %-ig (m/V)

2 g Natriumdodecylsulfat wurde in 100 ml Wasser gelöst und auf pH = 7,2 eingestellt

Natriumchlorid-Natriumcitrat (SSC)-Puffer (20-fach)

3 M NaCl und 0,3 M Trinatriumcitrat · 2 H₂O wurden in gereinigtem Wasser gelöst, auf pH = 7 eingestellt, mit DEPC behandelt und autoklaviert

RNA-Ladepuffer

250 µl deionisiertes Formamid, 83 µl Formaldehyd (37% V/V), 50 µl 10-facher MOPS-Puffer, 50 µl Glycerol (99% V/V) und 15 mg Bromphenolblau wurden in DEPC-behandeltem Wasser gelöst und auf ein Endvolumen von 500 µl ergänzt

RNA-Agarosegel 1,5% (für 50 ml)

0,75 g Agarose wurden in 42,5 ml DEPC-behandeltem Wasser unter Erhitzen gelöst und nach dem Abkühlen auf etwa 60°C 5 ml MOPS-Puffer (10-fach) und 2,5 ml Formaldehyd (37% V/V) hinzupipettiert

P1-Puffer (5-fach)

0,5 M Maleinsäure und 0,75 M NaCl wurden in DEPC-behandeltem Wasser gelöst und mit festem NaOH auf pH = 7,5 eingestellt

P1-Puffer (1-fach)

5-facher P1-Puffer wurde mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und der pH-Wert kontrolliert, ggf. auf pH = 7,5 eingestellt

P3-Puffer (5-fach)

0,5 M Tris und 0,5 M NaCl wurden in DEPC-behandeltem Wasser gelöst und mit HCl auf pH = 9,5 eingestellt

P3-Puffer (1-fach)

5-facher P3-Puffer wurde mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt, der pH-Wert kontrolliert und ggf. auf pH = 9,5 eingestellt

SSC-Puffer + 0,1% SDS (2-fach)

20-facher SSC-Puffer wurde mit gereinigtem Wasser auf 2-fache Konzentration verdünnt, 0,1 % SDS darin gelöst, mit DEPC behandelt und autoklaviert

SSC-Puffer + 0,1% SDS (0,2-fach)

20-facher SSC-Puffer wurde mit gereinigtem Wasser auf 0,2-fache Konzentration verdünnt, darin 0,1 % SDS gelöst, mit DEPC behandelt und autoklaviert

Methanolische Toluidinblaulösung (100-fach)

1 % (m/V) Toluidinblau wurden in Methanol 40% (V/V) gelöst

Toluidinblau-Lösung (1-fach)

100-fache, methanolische Toluidinblaulösung wurde 1 : 100 mit gereinigtem Wasser verdünnt

3.12 Computerprogramme und Online-Dienste zur Datenauswertung

Analyse und graphische Umsetzung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

CLUSTALX 1.83 (Thompson et al., 1997)

Freeware über <ftp://ftpigbmc.ustrasbg.fr/pub/ClustalX>

GENEDOC 2.6.02 (NICHOLAS und NICHOLAS, 1997)

Freeware über <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>

LASERGENE 99 (DNASStar)

inklusive Edit Seq 4.01, Seq ManII 4.02 , Map Draw 4.01, Primer Select 4.01

TREEVIEW 1.6.6 (©Page, 2001)

Freeware über <http://zoology.taxonomy.gla.ac.uk/rod/rod.html>

Online-Sequenzvergleiche mit Nukleotid-Datenbanken sowie Identifizierung von Motiven und Domänen in Polypeptiden

Basic Local Alignment Sequence Tool (Altschul et al., 1990; 1997)

BLASTX, BLASTP, PSI-BLAST und PHI-BLAST

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>

ENTREZ (Benson et al., 1999)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>

PFAM (Bateman et al., 2002)

<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>

SMART (Schulz et al., 2002)

<http://smart.emblheidelberg.de>

TMPRED (Hofmann et al., 1993)

http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html

PROSITE (Bairoch et al., 1992; Falquet et al., 2002)

<http://www.isrec.isbsib.ch/software/PFSCAN>

<http://www.ebi.ac.uk>

BLOCKS (Henikoff und Henikoff, 1994)

<http://blocks.fhcrc.org/blocks>

PRODOM

<http://prodes.toulouse.inra.fr/prodom/2002.1/html>

ExPASy Proteomics Server

<http://us.expasy.org>

Online-Enzymdatenbank

BRENDA (Prof. Dr. D. Schomburg, Universität Köln)
<http://www.brenda.unikoeln.de>

Online-Literaturrecherche

HIGHWIRE
<http://highwire.stanford.edu/cgi/search>

PUBMED
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

ELEKTRONISCHE ZEITSCHRIFTENBIBLIOTHEK
<http://rzblx1.uniregensburg.de/ezeit/fl.phtml?bibid=UBMZ>

4 Methoden

4.1 Hälterung der Meeresschwämme

Schwämme der Spezies *Suberites domuncula* wurden in 130 Liter-Aquarien in künstlichem Meerwasser, welches aus *Aqua bidest.* unter Zusatz der Meersalzmischung *Tropic Marine* (Dr. Binder GmbH, Wartenberg) hergestellt wurde, über mehrere Monate gehältert. Das Meerwasser war auf 16°C temperiert, zirkulierte permanent und wurde vor dem Wiedereinleiten zweifach filtriert. Zweimal die Woche wurden die Tiere mit je 4 ml Phytoplankton „Marin Niedere Tiere“-Futter (Amtra Aquaristik, Rodgau) gefüttert. Darüber hinaus wurden zweimal im Monat Vitamine und Spurenelemente ins Wasser gegeben (*Vitamin & Mineral Supplement*; Kent Marine, Marietta, USA). Da *S. domuncula* mit Einsiedlerkrebsen der Spezies *Paguristes eremita* in Symbiose lebt, wurden ebenso die Krebse zweimal in der Woche mit 5 g der Salzwasserkrebse *Artemia salina* gefüttert. Ebenfalls zweimal die Woche wurde der Salzgehalt des Meerwassers überprüft und auf eine spezifische Dichte von $\delta = 1,028$ eingestellt.

4.2 Inkubation der Schwämme mit Lipopolysacchariden

10 mg Lipopolysaccharide von *E. coli* (Serotype 026:B6; Sigma-Aldrich) wurden in 1000 ml künstlichem Meerwasser gelöst, so dass die Endotoxinkonzentration 10 µg LPS pro ml Meerwasser betrug. Die Inkubation für das molekularbiologische Experiment wurde mit einem mittelgroßen Exemplar von *S. domuncula* in einem 2 Liter Becherglas unter optimaler Luftversorgung durchgeführt. Als Kontrolle wurde vor Beginn der LPS-Inkubation ein etwa 0,5 g schweres Gewebestück abgeschnitten und dieses sofort mit flüssigem Stickstoff gefroren. Dann wurde das Tier in das LPS-haltige Meerwasser eingesetzt und für insgesamt 72 Stunden inkubiert. Jeweils nach den Inkubationszeiträumen 8, 16, 24 und 72 Stunden wurde erneut ein etwa 0,5 g schweres Gewebestück abgeschnitten und daraus die Gesamt-RNA isoliert sowie deren Reinheit und Gehalt überprüft (4.3). Die Gewebeentnahme erfolgte in räumlichem Abstand zur vorherigen Schnittstelle, um eine Beeinflussung der Ergebnisse auszuschließen.

Für die Quantifizierung von Etherphospholipid-Derivaten in Kooperation mit dem Pharmazeutischen Institut der Universität von Neapel (4.15) wurden jeweils drei Exemplare von *S. domuncula* in gleicher Weise inkubiert und anschließend zusammen

mit drei nicht-inkubierten Exemplaren als Kontrolle bei -20°C bis zur späteren Analyse eingefroren.

4.3 RNA-Präparation

Da im Gegensatz zu DNA RNA empfindlich gegenüber dem enzymatischen Angriff von RNA-abbauenden Enzymen, den RNAsen ist, müssen Maßnahmen ergriffen werden, um die Integrität der isolierten RNA zu gewährleisten und um einer Kontamination der Proben mit RNAsen vorbeugen.

Da sich solche Enzyme im Wasser, in Chemikalien, auf der Haut sowie auf sämtlichen Oberflächen befinden, wurden Oberflächen zunächst mit kommerziell erwerblichen RNase-inaktivierenden Lösungen (*RNase Away*, Roth, Karlsruhe) behandelt, Einmal-Laborhandschuhe häufig gewechselt, Glas- und Metallgeräte vor Gebrauch gut gereinigt und mindestens 3 Stunden bei 180°C sterilisiert. Alle verwendeten Lösungen wurden mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und bei 37°C über Nacht gerührt oder wahlweise mit DEPC-behandeltem Wasser hergestellt. DEPC inaktiviert RNAsen durch Aminoalkylierung besonders an Tyrosin- und Histidinresten, was die Zerstörung der Enzymstruktur zur Folge hat (Leonard *et al.*, 1970). Verbrauchsmaterialien wurden ebenfalls über Nacht in einer 0,1 %-igen wässrigen Lösung (V/V) von DEPC eingelegt, das in den Lösungen enthaltene überschüssige DEPC musste jedoch vor der Anwendung durch einstündiges Autoklavieren inaktiviert werden.

4.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen und Geweben beruht auf dem Verfahren von Chomczynski und Sacchi (1987) und kann mit Hilfe des *TRIzol*-Reagenzes (Gibco BRL über Roth, Karlsruhe) durchgeführt werden. Diese Lösung aus flüssigem Phenol und dem chaotropen Salz Guanidinisothiocyanat garantiert die Integrität der RNA während der Homogenisierung des Gewebes und der Lyse der Zellen. Ein Zusatz von Chloroform bewirkt die Entstehung einer klaren, oberen wässrigen Phase, einer intermediären, weißgefärbten Phase sowie einer rotgefärbten, unteren organischen Phase. Da sich die RNA ausschließlich in der oberen Phase befindet, kann sie aus dieser mit Isopropanol ausgefällt und anschließend gereinigt werden.

Etwa 1g frisches Gewebe wurde direkt nach der Entnahme mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, um die RNA zu konservieren. Anschließend wurde das Gewebe mehrmals mit Aluminiumfolie umwickelt und durch Hämmern zunächst grob zerkleinert. Die Gewebekomogenisierung mit Mörser und Pistill erfolgte anschließend unter ständiger Zugabe flüssigen Stickstoffs. Das feine Gewebepulver wurde in 10 ml *TRIzol*-Reagenz überführt und die Mischung 5 min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Mischung wurde danach auf 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt und durch einen 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 10.000 g alle unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Zu je 550 µl des Überstands wurden 200 µl Chloroform hinzupipettiert, 15 sec. stark mit der Hand umgeschüttelt, für 3 min. bei Raumtemperatur inkubiert und 20 min. bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der RNA-enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. bei 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das am Boden sichtbare RNA-Pellet mit 1 ml 75%-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation bei 7.500 g wurde der Ethanol abpipettiert und nach 5-minütigem Trocknen bei Raumtemperatur das Pellet in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

4.3.2 Bestimmung der Reinheit von RNA

RNA besitzt zwei charakteristische Absorptionsmaxima, ein erstes bei $\lambda = 260$ nm und ein zweites bei $\lambda = 280$ nm. Das Verhältnis der Absorptionen A_{260}/A_{280} lässt eine ungefähre Aussage über die Reinheit der isolierten RNA zu. Reine RNA besitzt ein A_{260}/A_{280} Verhältnis von 1,9-2,3 in Tris-Puffer (10 mM; pH = 7,5), wobei Proteinverunreinigungen das pH-abhängige Absorptionsverhältnis verschlechtern können.

4.3.3 Bestimmung der Konzentration von RNA

Die Konzentrationsbestimmung von RNA wurde mittels Absorptionsspektrometrie bei $\lambda = 260$ nm in Quarzküvetten durchgeführt. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ist die Extinktion einer lichtabsorbierenden Substanz mit konstantem, molarem Extinktionskoeffizienten E bei konstanter Schichtdicke d und Wellenlänge λ proportional zu ihrer Konzentration c . Das Gesetz gilt nur in verdünnter Lösung. Bei Extinktionswerten > 1 wurde deshalb nur nach entsprechender Verdünnung gemessen. Bei einer Pfadlänge von

1 cm entspricht die Absorption von 1 bei $\lambda=260$ nm einer RNA-Konzentration von $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ in Tris-Puffer (10 mM, pH = 7,5).

4.4 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986) ist eine Methode zur schnellen, enzymatischen *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Fragmenten spezifischer Länge. Sie kann aufgrund ihrer enormen Sensitivität zur Detektion seltener DNA verwendet werden, da theoretisch nur ein Matrizenmolekül zu ihrer Durchführung benötigt wird. Hierin liegt auch der Nachteil der Methode, da mit Fremd-DNA kontaminierte Proben ebenfalls hochamplifiziert werden und zu ungewollten Reaktionsprodukten führen.

Zur Durchführung der PCR benötigt man die zu amplifizierende DNA-Matrize, zwei kurze, einzelsträngige PCR-Primer, eine hitzeresistente DNA-Polymerase, eine Mischung aus den vier Desoxynukleotiden dATP, dGTP, dCTP und dTTP als Bausteine des neuen Nukleinsäure-Stranges sowie eine MgCl_2 -haltige Pufferlösung. Primer sind Oligonukleotide mit einer Länge zwischen 18 und 24 Basen, welche die zu amplifizierende Region der Matrize flankieren. Nach der thermischen Auftrennung des DNA-Doppelstrangs in Einzelstränge, der Denaturierung, lagern die PCR-Primer an komplementäre Sequenzen der DNA-Matrize stabil und hochspezifisch an, während die zueinandergerichteten 3'-Enden als Initiationsstelle für die DNA-Neusynthese durch die DNA-Polymerase bei einer Temperatur von etwa 72°C dienen. Oligonukleotid-Primer werden als Vorwärts- oder Rückwärts- primer bezeichnet, je nachdem ob die Synthese des 3'-Bereiches oder des 5'-Bereiches der Matrize initiiert wird. Die beschriebene Reaktionsmischung wird 35 bis 40 Reaktionszyklen unterworfen, wobei jeder Zyklus aus drei charakteristischen Reaktionsschritten besteht:

- (1) das eine bis mehrere Minuten andauernde Erhitzen auf 94 bis 96°C , wobei die DNA Matrize reversibel denaturiert (*denaturation*)
- (2) die eine bis mehrere Minuten andauernde Inkubation bei 50 bis 60°C (abhängig von der Schmelztemperatur T_m der PCR-Primer, 4.4.6), wobei es zur Anlagerung der PCR-Primer an ihren komplementären, die Zielsequenz flankierenden Sequenzbereich kommt (*annealing*)

(3) die eine bis mehrere Minuten andauernde Inkubation bei 72°C, während dessen die hitzestabile DNA-Polymerase an den 3'-Enden der jeweiligen Primer bindet und den komplementären Strang synthetisiert (*elongation*)

Nach dem ersten Reaktionszyklus haben sich zwei neue DNA-Stränge von undefinierter Länge gebildet, an welche in gleicher Weise die Primer nach Denaturierung der Parentalstränge hybridisieren können. Nach dem zweiten Zyklus aus *denaturation*, *annealing* und *elongation* bildet sich erstmals ein doppelsträngiges PCR-Produkt, dessen Länge exakt durch die Enden der Primer determiniert wird. Dieses Syntheseprodukt dient in den weiteren Zyklen wiederum als Matrize, so dass sich nach jedem weiteren Zyklus die Menge an Reaktionsprodukt verdoppelt und schließlich exponentiell akkumuliert. Durch 35 Zyklen werden etwa eine Millionen Kopien des ursprünglichen Reaktionsproduktes erhalten.

4.4.1 Standard-PCR

Für eine Standard-PCR wurden die folgende Komponenten in 0,2 ml Mikroreaktionsgefäßen zusammenpipettiert:

x µl	DNA-Matrize (variabel je nach Reaktionsansatz)
5 µl	PCR-Puffer (10-fach)
1 µl	dNTP-Mix (5 mM)
1 µl	Rückwärtsprimer (10 µM)
1 µl	Vorwärtsprimer (10 µM)
0,5 µl	hitzestabile DNA-Polymerase (5 U/µl)
1 µl	MgCl ₂ (50 mM)
x µl	steriles Wasser (variabel je nach Reaktionsansatz)

Anschließend wurden in aller Regel die folgenden Temperaturzyklen durchlaufen:

1 Zyklus	3 min. bei 95°C (initiale Denaturierung der DNA-Matrize)
35 Zyklen	30 sec. bei 95°C 30 sec. bei T_m x sec. bei 72°C
1 Zyklus	10 min. bei 72°C (Fertigstellung noch nicht fertigsynthetisierter DNA-Stränge)
danach	Kühlen des Reaktionsansatzes bei 4°C

Je nach Anwendung und Art der Matrize muss bei der PCR die Anlagerungstemperatur T_m (*melting temperature*, 4.4.6), die Amplifikationszeit und die Zyklenanzahl variiert werden, um die Reaktionsbedingungen zu optimieren. Die Zeitdauer x der Nukleinsäure-Synthese hängt dabei von der zu erwartenden Fragmentlänge und der Synthesegeschwindigkeit der DNA-Polymerase ab. Da herkömmliche, hitzestabile DNA-Polymerasen (beispielsweise *Biotherm*-Polymerase von Promega) eine Fehlerquote von einem Fehler pro 1000 neusynthetisierte Nukleotide besitzen, werden diese nur bei Routine-Reaktionen wie der Checking-PCR (4.4.2) eingesetzt. Da deren Syntheseleistung etwa 1000 Basen pro Minute beträgt, muss eine einminütige Synthesezeit für ein 1 kB langes Zielfragment gewählt werden. Thermostabile DNA-Polymerasen mit ausgeprägter 3',5'-Exonukleaseaktivität (*proof-reading*-Funktion; beispielsweise *Synergy*-Polymerase von Promega) besitzen eine geringere Fehlerquote von nur etwa einem Fehler pro 5.000 neusynthetisierten Nukleotiden und stehen für spezielle PCR-Anwendungen zur Verfügung. Da diese Enzyme für die Synthese von 1 kB etwa 1,5 Minuten benötigen, muss bei ihrer Anwendung die Synthesezeit entsprechend erhöht werden.

Bemerkenswert ist, dass bei der PCR mittels *Taq*-Polymerase diese ein überhängendes Adenin-Nukleotid an das 3'-Ende der PCR-Produkte anhängen (Clark, 1988). Dieses Phänomen macht man sich bei der späteren Ligation (4.7) der entstehenden PCR-Fragmente mit speziellen Vektoren zunutze.

4.4.2 Checking-PCR

Die Checking-PCR dient zur schnellen Überprüfung der erfolgreichen Insertion eines DNA-Fragmentes in einen Klonierungsvektor. Nach Ligation (4.7), Transformation und Beimpfung von Selektionsnährböden (4.9) werden vor Ansetzen einer Über-Nacht-Kultur (4.10) ausgewählte Bakterienklone mittels steriler Pipettenspitze vom Selektionsnährboden gepickt, in 20 µl LB-Medium überführt und 1 h bei 37°C unter Rütteln inkubiert. 1 µl des so beimpften Nährmediums wird anschließend in der PCR als Matrize verwendet, wobei als Vorwärts- und Rückwärtsprimer vektorspezifische Oligonukleotide, welche die Klonierungsstelle (*multiple cloning site*; MCS) flankieren, verwendet werden. Enthält das Plasmid ein Insert, so amplifiziert sich ein um die Länge der mcs entsprechend längeres PCR- Fragment. Als pGEM T-Vektorprimer wurden T7-Forward und SP6-Reverse verwendet.

4.4.3 Nested-PCR

Die Nested-PCR steigert die Selektivität für die Amplifikation eines gewünschten PCR Fragmentes. Bilden sich beispielsweise in einer Standard-PCR neben dem gewünschten Fragment mehrere unspezifische Reaktionsprodukte, so kann der Reaktionsansatz 1:100 mit PCR-Wasser verdünnt werden und eine zweite PCR durchgeführt werden. Dabei werden Vorwärts- und Rückwärtsprimer verwendet, welche innerhalb der Sequenz des ersten Reaktionsproduktes binden, wodurch nur das gewünschte Fragment zur Amplifikation kommt.

4.4.4 Touchdown-PCR

Ähnlich der Nested-PCR steigert die Touchdown-PCR die Selektivität für die Amplifikation eines bestimmten PCR-Fragmentes. Hierbei startet man die PCR mit fünf Zyklen bei einer T_m (4.4.6), welche etwa 6°C über der kalkulierten T_m der Primer liegt. In diesen ersten fünf stringenten Zyklen bildet sich das gewünschte Reaktionsprodukt, jedoch nur in geringer Ausbeute. In jeweils fünf weiteren Zyklen wird die Anlagerungstemperatur dann sukzessiv um 2°C gesenkt, bis schließlich die ermittelte optimale T_m der Primer erreicht ist. Ab diesem Zeitpunkt wird die PCR in der üblichen Weise zu Ende geführt.

4.4.5 Labeling-PCR

Mit Hilfe der Labeling-PCR werden PCR-Produkte bei ihrer Synthese markiert. Diese werden später als Sonden zur Detektion von DNA oder RNA beispielsweise in Southern oder Northern-Blotting-Analysen oder der *in situ*-Hybridisierung verwendet. Die Markierung erfolgt durch den Einbau von Biotin-, Fluorescein-, Estradiol- oder Digoxigenin-markierten Nukleotiden. Nach der Hybridisierung der so markierten Sonden mit ihrer komplementären Zielsequenz erfolgt die enzymgekoppelte Detektion der Hybridisierungsprodukte. Für die vorliegende Arbeit wurde der *PCR DIG Labeling Mix* (Roche Diagnostics) verwendet. Er enthält die vier Standardnukleotide sowie einen geringen Anteil an Digoxigenin-11-dUTP, welches durchschnittlich alle 20 bis 25 Nukleotide in den wachsenden Strang eingebaut wird. Da der enzymatische Einbau gelabelter Nukleotide etwas mehr Zeit benötigt, als die normale Nukleinsäure-Synthese, muss die Syntheszeit um etwa ein Drittel verlängert werden. Ob ein DNA-Fragment erfolgreich markiert worden ist, kann durch Agarosegel-Elektrophorese (4.6.1) überprüft werden. Die DIG- Markierung verändert das Laufverhalten der Sonde im Agarosegel, so dass diese im Vergleich zum ungelabelten DNA-Fragment etwas langsamer wandert. Auf diese Weise wurden DIG-markierte Sonden gegen β -Tubulin, SDADS, SDLIS1 sowie SDGLUBP hergestellt.

4.4.6 Herstellung genspezifischer Primer

Bei der Herstellung genspezifischer Primer, die zur gezielten Amplifikation von DNA beispielsweise aus cDNA-Banken dienen, sind folgende Kriterien zu beachten:

- (1) es dürfen keine Sequenzen gewählt werden, welche zur Ausbildung von intramolekularen Haarnadelstrukturen (*hairpins*) und Schleifen (*loops*) oder zur Ausbildung von Primer-Dimeren führen können (Rychilk und Rhodes, 1989; Saiki, 1989; Rychilk, 1993)
- (2) damit eine stabile Anlagerung an der Matrize resultiert, sollte sowohl das Zentrum des Primers als auch das 5'-Ende Guanin-reich oder Cystein-reich sein, da diese beiden Nukleotide drei Wasserstoffbrücken ausbilden können. Das Einführen von „stark paarenden“ Nukleotiden G oder C am 3'-Ende und die dadurch bedingte, affinere Anlagerung an der Matrize führt zu einer besserer Produktausbeute und einer höheren Selektivität in der PCR.

(3) intermolekulare Komplementarität zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer muss vermieden werden, da die Primer sonst mit sich selbst dimerisieren und nicht an die Zielsequenz binden

(4) das Verhältnis der Nukleotide GC:AT sollte etwa 40:60 betragen, damit die Schmelztemperatur T_m , welche diejenige Temperatur ist, bei welcher 50 % der Primer mit der Zielsequenz dimerisieren, nur geringfügig voneinander abweichen. Während eine zu geringe Schmelztemperatur zu unspezifischer Anlagerung an der Matrize und dadurch zu unspezifischen Reaktionsprodukten führen kann, so führen zu stringente Bedingungen (zu hohe T_m) zu mangelhafter oder keiner Anlagerung und dadurch zu geringerer oder keiner Produktausbeute

Alle für die vorliegende Arbeit verwendeten Primer wurden manuell nach den genannten Regeln konstruiert.

4.4.7 Berechnung der Schmelztemperatur von PCR-Primern

Schmelztemperaturen von Primern sind je nach Basenzusammensetzung und Länge des Oligonukleotids verschieden und können nach folgender Annäherungsformel berechnet werden (Thein und Wallace, 1986):

$$T_m = (\text{Anzahl von A+T}) \times 2^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von G+C}) \times 4^\circ\text{C}$$

Auch auf diversen Internetseiten (z.B. auf <http://alces.med.umn.edu/rawtm.html>) lassen sich Schmelztemperaturen von Primern kalkulieren.

4.5 Extraktion und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

4.5.1 Aufreinigung durch die Ethanol-Präzipitationsmethode

DNA kann aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von reinem Ethanol bei Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen aus ihrer Lösung ausgefällt, dann gewaschen und erneut gelöst werden. Die Kationen der chaotropen Salze Ammonium- oder Natriumacetat heben dabei als starke Gegenionen die negativen Ladungen des Zucker-Phosphat-Gerüsts auf, während reiner Ethanol die Dielektrizitätskonstante des Wassers herabsetzt. Der Vorgang kann durch das Coulomb'sche Gesetz beschrieben werden: in Wasser sind die intermolekularen elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen Ionen

gegensätzlicher Ladung (hier zwischen DNA und Salzkationen) in der Regel aufgrund der großen Dielektrizitätskonstante von Wasser gering. Durch Zusatz von reinem Ethanol kann diese so weit verringert werden, dass die Anziehungskräfte zwischen DNA und Gegenionen zunehmen, bis sich schließlich präzipitierende Ionenpaare bilden (Frank, 1997). Ein Zusatz von 10 µg tRNA aus *E. coli* oder *S. cerevisiae* begünstigt die Fällung der DNA, da tRNA als Trägermolekül mit der aufzureinigenden DNA kopräzipitiert. tRNA beeinflusst dabei nicht die sich der Fällung und Aufreinigung anschließenden, enzymatischen Reaktionen (Ausubel *et al.*, 1998).

Die erhaltene DNA-Lösung (z.B. 50 µl PCR-Ansatz) wurde mit autoklaviertem Wasser zu 200 µl ergänzt und das gleiche Volumen 7,5-molarer Ammoniumacetat-Lösung oder 1/10 des Volumens an 3-molarer Natriumacetatlösung hinzupipettiert. Nach Zugabe von 2 µl tRNA-Lösung (10 µg µl⁻¹) und Vortexen wurde die 3-fache Menge an reinem Ethanol hinzupipettiert, gemischt und diese Lösung über Nacht bei –80°C gelagert. Danach wurde die Lösung für 30 min. bei 14.000 g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das an der Reagenzgefäßwand sichtbare DNA-Pellet mit 600 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter, 15-minütiger Zentrifugation bei 14.000 g wurde der Überstand abpipettiert, das Pellet für kurze Zeit an der Luft getrocknet und schließlich in 20 µl autoklaviertem Wasser unter gelegentlichem Vortexen und Zentrifugieren gelöst. Die Lösung konnte bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert werden.

4.5.2 Aufreinigung mittels Extraktions- und Reinigungs-Kits

Um größere DNA-Mengen nach einer PCR (4.4) oder einem Restriktionsverdau (4.8) weiterverarbeiten zu können, müssen die Reaktionsansätze von überschüssigen Primern, Salzen und Enzymen gereinigt werden. Dies kann mit Hilfe der Glasfaser-Fleece-Methode und kommerziell erwerblichen Kits erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurden wahlweise der *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche, Mannheim) oder der *Nucleo Spin PCR cleanup kit* (Macherey & Nagel, Düren) angewendet. Dabei wurden die aufzureinigenden DNA-Fragmente in Anwesenheit der im Bindepuffer enthaltenen großen Mengen eines chaotropen Salzes an das Glasfaser-Fleece gebunden. Nach dem Waschen der gebundenen DNA-Fragmente mit ethanolhaltigem Waschpuffer wurden die gereinigten Fragmente mittels Elutionspuffer vom Fleece eluiert, aufgefangen und bei –20°C gelagert (Hamaguchi und Geiduschek, 1962; Vogelstein und Gillespie, 1979).

4.5.3 Extraktion aus Agarosegelen

Die Wiedergewinnung von DNA-Fragmente aus Agarosegelen nach Elektrophorese kann mit Hilfe der Glasfaser-Fleece-Methode mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* der Fa. Roche erfolgen. Das gewünschte DNA-Fragment wurde nach der Elektrophorese und kurzer Ethidiumbromid-Anfärbephase (maximal 10 min.) mittels sterilem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit je 300 µl Bindepuffer pro 100 mg Gelstück in einem Reaktionsgefäß versetzt. Durch 10-minütiges Erwärmen auf 60°C bei wiederholtem vortexen schmolz das Gel und das DNA-Fragment löste sich aus der Gelmatrix. Diese Lösung wurde nun über die Glasfaser-Fleece-Säule gegeben, wobei das DNA-Fragment nach dem Abzentrifugieren des Bindepuffers am Fleece haftete und durch Zugabe von ethanolhaltigem Waschpuffer gereinigt werden konnte. Anschließend wurde es durch Elutionspuffer vom Fleece eluiert und bei -20°C gelagert.

4.5.4 Extraktion und Aufreinigung von Plasmid-DNA

Um aus Bakterienzellen Plasmid-DNA zu isolieren und zu reinigen, müssen zunächst Barrieren wie Zellwände und Zellmembranen der Bakterien aufgelöst werden. Die Zell-Lyse wird durch Zusatz eines Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*; SDS)/NaOH-enthaltenden Puffers in Anwesenheit von RNase A, welche im Suspensionspuffer enthalten ist, herbeigeführt (Birnboim und Doly, 1979). RNase A baut freigesetzte RNA ab, während SDS Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellmembranen in Lösung bringt. Dies hat die Freisetzung des Zellinhaltes zur Folge. Gleichzeitig kommt es unter alkalischen Bedingungen zu einer Denaturierung sowohl von Proteinen, von chromosomaler DNA als auch von Plasmid-DNA. Durch Zugabe von Bindepuffer, welcher der Reaktionslösung die hohe Salzkonzentration verleiht, wird das Lysat anschließend neutralisiert und denaturierte Proteine, chromosomale DNA, Zelltrümmer sowie SDS präzipitiert. Die kürzere Plasmid-DNA renaturiert hingegen und verbleibt in Lösung. Nach Aufgabe des Überstandes auf die Glasfaser-Fleece-Säule wird die Plasmid-DNA gebunden und kann nach einem zwischengefügten Waschschrift mit Tris-Elutionspuffer von diesem eluiert werden.

Zur Isolierung und Aufreinigung wurden der *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche, Mannheim) oder der *Nucleo Spin Plasmid DNA Purification Kit* (Macherey und Nagel, Düren) verwendet. Nach Zentrifugation von 2 ml einer über Nacht-Kultur (4.11.1) bei 8.000 g für 5 min., wurde das erhaltene Bakterien-Pellet in 250 µl RNase-haltigem

Suspensionspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl SDS/NaOH-haltigem Lysepuffer und sanfter Inversion wurde 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350 µl eisgekühlter Bindepuffer zugegeben, erneut sanft invertiert und nochmals 5 min. auf Eis inkubiert. Dabei bildete sich ein weißes Präzipitat aus denaturierten Proteinen und anderen Zellbestandteilen. Nach dem Abzentrifugieren des Präzipitates für 10 min. bei 14.000 g wurde der Überstand in das Glasfaser-Fleece-enhaltende Reaktionsgefäß überführt, 1 min. bei 14.000 g zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Nach Zugabe von 700 µl Waschpuffer wurde 1 min. bei 14.000 g zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Um Reste von Waschpuffer zu entfernen, wurde nochmals für 1 min. bei 14.000 g zentrifugiert und die DNA anschließend mit 50 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die gereinigten Plasmide konnten bei -20°C aufbewahrt werden.

4.6 Elektrophoretische Auftrennung und Detektion von Nukleinsäuren

4.6.1 Elektrophorese von DNA

Nach Restriktion (4.8) oder PCR (4.4) können DNA-Fragmente mittels der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Elektrophorese bezeichnet die Trennung geladener Moleküle aufgrund ihres unterschiedlichen Wanderungsverhaltens in einem elektrischen Feld durch eine Gelstruktur. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Molekülgröße, der Form der Moleküle, der Ionenstärke des Laufpuffers, der Art des Trenngels sowie der Stärke des elektrischen Feldes ab. Kleinere Moleküle wandern dabei schneller durch die Gelmatrix als größere Moleküle; Nukleinsäuren wandern strukturbedingt im elektrischen Feld zur Anode.

Die Trennung erfolgte auf Horizontalgelen einer Konzentration zwischen 0,5 % und 2 % (m/V) Agarose. Als Laufpuffer fanden TBE-Puffer (1-fach) oder TAE-Puffer (1-fach) Anwendung, wobei letzterer eine schärfere Auflösung längerer Fragmente von größer als 1.000 Bp bewirkt, jedoch eine geringere Pufferkapazität als TBE-Puffer besitzt. TAE-Puffer musste deshalb nach jedem Lauf gewechselt werden. Die entsprechende Menge Agarose wurde unter kurzem Aufkochen in 1-fachem TAE-Puffer kolloidal gelöst und nach dem Abkühlen auf etwa 60°C in die Elektrophorese-Kammer gegossen. Bei weiterem Abkühlen bildet sich ein opaleszentes Gel. Neben einem Standard aus DNA-Fragmenten definierter Länge wurden 15 µl des zu untersuchenden

DNA-Gemisches mit 1/6 des Volumens an 6-fachem Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Spannung wurde auf $< 2 \text{ V/cm}$ begrenzt, um ein durch starkes Erwärmen bedingtes Schmelzen des Gels zu vermeiden. Der Lauf wurde beendet, nachdem die blaue Ladepufferfront etwa zwei Drittel der Gel-Länge durchlaufen hatte.

4.6.2 Detektion von DNA in Agarosegelen

4.6.2.1 Färbung mit Ethidiumbromid

Beim Umgang mit Ethidiumbromid muss mit großer Vorsicht gearbeitet werden, da es mutagene Wirkung besitzt. Die Handhabung der Lösung oder gefärbter Gele mit Nitrilhandschuhen ist obligat.

In Agarosegelen aufgetrennte DNA-Fragmente können mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Dieser diffundiert in das Agarosegel hinein und lagert sich aufgrund seiner planaren Struktur als Interkalator zwischen benachbarte Basenpaare des DNA-Doppelstranges ein. Durch eine Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 302 \text{ nm}$ fluoresziert Ethidiumbromid aufgrund anregbarer Elektronen im mesomeriestabilisierten Chromophor und emittiert bei $\lambda = 590 \text{ nm}$ blauviolett Licht. Dadurch werden die DNA-Fragmente sichtbar (Crawford und Waring, 1967). Mit dieser Methode können selbst DNA-Mengen von weniger als 10 ng sichtbar gemacht werden.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel zwischen 20 und 30 min. in eine Lösung von Ethidiumbromid ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$) eingelegt und anschließend mit Hilfe eines Geldokumentationssystems betrachtet. Anhand der Signalintensitäten der Banden des Längenmarkers, deren Konzentrationen bekannt waren, konnte die Menge an aufgetragener DNA abgeschätzt werden.

4.6.2.2 Färbung mit SYBR green I-Reagenz

Beim Umgang muss mit der gleichen Vorsicht wie beim Umgang mit Ethidiumbromid gearbeitet werden, da auch SYBR green I potentiell mutagene Wirkung besitzt.

Das Färbereagenz SYBR green I (Molecular Probes, Eugene) kann ähnlich wie Ethidiumbromid zur Sichtbarmachung von Nukleinsäuren genutzt werden. Dazu wird

eine 1:10.000-fache Verdünnung der Stammlösung hergestellt und das zu färbende Agarosegel etwa 15 min. darin eingelegt.

Nach Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$ fluoresziert *SYBR green I*, wobei die Nachweisgrenze bei 1 ng DNA liegt (Datenblatt *SYBR green I*).

4.6.3 Elektrophorese von RNA

Aus toxikologischen Gründen muss sowohl die Herstellung des Agarosegels als auch die Durchführung der Elektrophorese unter dem Abzug durchgeführt werden.

Da RNA unter nativen Bedingungen eine außerordentlich hohe Tendenz zur Ausbildung intramolekularer Sekundärstrukturen wie Schleifen (*loops*) oder Haarnadeln (*hairpins*) besitzt, muss die elektrophoretische Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen stattfinden. Zur Denaturierung kann Formaldehyd verwendet werden (Lehrach *et al.*, 1977). Da RNA im Gegensatz zu DNA einen niedrigeren pKa-Wert besitzt und zudem sehr leicht alkalischem Abbau unterliegt, spielt der Elektrophorese-pH-Wert eine wichtige Rolle. Er sollte neutral gehalten werden. Als Puffer wird MOPS-Puffer verwendet, da die Puffersubstanz 3-[N-morpholino]-Propansulfonsäure wegen seiner hohen Pufferkapazität bei pH = 7 für die RNA-Elektrophorese am besten geeignet ist. Alle RNA-Proben sowie der RNA-Längenstandard müssen vor dem Auftragen auf das Gel mit denaturierendem RNA-Ladepuffer, welcher sowohl Formaldehyd als auch Formamid als denaturierende Agenzien enthält, versetzt und 10 min. auf 65°C erhitzt werden.

Um der Kontamination mit RNAsen vorzubeugen wurde die verwendete Elektrophoresekammer zunächst über Nacht in 1%-ige SDS-Lösung eingeweicht. Anschließend wurde mit RNase-freiem, DEPC-behandeltem Wasser sowie mit Ethanol oder 2-Propanol ausgespült und nach Verdunsten des Lösungsmittels die Kammer mit 1-fachem MOPS-Laufpuffer gefüllt. Die Gelherstellung erfolgte, indem 0,75g Agarose in 42,5 ml DEPC-behandeltem Wasser unter Aufkochen gelöst wurden, nach dem Abkühlen auf etwa 60°C 5 ml 10-facher MOPS-Puffer und 2,5 ml deionisiertes Formaldehyd 37% (V/V) zugesetzt und die Mischung in die vorbereitete Elektrophoresekammer gegossen wurde. Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 3 µg der Total-RNA und 5 µl RNA-Längenstandard mit DEPC-behandeltem Wasser auf 15 µl aufgefüllt, mit 5 µl RNA-Probenpuffer vermischt und 10 min. auf 65°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde die Mischung schließlich auf das Gel aufgetragen.

4.6.4 Detektion von RNA in Agarosegelen

4.6.4.1 Färbung mit Toluidinblau-Lösung

Der Nachweis ribosomaler RNA-Banden im Anschluß an die RNA-Elektrophorese kann durch Toluidinblau erfolgen und gibt einen Hinweis auf die Integrität der präparierten RNA. Durch 5-minütiges Einlegen des Gels in eine 1 %-ige Toluidinblau-Lösung in 40 %-igem Ethanol erfolgt hierbei zunächst die Färbung des gesamten Agarosegels. Nach dem Entfärben des Gels über Nacht in Wasser bleiben jedoch nur die ribosomalen RNA-Banden sichtbar blau gefärbt.

4.6.4.2 Färbung mit *SYBR green* II-Färbereagenz

Die Sichtbarmachung mit *SYBR green* II RNA-Färbereagenz (Molecular Probes, Eugene) erfolgt durch 15-minütiges Einlegen des Gels in eine 1:10.000-fache Verdünnung der Reagenzlösung. Dieses bindet mit hoher Selektivität an RNA und fluoresziert graublau bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254 \text{ nm}$. Die hohe Sensitivität von *SYBR green* II ermöglicht die Detektion von bis zu 1 ng RNA (Datenblatt *SYBR green* II).

4.7 T/A-Ligation

Die Verknüpfung eines DNA-Fragments mit einem Vektormolekül bezeichnet man als Ligation. Ligierende Enzyme werden als Ligasen bezeichnet, welche *in vivo* als Reparaturenzyme Doppelstrangbrüche *in vitro* jedoch verschiedene oder auch gleiche DNA-Stücke über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpfen können. Bei der PCR mittels Taq-Polymerase (4.4.1) hängt diese an das 3'-Ende der PCR-Produkte ein überhängendes Adenin-Nukleotid an (Clark, 1988). Dieses Phänomen macht man sich bei der Ligation dieser PCR-Fragmente mit speziellen Vektoren zunutze, welche in linearer Form vorliegen und an beiden 3'-Enden ein zu dem überhängenden Adenin des PCR-Produktes komplementäres, überhängendes Thymin besitzen. Eine solche Ligation überhängender Nukleotide ist wesentlich effizienter als eine Ligation glatter Enden; eine gerichtete Ligation der DNA-Fragmente ist jedoch nicht möglich.

Zur T/A-Ligation wurde das pGEM-T Vector System I (Promega) verwendet. Dazu wurden 2 μl des gereinigten PCR-Produktes in 0,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt, zu diesem Volumen 2 μl Ligationspuffer (2-fach), 1 μl pGEM-T-Vektor (50 ng/ μl) sowie 1 μl

T4 DNA-Ligase (1 U/ μ l) zupipettiert und mit *Aqua bidest.* auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l aufgefüllt. Der Ansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gegebenenfalls über Nacht bei 4°C belassen. Nach der Ligation wurde der Ansatz zur Transformation (4.9) verwendet.

4.8 Checking-Restriktion

Restriktion ist das Spalten von Phosphodiesterbindungen in DNA durch Restriktionsendonukleasen. Diese bakteriellen Enzyme beschützen ihren Wirt vor dem Eindringen fremder DNA (z.B. Phagen-DNA), indem sie diese in Stücke zerschneiden. Jedes Restriktionsenzym spaltet dabei an einer spezifischen Erkennungsstelle, welche durch einen palindromischen Sequenzbereich erkannt wird (Smith und Wilcox, 1970). Die bakterieneigene DNA wird gegen Selbstverdau dadurch geschützt, dass eine Methylierung der spezifischen Restriktionsstellen erfolgt, wodurch eine Restriktion verhindert wird.

Checking-Restriktion wurde für diese Arbeit angewandt, um den Erfolg der T/A-Ligation und/oder der Transformation zu überprüfen. Da sich in der Regel innerhalb der Klonierungsstelle (MCS) eines Klonierungsvektors mehrere solcher Schnittstellen befinden, kann durch eine Zweifachrestriktion im Bereich der MCS erkannt werden, ob Fremd-DNA einligiert ist. Entsteht bei der Restriktion ein Fragment, welches länger als die MCS selbst ist, so ist hier in der Regel das gewünschte DNA- Fragment einligiert.

Für den Restriktionsverdau von pGEM-T wurden die beiden Restriktionsendonukleasen *Sph I* und *Spe I* sowie der Restriktionspuffer M (Roche Diagnostics) verwendet und folgender Restriktionsansatz zusammenpipettiert:

3 μ l	cDNA
1,5 μ l	Restriktionspuffer M
1 μ l	<i>Spe I</i> (5 U)
1 μ l	<i>Sph I</i> (5 U)
8,5 μ l	<i>Aqua bidest.</i>

Der Ligationsansatz wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend für 20 min. auf 80°C erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren. Dann wurden die Restriktionsfragmente mittels Elektrophorese (5.7) aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht (4.7.1).

4.9 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von Fremd-DNA in lebende Bakterienzellen. Die transformierten Bakterien wachsen, teilen sich und vermehren dabei das eingeschleuste DNA-Fragment. Die Vermehrung des transformierten Bakteriums mitsamt der eingeschleusten Fremd-DNA unter Bildung identischer Kopien wird auch als Klonierung bezeichnet. Damit Fremd-DNA in Zellen aufgenommen werden kann, müssen Bakterienzellen vor der Transformation einer speziellen Behandlung unterzogen werden, dem „kompetent machen“.

4.9.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach dem Protokoll von Nishimura *et al.* (1990) hergestellt. Der Erfolg dieser Methode beruht auf dem Wachstum der Zellen in einem Medium, das Mg^{2+} -Ionen und Glucose als Kohlenstoffquelle enthält. Die Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen im Medium stimuliert die Transformationseffizienz (Hanahan, 1983). Auch die Lagerung der Zellen in einem Glycerin-Polyethylenglycol- Mg^{2+} -Medium erhöht die Effektivität dieser Methode gegenüber anderen Protokollen. Verwendet wurde der *E. coli*-Stamm XL1 Blue MRF' (Stratagene). Kompetente Zellen nehmen DNA wesentlich effizienter auf als unbehandelte Zellen, obwohl die Transformationsrate immer noch bei < 0,1 % der ursprünglich eingesetzten Bakterienzahl liegt.

5 ml einer tetrazyklinhaltigen Suspensionskultur der *E. coli*-Zellen wurden in 500 ml Transformationsmedium A überführt und bis zur mittleren logarithmischen Phase des Wachstums (Optische Dichte 600 $\approx$ 0,5; 4.10.2) bei 250 rpm und 37°C im Inkubator geschüttelt. Danach wurden die Zellen 10 min. auf Eis gekühlt. Anschließend wurden sie in einer Kühlzentrifuge 10 min. bei 4°C und 1.500 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die weiteren Schritte wurden in einem Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die pelletierten Zellen wurden in 5 ml auf Eis vorgekühltem Transformationsmedium A vorsichtig resuspendiert und dann mit 25 ml Transformationsmedium B (3.11) versetzt. Nach nochmaligem, vorsichtigem Mischen wurden Aliquote von je 100 μ l in 1,5 ml

Reaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Aliquote erfolgte bei -80°C.

4.9.2 Überprüfung der Transformationseffizienz

Die Überprüfung der Kompetenz von kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte durch Transformation von 100 µl kompetenter Zellen mit 0,1 ng des Kontroll-Plasmids aus dem pGEM-T-Kit. Zu dieser Mischung wurden 900 µl LB-Medium ($\cong$ 0,1 ng DNA/ml) zugegeben, diese Mischung 1:10 mit LB-Medium verdünnt ($\cong$ 0,01 ng DNA/ml), jeweils 100 µl auf zwei Selektionsnährböden ausplattiert und über Nacht kultiviert ($\cong$ 0,001 ng DNA/ml). Am folgenden Tag wurden die koloniebildenden Einheiten (KBE) auf der Platte ausgezählt und die Transformationseffizienz mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \text{KBE pro } \mu\text{g Plasmid-DNA}$$

Die Transformationseffizienz der verwendeten Zellen lag in der Regel zwischen 10^6 und 10^7 KBE pro µg Plasmid-DNA

4.9.3 Selektion positiv-transformierter Klone

Zur Selektion der Transformanten waren dem für diese Arbeit eingesetzten Klonierungsvektor pGEM-T zwei selektierbare Marker eingefügt:

- (1) ein β -Lactamase-Gen bewirkte Ampicillinresistenz, so dass nur transformierte Zellen auf dem Selektionsnährboden wachsen konnten
- (2) ein lacZ-Gen, welches einen Teil des Enzyms β -Galaktosidase kodiert, versetzte darüber hinaus transformierte Zellen in die Lage, den Farbstoff *X-Gal* (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid) umzusetzen - dieses Laktose-Analogon, welches dem Selektionsnährboden zugesetzt war, entwickelte bei Spaltung einen dunkelblauen Farbstoff.

Innerhalb des lacZ-Gens befindet sich die Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, mcs), so dass bei Einligation eines DNA-Fragmentes der offene Leserahmen des lacZ-Gens unterbrochen wird. Dadurch können die transformierten Bakterien keine funktionelle β -Galaktosidase mehr exprimieren und der Farbstoff *X-Gal* wird nicht umgesetzt. Weiterhin war dem Selektionsnährboden Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)

zugesetzt, welches ein besonders starker Induktor des lacZ-Operons ist, jedoch nicht selbst als Substrat abgebaut werden kann.

Korrekt transformierte *E. coli*-Zellen bilden auf Selektionsnährböden weiße Kolonien, während positiv-transformierte Zellen ohne einligierte Fremd-DNA blaue Kolonien bilden. Nur weiße Kolonien wurden für die Checking-PCR (4.4.2) verwendet.

4.9.4 Herstellung von Selektionsplatten

LB-Agar wurde autoklaviert und auf 56°C abgekühlt. Nach Zugabe von Ampicillin (50 µg ml⁻¹), IPTG (0,5 mM) und *X-Gal* (0,2 %) wurde umgeschüttelt und etwa 30 ml der Mischung in Petrischalen (Ø = 85 mm) in der Reinraumbank (*laminar air flow*, LAF) ausgegossen. Nach dem Erhärten wurden die Platten luftdicht verpackt und konnten bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

4.9.5 Transformationsvorgang

25 µl der kompetenten *E. coli*-Zellen wurden aus -80°C entnommen und 2 min. auf Eis aufgetaut. 2,5 µl des Ligationsansatzes wurden hinzugefügt, kurz gemischt und 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit den Zellen 50 sec. auf 42°C im Wärmeblock erhitzt und so dem Hitzeschock unterzogen. Dieser fördert zusätzlich die DNA-Aufnahme (Cohen *et al.*, 1972). Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit 600 µl LB-Medium versetzt und 1 Stunde bei 250 rpm und 37°C im Inkubator geschüttelt. Nach dem Ausplattieren der Bakterien auf Selektionsplatten wurden die transformierten Bakterien über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

4.10 Bakterienkultur

4.10.1 Ansetzen einer Suspensionskultur

Transformierte Bakterien lassen sich in Flüssigmedium über Nacht bis zu einer geeignet hohen Keimzahl (z.B. für Plasmidisolierungen) heranzüchten. Ein solches Kulturmedium muss eine ausgewogene Mischung von Nährstoffen in Konzentrationen enthalten, die es den Bakterien ermöglichen, sich effizient zu vermehren. Ein geeignetes Medium für diese Ansprüche stellt das Luria Bertani (LB)-Medium dar, welches die notwendigen Nährstoffe, Salze und Vitamine für das optimale Wachstum der Bakterien

darstellt. Damit sich nach erfolgter Transformation nur die erwünschten Bakterien vermehren, wird dem Medium ein selektierendes Antibiotikum zugesetzt, welches von der durch den verwendeten Vektor vermittelten Antibiotika-Resistenz abhängig ist (im Falle von pGEM: Ampicillin).

5 ml LB-Medium, welches mit $50 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ Ampicillin angereichert war, wurde unter sterilen Bedingungen mit Bakterien angeimpft, welche mit steriler Pipettenspitze von der Selektionsplatte gepickt worden waren. Wurde vorher eine Checking-PCR (4.4.2) durchgeführt, so wurden 10 μl des bakterienhaltigen LB-Mediums überimpft (Sambrook *et al.*, 1989). Die Kulturen wurden 12 bis 16 h (über Nacht) bei 250 rpm und 37°C im Inkubator geschüttelt.

4.10.2 Bestimmung der Zellzahl

Das Wachstum einer Bakterienkultur kann verfolgt werden, indem man die Lichtabsorption der Zellen misst. Dazu wurde die zu vermessende Bakterienkultur in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ und einem Lichtweg von 1 cm durchstrahlt und die Absorption des Lichtes durch die Bakterienkultur ermittelt. Eine Einheit dieser als Optische Dichte (OD) bezeichneten Größe entspricht bei *E.coli* einer Zellzahl von etwa $0,8 \times 10^9$ je Milliliter (Brown, 1993).

Für die Messung der optischen Dichte wurde das Spektralphotometer DU 64 (Beckmann, München) benutzt, dabei ein Aliquot der Suspensionskultur 1:10 verdünnt und in einer 100 μl Mikroglasküvette gemessen.

4.10.3 Ansetzen einer Dauerkultur

Zur längerfristigen Aufbewahrung interessanter Bakterienklone können diese in einem speziellen Dauermedium gelagert werden.

In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurde die Über-Nacht-Kultur des betreffenden Bakteriums im Verhältnis 2:1 mit einer sterilisierten 1:1-Mischung aus LB-Medium und Glycerol 96% (V/V) versetzt. Die so hergestellte Dauerkultur wurde bei -80°C gelagert.

4.11 DNA-Sequenzierung nach der Sanger-Methode

Die DNA-Sequenzierung dient zur Bestimmung der Nukleotidabfolge eines charakteristischen DNA-Fragments. Nach T/A-Klonierung (4.9.1) eines zu sequenzierenden DNA-Fragmentes sowie der Isolierung und Aufreinigung der klonierten Plasmid-DNA (4.5.4) wurde die sogenannte Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt (Sanger et al., 1977). Sie besteht aus der Sequenzier-PCR (*Cycle Sequencing*) des isolierten Plasmids, der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung der entstandenen Sequenzierfragmente und der dazugehörigen Detektion und Computerauswertung. Die Sequenzierreaktion ähnelt einer üblichen PCR (4.4) wobei jedoch anstelle eines Vorwärts- und eines Rückwärtsprimers nur ein Primer Verwendung findet. Sequenzierprimer sind entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff für die spätere Detektion der Sequenzier-Fragmente durch Anregung mittels Lasers markiert oder die Detektion erfolgt durch Autoradiographie. In der vorliegenden Arbeit wurden Sequenzierprimer verwendet, welche an ihrem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (IRD 700 und IRD 800) markiert waren. Die Sichtbarmachung der Sequenzierfragmente erfolgte somit durch Fluoreszenzdetektion nach Anregung der markierten Sequenzierprimer.

In vier verschiedenen Reaktionsansätzen wurde die lineare PCR-Amplifikation durchgeführt, wobei in jedem Reaktionsansatz neben den drei herkömmlichen 2'-Desoxynukleotiden (dNTPs) als Bausteine des entstehenden cDNA-Stranges jeweils ein 2',3'-Didesoxynukleotid (ddNTP) enthalten waren. Wurde im Laufe der Synthese ein solches ddNTP eingebaut, erfolgte der Abbruch der Strangsynthese, da durch die fehlende 3'-Hydroxylgruppe in 2',3'-Didesoxyribose keine weitere Verknüpfung der Kette erfolgen konnte. Aus diesem Grund häufte sich in jedem Reaktionsansatz eine Population unterschiedlich langer Fragmente an, welche durch den fluoreszenmarkierten Sequenzierprimer und das jeweilige Kettenabbruchnukleotid determiniert waren.

Die Detektion der Fragmente erfolgte mit Hilfe eines automatisierten DNA-Sequenzierers (Licor 4200 und Licor 4200L) während der Auftrennung der Reaktionsprodukte durch Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) unter denaturierenden Bedingungen. Ein mit den Wellenlängen $\lambda=700$ bzw. $\lambda=800$ nm anregender Laser fuhr dabei während der Elektrophorese die gesamte Breite des Gels in regelmäßigen Zeitabständen ab und regte die markierten cDNA-Fragmente an. Ein Scanner, der parallel zur Anregung das Gel abschrift, detektierte das emittierte Licht und gab das Signal an den angeschlossenen Rechner weiter. Mithilfe geeigneter Software (*Image Collection* unter

OS/2 oder Eseq unter Windows) wurden die verarbeiteten Signale auf dem Computermonitor als Abbild des Elektrophoresegels dargestellt und die Sequenzen konnten ausgelesen werden. Die Methode führte zu gut lesbaren Sequenzen, wobei eine Auflösung von bis zu 900 Nukleotiden erreicht wurde.

4.11.1 Vorbereitung des Polyacrylamidgels

Die speziell zugeschnittenen Glasplatten wurden gründlich mit Seifenwasser, *Aqua bidest.* und schließlich mit 2-Propanol gereinigt. Nach dem Auflegen von Abstandshaltern (*spacer*) einer Dicke von 0,2 mm auf die untere Glasplatte, wurde die obere Glasplatte aufgelegt und mit Hilfe von speziellen Klammern fixiert. Das für die Elektrophorese verwendete, denaturierende Polyacrylamidgel wurde frisch aus einer Zweikomponentenlösung (*Sequagel XR*, Biozym) in dem das denaturierende Agens Harnstoff bereits enthalten war, hergestellt. Zur Herstellung wurde eine Spatelspitze Ammoniumperoxodisulfat als Polymerisationsinitiator in 6 ml Komponente II (enthält TBE-Puffer) gelöst, mit 24 ml Komponente I (enthält Methacrylat!) gemischt und die Mischung zügig und blasenfrei zwischen die leicht schräggestellten Glasplatten gegossen. An der oberen Kante des noch flüssigen Gels wurde der Vorkamm eingeschoben und dieser gut fixiert. Die Polymerisation dauerte mindestens 2 Stunden.

4.11.2 Durchführung der Sequenzierreaktion

Für diese Methode wurde der *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP* (Amersham, Freiburg) benutzt, in welchem die Komponenten für die Kettenabbruchreaktion bereits vorgemischt enthalten waren. Der Zusatz von 7-deaza-dGTP anstelle herkömmlichen dGTPs sollte das Auftreten von Bandenkompression während der Gelelektrophorese verhindern.

Zunächst wurde die folgende Mischung hergestellt:

10 µl	DNA oder Plasmid
1 µl	IR ₈₀₀ - oder IR ₇₀₀ - markierter Sequenzierprimer (2 pmol/µl)
8 µl	<i>Aqua bidest.</i>

Anschließend wurden je 1,5 µl der vier Terminationsmische (enthalten entweder ddGTP, ddATP, ddCTP oder ddTTP) auf den Boden von PCR-Reaktionsgefäßen (0,2 ml) vorgelegt und je 4,5 µl des obigen Gemischs an den Rand zupipettiert. Durch kurzes

Zentrifugieren vermischten sich die Reaktionskomponenten und das Temperaturprogramm wurde gestartet. Die Sequenzierreaktion wurde mit folgenden Temperaturzyklen durchgeführt:

1 Zyklus	3 min. bei 95°C
30 Zyklen	30 sec. bei 95°C
	30 sec. bei 56°C
	1 min. bei 72°C
danach	Kühlen des Reaktionsansatzes bei 4°C

4.11.3 Denaturierung von PCR-Fragmenten

Vor dem Auftragen der Sequenzierproben auf das Elektrophoresegel müssen diese denaturiert werden, da sich aufgrund der Ausbildung von inter- und intrazellulären Wasserstoffbrückenbindungen neben Schleifen (*loops*) auch Dimere sowie Polymere der Sequenzierfragmente bilden können. Deren Laufverhalten wäre so unterschiedlich, dass sich ein Auslesen der einzelnen Sequenzierbanden als unmöglich gestalten würde.

Als denaturierendes Agens wurde Formamid verwendet, welches bereits im Sequenzier-Ladepuffer enthalten war. Nach Zugabe von 3 µl dieses Puffers zu den Sequenzier-Proben wurde für 4 min. auf 85°C erhitzt, währenddessen die Denaturierung erfolgte. Denaturierte Proben konnten bei –20°C für etwa 1 Woche gelagert werden und mussten für ein weiteres Auslesen nicht erneut denaturiert werden.

4.11.4 Durchführung der Sequenzier-Elektrophorese

Nach Entfernung des Vorkammes wurde die entstandene Tasche gründlich von Gelresten gereinigt und mit *Aqua bidest.* gespült. Das fertige Gel wurde in die Sequenzierapparatur eingehängt, auf der Anodenseite 1-facher TBE-Puffer und auf der Kathodenseite 0,8-facher TBE-Puffer eingefüllt. Die variable Pufferkonzentration diente der Verbesserung der Bandenauflösung sowie der Reduktion von Bandenkompression. Ein etwa 40-minütiger Vorlauf diente der Äquilibration des Gels, dem Entfernen von restlichem Polymerisationsinitiator und dem Erwärmen des Gels auf 50°C als weitere denaturierende Maßnahme. Vor dem eigentlichen Start der Elektrophorese wurde die Geltasche mittels Spritze und Kanüle mit Laufpuffer gespült und durch Einpipettieren von Sequenzier-Ladepuffer die Beschaffenheit der Tasche überprüft. Nach dem Ausspülen des Puffers wurde der für 12 Sequenzierreaktionen ausgelegte Ladekamm

vorsichtig bis an den Ansatz des Gels in die Tasche geschoben, je 1,5 µl der denaturierten Sequenzierreaktionen in definierter Reihenfolge (hier: G, A, T, C) einpipettiert und die Elektrophorese unter folgenden Bedingungen gestartet:

Stromstärke	40 mA
Leistung	50 W
Spannung	1500 V
Vorlaufdauer	40 min.
Laufdauer	9 Stunden

Die Sequenzen wurden nach dem Auslesen manuell überprüft, gegebenenfalls korrigiert und gespeichert.

4.12 Analyse differentieller Genexpression mittels Differential Display

Die Methode des Differential Display wurde 1992 von A. Liang und A.B. Pardee entwickelt und zählt zu den leistungsfähigsten und am weitesten verbreiteten Methoden der Identifizierung differentieller Genexpression.

Nach der Isolierung der Gesamt-RNA aus dem betreffenden eukaryotischen Gewebe oder Zelltyp erfolgt hierbei zunächst die selektive reverse Transkription der enthaltenen Poly(A)⁺-RNAs. Dies geschieht mit Hilfe von 12 unterschiedlichen und als Ankerprimer (*anchor primer*) bezeichneten oligo(dT)-Primern. Diese bestehen aus 11 Thymidin-Nukleotiden, die am 3'-Ende um zwei weitere Nukleotide M und N erweitert sind, weshalb eine allgemeine Darstellungsweise T₁₁MN lautet. M steht dabei entweder für eine der drei Basen G, A oder C, während N jeweils eine der vier Basen G, A, T oder C sein kann. Ankerprimer, die sich nur in der letzten Base N unterscheiden werden zu Primersets zusammengefasst.

M und N bedingen die Verankerung des Primers am Beginn des 3'-untranslatierten Bereichs der entsprechenden Poly(A)⁺-RNA. Der oligo (dT)-Teil stellt zudem sicher, dass nur eukaryotische polyadenylierte RNA aus der Mischung der in Gesamt-RNA eines Organismus enthaltenen RNA-Typen (z.B. ribosomale RNA) revers transkribiert wird. Im Falle der in Symbiose mit Bakterien lebenden Schwämme wird so selektiv nur die RNA des Schwammes und nicht etwa assoziierter Bakterien der weiteren Analyse zugänglich gemacht.

Jeder Ankerprimer-Mix ist in der Lage, ein Drittel der Gesamtpopulation an polyadenylierter RNA zu erfassen und dessen reverse Transkription zu veranlassen.

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Ankerprimer-Mischungen:

Bezeichnung	Allgemeine Formel	Ankerprimer (5'→3')
A-Mix	T ₁₁ AN	TTTTTTTTTTTTTA ^G TTTTTTTTTTTTTA ^A TTTTTTTTTTTTTA ^T TTTTTTTTTTTTTA ^C
C-Mix	T ₁₁ CN	TTTTTTTTTTTTTC ^G TTTTTTTTTTTTTC ^A TTTTTTTTTTTTTC ^T TTTTTTTTTTTTTC ^C
G-Mix	T ₁₁ GN	TTTTTTTTTTTTTG ^G TTTTTTTTTTTTTG ^A TTTTTTTTTTTTTG ^T TTTTTTTTTTTTTG ^C

Die nach der reversen Transkription resultierenden, drei cDNA-Subpopulationen werden mittels PCR unter Verwendung spezieller, aus zehn Nukleotiden bestehenden, Arbiträrprimern (*arbitrary primer*) amplifiziert und dabei die entstehenden cDNA-Fragmente zur späteren Detektion markiert. Die PCR-Amplifikation erfolgte jeweils durch die Kombination eines von fünf Arbiträrprimern in Kombination mit einem der für die reverse Transkription verwendeten Ankerprimern. Die Markierung der PCR-Fragmente erfolgte durch die Verwendung 5'-Fluoreszenzfarbstoff-markierter Arbiträrprimer (IRD₈₀₀), wobei diese Variante als Fluoreszenz Differential Display (FDD) bezeichnet.

Eine allgemeine Darstellungsweise für Arbiträrprimer lautet:

Arbiträrprimer (Allgemeine Formel)	5'-NNNNNNNNNN-3'
------------------------------------	------------------

Deren Sequenz war zufällig (arbiträr) gewählt, doch sollte das Verhältnis der Purin- zu den Pyrimidin-Nukleotiden etwa 50:50 betragen. Jeder Arbiträrprimer ist theoretisch in der Lage, komplementäre Sequenzen in etwa 50 bis 100 cDNAs zu erkennen und so unter den gegebenen PCR-Bedingungen zu amplifizieren (Liang, 2002).

Die durch die jeweilige Ankerprimer-Arbiträrprimer-Kombination determinierten Amplifikationsprodukte werden anschließend mittels denaturierender Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) der Größe nach aufgetrennt, das Elektrophoresegel auf Millimeterpapier transferiert und die Banden mittels eines Fluoreszenzdetektors (LICOR *Odyssey IR-Imager*) im Gel sichtbar gemacht. Durch direkten Vergleich der Bandenmuster zweier Proben, der Kontrollprobe und der experimentell behandelten oder pathologischen Probe, wird die veränderte Genantwort direkt sichtbar. So deutet eine in der behandelten Probe auftretende jedoch in der Kontrolle fehlende Bande auf die Hochregulation eines funktionellen Gens hin; im Gegensatz dazu indiziert eine nur in der Kontrollspur nicht aber in der Spur der behandelten Probe auftretende Bande die Herunterregulation eines betreffenden Gens.

Im Differential Display auftretende cDNA-Fragmente sind in der Regel zwischen 250 bis 500 Nukleotide lang. Werden diese nach ihrer Rückgewinnung aus dem Polyacrylamidgel, ihrer Reamplifikation mittels PCR und ihrer Subklonierung sequenziert, so stellen sie aufgrund der verwendeten Primer den 3'-untranslatierten Bereich des vollständigen Gens dar. Zur Gewinnung der vollständigen Gene müssen deshalb cDNA-spezifische Rückwärtsprimer konstruiert werden, welche mit cDNA-Bank-spezifischen Vektorprimern (*BK-Reverse* oder *T3-Forward*) in der PCR kombiniert werden.

Das nachfolgende Schema gibt die typischen Arbeitsschritte des Differential Displays wieder (Abbildung 6):

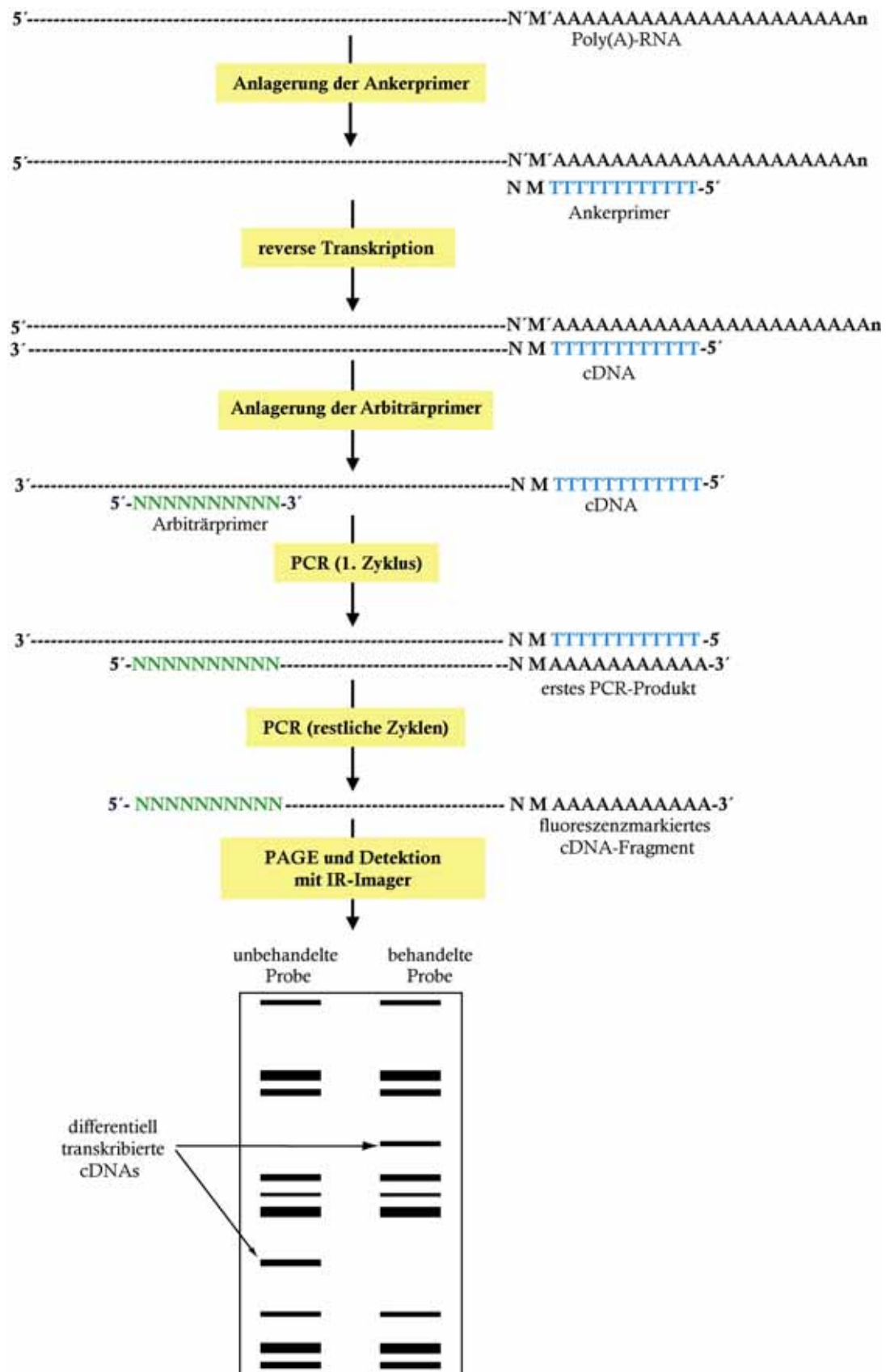


Abbildung 6: Schematischer Ablauf des Differential Display

4.12.1 Reverse Transkription

Die reverse Transkription der in *S. domuncula* enthaltenen Poly(A)⁺-RNA wurde mittels MMLV Reverse Transkriptase (Promega) durchgeführt. Diese besitzt RNase H-Aktivität, weshalb die Reaktion unter Zusatz eines RNase-Inhibitors durchgeführt werden musste.

In 3 Reaktionsgefäßen wurde jeweils ein Aliquot von 5 µg Gesamt-RNA mit je 4 µl einer der Ankerprimer-Mischungen T₁₂GN, T₁₂CN oder T₁₂AN (jeweils 10 pmol/µl der einzelnen Primer) und 5 µl dNTP-Mix (250 µmol/µl) vermischt, mit *Aqua bidest.* auf 20 µl aufgefüllt und 10 min. zur Denaturierung auf 70°C erhitzt. Nach Zugabe von 10 µl 5-fach konzentriertem MMLV Reverse Transkriptase-Puffer, 1 µl RNase-Inhibitor (30 U/µl) wurde mit *Aqua bidest.* zu 49 µl ergänzt, 1 µl MMLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) zugesetzt und 50 min. bei 42°C inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die reverse Transkription. Um die Reaktion zu beenden, wurde für 5 min. auf 95°C erhitzt. Vor der Weiterverarbeitung wurden die jeweiligen cDNA-Subpopulationen mittels Ethanol-Präzipitationsmethode (4.5.1) gereinigt.

4.12.2 Modifizierte PCR-Amplifikation der cDNA

Die gereinigten cDNA-Subpopulationen wurden 1/10 mit *Aqua bidest.* verdünnt und ein Aliquot von je 2 µl der PCR zugeführt. Jede Subpopulation wurde dabei mit einer Kombination aus jeweils einem der zwölf Ankerprimer und jeweils einem der drei 5'-Fluoreszenzfarbstoff-markierten Arbiträrprimern amplifiziert.

Der folgende PCR-Ansatz wurde zusammenpipettiert (angegeben sind die jeweiligen Endkonzentrationen) und das nachfolgende Temperaturprogramm ablaufen gelassen:

5 µl	cDNA-Subpopulation
5 µl	PCR-Puffer (10-fach, enthält 15 mM MgCl ₂)
5 µl	dNTP-Mix (250 µmol/µl)
1 µl	Ankerprimer (10 pmol/µl)
1 µl	Arbiträrprimer (2 pmol/µl)
0,5 µl	Synergy DNA-Polymerase (5 U/µl)
32,5 µl	<i>Aqua bidest.</i>

1 Zyklus	3 min. bei 95°C
40 Zyklen	30 sec. bei 95°C 2 min. bei 40°C 30 sec. bei 72°C
1 Zyklus	20 min. bei 72°C
danach	Kühlen des Reaktionsansatzes bei 4°C

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mit 25 µl Sequenzier-Ladepuffer versetzt und 5 min. bei 85°C denaturiert (4.11.3).

4.12.3 Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Transfer

Die Gelherstellung und der Gellauf erfolgten analog der Sanger-Sequenzierung (4.11), jedoch wurde die untere Glasplatte mit einem wasserabweisenden Silikonöl (*Repel Silan*; Pharmacia) imprägniert. Dadurch ließ sich das Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese gut von der Glasplatte ablösen. Nach dem Gellauf wurde die imprägnierte Glasplatte vorsichtig abgehoben und blaues Millimeterpapier (Schleicher und Schüll, Dassel) aufgelegt. Durch Anhaften am Papier konnte das Gel abgehoben, mit handelsüblicher Frischhaltefolie abgedeckt und mit der Gelseite nach oben auf Filterpapier (3 MM, Whatman) gelegt werden. Dann wurde es bei Raumtemperatur über Nacht in einem Geltrockner (Biorad, München) unter Anlegen von Vakuum getrocknet.

4.12.4 Isolierung von cDNA-Banden nach Infrarot-Detektion

Das getrocknete Gel wurde mit einem Zweikanal-Infrarotdetektor (Licor *Odyssey*) bei $\lambda = 700$ und $\lambda = 800$ nm gescannt. Diejenigen Bereiche des Gels, in denen differentiell hochregulierte Banden (sichtbar bei 800 nm aufgrund der Farbstoffmarkierung) detektiert werden konnten, wurden mit Hilfe der Koordinaten des Millimeterpapiers (sichtbar bei 700 nm) lokalisiert und mittels sterilem Skalpell ausgeschnitten. Die in den Gelstücken inkorporierten cDNA-Fragmente wurden anschließend durch 5-minütiges Kochen der Gelstücke in 100 µl Tris-Elutionspuffer eluiert und auf Eis gekühlt. Bei 14.000 g wurde dann 30 sec. zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Fragmente mittels Ethanol-Präzipitations- Methode (4.5.1) gereinigt.

4.12.5 Reamplifikation isolierter DNA-Fragmente

Eine PCR (5.5) zur Vervielfältigung der Differential Display-Fragmente wurde mit der jeweils gleichen Ankerprimer-Arbiträrprimer-Kombination durchgeführt. Hierbei wurden jedoch anstelle von markierten nun nichtmarkierte Arbiträrprimer verwendet. Der unter 4.12.2 beschriebene PCR-Reaktionsansatz wurde zusammenpipettiert, wobei jedoch 4 µl der nach Aufreinigung erhaltenen Lösung als Matrize verwendet wurden. Ebenfalls das unter 4.12.2 beschriebene Temperaturprogramm wurde anschließend durchlaufen gelassen.

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel überprüft (4.6.1) und bei positivem Ergebnis die reamplifizierten cDNAs kloniert (4.8) sowie sequenziert (4.11).

4.13 Quantifizierung von RNA durch Northern Blotting

Durch die Methode des Northern Blotting kann RNA selektiv sichtbar gemacht, deren Größe untersucht und die Konzentration semiquantitativ bestimmt werden. Hierzu wird isolierte Gesamt-RNA zunächst mittels denaturierender Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt (4.6.2) und anschließend auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N⁺, Amersham, Freiburg) transferiert. Nach Immobilisierung auf der Membran durch UV-Fixierung (Alwine *et al.*, 1977) wird die durch Labeling-PCR (4.4.5) hergestellte, markierte DNA-Sonde mit der Zielsequenz hybridisiert. Das gesuchte Fragment kann in einer Antigen-Antikörper-Reaktion, beispielsweise durch Chemilumineszenz, sichtbar gemacht werden. Mittels dieser Technik ist es möglich, Nukleinsäuren im Nanogramm-bereich zu detektieren und zu identifizieren.

4.13.1 RNA-Transfer und UV-Fixierung

Nach der Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen oder Gewebe, deren Reinheits- und Konzentrationsbestimmung (4.3) wurden 3 µg Gesamt-RNA mittels denaturierender Formaldehydgel-Elektrophorese (4.6.2) aufgetrennt. Vor dem eigentlichen Transfer wurde das Agarosegel für 10 min. in 2-fachem SSC-Puffer geschwenkt, um überschüssiges Formaldehyd herauszuwaschen, da dieses den Transfer behindert. Ein handelsüblicher, quaderförmiger Haushaltsschwamm diente als Unterlage im Puffer-Vorratsgefäß. Dieser Transferschwamm wurde mit 20-fachem SSC-Puffer getränkt; außerdem wurde Puffer im Vorratsgefäß eingefüllt. Auf den getränkten Transferschwamm wurde Filterpapier für Nukleinsäuretransfer (Roth, Karlsruhe) der

Größe des Haushaltsschwammes gelegt. Das gewaschene Agarosegel wurde mit der Oberseite nach unten auf das Filterpapier gelegt und darauf die auf die Größe des Gels zurechtgeschnittene, positiv geladene Nylonmembran (Amersham, Freiburg) gefolgt von 2 Lagen zugeschnittenen Filterpapiers, aufgelegt. Durch Hin- und Herrollen einer sterilen 10 ml-Pipette wurden Luftblasen zwischen den Lagen entfernt, da diese den Transfer behindern konnten. Nach dem Auflegen eines etwa 10 cm hohen Stapels von zurechtgeschnittenem Zellstoff, wurde dieser mit einem 400 g schweren Gewicht beschwert. Der entstehende Kapillarsog bewirkte den vertikalen Transfer der im Gel getrennten RNA-Fragmente auf die Membran. Nach dem Transfer wurde die Membran mit der Oberseite nach oben auf zwei Lagen mit 2-fach SSC-Puffer getränktem Filterpapier gelegt. Durch Bestrahlen mit UV-Licht in einem UV-Crosslinker wurde die transferierte RNA irreversibel an die Membran gebunden.

4.13.2 Prähybridisierung und Hybridisierung

Nach irreversibler Fixierung der RNA auf der Membran wurde diese mit nach innen gerollter Oberseite in ein 50 ml Falcon-Reaktionsgefäß überführt, in dem sich 20 ml auf 50°C vorgewärmte Hybridisierungslösung *DIG Easy Hyb* (Roche, Mannheim) befanden. Im Hybridisierungssofen (Sauer, Reutlingen) wurde für mindestens 1 Stunden bei dieser Temperatur prähybridisiert. Dann wurde die DIG-markierte DNA-Sonde für 10 min. in siedendem Wasser denaturiert und zur Hybridisierlösung zupipettiert. Die Hybridisierung der Sonde mit der Ziel-RNA erfolgte während des Rollens über Nacht bei 50°C.

4.13.3 Waschen der Membran und Detektion

Nach der Hybridisierung über Nacht wurde die Membran aus dem Reaktionsgefäß entnommen, zweimal für 5 min. in 2-fachem SSC-Puffer, der 0,1 % (m/V) SDS enthielt, bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde sie zweimal für 15 min. bei 50°C in 0,2-fachem SSC-Puffer, welcher ebenfalls 0,1 % (m/V) SDS enthielt, gewaschen. Dann wurde die Membran 3 min. in 100 ml P1-Puffer (1-fach) äquilibriert und mindestens 30 min. in 100 ml Blockierungslösung 1 % (m/V) blockiert. 12 µl Anti-DIG-Antikörper-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Roche, Mannheim) wurden in 20 ml 1 %-iger Blockierungslösung (m/V) pipettiert und diese Lösung zur Membran zugegeben, wodurch die Antikörper-Endverdünnung 1:20.000 betrug. Nach maximal 30-minütiger Inkubation wurde die Antikörperlösung verworfen und zweimal 15 min. in 100 ml 1-fachem P1-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach

3-minütiger Äquilibrierung in 1-fachem P3-Puffer wurde die Membran gleichmäßig mit Chemilumineszenz-Substrat *CDP-Star* (Roche, Mannheim) beträufelt und in handelsübliche Frischhaltefolie eingewickelt.

CDP-Star ist ein 1,2-Dioxethan-Chemilumineszenz-Enzymsubstrat, das durch die am Anti-DIG-Antikörper konjugierte Alkalische Phosphatase zu einem metastabilen Dioxethan-Phenolat-Anion umgesetzt wird, welches unter Zerfall Licht emittiert (Beck und Koester, 1990). Die Sichtbarmachung des emittierten Signals erfolgte durch Belichtung eines Röntgenfilms (Fuji RX) und nachfolgender Entwicklung sowie Fixierung in der Dunkelkammer. Die Expositionszeit des Röntgenfilms richtete sich nach der Stärke des Signals und wurde in der vorliegenden Arbeit auf 12 Minuten beschränkt.

4.14 Rechnergestützte Sequenzanalyse mit bioinformatischen Mitteln

4.14.1 Datenbankanalyse und Homologiesuche mit BLAST

Um neue Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen auf ihre Ähnlichkeit mit bereits bekannten Sequenzen hin zu analysieren, bietet sich eine komparative Analyse mit in elektronischen Datenbanken abgelegten Sequenz-Informationen an. Nicht selten lassen sich so strukturelle und funktionelle Homologien identifizieren und Rückschlüsse über die stammesgeschichtliche Verwandtschaft der miteinander verglichenen Sequenzen ziehen. Durch in den letzten Jahren erfolgreich abgeschlossene Genomprojekte wie beispielsweise die Sequenzierung des *Caenorhabditis*-Genoms im Jahr 1998, des *Drosophila*-Genoms im Jahr 2000 oder des Humangenoms im gleichen Jahr, stehen heute riesige Mengen an Sequenzinformationen der verschiedensten Organismen zur Verfügung. Diese Daten sind in Nukleinsäure- oder Proteindatenbanken hinterlegt und in aller Regel für Jedermann zugänglich. Zu den internationalen Nukleinsäure-Datenbanken zählen *Genbank* des *National Center for Biotechnology* (NCBI) am *National Institute for Health* (NIH), die *Nucleotide Database* des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL). Eine proteinorientierte Datenbanken ist *Swiss-Prot* als Teil der *ExPASy*-Webseite des *Swiss Institute for Bioinformatics* (<http://us.expasy.org>). Eine der populärsten Webseiten für die Sequenzhomologiesuche ist das *Basic Local Alignment Sequence Tool* (BLAST, Altschul et al., 1990) des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) Auf dieser Webseite sind eine Fülle von Programmen bereitgestellt, die Ähnlichkeiten zwischen neuen

Sequenzen und den in Datenbanken enthaltenen Sequenzen aufspüren und verarbeiten können.

Auf die BLAST-Homologiesuche soll im nächsten Absatz etwas näher eingegangen werden. Zunächst wird die zu untersuchende Sequenz (*query sequence*) im FASTA-Format in die Suchmaske des BLAST-Servers eingestellt. Dann kann eine Reihe benutzerdefinierter Parameter eingestellt werden, um die Suche sensitiv und selektiv zu gestalten. Zu solchen Einstellungen gehören die Wahl der Datenbank, die Wahl eines Filters, der die Toleranzgrenze für falsch-positive Suchergebnisse einstellt oder die Wahl des Organismus-Genoms, welches mit der *query*-Sequenz nach Ähnlichkeiten durchsucht werden soll. Nach Abschicken der Suche wird diese vom BLAST-Server bearbeitet und nach kurzer Zeit das Suchergebnis je nach gewählter Einstellung als graphische Darstellung, als Zusammenfassung (*summary*) und als Alignment wiedergegeben. Ein wichtiger Faktor dafür, ob eine Ähnlichkeit der *query*-Sequenz mit einer Sequenz der Datenbank besteht, ist der Wert S (*score*). Er trifft eine Aussage darüber, ob bei Verwendung einer bestimmten Substitutionsmatrix (4.12.2) Bereiche mit identischen Resten, sogenannte *high scoring segment pairs* (HSPs), identifiziert wurden. Je höher der S-Wert desto größer ist das Ausmaß der Sequenzübereinstimmung. Darüber hinaus wird durch den *expectation cut off value* („E-Wert“), der sich aus S berechnen lässt, eine Aussage über die Signifikanz der gefundenen Übereinstimmung getroffen. Er bezieht sich auf die Wahrscheinlichkeit, dass eine gefundene Sequenzübereinstimmung rein zufällig entstanden ist und stellt die Anzahl derjenigen Sequenzen dar, bei denen eine ebenso gute oder bessere Übereinstimmung zu erwarten wäre, wenn die gleiche Datenbank mit einer randomisierten Sequenz durchsucht worden wäre (Lesk, 2002). Je kleiner der E-Wert (z.B. $E < 0,05$), desto wahrscheinlicher ist es, dass eine signifikante Ähnlichkeit besteht und eine echte Homologie gefunden wurde. Treffer mit sehr kleinen E-Werte (z.B. $E = 3e-25 \cong 3 \cdot 10^{-25}$) sind hingegen ein klares Anzeichen für die evolutionäre Beziehung des übereinstimmenden Sequenzpaares (Rauhut, 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten BLAST-Homologiesuchen wurden mit ungefilterten Standardeinstellungen von BLASTX und BLASTP durchgeführt.

4.14.2 Erstellung von Sequenz-Alignments

Ein Sequenz-Alignment ist die komparative Analyse zweier oder mehrerer Gene oder Proteine durch die Gegenüberstellung ihrer Nucleotid- oder Aminosäuresequenzen. Hierbei kann die Ähnlichkeit (*similarity*) der gegenübergestellten Sequenzen in aller Regel auf einen Blick erkannt und distinkte Entsprechungen der einzelnen Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzpositionen erfasst werden. Die so erkennbar gemachten Ähnlichkeiten oder Abweichungen lassen Schlüsse auf strukturelle, funktionelle und evolutionäre Beziehungen zu (Rauhut, 2001).

Im Verlauf der Entwicklungsgeschichte verliefen Aminosäureaustausche häufig konservativ, Substitutionen gleichgroßer Aminosäuren oder solcher mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften an bestimmten Positionen innerhalb der Sequenz konnten mit höherer Wahrscheinlichkeit beobachtet werden, als andere. Solche vereinzelt auftretenden, konservativen Austausch beeinflussten in aller Regel die Funktion der homologen Proteine nicht. Aufgrund bekannter Substitutionswahrscheinlichkeiten wurden sogenannte Substitutionsmatrizen (*distance matrices*) erstellt, welche die Wahrscheinlichkeiten bestimmter Aminosäureaustausche eines Alignments berücksichtigen. Mittels unterschiedlicher Bewertungssysteme (*scoring systems*) konnte so eine Aussage darüber getroffen werden, wie eine bestimmte Aminosäuresubstitution zu bewerten ist und wie richtig oder falsch das erstellte Alignment ist. Die ersten empirisch errechneten Austauschmatrizen waren die PAM-Matrizen (*point-accepted mutations*) von Dayhoff *et al.* (1978), während die von S. Henikoff und J.G. Henikoff (1994) eingeführten BLOSUM-Matrizen (*BLOCKS substitution matrices*) zur Bewertung von Substitution neueren Datums sind.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenz-Alignments wurden mit dem Computerprogramm *Clustal W* (*Clustal X*) erstellt und basieren auf den PAM-Substitutionsmatrizen.

4.14.3 Erstellung phylogenetischer Stammbäume

Phylogenie oder Stammesgeschichte ist die Beschreibung der evolutionären Verwandtschaftsbeziehungen von einzelnen Molekülen (DNA, RNA oder Proteine) oder von ganzen Organismen. Während die traditionelle Phylogenie versucht, eine Ordnung in die Artenvielfalt durch Erfassung der äußeren Eigenschaften der Organismen zu bringen, so beruht die molekulare Phylogenie auf den Gesetzmäßigkeiten der molekularen Evolution von Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die Geschichte eines Gens in seiner Nukleotidsequenz und die Geschichte eines Organismus in der Summe seiner Gene aufgezeichnet ist (Rauhut, 2001). Das gleiche trifft für die evolutionäre Verwandtschaft von Proteinen zu.

Phylogenetische Verwandtschaften werden in aller Regel in Form von verästelten Bäumen dargestellt (*phylogenetic trees*). Die graphische Darstellung eines solchen phylogenetischen Baumes besteht gewöhnlich aus durch Linien verbundene Knoten (*nodes*) und Zweige (*branches*), wobei das Verzweigungsmuster die Topologie des Stammbaumes bildet. Während Knoten die miteinander verglichenen Gene, Proteine oder Spezies darstellen, so repräsentieren Zweige die evolutionären Beziehungen zwischen den Knoten. Die Länge der Zweige beschreibt hierbei entweder die Zahl der Mutationen oder Aminosäureaustausche zwischen den verglichenen Moleküle oder die evolutionäre Zeit, die zwischen den betrachteten Molekülen oder Organismen liegt. Phylogenetische Stammbäume können *rooted* und *unrooted* dargestellt sein. Im ersten Fall wird der Stammbaum auf einen als *outgroup* bezeichneten, gemeinsamen Vorläufer bezogen, der den evolutionären Ursprung (*root*) des Stammbaumes darstellt. Im Fall des als *unrooted* erstellten Stammbaumes wird lediglich die Beziehung der Sequenzen untereinander wiedergegeben, nicht aber die evolutionäre Verwandtschaft beschrieben.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten phylogenetischen Analysen beruhen auf Sequenz-Alignments (5.2) der identifizierten Moleküle mit Molekülen aus *GenBank* des BLAST-Servers.

4.15 Quantifizierung von Etherphospholipiden

Die Isolierung und Quantifizierung von Etherphospholipid-Derivaten aus *S. domuncula* wurde durch die Mitarbeiter der Abteilung für Naturstoffchemie des Pharmazeutischen Institutes der Universität von Neapel (Arbeitsgruppe Prof. Dr. E. Fattorusso) durchgeführt.

4.15.1 Extraktion der Schwämme und Isolierung von lyso-PAF-Derivaten

Jeweils mehrere Exemplare von *S. domuncula* wurden homogenisiert und bei Raumtemperatur zunächst mit Methanol (3 x 200 ml) und anschließend mit Chloroform (3 x 200 ml) extrahiert. Die vereinigten Rohextrakte wurden *in vacuo* eingedampft und zwischen Wasser und Butanol ausgeschüttelt. Nach Verdampfen der organischen Phase wurde der verbliebene Rückstand zunächst durch Anwendung der Mitteldruck-Flüssigchromatographie (*medium pressure liquid chromatography*, MPLC) über ein RP-18-Umkehrphasenmaterial (Merck, Darmstadt) als stationäre Phase aufgetrennt. Dabei wurde der lineare Lösungsmittelgradient $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Methanol} \rightarrow \text{Chloroform}$ als mobile Phase verwendet. Die erhaltenen Fraktionen wurden eingedampft und dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-Fertigplatten 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) separiert. Solche Fraktionen, in denen Substanzflecken ähnlicher R_f-Werte nach Betrachtung unter dem UV-Licht sichtbar wurden, konnten erneut vereinigt werden und wurden anschließend einer orientierenden ¹H-NMR (*nuclear magnetic resonance*)-Spektroskopie auf einem 500 MHz-Gerät der Firma Bruker unterzogen. Hierfür wurden die Substanzen je nach ihrer Polarität entweder in deuteriertem Chloroform (CDCl₃) oder deuteriertem Methanol (MD₃OD) gelöst. In der MPLC-Fraktion, welche durch die Mischung aus Wasser und Methanol im Verhältnis 1:10 von der Säule eluierte, wurden charakteristische Etherphospholipid-Signale identifiziert, weshalb diese Fraktion der weiteren Analyse unterzogen wurde. 20 mg der Fraktion wurden mittels Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigchromatographie (*high pressure liquid chromatography*, HPLC) unter Verwendung einer RP-18-Säule (Phenomenex; Ø = 3 µm, 150 x 4,6 mm, Torrance, USA) und einer Mischung aus Methanol und Wasser im Verhältnis 95:5 aufgetrennt und die beiden Etherphospholipide 1-O-Hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso-PAF I) sowie 1-O-Octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso-PAF II) isoliert und durch Vergleich mit in der Literatur angegebenen kernresonanzspektroskopischen und massenspektrometrischen

Daten sowie den Daten der optischen Drehung identifiziert (Noda *et al.*, 1992a, 1992b; Müller *et al.*, 2004).

4.15.2 Erstellung der Eichgeraden

Zur Erstellung einer Eichgeraden für die Quantifizierung wurde zunächst eine *flow injection analysis*-Massenspektrometrie (FIA-MS) unter Verwendung der aus SP4000-Hochdruckpumpe und angeschlossenen *MAT LCQ* Massenspektrometer (beides Thermo Finnigan, San José, USA) bestehenden Apparatur durchgeführt. Hierfür wurden drei lyso-PAF-I-Standardlösungen der Konzentrationen 0,009, 0,001 und 0,0001 mg ml⁻¹ in Methanol unter Zusatz von 1 % Ameisensäure hergestellt. Nach direkter Injektion eines Aliquots der Lösungen, Elektrospray-Ionisation (ESI) von lyso-PAF I und positivionenselektiver, massenspektrometrischer Detektion wurden die korrespondierenden Signalintensitäten ermittelt und aus den Mittelwerten aus jeweils drei Messungen die Eichgerade erstellt. Die Flussrate betrug 200 µl min⁻¹, als mobile Phase wurde eine Mischung aus Methanol, 2-Propanol und Hexan unter Zusatz von 0,1-molarer wässriger Ammoniumacetat-Lösung in einem Verhältnis 100:10:2:5 (V/V) verwendet.

4.15.3 Quantifizierung mittels LC-MS

Die LC-MS-gekoppelte Auftrennung der lyso-Etherphospholipide enthaltenden HPLC-Fraktion erfolgte grundsätzlich unter den gleichen Bedingungen, wobei jedoch eine Flussrate von 400 µl min⁻¹ angewandt wurde. Als stationäre Phase der LC-Trennung wurde eine RP-18-Säule (Phenomenex; Ø = 3 µm, 15 x 4,5 mm; Torrance, USA) verwendet. Die Experimente wurden dreifach durchgeführt und die Mittelwerte der erhaltenen Signalintensitäten zur Quantifizierung herangezogen.

5 Ergebnisse

5.1 Identifizierung differentieller Genexpression mittels Differential Display

Nach Inkubation des Meeresschwammes *Suberites domuncula* mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Lipopolysacchariden (LPS) von *E. coli* über einen Zeitraum von insgesamt 72 Stunden, wurden jeweils nach 0, 8, 16, 24 und 72 Stunden Gewebeproben entnommen, daraus die Gesamt-RNA isoliert und die Methode des Differential Display (Liang und Pardee, 1992) zur Identifizierung der durch LPS ausgelösten, differentiellen Genexpression angewandt.

Mit Hilfe von 12 Ankerprimern ($T_{11}\text{GN}$, $T_{11}\text{AN}$ und $T_{11}\text{CN}$), die zu drei Ankerprimer-Sets zusammengefasst waren, wurden zunächst alle in der isolierten Gesamt-RNA enthaltenen, eukaryotischen Poly(A)⁺-RNAs revers transkribiert (4.12.1). Anschließend wurde mit einem Aliquot der jeweiligen cDNA-Subpopulation die modifizierte Reamplifikations-PCR (4.12.2) durchgeführt, wobei jeder der 12 für die reverse Transkription benutzten Ankerprimer einzeln mit fünf 5'-fluoreszenzmarkierten Arbiträrprimern kombiniert wurde. Die resultierenden Amplifikationsprodukte wurden durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) in 6 %-igen Polyacrylamidgelen (V/V) unter denaturierenden Bedingungen mittels automatisiertem DNA-Sequenzierer (LICOR 4200 *LongReadir*) aufgetrennt (4.12.3). Die durch Verwendung der gleichen Arbiträrprimer-Ankerprimer-Kombination erhaltenen Proben wurden dabei so nebeneinander aufgetragen, dass die Bandenmuster später direkt verglichen werden konnten. Nach dem Gellauf und dem Transfer des Gels auf Millimeterpapier sowie dessen Vakuumtrocknung über Nacht wurde das getrocknete Gel mit einem Infrarotdetektor (LICOR *Odyssey*) sowohl bei $\lambda = 700 \text{ nm}$ als auch bei $\lambda = 800 \text{ nm}$ gescannt (4.12.4). Die Bandenmuster der unterschiedlich behandelten Gewebe (sichtbar bei 800 nm, da mit IRD_{800} -markierten Arbiträrprimern amplifiziert) wurden betrachtet, Gelsektionen mit differentiell amplifizierten cDNA-Banden ausgewählt und mit Hilfe der Koordinaten des Millimeterpapiers (sichtbar bei 700 nm) exakt lokalisiert. Mittels eines sterilen Skalpells wurden sie in der Folge ausgeschnitten, durch 15-minütiges Aufkochen in Tris-Elutionspuffer aus den Gelstücken eluiert und anschließend aus den Überständen mittels Ammoniumacetat-Ethanol-Präzipitationsmethode (4.5.1) aufgereinigt.

Ein Aliquot der jeweiligen, gereinigten cDNA-Fragmente wurde unter Verwendung der gleichen Ankerprimer-Arbiträrprimer-Kombination sowie des gleichen PCR-Programmes wie bei der modifizierten PCR reamplifiziert und die reamplifizierten Fragmente mittels Agarosegel-Elektrophorese (4.6.1) überprüft. Nach Aufreinigung und Klonierung in den pGEM-T-Vektor (4.8, 4.9) wurden diese mittels der Sanger-Kettenabbruchmethode sequenziert (4.11) und die Sequenzen einer BLAST-Datenbankanalyse unterzogen (4.15.1). Die Länge der PCR-Fragmente rangierte zwischen 267 und 550 Basenpaaren.

Da es sich bei den amplifizierten cDNA-Fragmenten um den 3'-untranslatierten Bereich der entsprechenden mRNA handelte, wurde in den meisten Fällen nur sehr geringe *expectation cut off*-Wert („E-Werte“; siehe 4.15.1) von kleiner als 0,05 beobachtet und somit nur eine geringe Ähnlichkeit zu bekannten Sequenzen der Datenbank *GenBank* indiziert. Andere Fragmente besaßen Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen, denen jedoch bisher noch keine Funktion zugeordnet worden war. Diese Gene wurden von BLAST als *unknown sequences*, *hypothetical open reading frames* oder *hypothetical proteins* definiert. Darüber hinaus wurden Fragmente identifiziert, die mit der Transkription, der allgemeinen Proteinbiosynthese oder dem Energieumsatz des Schwammes in Verbindung gebracht werden konnten. So wurde beispielsweise der bevorzugt an die CAAT-Box bindende Transkriptionsfaktor C/EBP γ (Lewin *et al.*, 2002) sowie der am Spleißvorgang eukaryotischer prä-mRNA beteiligte Faktor SRm160/300 als hochreguliert identifiziert. Auch die Steigerung der Transkription bestimmter, an der Proteinbiosynthese beteiligter Faktoren, fiel auf. Dieses waren beispielsweise ein cDNA-Fragment mit großer Ähnlichkeit zu dem humanen Translations-Elongationsfaktor 1 α sowie ein weiteres mit großer Ähnlichkeit zu dem humanen Translations-Initiationsfaktor 4B. Des Weiteren zeigte sich im Differential Display die gesteigerte Transkription eines Proteins mit großer Ähnlichkeit zu dem nukleolären Phosphoprotein xNopp180/Nopp140, dessen Rolle bei der Ribosomen-Biogenese diskutiert wird (Cairns und McStay, 1995). Die Hochregulation einer Untereinheit der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase aus *S. domuncula* deutete darüber hinaus auf den gesteigerten Energieumsatz des Tieres hin (Kim *et al.*, 2001).

Die folgende Tabelle gibt eine Auswahl der nach LPS-Stimulation hochregulierten Gene wieder:

cDNA-Fragment	Länge [Bp]	E-Wert	BLAST <i>accession number</i>
Unknown sequence (<i>Danio rerio</i>)	267	3e ⁻⁰⁵	AAH 66585.1
Unknown sequence (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	356	1e ⁻⁰⁴	CAF 88024.1
NADH-ubiquinone -oxidoreduktase (<i>Bos tarurus</i>)	451	3e ⁻⁰⁵	S 28242
Glycoprotein (<i>Dictyostelium discoideum</i>)	322	0,007	AAM 34345.1
Nukleolar phosphoprotein xNopp180 / Nopp140 (<i>Xenopus laevis</i>)	423	1e ⁻⁰²	I 51618
Kelch-like protein 3 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	412	5e ⁻⁰⁵	NP 059111.1
Splicing coactivator subunit SRm160 / 300 (<i>Homo sapiens</i>)	435	1e ⁻¹⁶	NP 057417
Translation elongationfactor 1α (<i>Homo sapiens</i>)	355	2e ⁻³⁵	CAA 70221.1
Endonuclease III (<i>Homo sapiens</i>)	265	30	AC 00999917
Hypothetical protein MGC56020 (<i>Danio rerio</i>)	243	3e ⁻⁰⁵	CAE 58933.1
Translation initiationfactor 4B (<i>Homo sapiens</i>)	288	4e ⁻¹²	NP 001408
Transcription factor C / EBP γ (<i>Rattus norvegicus</i>)	410	3e ⁻⁰⁴	S 26300
Hypothetical protein F18E5.70 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	382	0,59	T 05153
77 kDa microtubule-associated protein (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)	288	1e ⁻⁰⁸	A 55665

Die für die vorliegende Arbeit aus der Vielzahl der klonierten als wichtig erachteten cDNA-Fragmente waren solche, die nach dem Kontakt mit LPS weder mit dem Nukleinsäurestoffwechsel, der Proteinbiosynthese noch dem Energieumsatzes in Verbindung gebracht werden konnten.

Es handelte sich dabei zum Ersten um cDNA-Fragmente mit großer Sequenzähnlichkeit zu dem Enzym Alkyl-Dihydroxyacetonphosphat-Synthase (Alkyl-DHAP-Synthase; EC 2.5.1.26). Dieses Schlüsselenzym der Etherphospholipid-Biosynthese katalysiert dessen zweiten Schritt (de Vet *et al.*, 1998) (siehe Abbildung 7). Zu dieser speziellen Phospholipid-Gruppe zählt beispielsweise plättchenaktivierender Faktor (PAF), welcher als Lipidmediator bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielt. Dessen Deacetylierungsderivat lyso-plättchenaktivierender Faktor (lyso-PAF) konnte bereits aus dem für die vorliegende Arbeit verwendeten Modellorganismus *S. domuncula* isoliert werden (1.4)

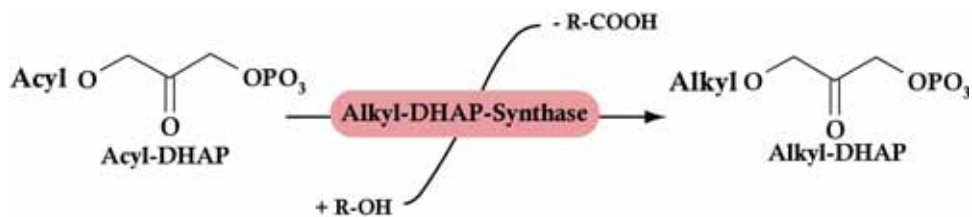


Abbildung 7: Reaktion der Alkyl-DHAP-Synthase

Zum Zweiten wurde ein cDNA-Fragment mit großer Ähnlichkeit zu dem für das Lissenzephalie 1-Protein codierende Gen aus *H. sapiens* identifiziert. Dieses Protein wurde erstmals als nichtkatalytischer Bestandteil des Enzyms PAF-Acetylhydrolase I identifiziert. Diese PAF-spezifische Phospholipase A₂ ist ein Heterotrimer aus zwei katalytischen Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sowie dem Lis1-Genprodukt als β -Untereinheit (Hajra, 1988; Hattori *et al.*, 1993). Das Enzym katalysiert die Deacetylierungsreaktion von plättchenaktivierendem Faktor (PAF) unter Bildung von lyso-PAF (siehe Abbildung 8):

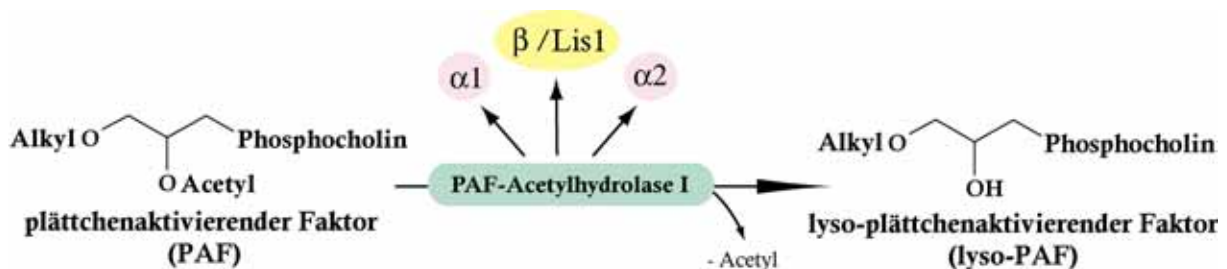


Abbildung 8: Reaktion der PAF-Acetylhydrolase I

Die folgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Differential Displays, in dem die beiden cDNA-Fragmente identifiziert wurden (Abbildung 9):

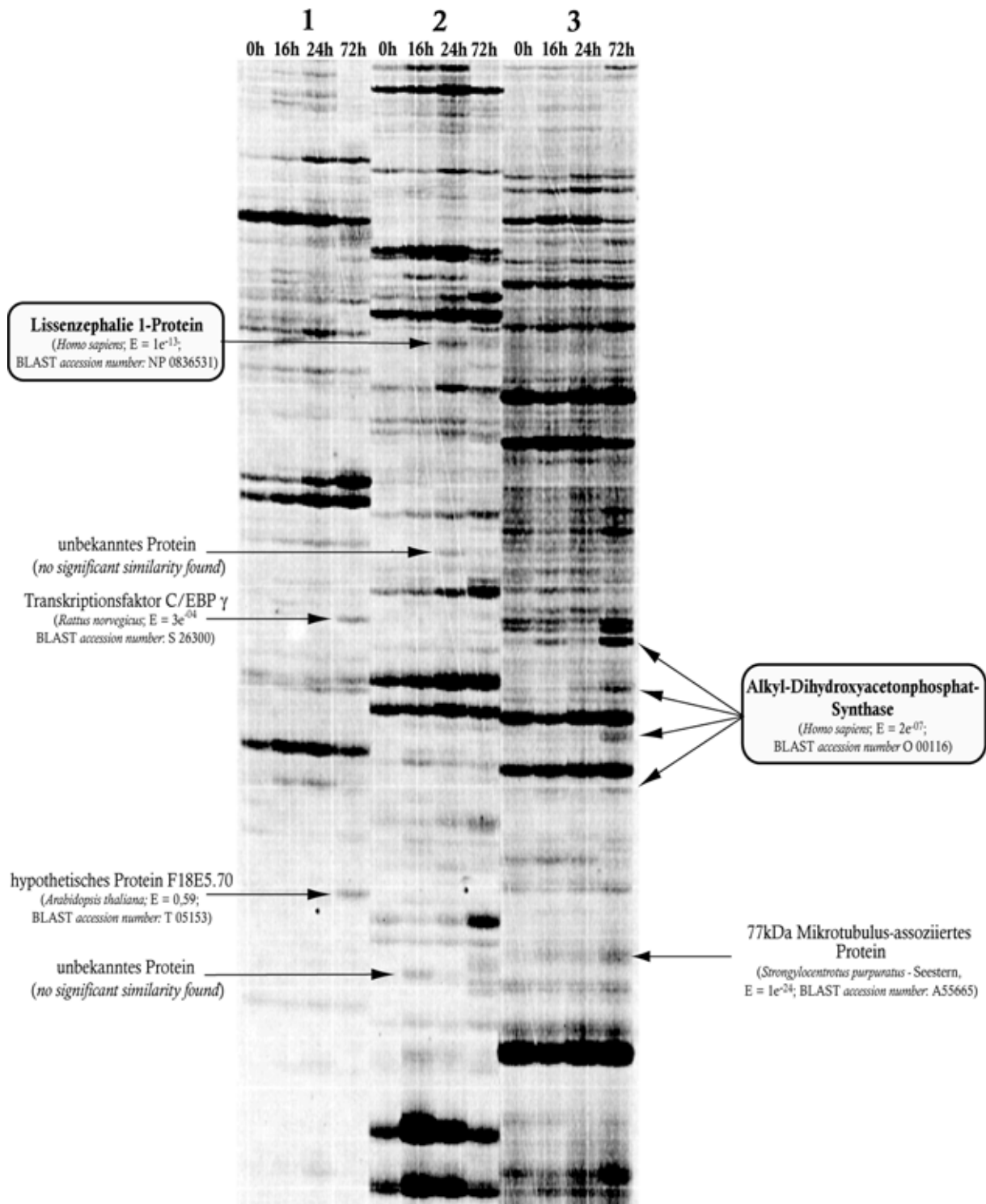


Abbildung 9: Ausschnitt des Differential Displays

Die durch die gleiche Ankerprimer-Arbiträrprimer-Kombination determinierten Amplifikationsprodukte wurden in jeweils vier Spuren zusammengefasst aufgetragen. Die mit Nummer 1 gekennzeichneten Spuren wurden durch die Kombination aus T₁₁CG und dem Arbiträrprimer 1 (5'-CTTGATTGCC-3'), Nummer 2 mit T₁₁GA und Arbiträrprimer 2 (5'-GTGATCGCAG-3') und Nummer 3 mit T₁₁CG und Arbiträrprimer 3 (5'-GTAAGCGATG-3') amplifiziert. Die jeweilige Inkubationszeit ist in Stunden (h) angegeben, wobei der Zeitpunkt 0 h die jeweilige Kontrolle darstellt.

5.2 Klonierung und Charakterisierung der Alkyl-DHAP-Synthase

Die 3'-cDNA-Fragmente mit hoher Homologie zu humaner Alkyl-DHAP-Synthase wurden für die weitere Bearbeitung ausgewählt. Um das fehlende 5'-Ende aus der cDNA-Bibliothek von *S. domuncula* zu amplifizieren, wurden die fragmentspezifischen Rückwärtsprimer ADS Reverse 1 (Nt 1898-Nt 1919) und ADS Reverse 2 (Nt 1871-Nt 1890) konstruiert (4.4.6) und in Kombination mit dem vektorspezifischen Vorwärtsprimer T3 in einer Nested-PCR (5.5.4) eingesetzt. Es gelang ein 1765 Basenpaar langes cDNA-Fragment aus der cDNA-Bibliothek zu amplifizieren, welches nach Klonierung in den pGEM-T-Vektor sequenziert wurde. Dieses Fragment überlappte vollständig mit dem aus dem Differential Display gewonnenen 3'-Ende. Um die Richtigkeit des überlappenden Produktes erneut zu überprüfen, wurde der fragmentspezifische Vorwärtsprimer ADS Forward (Nt 643-Nt 663) konstruiert und in Kombination mit dem vektorspezifischen Rückwärtsprimer T7 in einer Standard-PCR eingesetzt. Auch hier wurde eindeutig gezeigt, dass es sich bei den amplifizierten Teilfragmenten um das 3'- sowie das 5'-Ende des für die Alkyl-DHAP-Synthase-codierenden Gens aus *S. domuncula* handelte. Die cDNA-Sequenz wurde mit SDADS (*S. domuncula* Alkyl-DHAP-Synthase) bezeichnet.

5.2.1 Analyse der Nukleotidsequenz

Die als SDADS bezeichnete cDNA besitzt eine Länge von 2079 Nukleotiden exklusive des Poly(A)-Schwanzes. Der offene Leserahmen umfasst den Bereich von Nt 60-62 (Startcodon) bis Nt 1947-1949 (Stopcodon) und codiert für das 630 Aminosäuren lange Protein, welches im Folgenden als ADS_SUBDO bezeichnet wird.

Ein charakteristisches 3'-Polyadenylierungssignal nach Zarkower *et al.* (1986) konnte nicht identifiziert werden, wenngleich dessen Fehlen ein bei Schwämmen üblicherweise zu beobachtendes Phänomen ist (Pfeiffer *et al.*, 1993a; 1993b). In der Regel werden 3'-Enden eukaryotischer mRNA durch endonucleolytische Spaltung eines mRNA-Vorläufermoleküls (prä-mRNA) und der anschließenden Anbindung eines aus durchschnittlich 250 Adenylatresten bestehenden Poly(A)-Schwanzes modifiziert. Für die Spaltung der prä-mRNA wurde von Zarkower *et al.* das charakteristische Polyadenylierungssignal der Konsensussequenz AAUAAA ermittelt, welches sich zwischen 6 und 26 Nukleotiden vor der eigentlichen Spaltungsstelle der prä-mRNA befinden kann (Zarkower *et al.*, 1986). Ein solches Signalmotiv wurde in Alkyl-DHAP-Synthase aus *S. domuncula* nicht identifiziert, es wurde jedoch demonstriert,

dass durch Punktmutationen innerhalb dieser Konsensussequenz die Polyadenylierungsreaktion nicht komplett unterbunden wird (Montell *et al.*, 1983; Wickens und Stephenson, 1984). Da mRNA von Schwämmen grundsätzlich polyadenyliert ist, existieren möglicherweise noch weitere, bisher unbekannte Mechanismen für die Steuerung dieser posttranskriptionellen Modifikation. In einigen Fällen scheint zwar das Sequenzmotiv TAG..TAGT..TT als Signalsequenz der Polyadenylierung zu dienen (Irninger *et al.*, 1991; Pfeifer *et al.*, 1993a; 1993b), welches aber ebenfalls nicht identifiziert werden konnte.

Das Start-ATG (Nt 60-62) liegt nicht vollständig innerhalb der für die Translationsinitiation bei Wirbeltieren charakteristischen Konsensussequenz GCC(A/G)CCATGG (Kozak, 1978, 1991). Lediglich die das Startcodon flankierenden Positionen - 3 (G) und + 4 (G) stimmen überein. Diese sind jedoch außerordentlich wichtig, da sie die Effizienz der Translation um das Zehnfache steigern können. Die Auswirkung der anderen Basen innerhalb der Konsensussequenz sind demgegenüber als weitaus geringer einzustufen (Lewin, 2002).

Nachfolgend ist die vollständige cDNA der aus *S. domuncula* klonierten Alkyl-DHAP-Synthase sowie das daraus abgeleitete Protein abgebildet (Abbildung 10):

M D S

```

GATCTGTGCAGTAATTGAGCTTTGACTGCGTTTATTCCTCGTCTTGAGCTACTAGAGATGGATTCA 66
T E G T R G S N A A R R L A V L K G H L N S
ACTGAGGGAACACGTGGTTCTAACGCTGCTAGACGTCTAGCTGTGCTCAAGGGGCACCTAAATTCG 132
K Q V Q H S P C N S M Q S S A P M S S S K D
AAGCAAGTCCAACATTCCCACATGCAATTCAATGCAGTCTAGTGCCCTATGTCCAGCAGTAAGGAT 198
E V Q R A F P R E R Q E V L K W N G W G Y K
GAAGTCCAGAGAGCTTTTCCACGAGAGAGACAAGAAGTGCTCAAGTGGAATGGGTGGGGCTACAAA 264
D S G F L I N D K G M A Q F L G K R Y A I G
GACTCTGGCTTCCTCATCAACGACAAAGGAATGGCTCAGTTTCTCGGAAAAAGGTATGCCATAGGT 330
G Q E L P H F R K W M E E N V Q L D L S Q T
GGACAAGAGTTGCCTCACTTCCGTAAGTGGATGGAAGAGAATGTACAAGTGGATCTGTCCCAGACC 396
S F S Q P R P P P E E I P A P I Q P S Q A F
TCATTCTCACAGCCCCGCCCACCTCCAGAGGAGATCCCCGCCCCCATCCAACCCAGTCAAGCGTTC 462
I D E I A H H C K V F T D S A D E R I F R S
ATTGACGAGATAGCACATCACTGCAAGGTTTTTACTGACTCGGCAGATGAACGGATCTTTAGATCT 528
H G H T C H E L F S L R T G K V G R I P D L
CACGGTCACACTTGCCATGAAGTGTCTTCTCGGACTGGTAAGGTTGGACGTATTCCTGACCTC 594
V V W P R S H Q D V E V I V K A A L R H D M
GTGGTCTGGCCTAGATCACATCAGGACGTTGAGGTAATAGTGAAAGCTGCACTCAGACATGACATG 660
C I I P F G G G T N V S G A L L C P P E E E
TGTATCATACATTTGGAGGTGGTACTAATGTGTCTGGTGCTCTGCTGTGTCCCCCTGAGGAGGAG 726
R P I V S L D M T E M D R I L W I D E E N L
CGTCCAATCGTATCGCTGGATATGACCGAGATGGATCGAATACTCTGGATAGACGAGGAAAACCTC 792
T A C I E G G C V G Q D L E R K L G E M G Y
ACAGCTTGATCGAGGGTGGGTGTGTCGGGCAAGACCTTGAACGAAAGCTTGGTGAGATGGGATAT 858
T T G H E P D S L E F S T V G G W V A T R S
ACAACCGGCCATGAGCCAGACTCTCTCGAGTTCAGCACAGTCGGGGGATGGGTAGCCACGAGATCA 924

```

```

S G M K K D V Y G N I E D L V V R V R M V T
TCTGGTATGAAGAAGGATGTGTATGGGAATATAGAGGACCTTGTGGTGAGGGTACGTATGGTGACA 990
P R G T V E R S I L G P R N S V G P D V Q Q
CCCAGGGGAACCGTGGAGAGAAGTATTCTGGGTCCTCGTAACTCCGTTGGACCGGATGTCCAACAA 1056
F V I G S E G I L G V I T E V T M R I R P L
TTTGTATCGGTTCTGAAGGCATATTGGGTGTCATCACAGAGGTAACCATGCGTATCCGCCCACTC 1122
P E V R R Y G S V V F P S F Q P G V E F M R
CCCGAAGTACGACGATACGGTTTCAGTGGTTTTTCCCTCGTTTCAGCCGGGGGTGGAGTTTATGAGG 1188
E V A R Q R C A P A S I R L M D N W Q F Q M
GAAGTTGCTAGGCAACGTTGTGCCCTGCTTCAATTAGACTAATGGACAACCTGGCAGTTTCAAATG 1254
G Q A M K P A A S V F K S F T D A L K K L Y
GGTCAAGCAATGAAGCCAGCTGCTTCTGTTTTCAAGTCATTACAGATGCCCTCAAGAAACTCTAC 1320
V T K F K G F D P Y E M V A C T L L F E G A
GTCACAAAGTTCAAAGGATTTGATCCGTATGAGATGGTCGCCTGTACTCTGTTGTTTGAGGGGGCA 1386
A E E V A I Q E R R I Y E I A A K F G G I P
GCTGAGGAGGTAGCTATCCAGGAGAGGAGAATTTATGAAATAGCTGCCAAATTTGGTGGTATACCA 1452
A G E E N G R R G Y L F T F V I A Y I R D L
GCGGGAGAAGAAAATGGTCGCCGTGGATACCTCTTCACATTTGTCATTGCATACATTAGGGACCTA 1518
G F D Y S Y L A E S F E T S V P W S R V S E
GGATTGCACTACAGTTACCTAGCTGAATCATTTGAAACATCTGTTTCTTGGAGTCGTGTCTCAGAG 1584
L V R N V K D R V R R E C L K H G I G N Q P
CTTGTTTCGTAATGTTAAAGACAGAGTGCGGAGAGAATGTTTAAACACGGCATAGGCAACCAACCT 1650
L I S A R V T Q T Y D A G A C I Y F Y L V F
CTCATATCAGCTAGAGTGACACAAACGTATGATGCAGGTGCCTGTATATACTTCTATCTAGTGTTT 1716
N Y V G N N D P I T A F D E V E T A A R G E
AACTATGTTGGCAATAACGACCCAATTACTGCGTTTGTGAAGTCGAGACGGCAGCCAGAGGTGAG 1782
I L A C G G S L S H H H G V V K I R K R W V
ATATTGGCTTGTGGAGGAAGTCTCTCTCACCACCATGGAGTTGTTAAAAATTCGTAAGCGATGGGTA 1848
E Q T L S R T G V E M L R A I K D R I D P H
GAGCAGACTCTCTCTCGTACTGGAGTGGAGATGCTGAGAGCTATCAAAGATCGCATTGATCCACAT 1914
N I F G A G N L I P N *
AACATATTTGGTGCAGGCAACTTGATCCCAAATTAACACTGATTATTTTTGTATTCTAAAAATGTG 1980
TACATGACTAGAATTTTCGAGGTATATATTTGGCAATCATGAATTTTGTCTTATTTGCTGCC 2046
ATGCTTAACTTTTTATGGTGATTGTTATGCCAAAAAAAAAAAA 2088

```

Abbildung 10: Nukleotidsequenz SDADS und prädiktive Proteinsequenz ADS_SUBDO

Das mutmaßliche Startmethionin und das zugehörige Startcodon (ATG) sind rot markiert; das erste im Leserahmen erscheinende Stop-Codon (TAA) ist grün markiert

5.2.2 Analyse der prädiktiven Proteinsequenz

Anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde das Protein auf in seine physikochemischen Eigenschaften beschreibende Parameter hin analysiert und enthaltene Domänen und Motive identifiziert.

So beträgt das kalkulierte Molekulargewicht des abgeleiteten Proteins ADS_SUBDO 70,584 kDa und der isoelektrische Punkt wurde zu IP = 6,9 ermittelt. Das Protein besteht aus 75 stark basischen (K, R), 78 stark sauren (D, E), 211 hydrophoben (A, I, L, F, W, V) und 143 polaren Aminosäuren (N, C, Q, S, T, Y):

Molekulargewicht	70,584 kDa
Isoelektrischer Punkt	6,9
Anzahl basische Aminosäuren	75
Anzahl saure Aminosäuren	78
Anzahl hydrophobe Aminosäuren	211
Anzahl polare Aminosäuren	143

Das abgeleitete Polypeptid wurde des weiteren mittels einer der SMART-Datenbankanalyse (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) auf konservierte Regionen hin analysiert. Dabei wurden die folgenden Domänen und Motive identifiziert:

Motiv / Domäne	Position
Typ 2-Peroxisomen-Steuersignal (PTS2) (Subramani, 1998)	15-23
FAD / FMN-Dehydrogenase-Domäne (Fraaije <i>et al.</i> , 1999)	145-630
FAD-Bindedomäne (Mattevi <i>et al.</i> , 1997a)	177-341
FAD-gekoppelte Oxidasedomäne (Mattevi <i>et al.</i> , 1997b)	355-627

Die identifizierten Domänen und Motive sollen im Folgenden näher beschrieben werden:

Das PTS2-Steuersignal stellt eine charakteristische Signalsequenz für die Translokation peroxisomaler Proteine dar. PTS2-enhaltende Proteine werden durch die N-terminale PTS2-Konsensussequenz [R]-[L/V/I]-X(5)-[H/Q]-[L/A] von einem Rezeptor der Peroxin-Klasse, welcher durch das Pex 7-Gen codiert wird, erkannt und so in das peroxisomale Kompartiment transloziert (Subramani, 1998; Hettema *et al.*, 1999).

Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) dient als prosthetische Gruppe bei enzymatischen Redoxreaktionen. In FAD-abhängigen Oxidoreduktasen kann es kovalent an einen Histidin-Rest über eine 8- α -(N³-histidyl)-FAD-Bindung innerhalb einer konservierten FAD-Bindedomäne gebunden sein. Eine solche Domäne wurde auch in ADS_SUBDO identifiziert. Durch Mutationsstudien der humanen Alkyl-DHAP-Synthase konnte gezeigt werden, dass einige Aminosäuren für die FAD-Bindung und damit die enzymatische Aktivität besonders wichtig sind (de Vet *et al.*, 2000). Im Falle des Schwammenzyms sind dies die Histidin-Reste H271, H585, H586 und H587 sowie der Serin-Rest S338.

Die C-terminale FAD-abhängige Oxidasedomäne zeigt Ähnlichkeit zu dem korrespondierenden Bereich von Vanillylalkohol-Oxidase (VAO, EC 1.1.3.38), welche eine Reihe von Substraten (beispielsweise aromatische Amine oder 4-Alkylphenole) oxidieren kann.

In dem folgenden Aminosäuresequenz-Alignment zwischen dem prädiktiven Protein ADS_SUBDO und der humanen Alkyl-DHAP-Synthase (BLAST *accession number* NP 003650.1; Wanders *et al.*, 1994) sind die charakteristischen Domänen sowie die für die FAD-Bindung essentiellen Aminosäurereste eingezeichnet (siehe Abbildung 11):

ADS SUBDO :	MDSTEGTRGSN-----AARRLAVLKGHNLN----	: 24
ADS_HUMAN :	MAEAAAAAGGTGLGAGASYGSAADRDRDPDPDRAGRLRLVLSGHLLGRPR	: 50
PTS2-Steuersignal		
ADS SUBDO :	---SKOVQHSPCNSMQSSAPMSSSKDEVQRAFPFRERQEVWKWNGWGYKD	: 70
ADS_HUMAN :	EALSTNECKARRAASAATAAPTATPAAQESGTIPKKRQEVWKWNGWGYND	: 100
ADS SUBDO :	SGFLINDKGMAGFLGKRYAIGGQELPHFRKWMEEENVOLDLSQTSFSQPRP	: 120
ADS_HUMAN :	SKFLFNKKGQIELTGKRYPLSGMGLPTFKEWIQNTLGVNVEHKTTSKASL	: 150
ADS SUBDO :	PFEIIPAPIQPSQAFIDEIAHHCKVFTDSADERIFRSHGHTCHELFSLRRT	: 170
ADS_HUMAN :	NPSDTPPSVFN-EDFLHDLKETNISYSQEAADDRVFRAHGHCLHEIFLLRE	: 199
ADS SUBDO :	GKVGRIPLDVVWPRSHQDVEVIVKAALRHDMCIIFGGGTINVSGALLCPP	: 220
ADS_HUMAN :	GMFERIPDIVLWPTCHDDVVKIVNLACKYNLCIIFGGGTSVSYGLMCPA	: 249
FAD-Bindedomäne		
ADS SUBDO :	BEERPIVSLDMTEMDRILWIDEENLTACIEGGCVGDLEKLGEMGYTTG	: 270
ADS_HUMAN :	DETRTIISLDTSQMNRILWVDENNLTAHVEAGITGQELERQLKESGYCTG	: 299
ADS SUBDO :	HEPDSLEFSTVGGWVATRSSGMKKDVYGNIEDLVVRVMVTPRGTVVERSI	: 320
ADS_HUMAN :	HEPDSLEFSTVGGWVSTRASGMKKNIYGNIEDLVVHIKMVTPRGIIEKSC	: 349
ADS SUBDO :	LGPNSVGPDVQCFVIGSEGLGVITEVTMRIRPLPEVRRYGSVVFPSFO	: 370
ADS_HUMAN :	OGPRMSTGPDIIHFIIMGSEGLGVITEATIKIRPVPEYQKYGSVAFPNFE	: 399
ADS SUBDO :	PGVEFMREVARQRCAPASIRLMDNWQFQMGCAMKFAAS-VFKSFTDALKK	: 419
ADS_HUMAN :	QGVACLREIAKORCAPASIRLMDNKQFQFGHALKQVSSIFTSFLDGLKK	: 449
ADS SUBDO :	LYVTKFKGFDPYEMVACTLLFEGAAAEVAIQERRIYEIAAKFGGIPAGEE	: 469
ADS_HUMAN :	FYVTKFKGFDPNQLSVATLLFEGDREKVLQHEKQVYDIAAKFGGLAAGED	: 499
ADS SUBDO :	NGRRGYLFTFVIAYIRDLGFDYSYLAESFETSVPSRVSELVRNVKDRVR	: 519
ADS_HUMAN :	NGORGYLITYVIAYIRDLALEYVVLGESFETSAPWDRVVDLCRNVKERIT	: 549
FAD-Oxidasedomäne		
ADS SUBDO :	RECLKHGIGNQPLISARVTQTYDAGACIYFYLVFNVVGNNDPITAFDEVE	: 569
ADS_HUMAN :	RECKEKGVQFAPFSTCRVTQTYDAGACIYFYFAFNVRGISDPLTVFEQTE	: 599
ADS SUBDO :	TAARGEILACGGSLSHHHGVVKIRKRWEQTLSTRTGVEMLRAIKDRIDPH	: 619
ADS_HUMAN :	AAAREEILANGGSLSHHHGVVKLRKQWLKESISDVGFGLKSVKEYVDEN	: 649
ADS SUBDO :	NIFGAGNLIPN :	: 630
ADS_HUMAN :	NIFGNRNLL--	: 658

Abbildung 11: Alignment von ADS_SUBDO und humaner Alkyl-DHAP-Synthase

Konservierte Aminosäuren sind schwarz (100 % Identität) und grau (60 % Identität) unterlegt. Die charakteristischen Domänen sind grün (PTS2-Steuersignal), blau (FAD-Bindedomäne) und rot (FAD-Oxidasedomäne) gekennzeichnet. Die für die FAD-Bindung und Aktivität wichtigen Reste sind H271 (●), S338 (□) sowie H585, H586 und H587 (■).

Wie bereits im Sequenzalignment zu erkennen ist, besteht eine außerordentliche Sequenzähnlichkeit zwischen dem Schwammprotein und dem humanen Polypeptid. 51 % der Aminosäuren sind dabei identisch, während 70 % Aminosäuren ähnlich nach physikalisch-chemischen Gesichtspunkten sind (siehe auch phylogenetischer Stammbaum unter 5.2.3).

Anschließend wurde die Sequenz nach Stellen möglicher, posttranslationaler Modifikation durch eine PROSITE-Datenbankanalyse (Bairoch *et al.*, 1992; Falquet, 2002) hin untersucht. Sie sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Posttranslationelle Modifikation	Signatur	mögliche Positionen
N-Glycosylierung von Asparagin	[N]-X-[ST] (Gavel und Heijne, 1990; Miletich und Broze, 1990)	211-214, 244-247
N-Myristylierung von Glycin	[G]-[EDRKHPFYW]-X(2)-[STAGCN] (Towler <i>et al.</i> , 1988; Grand, 1989)	6-11, 21-25, 207-212, 251-256, 282-287, 462-467, 580-585
Phosphorylierung von Serin/Threonin durch Proteinkinase C (PKC)	[ST]-X-[RK] (Kishimoto <i>et al.</i> , 1985; Woodget <i>et al.</i> , 1986)	44-46, 167-169, 170-172, 311-313, 349-351, 388-390, 534-536
Phosphorylierung von Serin/Threonin durch Caseinkinase 2	[ST]-X(2)-[DE] (Pinna, 1990)	44-47, 149-152, 161-164; 185-188, 232-235, 269-272, 412-415, 563-566, 604-607
Phosphorylierung von Tyrosin durch Tyrosinkinase	[RK]-X(2)-[DE]-X(3)-[Y] oder [RK]-X(3)-[DE]-X(2)-[Y] (Patschinsky <i>et al.</i> , 1982; Hunter, 1982; Cooper <i>et al.</i> , 1984)	260-267, 353-361
Amidierung einer beliebigen Aminosäure X	X[G][RK][RK] (Kreil, 1984; Bradbury und Smyth, 1987)	84-87, 470-473

Im Folgenden sollen die identifizierten Modifikationsmöglichkeiten etwas näher beschrieben werden:

Die N-Glycosylierung eines Asparagin-Restes ist charakteristisch für Proteine, die den Sekretionsapparat passieren und stellt eine für das membranständige Protein Alkyl-DHAP-Synthase wahrscheinliche, posttranslationelle Modifikation dar. Die Glycosylierung erfolgt in aller Regel durch Übertragung der Oligosaccharid-Gruppe von Dolichol auf die Aminogruppe des Asparagins und wird durch eine Glycosyltransferase katalysiert (Lewin, 2002).

Desweiteren wäre die kovalente Verknüpfung von Myristinsäure (N-Myristylierung) an Glycin-Reste denkbar, da diese Modifikation ebenfalls der Verankerung von Proteinen in Membranen dient. Sie erfolgt jedoch in aller Regel an einem außenliegenden, N-terminalen Glycinrest, doch obwohl insgesamt sieben N-Myristylierungsstellen identifiziert wurden, ist diese Modifikation nur am Glycin in Position 6 nach Abspaltung der Aminosäuren 1-5 denkbar. Eine solche Abspaltung von Aminosäuren, die vor einem modifizierbaren Glycin liegen, ist bei ubiquitär vorkommenden Src-Tyrosinkinasen beobachtet worden. Hierbei erfolgt die kovalente Verknüpfung an der zweiten Position des N-Terminus nach Abspaltung des Startmethionins (Berg *et al.*, 2003).

Darüber hinaus wurden insgesamt 18 Phosphorylierungsstellen identifiziert. Die esterartige, kovalente Anknüpfung von Phosphatresten ist die wichtigste Modifikation zur Steuerung der Aktivität von Enzymen, wobei sowohl eine Aktivierung als auch eine Inaktivierung durch Phosphorylierung resultieren kann. Auch die Regulation der Signalübertragung und der Transkription wird in vielen Fällen durch den Phosphorylierungsstatus der beteiligten Adapterproteine oder der Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Die gezielte Phosphorylierung der Alkyl-DHAP-Synthase ist demnach ein wahrscheinlicher Regulationsmechanismus ihrer Enzymaktivität.

5.2.3 Phylogenetischer Vergleich mit verwandten Genprodukten

Die Konstruktion eines phylogenetischen Stammbaumes ermöglicht es, basierend auf Sequenz-Alignments der aus verschiedenen Organismen isolierten Proteinen sowohl Aussagen über die stammesgeschichtliche Entwicklung der betreffenden Proteine als auch über ihre evolutionäre Verwandtschaft zu treffen (4.15.3). Darüber hinaus ist die

Abgrenzung eukaryotischer von prokaryotischen Polypeptiden möglich und liefert im Fall der Schwämme Hinweise auf den „Besitzer“ des jeweiligen Gens.

Der im Folgenden abgebildete, phylogenetische Stammbaum basiert auf den PAM-Substitutionsmatrices (Dayhoff *et al.*, 1978). Das Alignment wurde mit *Clustal X* 1.81 (Thompson *et al.*, 1997) und die graphische Darstellung des Stammbaums mit *Treeview* 1.6.6 erstellt (siehe Abbildung 12, Seite 91).

Der phylogenetische Vergleich der Alkyl-DHAP-Synthase aus *S. domuncula* (ADS-SUBDO) mit verwandten Proteinen anderer Organismen aus der Datenbank *Genebank* zeigt, dass das Schwamm-Protein die größte Ähnlichkeit zu den Polypeptiden der Metazoa aufweist. Die engste stammesgeschichtliche Verwandtschaft unter Berücksichtigung identischer und physikochemisch-ähnlicher Aminosäuren besteht zwischen dem Schwamm-Protein und dem homologen Protein aus *Homo sapiens* (51 % identische und 70 % ähnliche Aminosäuren). Auch ist die phylogenetische Verwandtschaft zu anderen Alkyl-DHAP-Synthasen vielzelliger Tiere wie *Drosophila melanogaster* (49 % identische und 63 % ähnliche Aminosäuren) und *Dictyostelium discoideum* (29 % identische und 46 % ähnliche AS) relativ hoch. Daneben verdeutlicht der phylogenetische Vergleich jedoch auch, dass die Verwandtschaft zu ähnlichen aber in ihrer Funktion unterschiedlichen Proteinen wie den D-Lactat-Dehydrogenasen aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (16 % identische und 33 % ähnliche Aminosäuren) und der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (18% identische und 34 % ähnliche Aminosäuren) sowie einem Flavoprotein des Aktinobakteriums *Streptomyces coelicolor* (27 % identische und 42 % ähnliche Aminosäuren) wesentlich geringer ist.

Diese Tatsachen belegen die Zugehörigkeit des Schwamm-Enzyms zu den Enzymen der Metazoa und grenzen das Polypeptid eindeutig von bakteriellen, pflanzlichen oder aus Pilzen klonierten Proteinen ab.

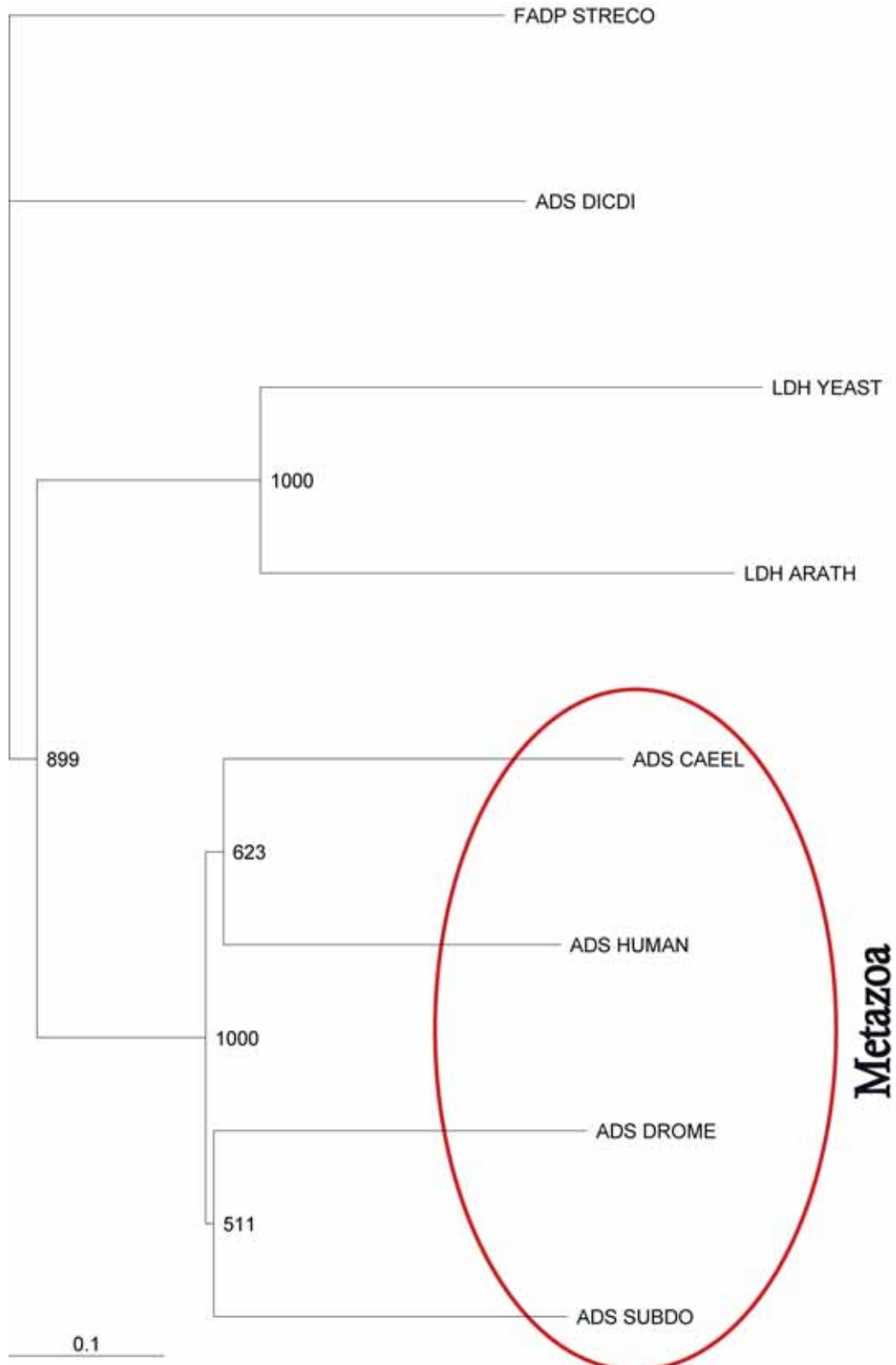


Abbildung 12: Phylogenetischer Stammbaum von ADS_SUBDO

Das Schwamm-Protein wurde mit verschiedenen Proteinen anderer Metazoa wie *C. elegans* (ADS CAEEL, NP 497185; De Vet *et al.*, 1998), *D. melanogaster* (ADS DROME; NP 611006; Adams *et al.*, 2000), *H. sapiens* (ADS HOMO; NP 003650.1; Wanders *et al.*, 1994) und *D. discoideum* (ADS DICDI; O 96759; De Vet und van den Bosch, 1998) sowie der verwandten D-Lactat-Dehydrogenase aus *S. cerevisiae* (LDH YEAST; CAA 46852; Lodi und Ferrero, 1993), *A. thaliana* (LDH ARATH; NP 568170) und einem Flavoprotein aus *Streptomyces coelicolor* (FADP STRECO; CAB 61185) verglichen. Die Skala bezeichnet den evolutionären Abstand von 0,1 Aminosäuresubstitution pro Position in der Sequenz.

5.3 Klonierung und Charakterisierung des Lissenzephalie 1-Gens

Das im Differential Display identifizierte, 360 Nukleotide lange 3'-Fragment mit hoher Homologie zu dem humanen Lissenzephalie 1-Gen (BLAST *accession number* NP 000421.1), wurde ebenfalls für die weitere Bearbeitung ausgewählt. Um das fehlende 5'-Ende aus der cDNA-Bibliothek von *S. domuncula* zu amplifizieren, wurden zunächst die fragmentspezifischen Rückwärtsprimer LIS 1 *Reverse* 1 (Nt 1898–Nt 1919) und LIS 1 *Reverse* 2 (Nt 1871–Nt 1890) konstruiert und in Kombination mit dem vektorspezifischen Vorwärtsprimer T3 unter Anwendung der Nested-PCR (5.5.4) eingesetzt. Die Überlappung mit dem aus dem Differential Display gewonnen 3'-Teilfragment wurde durch erneute Sequenzierung und Sequenzvergleich mit der BLAST-Datenbank bestätigt.

5.3.1 Analyse der Nukleotidsequenz

Die für das Lissenzephalie 1-Gen codierende, als SDLIS1 bezeichnete cDNA, besitzt eine Länge von 1759 Nukleotiden. Aufgrund variabler Länge des Poly(A)-Schwanzes wurde dieser nicht eingerechnet. Der offene Leserahmen umfaßt den Bereich von Nt 145-147 (Startcodon) bis Nt 1390-1392 (Stopcodon) und codiert für das 416 Aminosäuren lange Protein, welches im Folgenden mit LIS1_SUBDO bezeichnet wird.

Ein 3'-Polyadenylierungssignal nach Zarkower *et al.* (1986) wurde nicht identifiziert. Das Start-ATG (Nukleotide 145-147) liegt nicht innerhalb der vollständigen für die Translationsinitiation bei Wirbeltieren charakteristischen Konsensussequenz nach Kozak (Kozak 1978, 1991). Lediglich die wichtige, das Startcodon flankierende Position - 3 (A) ist enthalten.

Die folgende Abbildung zeigt die cDNA-Sequenz und das abgeleitete Aminosäuresequenz des aus *S. domuncula* klonierten Lissenzephalie 1-Proteins (Abbildung 13):

```
CCTTTGGACAGTCTAGACAGTGACAGGTTAATAGTACGTACTATACTGTACACACCGAGCACTAGG 66
GCAGACAGGCCGTCCTACTCTGCCTACAAACACTTATACAGTAGTCTGCAGGAAATGCCAGCAGTAGG 132
      M  S  N  A  K  F  T  L  S  T  R  Q  K  V  E  L  N  S
GACCATTTTAAATGAGCAACGCAAAGTTTACTCTTTCAACAAGACAGAAGGTGGAGCTTAAGTCT 198
A  I  S  E  Y  L  H  S  Q  G  Y  N  E  S  V  E  C  F  R  K  E  A
GCCATATCTGAGTACCTTCACTCACAAGGCTACAATGAGTCAGTCGAATGCTTTTCGAAAGAAGCT 264
D  L  R  D  T  G  S  N  S  K  Y  V  G  L  L  E  K  K  W  T  S  V
GATTTGAGAGATACGGGTCCAATTCAAAGTATGTTGGCCTACTAGAGAAGAAATGGACATCTGTC 330
I  R  L  Q  K  K  V  M  D  L  E  Q  K  L  S  E  I  Q  K  E  V  V
ATCCGGCTACAGAAGAAGGTCATGGACCTTGAACAAAAGCTTTTCAGAAATACAGAAGGAAGTGGTC 396
E  G  G  A  T  R  K  T  R  L  A  T  D  W  I  P  R  P  P  E  R  Y
GAAGGCGGTGCCACACGGAACAGGCTGGCTACAGACTGGATACCCAGGCCACCAGAAAGGTAC 462
E  L  T  G  H  R  A  P  I  S  T  V  I  F  H  P  V  Y  S  L  A  V
```

```

GAATTAACAGGACATAGGGCACCCATCTCTACAGTAATTTTCCATCCTGTGTACAGTTTAGCAGTA 528
S C S E D A T I K V W D Y E T G D F E R T M
TCATGTTTCTAGAGATGCGACAATTAAGGTATGGGATTATGAGACTGGAGACTTTGAGAGAACAATG 594
K G H T D S V Q D L A F D H T G K L L A S C
AAAGGTCACACAGATTCTGTGCAGGACTTGGCATTTCGATCACACTGGAAAGTTATTAGCGTCATGC 660
S A D M S I R L W D F T T Y E C V R T L Q G
TCAGCAGCATGTCTATTAGACTGTGGGATTTTACAACTACGAGTGTGTCCGGACATTGCAAGGT 726
H D H N V S S V C F M P S G D F L M S C S R
CACGACCACAATGTCTCGTCTGTGTGCTTTATGCCCTCAGGGGACTTTCTCATGTTCATGTTCCCGA 792
D K T I K M W E V A T G Y C V K T Y V G H R
GATAAGACCATCAAGATGTGGGAGGTAGCCACTGGGTATTGTGTGAAGACATATGTTGGTTCACAGA 858
E W V R E V R V S P D G S L L A S C S S D Q
GAGTGGGTCTAGAGAGGTCTAGAGTCCAGATGGCTCTCTACTAGCCAGCTGCTCAAGTGACCAG 924
T V R V W V A S T K E C K A E L R G H E H V
ACTGTGAGAGTGTGGGTGGCCTCAACTAAGGAGTGTAAGGCGGAGTTGAGAGGTCATGAACATGTC 990
V E A I A W A P D V A L P H I A E A C G I E
GTGGAGGCAATAGCCTGGGCACCTGACGTGGCACTGCCTCATATCGCAGAGGCATGTGGTATCGAG 1056
H K K G G P A P G P F L I S G S R D K T I K
CATAAAAAAGGAGGTCTGCTCCCGGTCCTTTCTCATCTCTGGCTCCAGAGACAAGACCATCAAG 1122
L W D A L T G V C L L T L I G H D N W V R G
CTGTGGGATGCACTCACAGGAGTCTGTCTATTAACACTGATTGGCCATGATAACTGGGTACGAGGG 1188
L T F H P G G G K V I I S V S D D K T L R I
TTGACCTTTACCCCTGGTGGTGGGAAGGTGATCATTAGTGTATCAGATGATAAGACATTACGAATC 1254
W D Y K N H R C R K T L E A H T H F V T S L
TGGGACTACAAGAACCATCGCTGTGCGAAGACACTAGAAGCACACACATTTTGTAACTTCACTT 1320
D F H K S A P Y V V T G S V D Q T V K I W E
GATTTCCACAAGTCAGCTCCGTATGTTGTGACTGGTAGCGTGACCAAACTGTTAAATATGGGAG 1386
C R *
TGTCGTTAGAAAGGTTTGCATGTCTAGCTCAAATAGAACTTTTAGGTCCTTGAAAAAGAAACA 1452
AAACAGACTATCGACATGACATGACAGCAAAGATTCTGTACTAATTATTATTATTTGACCCTGTT 1518
TCCTGCATAACTGTGTGCATATGTACAGTGTGCTGGTCTCCTTGTAGGATGTTTGTCTATTGTAA 1584
TGTACATAATAGTGCCTTATGTAAACATAACAGATCTTAGTTTTTGTACTATTGTATGCATACG 1650
TATGCATGGAAAGTGTTACATGAGCTTTCCATGTAATTACTGTTGTTGTTATGTAGCTACTCTGCT 1716
GCTGTGCTTGTATTACATGTGTTTGAACGTGGTACACCTGCTCAAAAAAAAAAAAAA 1774

```

Abbildung 13: Nukleotidsequenz SDLIS1 und prädiktive Proteinsequenz ADS_LIS1

Das mutmaßliche Startmethionin und das zugehörige Startcodon (ATG) sind rot markiert; das erste im Leserahmen erscheinende Stop-Codon (TAG) ist grün markiert.

5.3.2 Analyse der prädiktiven Aminosäuresequenz

Anhand der vorhergesagten Aminosäuresequenz wurden die das Protein in seinen physikochemischen Eigenschaften beschreibenden Parameter vorhergesagt und die enthaltenen Domänen und Motive identifiziert. Das kalkulierte relative Molekulargewicht beträgt 46,823 kDa und der isoelektrische Punkt wurde zu IP = 7,4 ermittelt. Das Protein enthält 53 stark basische (K, R), 53 stark saure (D, E), 136 hydrophobe (A, I, L, F, W, V) und 108 polare Aminosäuren (N, C, Q, S, T, Y).

Molekulargewicht	46,823 kDa
Isoelektrischer Punkt	7,4
Anzahl basische Aminosäuren	53
Anzahl saure Aminosäuren	53
Anzahl hydrophobe Aminosäuren	136
Anzahl polare Aminosäuren	108

Das abgeleitete Polypeptid wurde durch eine SMART-Datenbankanalyse (<http://smart.emblheidelberg.de/>) auf konservierte Regionen hin analysiert. Dabei wurden charakteristische Domänen und Motive identifiziert:

Motiv / Domäne	Positionen
Lis-homologes Motiv (LisH) (Emes und Pointing, 2001)	12-44
superspiralisierte Region (Tai <i>et al.</i> , 2002)	64-86
WD 40-Motive (Neer <i>et al.</i> , 1994)	101-140, 143-182 185-224, 227-266 269-329, 332-372 375-414

Im Folgenden werden die identifizierten Domänen und Motive etwas näher beleuchtet:

Das im N-Terminus des Proteins lokalisierte Lis-homologe Motiv (LisH) ist ein ubiquitär vorkommender α -helikaler Bereich und wurde bisher in über 114 eukaryotischen Proteinen identifiziert (Emes und Pointing, 2001). Es ist an der Dimerisierung des Lissenzephalie 1-Proteins mit dem katalytischen Homodimer der PAF-Acetylhydrolase I beteiligt (Kim *et al.*, 2004).

Superspiralisierte α -Helices (*coiled coils*) sind weitverbreitete, strukturgebende Bereiche ubiquitär vorkommender Proteine wie dem Fibrin in Blutgerinnseln oder dem Keratin der Haare. Tai *et al.* (2002) fanden heraus, dass dieses Strukturmotiv, welches sich im

Lissenzephalie 1-Protein aus *S. domuncula* von Position 68 bis 86 erstreckt, ebenfalls an der Anlagerung von Lis1 an seine Bindungspartner beteiligt sein kann.

Das LIS 1-Protein gehört der Familie der WD 40-Proteine an, zu der 29 weitere Polypeptide gerechnet werden. Diese sind durch das Vorhandensein von vier bis acht sogenannter WD 40-Einheiten gekennzeichnet, welche durch die charakteristische Signatur {X₅₋₉₄—[GH—X₂₃₋₄₁—WD]} beschrieben wird (Neer *et al.*, 1994). Dieses Motiv besteht aus einem konservierten Kernbereich von 27 bis 45 Aminosäuren, deren äußere Begrenzung die beiden Dipeptidsequenzen GH (Glycin und Histidin, Begrenzung in Richtung N-Terminus) und WD (Tryptophan und Asparagin; Begrenzung in Richtung C-Terminus) darstellen. Zwei solcher Einheiten können von einer variablen Oligopeptidregion separiert sein, die aus 6 bis 94 Aminosäuren aufgebaut ist.

WD 40-Proteine können entweder ausschließlich aus WD 40-Einheiten aufgebaut sein (Guillemot *et al.*, 1989; Pryer *et al.*, 1993) oder aus einer unterschiedlichen Anzahl von WD 40-Motiven und einem bis zu 600 Aminosäuren langen, WD 40-freien Bereich bestehen (Hattori *et al.*, 1994). Zu letzteren zählt auch das aus *S. domuncula* klonierte Lissenzephalie 1-Protein, in dem sieben WD 40-Motive identifiziert wurden.

Für WD 40-Motive-enthaltende Proteine wurde eine Beteiligung an Prozessen der Signaltransduktion, der Transkriptionsregulation oder der Organisation des Cytoskeletts nachgewiesen. So zählen beispielsweise die β -Untereinheit von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Fong *et al.*, 1986), das Aktin-bindende Protein Coronin aus *D. discoideum* (de Hostos *et al.*, 1991) oder der Transkriptionsregulator TUP1 aus *S. cerevisiae* (Williams und Trumbly; 1990; Garcia-Higuera *et al.*, 1996) zu dieser Proteinfamilie.

Im folgenden Aminosäuresequenz-Alignment ist das aus *S. domuncula* klonierte Lissenzephalie 1-Protein mit dem homologen Protein aus *H. sapiens* (LIS1_HOMO; BLAST *accession number* P 43034) verglichen und die charakteristischen Domänen und Motive farblich gekennzeichnet (Abbildung 14). Bemerkenswert ist die außerordentlich große Sequenzähnlichkeit zwischen dem Schwamm-Protein und dem humanen Protein, wobei 69 % der Aminosäuren identisch und 82 % der Aminosäuren ähnlich in Bezug auf ihre physikochemischen Eigenschaften sind (siehe auch phylogenetischer Stammbaum; 5.3.3 auf Seite 100).

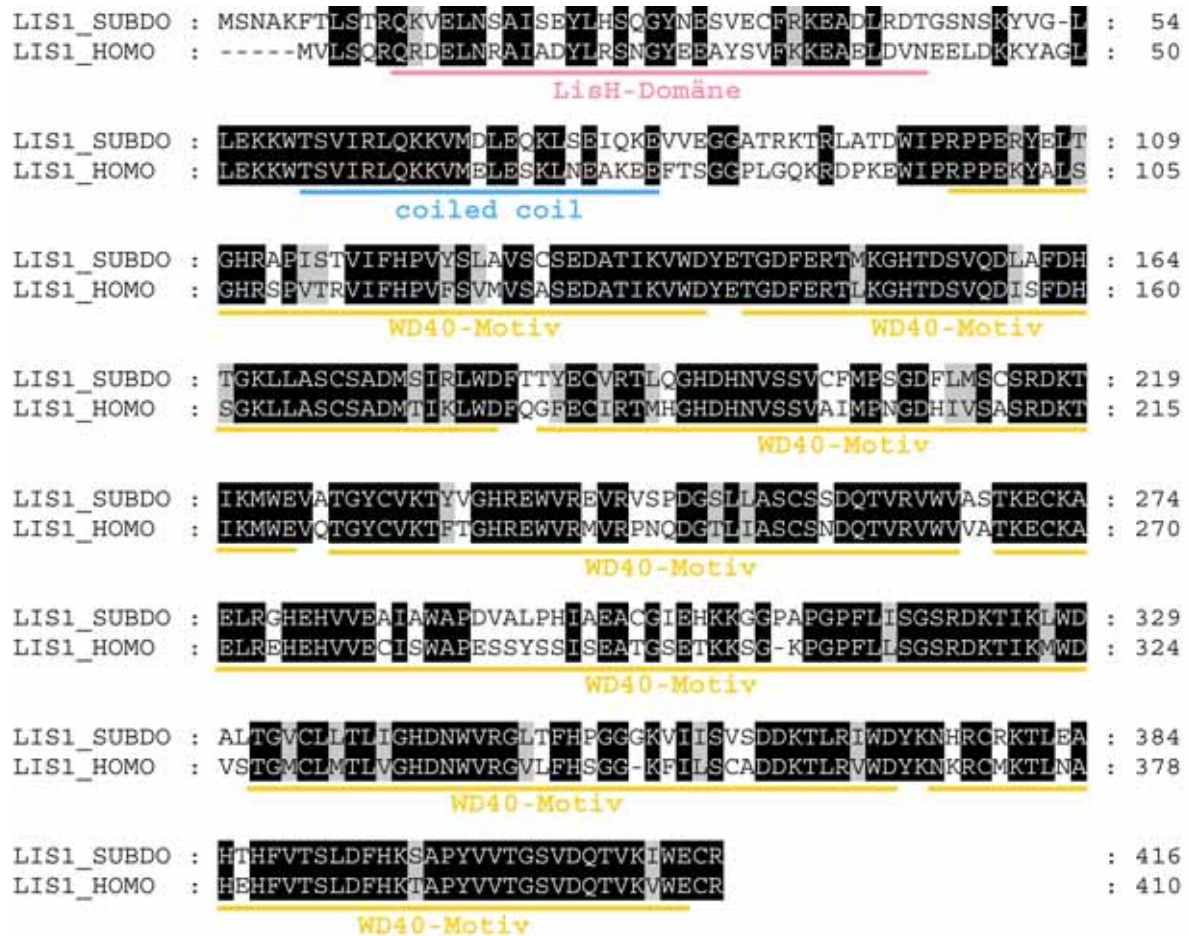


Abbildung 14: Alignment von Lis1_SUBDO und dem humanem Lis1-Protein

Die konservierten Aminosäuren sind schwarz (100% Identität) und grau (80% Identität) unterlegt. Die charakteristischen Domänen sind gekennzeichnet: LisH-Domäne (violett); superspiralisierte *coiled coil* – Region (türkis) und sieben WD 40-Motive (gelb).

Das prädiktive Protein wurde außerdem auf Stellen möglicher, posttranslationaler Modifikationen mittels einer PROSITE-Datenbankanalyse untersucht (Bairoch *et al.*, 1992; Falquet *et al.*, 2002). Dabei wurden die folgenden Modifikationspositionen identifiziert:

Posttranslationelle Modifikation	Signatur	mögliche Positionen
N-Glycosylierung von Asparagin	[N]-X-[ST] (Gavel und Heijne, 1990; Miletich und Broze, 1990)	30-33; 198-201
N-Myristylierung von Glycin	[G]-[EDRKHPFYW]-X(2)-[STAGCN] (Towler et al., 1988; Grand, 1989)	250-255
Phosphorylierung von Serin/Threonin durch Proteinkinase C (PKC)	[ST]-X-[RK] (Kishimoto <i>et al.</i> , 1985; Woodget <i>et al.</i> , 1986)	9-11, 89-91 135-137, 149-151 165-167, 177-179 219-221, 261-263 286-270, 324-326 367-369, 409-411
Phosphorylierung von Serin/Threonin durch Caseinkinase 2	[ST]-X(2)-[DE] (Pinna, 1990)	129-132, 156-159 184-187, 268-271 361-364, 390-393
Phosphorylierung von Tyrosin durch Tyrosinkinase	[RK]-X(2)-[DE]-X(3)-[Y] oder [RK]-X(3)-[DE]-X(2)-[Y] (Patschinsky <i>et al.</i> , 1982; Hunter, 1982; Cooper <i>et al.</i> , 1984)	179-186
Phosphorylierung von Serin/Threonin durch eine cAMP/cGMP-abhängige Proteinkinase	[RK]-(2)X-[ST] (Fremisco <i>et al.</i> , 1980; Glass und Smith, 1983; Glass <i>et al.</i> , 1986)	57-60

Die N-Glycosylierung von zwei Asparagin-Resten in dem Schwammprotein ist möglich, obwohl dieses nicht membranständig zu sein scheint. Auch eine N-Myristylierungsstelle konnte identifiziert werden, obwohl diese Modifikation an Position 250 wenig wahrscheinlich ist, da in aller Regel N-Myristoylierungen zwecks Verankerung von Proteinen in Biomembranen an N-terminal lokalisierten Glycinresten erfolgt (Berg *et al.*, 2003). Bei Lis1 handelt es sich um ein stark phosphoryliertes Protein (Sapir *et al.*, 1997; 1999b). Diese Tatsache stimmt mit den zahlreichen, insgesamt 20, identifizierten Phosphorylierungsstellen überein.

5.3.3 Phylogenetische Analyse mit verwandten Genprodukten

Der phylogenetische Vergleich des Schwammproteins mit verwandten Genen aus der Datenbank *GenBank* zeigt eine hohe entwicklungsgeschichtliche Verwandtschaft mit anderen Proteinen der Metazoa und nur geringe Ähnlichkeit zu Polypeptiden aus Organismen wie Pflanzen, Bakterien, Pilzen oder Algen (Abbildung 15):

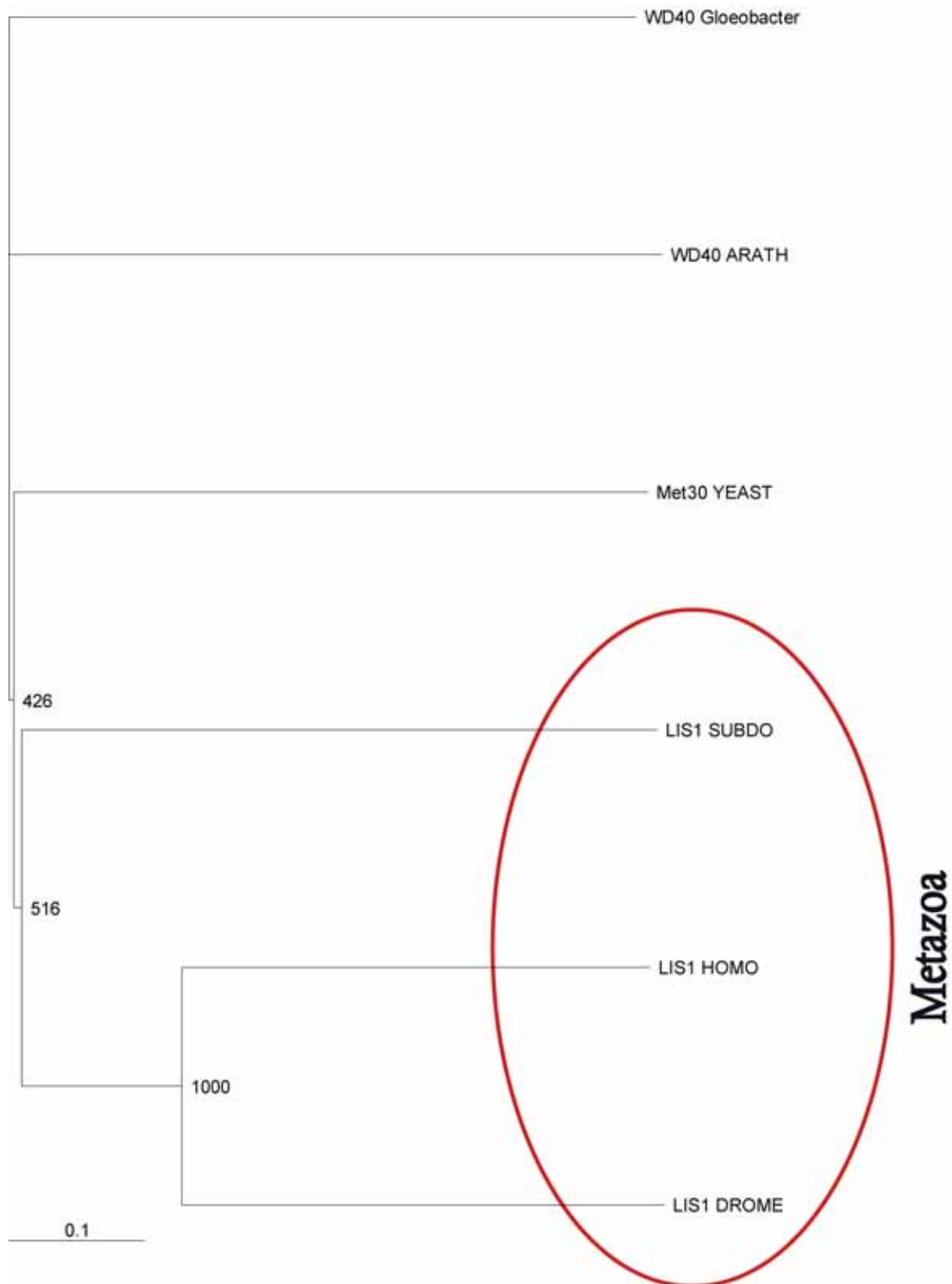


Abbildung 15: Phylogenetische Verwandtschaft von LIS1_SUBDO

Das Schwamm-Protein wurde mit verwandten Proteinen anderer Metazoa wie *Homo sapiens* (LIS1 HOMO, NP 000421.1) und *Drosophila melanogaster* (LIS1 DROME, NP 477160) sowie mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Met30 YEAST, AAA 96717), der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (WD 40 ARATH, NP 190535) und der Grünalge *Gloeobacter violaceus* (WD 40 GLOEO, NP 924911.1) verglichen. Die Skala bezeichnet den evolutionären Abstand von 0,1 Aminosäuresubstitution pro Position in der Sequenz.

Aus dem phylogenetischen Stammbaum ist zu ersehen, dass das Schwamm-Protein unter Berücksichtigung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der enthaltenen Aminosäuren die evolutionär engste Verwandtschaft zu dem Lissenzephalie 1-Protein aus *H. sapiens* besitzt. Insgesamt 69 % der enthaltenen Aminosäuren sind identisch und 82 % der Aminosäuren sind ähnlich bezüglich ihrer physikochemischen Eigenschaften. Enge Verwandtschaft besteht ebenfalls zu dem Lis 1-Protein aus *Drosophila melanogaster* (65 % identische und 81 % ähnliche Aminosäuren). Nur eine äußerst geringe Sequenzähnlichkeit und demnach nur entfernte Verwandtschaft besteht hingegen zwischen dem Protein aus *S. domuncula* und dem WD 40-Protein Transducin aus *Arabidopsis thaliana* (21 % identische und 35 % ähnliche Aminosäuren), dem Met 30-Protein der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (17 % identische und 27 % ähnliche Aminosäuren) sowie dem WD 40-Protein der Grünalge *Gloeobacter violaceus* (10 % identische und 16 % ähnliche Aminosäuren). Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass der Schwamm *S. domuncula* und nicht etwa assoziierte Bakterien das Genprodukt synthetisieren.

5.4 Quantifizierung von Transkriptionsraten durch Northern-Blotting-Analyse

Um die im Differential Display identifizierte Hochregulation sowohl der Alkyl-DHAP-Synthase als auch des Lissenzephalie 1-Proteins des Schwamms zu quantifizieren wurde die Technik des Northern Blotting angewandt (4.13). Dazu wurden jeweils 3 µg der isolierten Gesamt-RNA nach den jeweiligen Inkubationszeiträumen 0, 8, 16, 24 und 72 Stunden mittels denaturierendem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (4.6.2) und anschließend auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert („geblottet“) (4.13.1). Durch die Hybridisierung der RNA mit DIG-markierten Sonden gegen Alkyl-DHAP-Synthase (SDADS) sowie Lis1 (SDLIS) und anschließender Zugabe eines an Alkalische Phosphatase-gekoppelten DIG-Antikörpers sowie eines Chemilumineszenz-Substrates (*CDP-Star*) konnten die Signale durch Röntgenfilm-Belichtung und dessen Entwicklung sichtbar gemacht werden (4.13.1). Die relative Zunahme der Signalintensitäten wurde densitometrisch erfasst (*GelDoc*-System, Biorad) und mittels Analysesoftware (*QuantityOne*, Biorad) analysiert.

Auch der Einfluss von LPS auf den potentiellen *pattern recognition receptor* β -(1,3)-Glucan-Bindeprotein wurde untersucht, um eine mögliche Variation dessen Transkriptionsrate in Abhängigkeit von der Zeitdauer des LPS-Kontakts zu ermitteln und einen Hinweis auf eine Beteiligung an der LPS-Erkennung zu erhalten.

Um in jedem Fall sicherzustellen, dass gleiche Mengen der Gesamt-RNA aufgetragen worden waren, wurde als Kontrolle die Hybridisierung mit dem Haushaltsgen β -Tubulin des gleichen Schwamms durchgeführt. Als Ausgangswerte der Transkription im Ruhezustand (*steady-state*-Transkriptionsrate ohne LPS-Kontakt) wurden jeweils die nichtinkubierten RNA-Proben zum Zeitpunkt 0 Stunden sowie in gleicher Weise die Transkriptionsraten der betreffenden Gene nach der jeweiligen Inkubationsdauer quantifiziert. Dabei wurden jeweils identische Röntgenfilm-Belichtungszeiten von 12 Minuten eingehalten und die detektierten Signale um das Hintergrundrauschen (*background*) korrigiert.

5.4.1 Transkriptionsrate des β -Tubulins

Die densitometrische Detektion der β -Tubulin-Signalintensitäten in der RNA-Kontrolle sowie den LPS-inkubierten RNA-Proben zeigte, dass jeweils gleiche Mengen der Gesamt-RNA auf das Gel aufgetragen worden waren (siehe Abbildung 16 a und b).

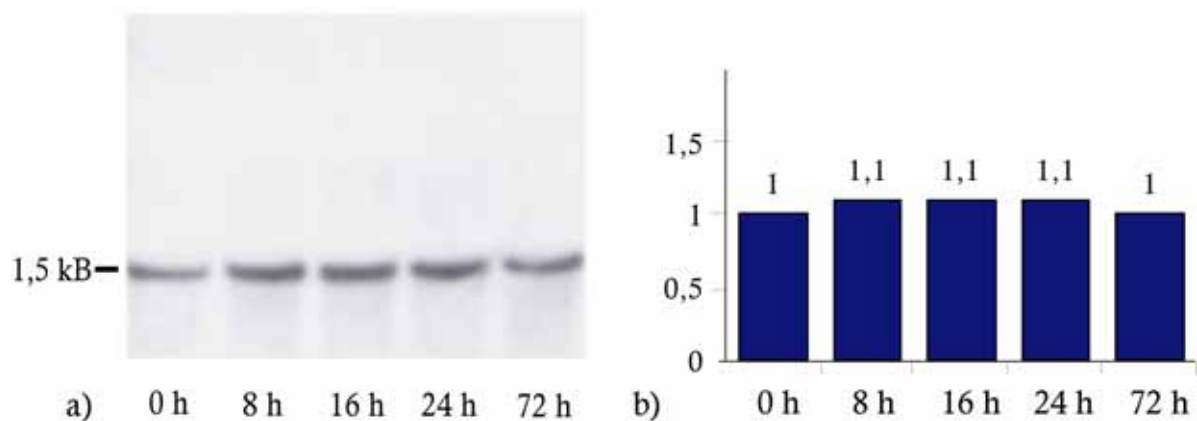


Abbildung 16: Quantifizierung des Transkriptionslevels von β -Tubulin

a) Northern Blotting-Analyse; die Länge des β -Tubulin-Transkriptes beträgt 1,5 kB

b) Graphische Darstellung der densitometrischen Bestimmung der Signalintensitäten

5.4.2 Transkriptionsrate der Alkyl-DHAP-Synthase

Bei der Quantifizierung der relativen Transkriptionsraten von SDADS zeigte sich ein Anstieg der Signalintensitäten zunächst nach 8 Stunden auf das 1,4-fache der Kontroll-Transkriptionsrate. Nach 16 Stunden betrug sie bereits das 1,6-fache und erreichte ein Maximum nach 24 Stunden. Der Transkriptionslevel betrug am Maximum das 2,3-fache des *steady-state*-Kontrollwertes. Nach 72 Stunden wurde eine Signalintensität detektiert, die mit dem 1,9-fachen Wert noch etwa doppelt so hoch war, wie der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 (siehe Abbildung 17 a und b):

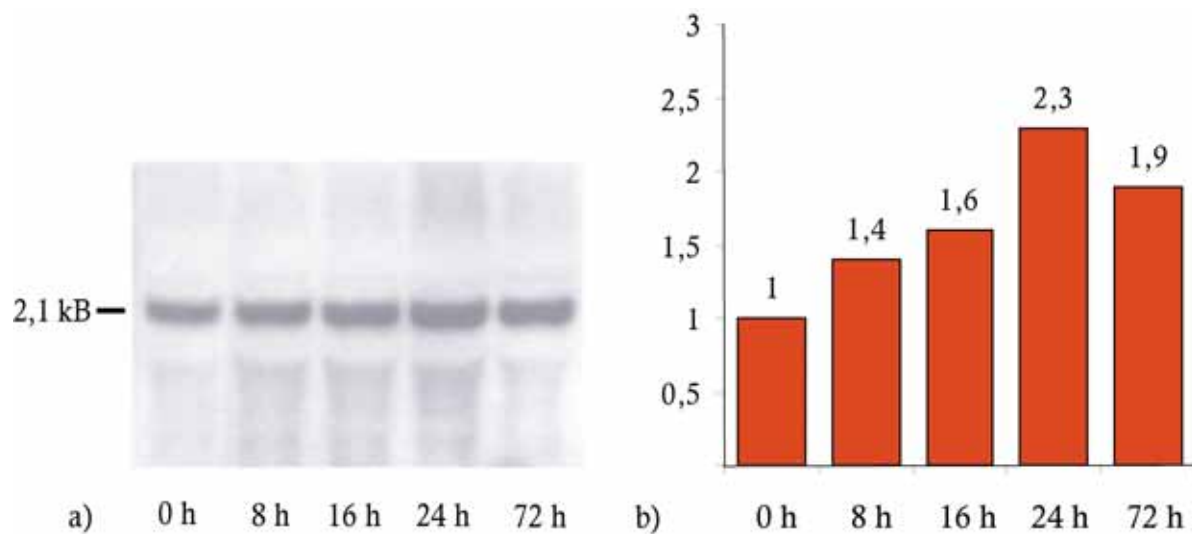


Abbildung 17: Quantifizierung des Transkriptionslevels von SDADS

a) Northern Blot-Analyse; die Länge des SDADS-Transkriptes beträgt 2,1 kDa

b) Graphische Darstellung der densitometrischen Bestimmung der Signalintensitäten

5.4.3 Transkriptionsrate des Lissenzephalie 1-Proteins

Die Bestimmung der Transkriptionslevel des Lissenzephalie 1-Proteins aus *S. domuncula* über eine Zunahme der Signalintensitäten nach LPS-Inkubation, zeigte zunächst einen geringen, relativen Anstieg zwischen 0 und 16 Stunden. Danach kam es zu einem sprunghaften Anstieg der Transkriptionsrate, so dass nach 24-stündiger Inkubationszeit ein Maximum erreicht wurde, welches das 2,6-fache des Ursprungswertes betrug. Nach 72 Stunden sank die Transkriptionsrate erneut auf das Ausgangsniveau ab (siehe Abbildung 18):

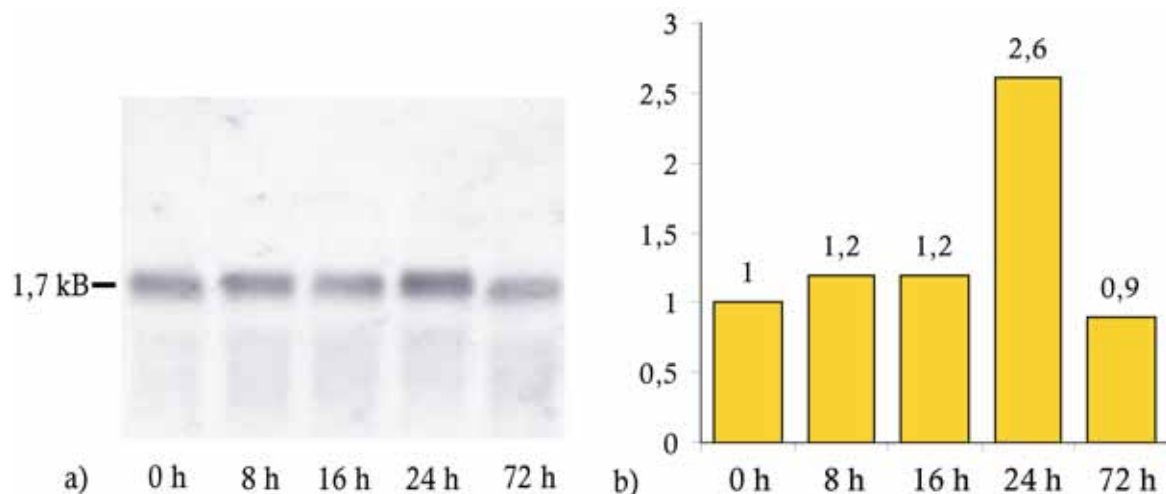


Abbildung 18: Quantifizierung des Transkriptionslevels von SDLIS1

a) Northern Blotting-Analyse; die Länge des SDLIS1-Transkriptes beträgt 1,7 kB

b) Graphische Darstellung der densitometrischen Bestimmung der Signalintensitäten

5.4.4 Transkriptionsrate des β -(1,3)-Glucan-Bindeproteins

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob das aus *S. domuncula* klonierte β -(1,3)-Glucan-Bindeprotein, dessen β -(1,3)-Glucan-Bindeaktivität durch Perovic-Ottstadt *et al.* (2004) nachgewiesen wurde, ebenfalls eine Funktion bei der Erkennung des pathogenassoziierten Moleküls LPS spielt, wurde in einer weiteren Northern Blotting-Analyse der Effekt von LPS auf dessen Transkriptionsrate untersucht und der zeitliche Verlauf der Transkription in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer quantifiziert. In der folgenden Abbildung ist der quantitative Verlauf der Transkription in zeitlicher Abhängigkeit vom LPS-Stimulus dargestellt (Abbildung 19):

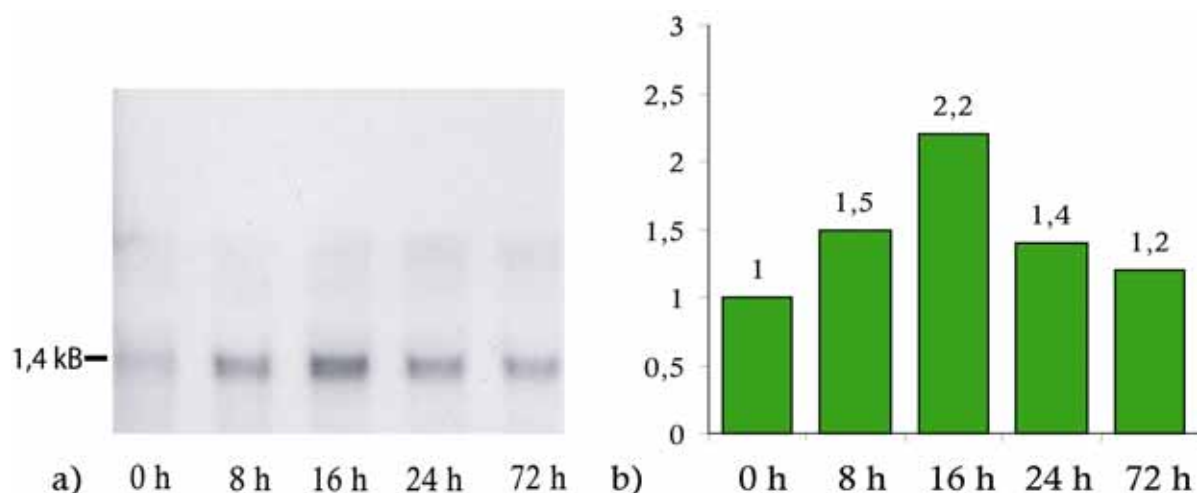


Abbildung 19: Quantifizierung des Transkriptionslevels von SDGLUBP

a) Northern Blotting-Analyse; die Länge des SDGLUBP-Transkriptes beträgt 1,7 kB

b) Graphische Darstellung der densitometrischen Bestimmung der Transkriptionsraten

Hierbei ist zu erkennen, dass zunächst nach 8-stündigem LPS-Kontakt ein Anstieg auf das 1,5-fache des Ausgangswertes erfolgte. Nach 16-stündigem Kontakt wurde ein Maximum der Transkriptionsrate und ein Anstieg auf das 2,2-fache des Ausgangswertes erreicht. Die Signalintensität - und damit die Transkriptionsrate - fiel danach wieder ab und betrug nach 72 Stunden annähernd den des Ausgangswertes. Da auch für die pleiotropen LPS- und β -(1,3)-Glucan-Bindeproteine der Krustazee *P. stylirostris*, des Nematoden *B. mori* sowie des Insekts *H. cunea* eine Induktion nach dem Kontakt mit LPS demonstriert wurde, ist eine Beteiligung des β -(1,3)-Glucan-Bindeproteins aus *S. domuncula* an der Erkennung des bakteriellen Endotoxins LPS nicht auszuschließen.

In der folgenden Graphik sind nochmals die Verläufe der Transkriptionsraten der untersuchten Gene für β -Tubulin, Alkyl-DHAP-Synthase, Lissenzephalie 1 sowie das β -(1,3)-Glucan-Bindeprotein nach dem Kontakt mit LPS dargestellt (Abbildung 20):

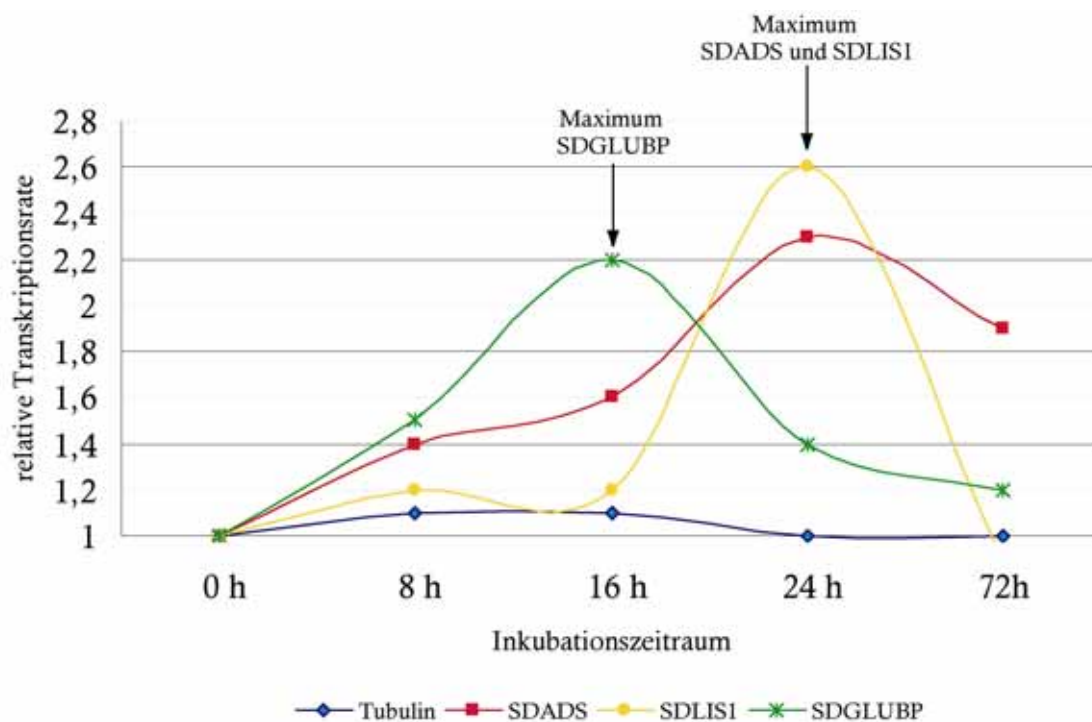


Abbildung 20: Verlauf der Transkriptionsraten

Graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Transkriptionsraten für β -Tubulin, Alkyl-DHAP-Synthase, das Lissenzephalie 1-Protein sowie für das β -(1,3)-Glucan-Bindeprotein aus *S. domuncula*. Bemerkenswert ist, dass das Transkriptionsmaximum des letztgenannten Proteins exakt 8 Stunden vor Erreichen der Maxima der anderen beiden, an der Etherphospholipid- bzw. lyso-PAF-Biosynthese beteiligten Gene, erreicht wird.

Im Fall von Alkyl-DHAP-Synthase (SDADS; rote Linie) und Lis1 (SDLIS1; gelbe Linie) wird das Maximum der Transkriptionsrate innerhalb von 24 Stunden nach Kontakt mit LPS erreicht und beträgt das 2,3-fache für SDADS und das 2,6-fache für SDLIS1 des *steady-state*-Ausgangswertes. Es ist anzunehmen, dass die Transkriptionsrate beider Gene zwischen 24 und 72 Stunden erneut langsam abfällt und zwar stärker für SDLIS1 als für SDADS. Dessen Transkriptionsrate ist auch nach 72-stündiger LPS-Stimulation immer noch etwa doppelt so hoch wie der Ausgangswert zum Zeitpunkt Null.

Bemerkenswert ist, dass die Transkriptionsrate des β -(1,3)-Glucan-Bindeproteins (SDGLUBP, grüne Linie) aus *S. domuncula* ebenfalls ansteigt, nachdem das Tier in Kontakt mit LPS gerät. Das beobachtete Transkriptionsmaximum wird jedoch im Gegensatz zu SDADS und SDLIS1 bereits nach 16 Stunden erreicht und liegt demnach exakt 8 Stunden vor Erreichen der maximalen Transkriptionsraten für SDADS und SDLIS1. Dass die Transkriptionsraten für das Haushaltsgen β -Tubulin konstant bleibt (blaue Linie) indiziert, dass gleiche Gesamt-RNA-Mengen während der Northern Blotting-Analyse aufgetragen wurden.

5.5 Quantifizierung von Etherphospholipid-Derivaten in *S. domuncula*

Durch Anwendung der Differential Display-Methode sowie durch Northern Blotting-Analyse wurde der differentielle Anstieg der Transkriptionsraten sowohl des Schlüsselenzyms der Etherphospholipid-Biosynthese, Alkyl-DHAP-Synthase, als auch die Hochregulation der regulatorischen Untereinheit der PAF-Acetylhydrolase I identifiziert.

Um die Frage zu beantworten, ob diese LPS-induzierte Reaktion des Schwammes den Konzentrationsanstieg der betreffenden bioaktiven Stoffwechselendprodukte 1-O-Hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso PAF I) und 1-O-Octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso PAF II) zur Folge haben könnte, wurden durch die Mitarbeiter der Abteilung für Naturstoffchemie am Institut für Pharmazie der Universität von Neapel die Konzentrationen der lyso-PAF-Derivate vor und nach 72-stündiger LPS-Inkubation von *S. domuncula* ermittelt. Die Quantifizierung nach Extraktion der Tiere und der Isolierung der lyso-Etherphospholipide durch flüssigchromatographische Methoden (MPLC, HPLC) wurde durch positionenselektive, quantitative Massenspektrometrie (MS) durchgeführt.

5.5.1 Extraktion der Schwämme und Isolierung von lyso-PAF-Derivaten

Mehrere LPS-inkubierte Exemplare von *S. domunula* (5,8 g Trockengewicht nach der Extraktion) sowie mehrere nicht-inkubierte Tiere (6,6 g Trockengewicht nach der Extraktion) wurden parallel wiederholt mit Methanol und Chloroform extrahiert, die vereinigten Rohextrakte zwischen Butanol und Wasser ausgeschüttelt und schließlich die butanolischen Rohextrakte der Mitteldruck-Flüssigchromatographie (*medium pressure liquid chromatography*, MPLC) zugeführt. Die Auftrennung der Bestandteile des Rohextraktes erfolgte über ein RP 18-Umkehrphasenmaterial (Merck, Darmstadt) unter Verwendung des linearen Lösungsmittelgradienten $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Methanol} \rightarrow \text{Chloroform}$. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend mittels Dünnschichtchromatographie (*thin layer chromatography*, TLC) auf Silikagel-Fertigplatten 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) auf in ihrer Polarität ähnliche Substanzen hin untersucht und die entsprechenden Fraktionen wiedervereinigt. Jede der Fraktionen wurde dann zunächst einzeln einer orientierenden ¹H-NMR-Analyse (*proton nuclear magnetic response spectroscopy*) in entsprechenden deuterierten Lösungsmitteln zugeführt. Das verwendete Gerät arbeitete mit 500 MHz-Technik (Bruker AMX 500).

In der mittelpolaren MPLC-Fraktion (285 mg), die durch eine Mischung aus Wasser und Methanol im Verhältnis 1:10 von der RP-Säule eluierte, wurden Etherphospholipid-Derivate aufgrund ihrer charakteristischen Kernresonanzsignale identifiziert. Durch analytische Auftrennung eines Aliquots von 20 mg dieser Fraktion unter Anwendung der Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) über eine RP 18-Säule (Phenomenex; Ø = 3 µm; 150 x 4,6 mm; Torrance, USA) unter Verwendung einer Mischung aus Methanol und Wasser im Volumenverhältnis 95:5, konnten schließlich die reinen lyso-PAF-Derivate 1-O-Hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso-PAF I; M = 481 g/mol) und 1-O-Ocatdecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso-PAF II; M = 509 g/mol) erhalten werden (Müller *et al.*, 2004).

5.5.2 Erstellung der Eichgeraden mittels FIA-MS

Eine Eichgerade unter Verwendung standardisierter lyso-PAF-Lösungen der Konzentrationen 0,009, 0,001 und 0,0001 mg ml⁻¹ in Methanol unter Zusatz von 1 % Ameisensäure mittels FIA-MS (*flow injection mass spectrometry*)-Analyse wurde erstellt. Dazu wurden die unterschiedlichen Standardlösungen nacheinander in die aus P4000 Hochdruckpumpe und MAT LCQ Massenspektrometer (beides: Thermo Finnigan, San

José) bestehende Apparatur injiziert, durch Elektrospray-Ionisation in die Gasphase überführt und die lyso-PAF-Derivate positivionenselektiv massenspektrometrisch erfasst. Die mobile Phase aus Methanol, 2-Propanol, Hexan und 0,1-molarer wässriger Ammoniumacetat-Lösung im Volumenverhältnis 100:10:2:5 wurde mit einer Flussrate von $200 \mu\text{l min}^{-1}$ eingepumpt. Die Versuche wurden jeweils dreifach durchgeführt und die Mittelwerte der resultierenden Signalintensitäten zur Erstellung der Eichgeraden herangezogen.

5.5.3 Quantifizierung mittels LC-MS

Eine Umkehrphasen-Flüssigchromatographie-Säule (Phenomenex RP 18; $\varnothing = 3 \mu\text{m}$; 15 x 4,5 mm; Torrance, USA) wurde mit der mobilen Phase aus Methanol, 2-Propanol, Hexan sowie 0,1-molarer wässriger Ammoniumacetatlösung im Volumenverhältnis 100:10:2:5 bei einer Flussrate von $400 \mu\text{l min}^{-1}$ äquilibriert, dann jeweils ein definiertes Volumen der Analysenlösung injiziert und über die LC-Säule dem Massenspektrometer zugeführt. Aus den durch positivionenselektive Detektion erhaltenen Signalen wurde der Gehalt der in *S. domuncula* enthaltenen lyso-PAF-Derivate vor und nach der LPS-Inkubation quantifiziert. Alle Experimente wurden dreifach durchgeführt und die Mittelwerte zur Berechnung verwendet.

In den folgenden beiden Abbildungen sind die Ausschnitte der Flüssigchromatographie sowie des dazugehörigen Massenspektrums des jeweiligen lyso-PAF-Derivates dargestellt. lyso-PAF I eluierte nach 8 min. von der LC-Säule, während lyso-PAF II nach 10,25 min. von der Säule eluierte. lyso-PAF I ergab im gekoppelten MS-Experiment einen Massenpeak von $m/z = 482,4$ und lyso-PAF II einen Massenpak von $m/z = 510,3$, beides aufgrund der sich bei der Elektrospray-Ionisation (ESI) gebildeten Pseudomolekülonen $[M+H]^+$. Aus den Signalintensitäten des jeweiligen lyso-PAF-Derivates in *counts per second* (cps) wurden dann die Konzentrationen ermittelt und auf die in einem Gramm Trockengewicht des Schwammes nach Extraktion enthaltene Menge in Milligramm hochgerechnet (Abbildung 21 und Abbildung 22):

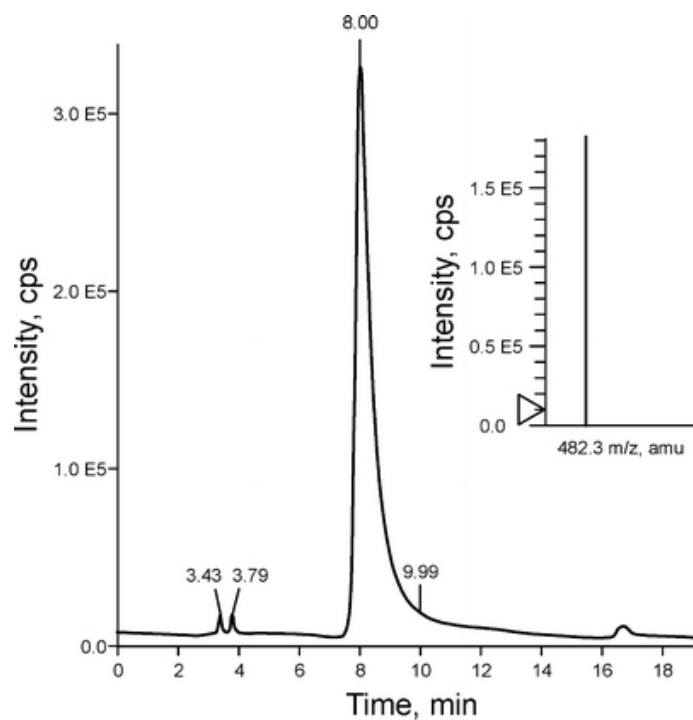


Abbildung 21: LC-MS-Spektrum von lyso-PAF I

lyso-PAF I eluierte nach 8 min. von der LC-Säule nach den o.a. Bedingungen. Der Massenpeak von 482,3 m/z entspricht der Masse des, bei der Ionisierung entstandenen Pseudomolekül-Ions $[M + H^+]$.

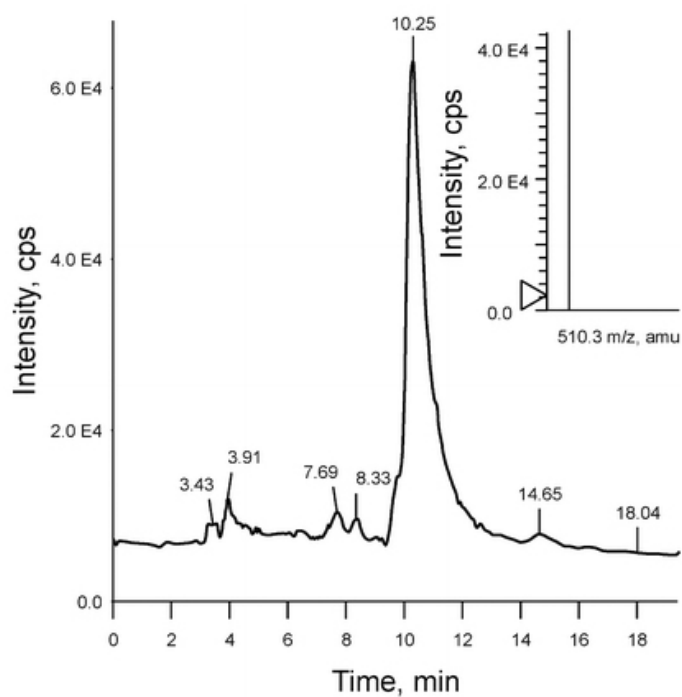


Abbildung 22: LC-MS-Spektrum von lyso-PAF II

lyso-PAF II eluierte nach 10,25 min. von der LC-Säule nach den o.a. Bedingungen. Der Massenpeak von 510,3 m/z entspricht der Masse des, bei der Ionisierung entstandenen Pseudomolekül-Ions $[M + H^+]$.

Die ermittelten Etherphospholipid-Konzentrationen nicht-inkubierter Exemplare von *S. domuncula* betrugen für lyso-PAF I 4,5 mg und für lyso-PAF II 0,8 mg bezogen auf ein Gramm Trockengewicht nach Extraktion. Während der 72-stündigen Inkubation mit LPS stieg der Gehalt der Etherphospholipide deutlich an und erreichte Werte von 5,7 mg für lyso-PAF I sowie 1,0 mg für lyso-PAF II bezogen auf ein Gramm Trockengewicht nach Extraktion. Dies entsprach einem relativen Konzentrationsanstieg von 26,7 % für 1-O-Hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso-PAF I) und von 25 % für 1-O-Octadecyl-*sn*-glycero- 3-phosphatidylcholin (lyso-PAF II) nach dem Kontakt mit LPS.

Die folgende Tabelle sowie Abbildung 23 geben die absoluten lyso-PAF-Konzentrationen in Milligramm pro Gramm Trockengewicht nach der Extraktion, vor und nach der LPS-Inkubation, sowie den relativen prozentualen Konzentrationsanstieg wieder (siehe Anhang; Müller *et al.* 2004):

lyso-PAF	- LPS (Kontrolle)	+ LPS (72 Stunden)	relative Zunahme
I	4,5 mg	5,7 mg	26,7 %
II	0,8 mg	1,0 mg	25 %

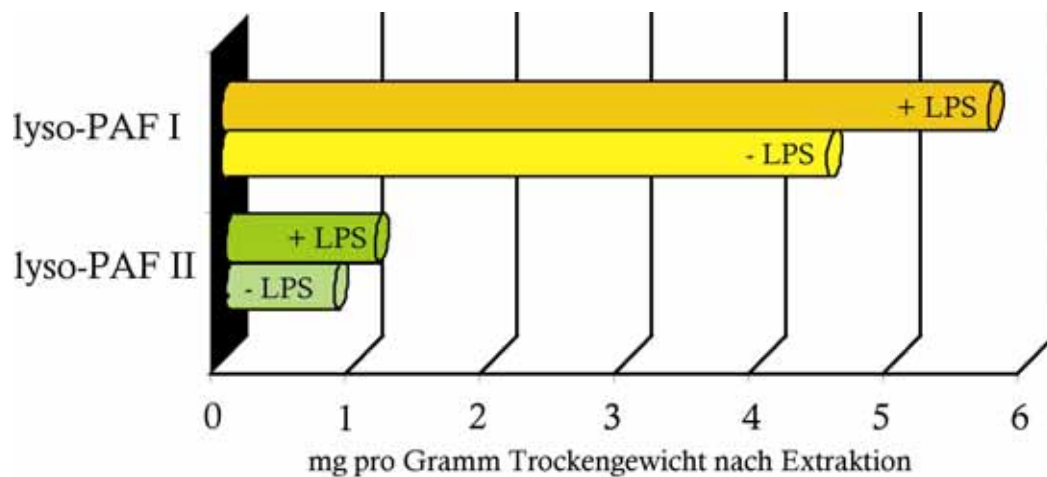


Abbildung 23: Quantifizierung von lyso-PAF-Derivaten

Die Tabelle und die Graphik geben die durch LC-MS-Analyse quantifizierten Konzentrationen der beiden lyso-PAF-Derivate I und II aus *S. domuncula* in mg pro g Trockengewicht nach Extraktion, vor und nach 72-stündigem Kontakt mit LPS, wieder.

6 Diskussion

6.1 Bedeutung adaptiver Abwehrmechanismen für marine Invertebraten

Adaptive Abwehrmechanismen sind insbesondere für sessile marine Tiere wie Schwämme essentiell, um das Überleben in einem komplexen Lebensraum wie dem Meer zu sichern. Da Schwämmen weder physikalische noch ausgeprägte immunologische Abwehrmechanismen zur Verfügung stehen, um sich gegenüber dem Angriff durch Predatoren, Raumkonkurrenten oder pathogenen Mikroorganismen zur Wehr zu setzen, müssen sie in der Lage sein, angepasst auf entsprechende Bedrohungen zu reagieren. So werden in aller Regel erst nach einem Pathogenbefall Produkte zur Verfügung gestellt, die das Pathogen direkt schädigen oder aber seine Verbreitung innerhalb des Organismus stoppen können.

Von Säugetieren ist bekannt, dass diese unter bestimmten Bedingungen bioaktive Lipide produzieren, um entzündliche Reaktionen zu initiieren und um bakterielle Infektionen abzuwehren. Neben der Phospholipase A₂-vermittelten Freisetzung von Lyso-phosphatidylcholin und Arachidonsäure sowie den aus Arachidonsäure synthetisierbaren Prostaglandin-, Thromboxan- und Leukotrien-Entzündungsmediatoren, zählen auch bioaktive Etherphospholipide wie plättchenaktivierender Faktor (PAF) zu diesen Substanzen (Zimmermann *et al.*, 1992; Kasimir *et al.*, 1992).

In einem *Screening*-Programm auf der Suche nach bioaktiven Sekundärmetaboliten in dem marinen Schwamm *Suberites domuncula* wurden die beiden bioaktiven Etherphospholipide 1-O-Hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso-PAF I) und 1-O-Octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (lyso-PAF II) identifiziert (Müller *et al.*, 2003). Diese wurden erstmals aus Würmern der Art *Pheretima asiatica* isoliert, die in getrocknetem Zustand als Droge *Jiryu* in Südostasien zur Beruhigung, Krampflösung und Fiebersenkung angewandt wird (Noda *et al.*, 1992a). Sie konnten auch aus der chinesischen Droge *Suitetsu* isoliert werden, die aus getrockneten Egeln der Art *Hirudo nipponica* besteht (Noda *et al.*, 1993). Andere terrestrische Nematoden sowie marine Invertebraten wie Seesterne und Seegurken enthalten ebenfalls größere Mengen dieser Substanzen (Iorizzi *et al.*, 1991; Yayli und Findlay, 1994; Tanaka *et al.*, 1995; 1997).

Für die aus *S. domuncula* isolierten lyso-Etherphospholipide wurden sowohl antibakterielle als auch neurotoxische Wirkungen demonstriert. So zeigt lyso-PAF I beispielsweise eine Wachstumshemmung gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* sowie gegenüber anderen grampositiven und gramnegativen Bakterien (Steel *et al.*, 2002). Darüber hinaus hemmt die Substanz bereits in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ den Calcium-Influx in foetale Kortikalzellen der Ratte (Schröder *et al.*, 2003). Auch konnten sowohl für lyso-PAF I als auch für lyso-PAF II wachstumshemmende Wirkungen gegenüber dem Schwamm-assoziierten Bakterium SB1 nachgewiesen werden (Müller *et al.*, 2004; Thakur *et al.*, 2003). Zusammengefasst deuten die beobachteten Bioaktivitäten auf eine ökologische Abwehrfunktion von lyso-Etherphospholipiden in niederen Invertebraten hin.

6.2 Pharmakologisches Potential von lyso-Etherlipiden

Lyso-Etherlipide, wie sie aus *S. domuncula* und anderen Invertebraten isoliert wurden, besitzen ein hohes pharmakologisches Potential, was an folgendem Beispiel deutlich wird: aus dem marinen Schwamm *Spirastrella abata* isolierte lyso-PAF-Derivate zeigen eine Hemmung der Cholesterolsynthese sowie eine ausgeprägte cytotoxische Wirkung gegenüber Zellen verschiedener humaner Krebszelllinien (Shin *et al.*, 1999; Alam *et al.*, 2001).

Die zytotoxische Wirkungsweise von lyso-Etherphospholipide könnte dabei auf einem membranauflösenden Effekt beruhen, wie er auch von anderen Lysolipiden her bekannt ist. Andererseits aktivieren viele bioaktive Lipide wie Lysophosphatidylcholin oder plättchenaktivierender Faktor (PAF) Signaltransduktionswege, die neben dem Zellwachstum und der Zelldifferenzierung auch Entzündungsreaktionen zu steuern vermögen (Matzke *et al.*, 2001). Von synthetischen Analoga natürlicher Phospholipide, den Alkylphosphatidylcholinen (APCs), wurde beispielsweise gezeigt, dass sie zur Initiierung des programmierten Zelltodes (Apoptose) in der Lage sind. Durch die Bindung dieser Substanzen an den transmembranären Todesrezeptor CD95 (Fas-Rezeptor) erfolgt eine Weiterleitung des extrazellulären Apoptosesignals über verschiedene Adaptermoleküle, was letztendlich die Aktivierung von Effektorproteasen der Apoptose (Caspasen) zur Folge hat. Die damit verbundenen, apoptotischen Zellveränderungen führen in der Folge zu einem gezielten Absterben der Tumorzellen (Gallagher *et al.*, 2001). Das Konzept des therapeutischen Einsatzes von

Alkylphosphatidylcholinen in der Onkologie wird bereits erfolgreich verfolgt. Während sich die Substanz 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholin (INN: Edelfosin®, Et-18-OCH₃) derzeit noch in klinischen Studien zur Behandlung von Leukämie befindet, so wird sein Analogon Hexadecylphosphatidylcholin (Miltefosin®, HPC) bereits als Salbe gegen Hautmetastasen bei Brustkrebs eingesetzt (Unger *et al.*, 1988, 1989; Vogler *et al.*, 1993). Für Miltefosin® wurde zudem ein antiparasitärer Effekt gegenüber dem Erreger der ohne Therapie oft tödlich verlaufenden, viszerale Leishmaniose (Kala-Azar), *Leishmania donovani*, demonstriert (Jha *et al.*, 1999).

Bemerkenswert ist, dass marine Schwämme ebenfalls über die Mechanismen der Apoptose verfügen. So erfolgt nach einem Kontakt mit Cadmium oder hitzeinaktivierten Bakterien (*E. coli*) die Induktion des proapoptotischen Gens MA-3 (Wagner *et al.*, 1998) sowie, während Abstoßungsreaktionen transplanterter Tiere, die Hochregulation eines Caspase-3-homologen Moleküls (Wiens *et al.*, 2003). Eine Aktivierung der Caspase-3 aus ihrem Vorläufermolekül (einer Procaspase) im Verlauf der Apoptose-Kaskade stellt in den meisten biologischen Systemen den kritischen Schritt der Weiterleitung des apoptotischen Signals dar. Wird dieser „*point of no return*“ erreicht, ist die betroffene Zelle unwiderruflich dem Tode geweiht (Gallagher *et al.*, 2001). Die damit verbundene DNA-Fragmentierung als charakteristisches Zeichen apoptotischer Zellveränderung wurde auch aufgrund eines Kontaktes von Schwammzellen mit LPS registriert (Müller *et al.*, 2004).

Es ist somit durchaus denkbar, dass in Analogie zu APC-induzierter Apoptose von Tumorzellen eine im Schwamm aufgrund bakterieller Infektion ausgelöste, adaptive Produktion von Etherphospholipiden in bisher noch unbekannter Art und Weise zur Induktion des programmierten Zelltodes führen kann. Neben einem direkten antibakteriellen Effekt von lyso-PAF I und II verursacht möglicherweise der ortsnahe Anstieg der lyso-PAF-Konzentrationen gezielte die Auslösung der Apoptose infizierter Schwammzellen. Dieser Mechanismus könnte der weiteren Ausbreitung der Infektion entgegenwirken.

6.3 Identifikation differentieller Genexpression durch Differential Display

Um der Frage nachzugehen, inwiefern Schwämme in der Lage sind, adaptiv auf mikrobielle Infektionen zu reagieren, wurden Tiere der Spezies *S. domuncula* über einen Zeitraum von 72 Stunden mit dem bakteriellen Endotoxin LPS inkubiert und aus den Gewebeproben nach 0, 8, 16, 24 und 72 Stunden die Gesamt-RNA isoliert sowie dem Differential Display unterzogen. Diese Methode wurde 1992 von P. Liang und A. B. Pardee entwickelt, um einerseits die genetische Ursache eines veränderten Zell- oder Gewebeszustandes zu ergründen sowie andererseits herauszufinden, inwiefern sich das Expressionsmuster von Genen als Reaktion auf variierende Umweltbedingungen, Verletzung oder Infektion verändern kann. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandte Technik des Fluoreszenz Differential Display (FDD) erlaubte eine nichtradioaktive Detektion und Identifizierung der aufgrund des LPS-Kontaktes in *S. domuncula* differentiell exprimierten, eukaryotischen Genen. Anhand der identifizierten Variationen im Expressionsmuster wurden Anhaltspunkte darüber erhalten, mit welchen Abwehrmechanismen sessile Tiere wie Schwämme gegenüber bakteriellen Infektionen reagieren können.

Neben unbekannten, sowie an der allgemeinen Transkription, dem Spleißen, der Proteinbiosynthese oder dem Energieumsatz beteiligten cDNAs, konnten Gene identifiziert werden, deren Translationsprodukte an der Biosynthese der aus *S. domuncula* isolierten lyso-Etherphospholipiden beteiligt sind.

Zum Ersten handelt es sich um das den Schlüsselschritt der Etherphospholipid-Biosynthese codierende Gen der Alkyl-DHAP-Synthase. Durch Northern Blotting-Analyse wurde die im Differential Display identifizierte Hochregulation der als SDADS bezeichneten cDNA verifiziert und hierbei ein relativer Anstieg der Transkriptionsrate in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer mit LPS festgestellt. Nach 24-stündiger LPS-Inkubation wurde ein Maximalwert erreicht, welcher der 2,3-fachen *steady-state*-Transkriptionsrate entsprach.

Zum Zweiten wurde die dem humanen Lissenzephalie 1-Gen homologe cDNA in *S. domuncula* als hochreguliert identifiziert. Das Genprodukt wurde erstmals als regulatorischer Bestandteil der PAF-Acetylhydrolase I (PAF-AH I) beschrieben, welche die Deacetylierung von plättchenaktivierendem Faktor unter Bildung von lyso-PAF katalysiert. Der im Differential Display beobachtete differentielle Anstieg der Transkriptionsrate konnte durch Northern Blotting-Analyse bestätigt und die

Hochregulation des Gens nach LPS-Kontakt quantifiziert werden. Das Maximum der Transkriptionsrate wurde, wie im Fall der Alkyl-DHAP-Synthase-cDNA, nach 24 Stunden erreicht, wobei ein 2,6-fach höherer Wert gegenüber der *steady-state* Transkriptionsrate erreicht wurde.

Bei Betrachtung der Etherphospholipid-Biosynthese, insbesondere der Synthese von lyso-PAF-Derivaten sowie einer genaueren Betrachtung der beiden differentiell exprimierten Gene Alkyl-DHAP-Synthase und Lis1 wurden Hinweise erhalten, dass die Aktivierung dieses Stoffwechselweges eine Steigerung der lyso-Etherphospholipid-Konzentrationen, als ein adaptiver antimikrobieller Abwehrmechanismus in dem Schwamm *S. domuncula*, zur Folge haben könnte.

6.4 Biosynthese von Etherphospholipiden

Die ersten beiden an der Etherphospholipid-Biosynthese beteiligten Enzyme sind ausschließlich in peroxisomalen Zellkompartimenten, den Peroxisomen (*microbodies*) lokalisiert, während die nachfolgenden Schritte im Cytoplasma erfolgen (Nagan und Zoeller, 2001). Peroxisomen sind von einer einfachen Biomembran umgebene Organellen, die einen Durchmesser von 0,1-0,5 µm besitzen und durch ihren besonders hohen Gehalt an Peroxidase und Katalase charakterisiert sind (Hajra, 1995).

Ausgangsmaterial der Etherphospholipidsynthese ist das der Glycolyse entstammende Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), welches aus dem Cytoplasma in die Peroxisomen gelangt. Durch die intraperoxisomale Veresterung dessen freier Hydroxylgruppe mit Acyl-CoA durch DHAP-Acyl-CoA-Acyltransferase (EC 2.3.1.42; Ofman *et al.*, 1999) bildet sich zunächst Acyl-Dihydroxyacetonphosphat (Acyl-DHAP). Im Anschluß erfolgt der, in seinen molekularen Einzelheiten noch gänzlich ungeklärte, Austausch der *sn1*-Acylgruppe durch einen langkettigen Alkohol an der luminalen Membranseite des Peroxisoms unter Bildung von Alkyl-Dihydroxyacetonphosphat (Alkyl-DHAP). Hierdurch erfolgt die Festlegung der biosynthetischen Route in Richtung der Bildung von Etherphospholipiden. Diese einzigartige biochemische Austauschreaktion ist nicht reversibel und wird durch das in der vorliegenden Arbeit klonierte Schlüsselenzym der Etherphospholipide-Biosynthese Alkyl-DHAP-Synthase (EC 2.5.1.26) katalysiert (Hajra *et al.*, 1988). Das anschließend an die cytosolische Membranseite des Peroxisoms gelangende Alkyl-DHAP wird in der Folge durch Acyl/Alkyl-DHAP-Reduktase (EC 1.1.1.101) reduziert (Datta *et al.*, 1990), das entstehende 1-Alkylglyceronphosphat (GPC)

mit aktivierter Essigsäure durch 1-Alkyl-GPC-Acetyltransferase (EC 2.3.1.105) verestert (Wykle *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1986) und nachfolgend an der *sn*3-Position durch 1-Alkyl-2-Acetyl-DHAP-Phosphohydrolase (EC 3.1.3.59; Lee *et al.*, 1988) dephosphoryliert. Die Anknüpfung der Cholin-Kopfgruppe durch 1-Alkyl-2-Acetyl-glycerol-CDP:Cholin- Cholintransferase (EC 2.7.8.16; Renooji und Snyder, 1981) führt dann im nächsten Schritt zur Bildung von 1-Alkyl-2-Acetyl-glycero-3-phosphatidylcholin, dem plättchenaktivierenden Faktor (PAF) (Lee *et al.*, 1986; 1988; Snyder, 1997).

PAF stellt die Vorstufe der für die antimikrobielle Abwehr in *S. domuncula* wichtigen lyso-PAF-Derivate dar, die durch gezielte PAF-Deacetylierung gebildet werden können. Das diese Reaktion katalysierende Enzym ist PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH), die in drei Isoformen existiert (Abbildung 24):

Typ	Isoform	Untereinheiten	Molekulargewicht (kDa)
sezerniert	Plasma	monomer	45
intrazellulär	II	monomer	40
intrazellulär	I	α 1-Untereinheit	30
		α 2-Untereinheit	29
		Lis1/ β -Untereinheit	45

Abbildung 24: Isoformen von PAF-Acetylhydrolasen

Während sowohl die monomere Plasma-PAF-Acetylhydrolase als auch die intrazelluläre PAF-AH Isoform II in der Lage sind, Etherphospholipide zu deacylieren, die an der *sn*2-Position längerkettige Acylreste von bis zu 10 Kohlenstoffatomen tragen (Stremmler *et al.*, 1989), so besitzt die PAF-AH Isoform I, deren β -Untereinheit in der vorliegenden Arbeit kloniert wurde, eine einzigartige Affinität zu dem *sn*2-Acetyl-Derivat PAF. In höheren Organismen katalysiert diese Isoform nur die *sn*2-Deacetylierung von PAF unter Bildung von lyso-PAF und dient somit ausschließlich der Regulation des PAF-Levels (Hattori *et al.*, 1993; Stafforini *et al.*, 1997).

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die Etherphospholipid-Biosynthese unter besonderer Berücksichtigung der Bildung von lyso-PAF (Abbildung 25):

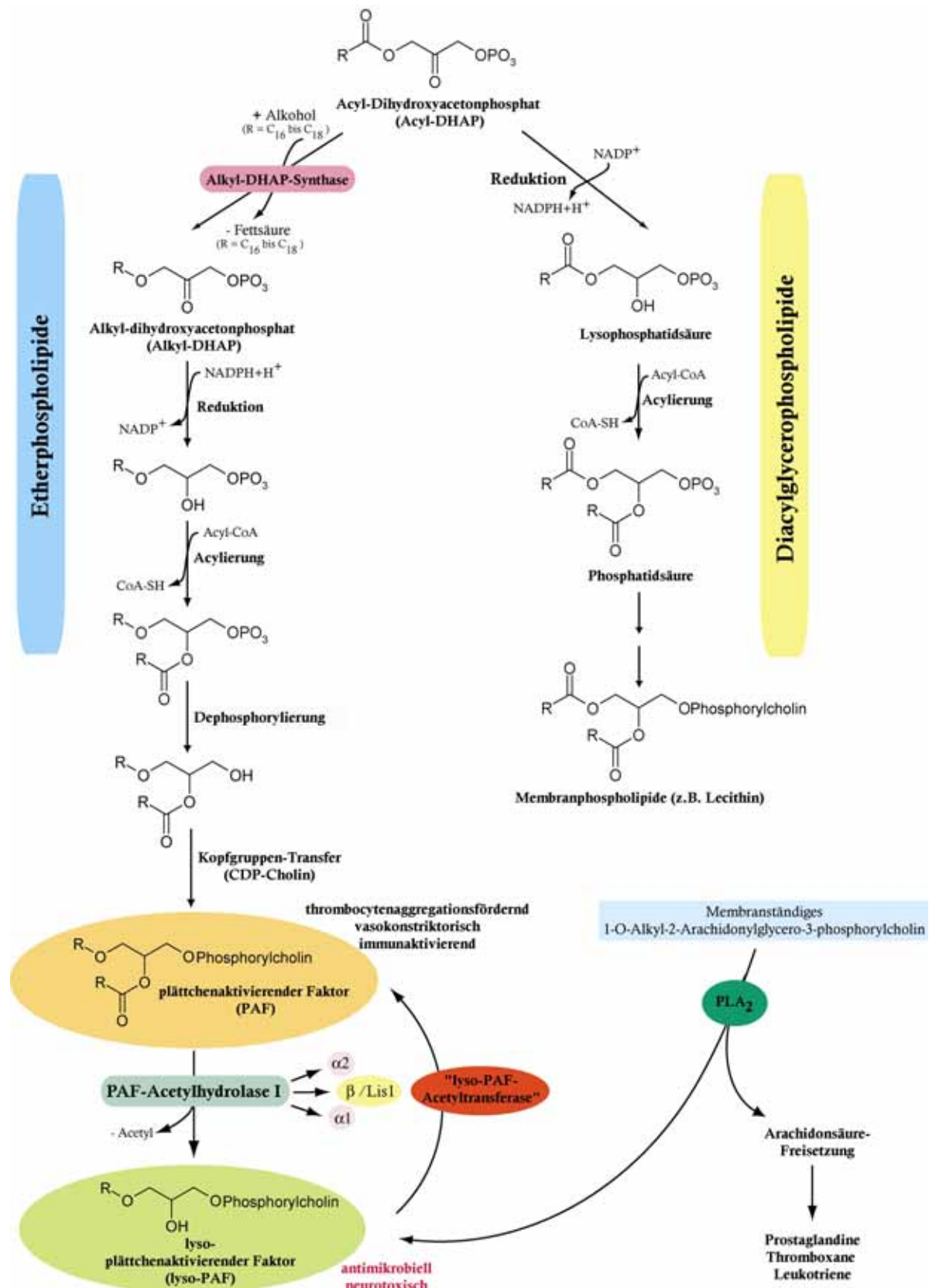


Abbildung 25: Biosynthese von Etherphospholipiden

Im linken Teil der Abbildung ist die Etherphospholipidbiosynthese dargestellt (speziell die PAF- bzw. lyso-PAF *de novo*-Synthese), die durch die Schlüsselreaktion der Alkyl-DHAP-Synthase initiiert wird. Rechts ist die Biosynthese herkömmlicher Diacylglycerophospholipide skizziert, die im Gegensatz zur Etherphospholipidsynthese durch direkte Reduktion von Acyl-DHAP initiiert wird. Eine alternative Bildung von lyso-PAF kann durch Phospholipase A₂-katalysierte Freisetzung von Arachidonsäure aus entsprechenden, membranständigen Etherphospholipiden erfolgen. Die Rückbildung von PAF aus lyso-PAF im *remodeling pathway* ist ebenfalls dargestellt. 116

Während das den entscheidenden Schritt der Biosynthese katalysierende, peroxisomale Enzym Alkyl-DHAP-Synthase sowohl in tierischen Zellen als auch in der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert wurde, so konnte es bisher weder aus Pflanzen noch aus Bakterien isoliert oder kloniert werden (Hajra, 1995). Diese Tatsache untermauert die Annahme, dass die antibakterielle Abwehrreaktion von dem Schwamm und nicht von assoziierten Bakterien initiiert wird.

Obwohl der Mechanismus der Bildung von lyso-PAF durch Deacetylierung von *de novo* gebildetem PAF durch PAF-Acetylhydrolase bekannt ist, so wurde bisher weder in *S. domuncula* noch in *H. nipponica* (die Droge *Suitetsu*) PAF direkt identifiziert. Eine Alternative der lyso-PAF-Bildung wäre dessen Freisetzung aus membranständigen Etherphospholipiden mit langkettigen Fettsäuren in der *sn2*-Position nach gezielter Deacylierung durch Phospholipase A₂ (PLA₂, siehe Abbildung 22). Diese Reaktion ist als ein möglicher Mechanismus der Arachidonsäurefreisetzung bekannt. Die Umsetzung des betreffenden, membranständige 1-O-Alkyl-2-Arachidonyl-glycero-3-phosphats führt zu einer Bildung von lyso-PAF auf direktem Wege. Der Vollständigkeit halber ist zu erwähnen, dass in höheren Organismen ein Mechanismus existiert, um aus lyso-PAF PAF zu regenerieren. In dieser als *remodeling pathway* bezeichneten Rückreaktion der Deacetylierung durch PAF-AH erfolgt die Acetylierung von lyso-PAF durch 1-Alkyl-2-lyso-glycerophosphatidylcholin-Acetyl:CoA-Acetyl-Transferase („lyso-PAF-Acetyltransferase“; Wykle *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1985; siehe Abbildung 24).

Es existieren somit theoretisch zwei Möglichkeiten der lyso-PAF-Freisetzung:

- (1) die Deacetylierung von *de novo* gebildetem PAF durch PAF-Acetylhydrolase sowie
- (2) die Freisetzung von lyso-PAF aus Membranlipiden durch den Einfluss von Phospholipase A₂

Um den exakten Bildungsmechanismus von lyso-PAF in Schwämmen festzustellen, sind deshalb weitergehende Untersuchungen nötig, bei denen beispielsweise markierte lyso-PAF-Vorstufen wie Hexadecanol oder Arachidonsäure eingesetzt werden könnten. Einen Hinweis auf die Deacetylierungsreaktion von *de novo* gebildetem PAF in *S. domuncula* liefert jedoch die adaptive Hochregulation der Lis1/ β -Untereinheit der PAF-AH I nach LPS-Inkubation. Die Untersuchung der katalytischen Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ sowie deren Wechselwirkungen mit Lis1/ β könnten zur Klärung des Bildungsmechanismus von lyso-PAF in *S. domuncula* beitragen.

6.5 Reaktionsmechanismus der Schlüsselreaktion

Der Mechanismus der durch Alkyl-DHAP-Synthase katalysierten Acyl/Alkyl-Austauschreaktion ist weitgehend unklar. Brown und Snyder (1981) postulieren einen Ping-Pong-Mechanismus, bei dem nach Enolisierung von Acyl-DHAP zunächst die Deprotonierung des *sn1*-Kohlenstoffs unter Bildung eines Carbokations erfolgt. Die Bereitstellung von Protonen könnte durch einen Protonen-Shuttle ähnlich der Carboanhydrase II erfolgen, was die Beteiligung von Protonen des Umgebungsmediums an der Reaktion ermöglicht (Berg *et al.*, 2003). Durch den Angriff eines nucleophilen Faktors X, beispielsweise eines funktionellen Histidinrestes des aktiven Zentrums des Enzyms, wird zunächst der Acylrest abgespalten und im folgenden Reaktionsschritt an dieser Position das Alkoholat des langkettigen Fettalkohols nukleophil addiert. Unter Abspaltung des Faktors X sowie erneuter Protonierung bildet sich schließlich das Alkyl-DHAP-Enol, welches zu Alkyl-DHAP tautomerisiert (siehe Abbildung 26).

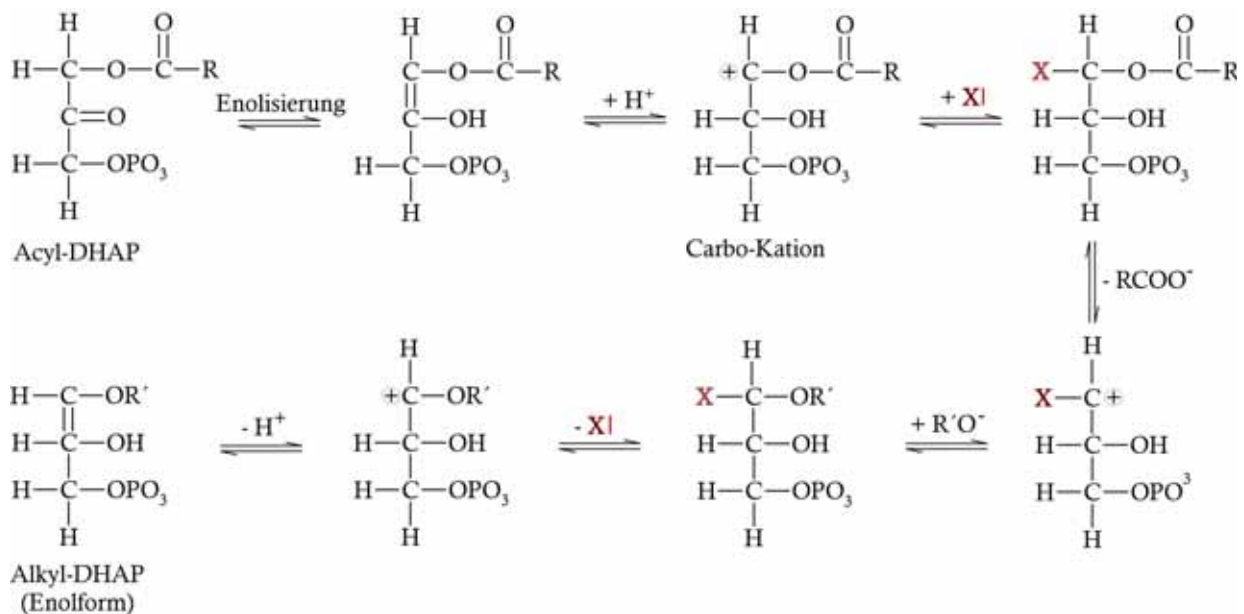


Abbildung 26: Molekularer Mechanismus der Alkyl-DHAP-Synthase-Reaktion

(verändert nach Brown und Snyder, 1981)

Plausibel wäre jedoch auch der direkte nukleophile Angriff des Alkoholates nach Enolisierung und Deprotonierung von Acyl-DHAP ohne eine Beteiligung des nucleophilen Faktors X.

Unklar bleibt, welche Rolle Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als Cofaktor von Redoxreaktionen bei dieser außergewöhnlichen Austauschreaktion spielt. Da das Vorhandensein von FAD essentiell für die Enzymaktivität ist (siehe 6.5.2; de Vet *et al.*, 2000), so unterliegt die Reaktion möglicherweise einem anderen als dem von Brown und Snyder postulierten Reaktionsmechanismus. Beispielsweise könnte eine initiale FADH₂-gekoppelte Reduktion der *sn*2-Carbonylgruppe von Acyl-DHAP unter Bildung des sekundären Alkohols Acylglycerol-3-phosphat erfolgen. Die nachgeschaltete stereospezifische Oxidation von Acylglycerol-3-phosphat regenerierte FADH₂, woraufhin das gebildete Enol für die oben aufgeführten Reaktionsschritte zur Verfügung stünde (Abbildung 27):

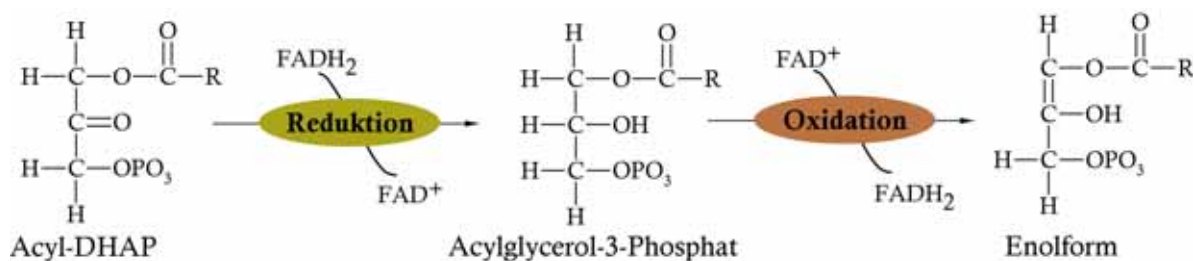


Abbildung 27: Mögliche Beteiligung von FAD an der Acyl/ Alkyl-Austauschreaktion

Obwohl diese Reduktion-Oxidation aus energetischer Sicht ungünstig ist, stellt sie eine Möglichkeit dar, mit der das Phänomen der FAD-Abhängigkeit dieser Reaktion erklärt werden kann.

6.6 Analyse der Alkyl-DHAP-Synthase aus *S. domuncula*

Ausgehend von dem im Differential Display identifizierten 3'-Teilstück der für Alkyl-DHAP-Synthase codierenden cDNA aus *S. domuncula* konnte mit Hilfe der PCR-Technik die vollständige cDNA aus der cDNA-Bibliothek des Schwammes isoliert werden. Der Klon wurde mit SDADS (*Suberites domuncula* Alkyl-DHAP-Synthase) bezeichnet. Durch Northern Blotting-Analyse konnte die relative Transkriptionsrate der mRNA in Abhängigkeit von der LPS-Inkubationsdauer bestimmt und darüber hinaus überprüft werden, ob die vollständige cDNA amplifiziert worden war.

Die Übersetzung der klonierten cDNA ergab einen offenen Leserahmen, so dass diese für ein sinnvolles Protein codiert. Dieses als ADS_SUBDO bezeichnete Genprodukt enthält die charakteristischen Domänen verwandter FAD/FMN-enthaltender Enzyme.

Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) dient in vielen Oxidoreduktasen als Cofaktor der Oxidation/Reduktion und ist in aller Regel kovalent an einen Histidin-Rest innerhalb der konservierten FAD-Bindedomäne über eine 8- α -(N³-histidyl)-FAD-Bindung gebunden. Obwohl angenommen wird, dass dieses Enzym keine Redoxreaktion katalysiert, wurde die FAD-Abhängigkeit der durch sie katalysierten Reaktion von de Vet *et al.* (2000) eindeutig nachgewiesen.

Die Struktur der in dem Schwammenzym identifizierten FAD-Bindedomäne vom Typ 4 wurde erstmals am Beispiel des Flavoproteins Vanillylalkohol-Oxidase (SWISSPROT *accession number* P 56216; Mattevi *et al.*, 1997a) aufgeklärt. Die für die FAD-Bindung und damit die Enzymaktivität verantwortlichen Aminosäure-Reste konnten zugeordnet werden. Anhand detaillierter Mutationsstudien an humaner Alkyl-DHAP-Synthase (EC 2.5.1.26), bei welcher Histidin-Reste (H) jeweils einzeln durch Asparagin-Reste (A) ausgetauscht wurden, konnten diese Positionen ermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass zum einen der Austausch von H300 gegen A300 zu einem Verlust der FAD-Bindekapazität und damit dem Verlust der Aktivität des Enzyms führte. Diese Position ist hochkonserviert und findet sich im Enzym des Schwamms an Position H271. Auch führten einzelne Mutationen der Histidin-Reste H585, H586 sowie H587 zum Verlust der FAD-Bindekapazität und damit der Enzymaktivität. Diese Histidinreste finden sich im Schwamm-Protein an den Positionen H585, H586 und H587 und sind Teil einer hochkonservierten Region, welche sich von Position 580-590 erstreckt. Diese Region entspricht dem Bereich 610-620 der humanen Alkyl-DHAP-Synthase (BLAST *accession number* NP 003650.1) und findet sich auch in Vanillylalkohol-Oxidase (SWISSPROT *accession number* P 56216) im Bereich der Aminosäuren 499-509.

Des Weiteren konnte eine Entsprechung des Serin-Restes S338 im Enzym des Schwamms mit der konservierten Position S367 des humanen Enzyms festgestellt werden. Dieser Serin-Rest ist Teil des Adenin-bindenden Bereichs der FAD-Bindedomäne; eine Mutation führte zu drastischer Abnahme der FAD-Bindekapazität (de Vet *et al.*, 2000).

Wie andere peroxisomale Proteine muß Alkyl-DHAP-Synthase nach der Translation im Cytosol an den Ort ihrer Bestimmung, in die Peroxisomen, transportiert werden (Lazarow und Fujiki, 1985). Die Translokation erfolgt hierbei durch Wechselwirkung des im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisierten, peroxisomalen Typ 2-Steuersignals (*peroxisomal targeting signal 2*, PTS2) mit dem entsprechenden PTS2-Rezeptor, einem

durch das pex 7-Gen codierte Peroxin (de Vet *et al.*, 1997; Subramani, 1998; Hettema *et al.*, 1999). Das PTS2-Steuersignal besteht aus dem Nonapeptid der Konsensus-Sequenz [R]-[L/V/I]-X5-[H/Q][L/A] (Osumi *et al.*, 1991; Subramani, 1998).

Bemerkenswert ist, dass sich das PTS2-Steuersignal zwar auch in dem homologen Enzym von *H. sapiens* findet, dem gleichen Enzym aus *Caenorhabditis elegans* allerdings fehlt. Die Alkyl-DHAP-Synthase des Nematoden besitzt ein PTS 1-Steuersignal, welches im Gegensatz zum N-terminalen PTS2-Steuersignal im C-Terminus des Enzyms lokalisiert ist und aus einem Tripeptid der Konsensus-Sequenz (S/C/A)(K/R/H)(L) besteht (Gould *et al.*, 1989; Mullen *et al.*, 1997; de Vet und van den Bosch, 1998). Diese Tatsache verdeutlicht die enge phylogenetische Verwandtschaft zwischen dem Schwammprotein und dem homologen humanen Protein. Das Phänomen der engen Verwandtschaft konnte bereits anhand früherer Sequenzanalysen demonstriert werden, denn in vielen Fällen besitzen Schwamm-Gene und davon abgeleitete Proteine eine höhere Homologie zu korrespondierenden humanen Genen als zu solchen aus evolutionär jüngeren Metazoa (Gamulin *et al.*, 2001; Müller *et al.*, 2001). Das anhand des Schlüsselenzyms der Etherphospholipidsynthese beobachtete Phänomen des Austausches der Peroxisomen-Steuersignale im Laufe der Entwicklungsgeschichte, was auch als PTS-switching bezeichnet wird (de Vet *et al.*, 1998), stützt die Hypothese, dass Porifera Gene besitzen, die zwar während der Evolution zu anderen Tiergruppen verschwanden oder sich stark veränderten, jedoch im Menschen in nahezu unveränderter Form vorhanden sind. Zudem wird die Annahme bestätigt, daß alle Metazoa von einem theoretischen Urmetazoa abstammen und somit monophyletischen Ursprungs sind (Müller, 2001).

Bezogen auf ADS_SUBDO blieb das PTS2-Signal im Laufe der Evolution von den Porifera zu den Mammalia erhalten, wurde jedoch innerhalb der Klasse der Nematoda durch ein PTS1-Signal ersetzt und ging hierbei schließlich verloren. Alkyl-DHAP-Synthase stellt damit ein Enzym dar, dessen Funktion innerhalb der Metazoa zwar konserviert geblieben ist, jedoch das für die Translokation des Proteins in das peroxisomale Kompartiment notwendige, peroxisomale Steuersignal ausgetauscht wurde.

Die folgende Abbildung zeigt schematisch den Unterschied (Abbildung 28):

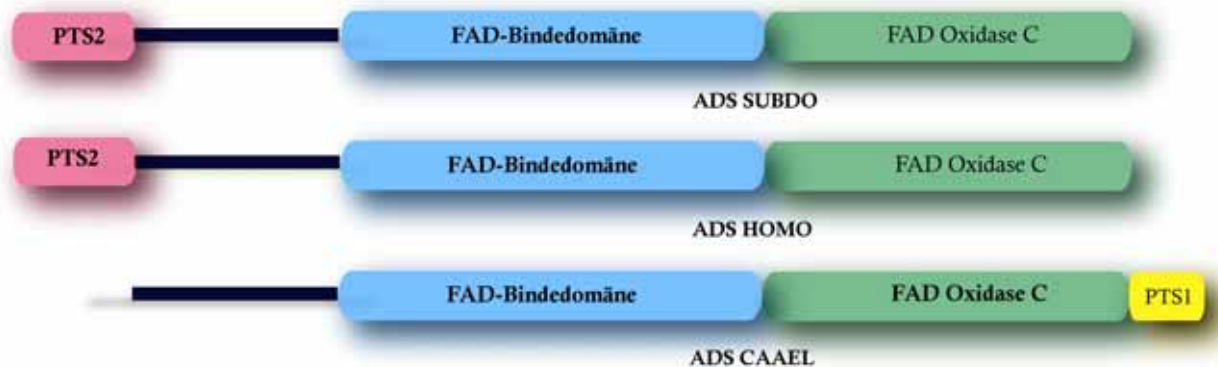


Abbildung 28: Alkyl-DHAP-Synthasen verschiedener Spezies

Die Domänen der homologen Enzyme aus *S. domuncula* (ADS SUBDO), dem Menschen (ADS HOMO) und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (ADS CAAEL) wurden verglichen. Schwamm und Mensch besitzen für die Translokation des Enzyms in die Peroxisomen ein PTS2-Steuersignal (rosa). Dieses fehlt bei *C. elegans*; die Funktion des PTS2-Signals wird hier durch ein C-terminales PTS 1-Signal (gelb) ersetzt. Die FAD-Bindedomänen (blau) sowie die C-terminalen, FAD-gekoppelten Oxidasedomänen (grün) sind eingezeichnet.

Insgesamt zeigt die prädiktive Aminosäuresequenz ADS_SUBDO eine hohe Sequenzhomologie zu korrespondierenden Enzymen der Metazoa, wohingegen die Ähnlichkeit zu bakteriellen und pflanzlichen Enzymen wesentlich geringer ist. Das Gen stammt demnach nicht von assoziierten Bakterien, sondern wird nach LPS-Kontakt adaptiv durch den Schwamm hochreguliert.

6.7 Funktion und Analyse des Lissenzephalie 1-Proteins

Die Rolle des im Differential Display identifizierten Lissenzephalie 1-Gens erschien zunächst unklar, da das Genprodukt primär aus humanpathologischer Sicht ins Auge fiel. Die Bezeichnung Lis1 rührt daher, dass eine Mutation des entsprechenden Gens eine schwerwiegende Entwicklungsstörung der Großhirnrinde zur Folge hat. Diese autosomale Typ I-Lissenzephalie oder Agyrie (= „windungsloses Gehirn“) bedingt das klinische Bild des Miller-Dieker-Syndroms, welches sich meistens in schwerer geistiger Behinderung, auffälliger Gesichtsform und spastischen Lähmungen äußert. Der auf dem Chromosom 17 lokalisierte Defekt tritt weltweit mit einer Häufigkeit von 1:20.000 bis 1:50.000 auf und ist mit dem frühen Versterben der betroffenen Kinder, oftmals in den ersten Lebenswochen, verbunden. Lis1 interagiert mit dem an den Mikrotubuli entlang wandernden Dynein-Motor und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Dynamik

mitotischer Mikrotubuli, unter anderem im sich entwickelnden Nervensystem. Möglicherweise ist diese Hemmung der Bewegungsvorgänge im sich entwickelnden Gehirn der Auslöser für die schwere Entwicklungsstörung bei einem Lis1-Defekt (Sasaki *et al.*, 2000; Faulkner *et al.*, 2000; Nicole *et al.*, 2000).

Bemerkenswert ist, dass das Lis1-Protein erstmals als Bestandteil der Isoform I des Enzyms PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH I; EC 2.3.1.67) identifiziert wurde (Hattori *et al.*, 1993). Diese Isoform besitzt im Gegensatz zu anderen, ubiquitär vorkommenden A₂-Phospholipasen (PLA₂), eine hohe Affinität zu 1-Alkyl-2-Acetyl-glycero-3-phosphatidylcholin (PAF) und katalysiert ausschließlich dessen *sn*2-Deacetylierung unter Bildung von lyso-PAF (Stafforini *et al.*, 1997). Das Enzym existiert als Heterotrimer aus zwei sehr ähnlichen, katalytischen Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$, die sich variabel zu einem $\alpha 1/\alpha 2$ -, $\alpha 1/\alpha 1$ - oder einem $\alpha 2/\alpha 2$ -Homo- bzw. Heterodimer zusammenlagern können. Lis1 assoziiert als nicht-katalytische β -Untereinheit an das katalytische Dimer, wodurch der Proteinkomplex eine große Ähnlichkeit zu G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren besitzt (Ho *et al.*, 1997). Interessant für die bearbeitete Fragestellung war, dass die Lis1/ β -Untereinheit je nach Zusammensetzung des katalytischen Dimers die Aktivität der PAF-AH I modulieren kann. Beispielsweise steigerte sich durch Bindung von Lis1/ β an das $\alpha 2/\alpha 2$ -Homodimer die PAF-deacetylierende Aktivität um das Vierfache (Manya *et al.*, 1999).

Ausgehend von dem im Differential Display identifizierten 3'-Teilstück der im Folgenden als SDLIS1 (*Suberites domuncula* Lissenzephalie 1) bezeichneten cDNA wurde mit Hilfe der PCR-Technik die vollständige cDNA aus der cDNA-Bibliothek von *S. domuncula* isoliert. Durch Northern Blotting-Analyse konnte die relative Transkriptionsrate der mRNA in Abhängigkeit von der LPS-Inkubationsdauer bestimmt und darüber hinaus überprüft werden, ob die vollständige cDNA amplifiziert worden war. Die Übersetzung der klonierten cDNA ergab einen offenen Leserahmen, der für ein sinnvolles Protein codiert.

Dieses prädiktive Protein enthält neben dem an der Assoziation des Proteins mit seinen Bindungspartnern beteiligten LisH-Motiv sowie einem superspiralisierten Bereich sieben WD 40-Einheiten, wobei jede dieser Einheiten durch die WD 40-Signatur charakterisiert wird (Neer *et al.*, 1994; Garcia-Higuera, 1996). Sind mehrere WD 40-Einheiten in einem Protein enthalten, so bilden sich globuläre Tertiärstrukturen aus, die als β -Propeller

bezeichnet werden (Reiner *et al.*, 1993). Zwischen vier und acht WD 40-Motive ordnen sich in einem solchen Fall ringförmig an und bilden die Propellerblätter des gefalteten Proteins, wobei jedes Propellerblatt wiederum die Form eines viersträngigen, verdrehten β -Faltblatts besitzt (Wall *et al.*, 1995). Berücksichtigt man die außerordentlich große Sequenzhomologie zwischen dem Schwammprotein und dem humanen Lis1-Protein, so ist anzunehmen, daß auch hier eine ähnliche Tertiärstruktur vorliegt.

Die Domänenstruktur des Lis1-Proteins aus *S. domuncula* ist in Abbildung 29 schematisch dargestellt. Abbildung 30 gibt die mögliche Anordnung der sieben enthaltenen WD 40-Motive und die charakteristische β -Propellerstruktur wieder:



Abbildung 29: Schematische Darstellung von LIS1_SUBDO

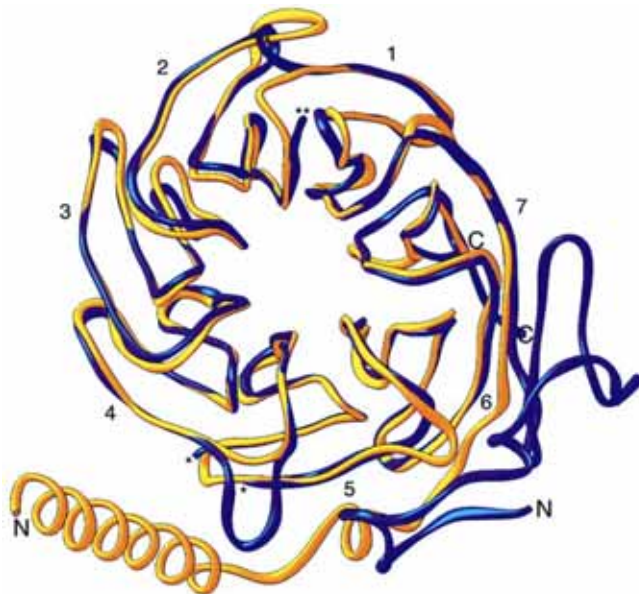


Abbildung 30: β -Propellerstruktur von Proteinen mit WD 40-Motiven

Die übereinandergelegten β -Propeller von Tup1 aus *S. cerevisiae* und der β -Untereinheit des G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus *H. sapiens*. Sieben WD 40-Einheiten bilden diese Struktur, die auch für das prädiktive Protein LIS1_SUBDO in Frage kommt (Abbildung nach Sprague *et al.*, 2000)

6.8 Analyse und Funktion des β -(1,3)-Glucan-Bindeproteins

Pathogene Mikroorganismen werden von ihrem Wirt durch spezielle *pattern recognition receptors* (PRR) erkannt und als Folge spezifische Abwehrreaktionen initiiert. Bei Invertebraten wie Krustazeen, Insekten oder Nematoden übernehmen vor allem LPS- und β -(1,3)-Glucan-Bindeproteine diese Funktion. Diese einfachen PRRs besitzen oft pleiotrope Bindeeigenschaften, können sowohl Lipopolysaccharide als Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien als auch β -(1,3)-Glucane als Zellwandbestandteile von Pilzen binden und werden in aller Regel nach einem Kontakt mit dem entsprechenden Pathogen hochreguliert (Beschin *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; 2000). Daraufhin kann die gesteigerte Synthese antimikrobieller Proteine oder die Aktivierung des pro-PO-Aktivierungssystems mit dem Resultat der Melanisierung erfolgen. Wie bereits von Lee *et al.* (2000) vermutet wurde, könnte die β -(1,3)-Glucan-bindende Region dieser Proteine auch die Funktion eines LPS-bindenden Motivs besitzen.

Im Fall des β -(1,3)-Glucan-Bindeproteins aus *S. domuncula* erfolgte dessen Induktion nach dem Kontakt mit LPS unter Steigerung der Transkriptionsrate. Diese erreichte nach 16 Stunden mit dem 2,2-fache Wert des *steady-state*-Transkriptionslevels ihr Maximum. Dieses Maximum wurde 8 Stunden vor dem Erreichen der Maxima der Transkriptionsraten der Alkyl-DHAP-Synthase und des Lissenzephalie 1-Gens erreicht, was die Vermutung nahe legt, dass dieses Protein bei höheren LPS-Konzentrationen in der Lage ist, als Erkennungsprotein auch für LPS zu fungieren und die adaptive Genexpression in dem Schwamm auslöst.

Die Aminosäuresequenz GLUBP_SUBDO (BLAST *accession number* AJ606470) wurde mit potentiellen LPS- und β -(1,3)-Glucan-Bindeproteinen (LGBPs) aus *GenBank* verglichen, wobei signifikante Sequenzähnlichkeiten zu dem LGBP des Flusskrebses *Pacifastacus leniusculus* (Lee *et al.*, 1999) mit 36 % identischen und 51 % ähnlichen Aminosäuren, zu dem *Coelomic cytolytic factor* (CCF1) des Ringelwurms *Eisenia foetida* (Beschin *et al.*, 1998) mit 35 % identischen und 54 % ähnlichen Aminosäuren und zu dem LGBP von *Penaeus stylirostris* mit 32 % identischen und 48 % ähnlichen Aminosäuren, demonstriert wurde. Diese Proteine sind in der Lage, das antimikrobielle pro-PO-Aktivierungssystem zu aktivieren, für dessen Existenz es in Meeresschwämmen Hinweise gibt (Müller *et al.*, 1999).

Bemerkenswert ist, dass das Schwamm-Protein in Analogie zu LGBPs anderer Invertebraten eine möglicherweise nichtfunktionelle β -(1,3)-Glucanase-Domäne besitzt. Diese Domäne ist charakteristisch für β -(1,3)-Glucan-spaltende Enzyme (Glucanasen) in Bakterien und Pflanzen, wobei Bakterien diese benutzen, um den Abbau der extrazellulären Matrix von Pilzen oder die Degradierung bakteriellen Zellwände zu bewirken. Pflanzen hingegen exprimieren β -(1,3)-Glucanasen als induzierbare Abwehrenzyme bei Befall mit Bakterien oder Pilzen, um diese abzuwehren (Molina *et al.* 1989; Sakellaris *et al.* 1990; Mauch *et al.*, 1988). Im Laufe der Evolution zu den Metazoa scheint die Glucan-spaltende Aktivität und damit die Funktion der direkten Pathogenenabwehr verlorengegangen zu sein. Lediglich die Binde- und Erkennungsfähigkeit für Pathogene erhalten blieb (Bachman und McClay, 1996; Lee *et al.*, 2000). Die ursprünglichen Funktion der β -(1,3)-Glucanasen reduzierte sich in den LGBPs somit auf eine rein signalweiterleitende Funktion, um letztendlich „effektivere“ Abwehrmechanismen wie die Synthese bioaktiver Abwehrprodukte oder die Aktivierung des pro-PO-Aktivierungssystem auszulösen. Auch für das älteste der β -(1,3)-Glucan-Bindeproteine aus *S. domuncula* kann ein solcher Funktionsverlust postuliert werden, was aber in weiteren Untersuchungen noch eindeutig geklärt werden soll.

In dem folgenden Sequenz-Alignment sind das β -(1,3)-Glucan-Bindeprotein aus *S. domuncula* mit den LGBPs aus *E. foetida*, *P. leniusculus* sowie *P. stylirostris* verglichen. Sowohl die β -(1,3)-Glucanase-Domäne (grün) als auch das potentielle Erkennungsmotiv für β -(1,3)-Bindungen in Polysacchariden (Yahata *et al.*, 1990; gelb) sind gekennzeichnet (Abbildung 31):

GLBP SUBDO	-----MALOLYSLAPAGVILLSCAFCTGORELVLALEDTTFEDFNL	: 40
LGBP PENST	MKTVLLSLSRMKGFVASVLLACGALAADIYOPEDCASSP--CMIFEDNFDYLDN	: 53
LGBP PASLE	-----MR--ALCFLLLACGALAVDWDPGSSSESP--CLIFNDDENDLNR	: 41
CCF1 EISFO	-----MRWTLVVLCLIFGEGFAFTDWDQMH---LWVQIEETFYFDG	: 37
GLBP SUBDO	SLWKHELTICGGGNSEFOWYTNNRSNSYVEDGVLHIKFTLLSDYLL-----DGD	: 89
LGBP PENST	DWWEHELTMSGGGNWEFOAYVNNRSISYTRDSTLEIKPELTANWK-----GD	: 100
LGBP PASLE	NWVKPEVTMSGGGNWEFOMYLNPNPLGYTRDSTLLIKPELTSKMY-----SE	: 88
CCF1 EISFO	AKMQHEVTATGGGNSEFQLYTQDGANSEVRDGLKLEIKETILLANINPQTGAPFET	: 92
GLBP SUBDO	NGVVNGOLNIWG-NOPADLCTGNAFFGGERNAOASGSYLNPIVSARLRTAESFSF	: 143
LGBP PENST	DELTSSTLDLYGMNGRGDVCTGNSYGGCSRTGSSS-NLVNPMVLSARLRTMSNFAF	: 154
LGBP PASLE	HELFNDELNLG-----DKCTDHRDMGCVRKSTSE-HIINPMMSAKFTTHPSFAF	: 136
CCF1 EISFO	DEMYNGVLDVWAMYG---ACTNTDNNGCYRTSAAG--DIEPMSARMRTFQKYSE	: 142
GLBP SUBDO	TYGKVEVCAKLPRGDWLWPAIWMLPTDNOYGGWPASGEIDLMESEGNAPNYTAGG	: 198
LGBP PENST	RYGRIEIRAKMPRGDWLWPAIWMLPRNWPYGAWPASGEIDILESNGND-NFGTLG	: 208
LGBP PASLE	RNGRVFVRAKMPRGDWLWPAIWMLPKDSRYGGWPASGEIDIVSESGNN-DYGNLG	: 190
CCF1 EISFO	THGRVVMHAKMPEVGDWLWPAIWMLPEEDWVYGGWPRSGEIDIETILGNR-DEKNTG	: 196
GLBP SUBDO	-----YDSFGSTLHWGVHYTONOFHRTHOVTSESOEODFTNDFHTYGLIWNETYI	: 248
LGBP PENST	-----NOYGGTTLHWGPFWIPYNFFFEKTHVEYS-ANEGSEADDFHWRLDWTIKGM	: 257
LGBP PASLE	-----HCHAGSTLHWGPNPOANMFLKTEKTYK-ANDGSEANNFHIWRUDWTRONM	: 239
CCF1 EISFO	GEFLGIQKMGSTMHWGEGMDDNRYWLTSLPKH-SIDWNYGDNFHTFWFWSFGLI	: 250
GLBP SUBDO	GTYLDTESNPVLOVPI-----TOSFFOLGG--WSPSPWANPWRGRRNAPFD	: 293
LGBP PENST	EEYVDEVLO--LTIDP-----GNSFWDFSG--YDSV-YENPWSAGSKMAPFD	: 299
LGBP PASLE	KEYVDDCLO--LTVDP-----GSNFWDFGG--LGNS-ONNPWRDGSKMAPFD	: 281
CCF1 EISFO	REFVDDNCALLDMPYPLIDANPWWVDFWENCKPWIPQYENONPWAGETNIAPFD	: 305
GLBP SUBDO	RRYFILLNLAVGGTGGFFPD-----EDGK-----PWNS--OSNAVNSFYDARDEW	: 337
LGBP PENST	ORFYILLNVAVGGTNGFFPD-----DVAS-----PWSNL--SPTAFLDFWNARDEW	: 344
LGBP PASLE	OKFYILLNLAVGGTNGYEPD-----GVSSNPAPWNN--SPHASRDFWNARGSW	: 329
CCF1 EISFO	QNEHFILLNVAVGGTNGEIPDGCINRGDPALQNPWSNGDWYNDAMRKFEEDARGNW	: 360
GLBP SUBDO	FETWTOSFOIDSVRVWVTYODVSPVTTTSTTTSSAIGTLVYLLTNSTLLHTIVCIV	: 392
LGBP PENST	LPSWOAGEGRISEGAAMOVYVRVWKMESAE-----	: 376
LGBP PASLE	LPSWEHGEHISENAALKVDYVKVWKMESVE-----	: 361
CCF1 EISFO	KWTWDD---EGDNNAMOVYIRVYKRN-----	: 384

Abbildung 31: Alignment des β -(1,3)-Glucan-Bindeproteins

GLBP SUBDO wurde mit dem *Coelomic cytolytic factor* aus *Eisenia foetida* (CCF1 EISFO; AF030028; Beschin et al., 1998), dem LGBP des Flusskrebsses *Pacifastacus leniusculus* (LGBP PASLE; AJ250128; Lee et al., 2000) sowie des LGBPs der Krustazee *Penaeus stylirostris* (LGBP PENST; AF473579; Roux et al., 2002) verglichen. Konservierte Aminosäuren sind schwarz (100 % Identität) und grau (60 % Identität; konservative Austausche) unterlegt. Das potentielle Erkennungsmotiv für β -(1,3)-Verknüpfungen in Polysacchariden ist rot unterstrichen, die konservierten Aminosäuren der katalytischen Triade bakterieller β -(1,3)-Glucanasen sind mit * gekennzeichnet.

7 Zusammenfassung

Die Schwämme (Porifera) sind die ältesten, vielzelligen Tiere der Erdgeschichte und zählen zu einer der reichhaltigsten Quellen bioaktiver Naturstoffe. Ein großes Problem der Weiterentwicklung von aus Schwämmen isolierbaren, pharmakologisch interessanten Substanzen bis zu ihrer medizinischen Anwendung, stellt jedoch das Problem der nachhaltigen Verfügbarkeit der Tiere dar. Bestünde die Möglichkeit, die Biosynthese von bioaktiven Sekundärstoffwechselprodukte bei begrenzter Biomasse durch experimentelle Maßnahmen zu erhöhen, so könnten dennoch ausreichende Substanzmengen gewonnen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nach Inkubation des Meeresschwammes *Suberites domuncula* mit dem bakteriellen Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) unter Anwendung der Differential Display-Technik eine differentielle Genexpression identifiziert. Die betreffenden Gene wurden kloniert, sequenziert und deren Beteiligung an der Biosynthese der aus dem Schwamm isolierbaren, bioaktiven lyso-PAF-Derivate diskutiert. Zum einen handelte es sich um das Schlüsselenzym der Etherphospholipid-Biosynthese Alkyl-Dihydroxyacetonphosphat-Synthase (Alkyl-DHAP-Synthase). Dessen cDNA-Sequenz fand Eingang in *GenBank* des EMBL unter der Zugangsnummer AJ 306615. Zum anderen handelte es sich um das Lissenzephalie 1-homologe Gen des Schwammes, welches als regulatorische β -Untereinheit des Enzyms PAF-Acetylhydrolase I bekannt ist. Dieses Enzym katalysiert die Deacetylierung von plättchenaktivierendem Faktor (PAF) unter Bildung von lyso-PAF. Durch phylogenetische Analyse wurde der Verwandtschaftsgrad zwischen den prädiktiven Schwammproteinen und anderen homologen Proteinen ermittelt und die eindeutige, entwicklungsgeschichtliche Zugehörigkeit zu den Proteinen der Metazoa nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde nur eine entfernte Ähnlichkeit zu Proteinen aus Bakterien, Pilzen, Pflanzen oder Algen identifiziert. Diese Tatsache belegt, dass nicht assoziierte Mikroorganismen, sondern der Schwamm selbst die beobachtete Reaktion initiierte.

Um des weiteren einen Zusammenhang zwischen dem extrazellulären LPS-Stimulus und der identifizierten Veränderung der Genexpression herzustellen, wurde durch Northern Blotting-Analyse die Transkriptionsrate des β -(1,3)-Glucan-Bindeproteins aus *S. domuncula* untersucht. Dessen LPS-induzierter Anstieg lieferte einen Hinweis auf die Beteiligung an der LPS-Erkennung und somit der Initiation der adaptiven Reaktion des Schwammes.

Aufgrund der beobachteten Hochregulation der genannten Gene wurde schließlich eine quantitative Analyse der in *S. domuncula* enthaltenen, antibakteriellen Etherphospholipide 1-O-Hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphat (lyso-PAF I) sowie 1-O-Octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphat (lyso- PAF II) durch die Abteilung für Naturstoffchemie des Pharmazeutischen Institutes der Universität von Neapel durchgeführt. Hierbei wurde nach 72-stündigem LPS-Kontakt ein, auf der identifizierten Variation der Genexpression beruhender, drastischer Konzentrationsanstieg von 25 % für lyso-PAF I sowie von 26,7 % für lyso-PAF II identifiziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde somit erstmals, sowohl durch die Analyse der durch LPS induzierten, differentiellen Genexpression, als auch durch eine Quantifizierung antibakterieller Etherphospholipide, ein völlig neuartiger und adaptiver antibakterieller Abwehrmechanismus des Meeresschwammes *Suberites domuncula* identifiziert und dessen molekularer Ursprung teilweise aufgeklärt.

8 Ausblick

Die vorliegenden Erkenntnisse legen eine medizinische Anwendung der aus *S. domuncula* isolierten bioaktiven lyso-Etherlipide 1-O-Hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphat sowie 1-O-Octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphat nahe. Aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkungen und ihrer ausgeprägten Zytotoxizität, möglicherweise über eine Induktion der Apoptose, könnten diese als Vorläufersubstanzen für antibakterielle und antitumorale Wirkstoffe dienen. Die Erkenntnis, dass synthetische Alkyletherphosphatidylcholine (Miltefosin® und Edelfosin®) den programmierten Zelltod über definierte Rezeptoren in der Zellmembran auslösen können, zeigt hoffnungsvolle Perspektiven für den erfolgreichen Einsatz verwandter Substanzen in der Tumorthherapie auf. Das Studium bioaktiver Sekundärmetabolite, besonders aus marinen Invertebraten wie den Porifera, verdeutlicht hierbei erneut das außerordentliche Potential der Natur, pharmakologisch-aktive Substanzen zu produzieren, die bei der Behandlung von Krankheiten an Mensch und Tier hilfreich sein können.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Züchtung von marinen Schwämmen in Marikultur, Aquarien und Bioreaktoren, insbesondere falls der Schwamm und nicht Schwamm-assoziierte Bakterien als Produzent der begehrten Sekundärmetaboliten identifiziert werden, stellt sich die Frage, mit welchen Methoden eine Steigerung der Substanzausbeute in geschlossenen Systemen erreicht werden kann. Hierzu wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine einfache experimentelle Maßnahme eingeführt. Durch Simulation einer bakteriellen Infektion durch den gezielten Kontakt mit der LPS-Fraktion gramnegativer Bakterien konnte im Fall von *S. domuncula* ein bis zu 27%-iger Anstieg der enthaltenen bioaktiven Etherphospholipide erreicht werden. Damit ist ein weiterer Schritt auf dem Weg zur Etablierung von Bioreaktoren zur nachhaltigen Produktion pharmakologisch-aktiver Sekundärmetaboliten aus marinen Schwämmen gelungen.

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen, Akronyme und Summenformeln

Buchstabe	Abkürzung	Bedeutung
A	Abb.	Abbildung
	AIX	Ampicillin-IPTG-X-Gal
	Amp	Ampicillin
	AP	Alkalische Phosphatase
	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	Aq. bidest.	Aqua bidestillata
	AS	Aminosäure
B	Bp	Basenpaar
C	°C	Grad Celsius
	C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
	cDNA	complementary DNA
	CDP	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.-1.13,7] decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate
	<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
	cm	Zentimeter
	cm ²	Quadratzenimeter
	C-terminal	carboxyterminal
	cps	count per second
D	DD	Differential Display
	ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphat
	DIG	Digoxigenin
	<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
	DMPC	Dimethylpyrocarbonat
	DNA	Desoxyribonucleic acid
	DNase	Desoxyribonuklease
	dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
E	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	ESI	Elektropray-Ionisation
F	FDD	fluorescence Differential Display
	FIA-MS	flow injection analysis mass spectrometry
G	g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) oder Gramm
	<i>G. cydonium</i>	<i>Geodia cydonium</i>
	GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H	HCl	Salzsäure
	<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
	H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
	HCOH	Formaldehyd
I	I	Stromstärke
	IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
	IR	Infrarot (infrared)
	IRD	infrared dye
J	JNK	c-Jun N-terminal Kinase

K	Kb	Kilobase
	KCl	Kaliumchlorid
	kDa	Kilodalton
	KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
	KOH	Kaliumhydroxid
L	l	Liter
	LB	Luria Bertani
	LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i>
	log	logarithmisch
M	m	Meter
	mA	Milliampere
	M	molar [mol/l]
	MCS	<i>multiple cloning site</i>
	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
	min	Minute(n)
	ml	Milliliter
	mm	Millimeter
	mM	millimolar
	MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
	MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
	mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
	MS	Massenspektroskopie (<i>mass spectroscopy</i>)
	µl	Mikroliter
	µM	Mikromolar
	m/V	Masse pro Volumen
N	NaCl	Natriumchlorid
	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
	NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
	Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
	NaOH	Natriumhydroxid
	Na ₃ PO ₄	Natriumphosphat
	ng	Nanogramm
	nm	Nanometer
	NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
O	N-terminal	aminoterminal
	OD	Optische Dichte
R	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
	RNase	Ribonuklease
	rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
	RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
S	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
	sec	Sekunde(n)
	SSC	<i>saline sodiumcitrate</i>
	SRm160/300	<i>serine/arginine (SR)-related nuclear matrix protein of 160 kDa and a 300-kDa nuclear matrix antigen</i>

T	Tab.	Tabelle
	TBE	<i>Tris Borate</i> EDTA buffer
	TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
	T _m	Primer-Schmelztemperatur
	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	tRNA	Transfer-RNA
U	U	<i>unit(s)</i> oder Spannung
	ü. N.	über Nacht
	UV	ultraviolett
V	V	Volt
	V/V	Volumen pro Volumen
X	<i>X-Gal</i>	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid

Abkürzungscodes für Nukleotide

Nukleotid	Einbuchstabencode
Guanin	G
Adenin	A
Thymin	T
Cytosin	C

Abkürzungscodes für Aminosäuren

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

10 Literaturverzeichnis

Alberts, B, Bray, D, Lewis, J, Raff, M, Roberts, K und Watson, JD (1989)

Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc, New York, London

Al-Darmaki S, Schenkein HA, Tew JG, Barbour SE (2003) Differential expression of Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase in macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology* **170**:167-173

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990)

Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-410

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl Acids Res* **25**:3389-3402

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977) Methods for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA-probes. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**(12):5350-5354

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1994) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc USA

Bachman ES, McClay DR (1996) Molecular cloning of the first metazoan b-1,3 glucanase from eggs of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 6808–6813

Battershill CN, Page MJ (1996) Sponge aquaculture for drug production. *Aquac Updates* **16**:5-6

Bairoch, A (1992) Prosite: a dictionary of sites and patterns in proteins *Nucl Acids Res* **20**: 2013-2018

Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Etwiller L, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Howe KL, Bewley CA, Holland ND, Faulkner DJ (1996) Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* **52**: 716-722

Baumann H, Gauldie J (1994) The acute phase response. *Immunol Today* **15**(2):74-80

Beck G, Habicht GS (1997) Das Wirbeltier-Immunsystem: Vorformen bei Wirbellosen. *Spektrum der Wissenschaften* **1**:30-35

Beck S, Koester H (1990) Application of dioxethane chemiluminescent probes to molecular biology. *Analyt. Chem.* **62**(21):2258 - 2270

- Beckmann F (1996)** Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition host response and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 216:39-81
- Benson DA, Boguski MS, Lipman DJ, Ostell J, Ouellette BF, Rapp BA, Heeler DL (1999)** GenBank. *Nucl Acids Res* 27:12-17
- Berg JM, Tymocko JL, Stryer L (2003)** Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Bergmann W, Feeney RJ (1951)** Contribution to the study of marine sponges 32 The nucleosides of sponges. *J Org Chem* 16:981-987
- Bergquist PR (1978)** Sponges. University of California Press, Berkeley
- Berkow RL, Kraft AS (1985)** Bryostatin, a non-phorbol macrocyclic lactone, activates intact human polymorphonuclear leukocytes and binds to the phorbol ester receptor *Biochem Biophys Res Commun* 131(3):1109-1116
- Beschin A, Bilej M, Hanssens F, Raymakersi J, Van Dyck E, Revets H, Brys L, Gomez J, De Baetselier P, Timmermans M (1998)** Identification and cloning of a Glucan- and Lipopolysaccharide-binding Protein from *Eisenia foetida* earthworm involved in the activation of prophenoloxidase cascade. *J Biol Chem* 273(38):24948–24954
- Bewley CA, Holland ND, Faulkner DJ (1996)** Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* 52: 716-722
- Bewley CA, Faulkner DJ (1998)** Lithistid sponges: star performance of hosts to the stars? *Angew Chem (Int Ed)* 37:2162-2178
- Biermann J, Just WW, Wanders RJ, van den Bosch H (1999)** Alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase form a protein complex in peroxisomes. *Eur J Biochem* 261:798-803
- Birnboim, HC und Doly, J (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 7:1513-1522
- Blackhall FH, Ranson M, Radford JA, Hancock BW, Soukop M, McGown AT, Robbins A, Halbert G, Jayson GC (2001)** A phase II trial of bryostatin 1 in patients with Non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer* 84:465-469
- Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR (2004)** Marine natural products. *Nat. Prod Rep* 21:1–49

- Böhm M, Hentschel U, Friedrich A, Fieseler L, Steffen R, Gamulin V, Müller IM, Müller WEG (2001)** Molecular response of the sponge *Suberites domuncula* to bacterial infection. *Mar Biol* **139**:1037-1045
- Bone R (1991)** The pathogenesis of sepsis. *Ann Int Med*, **115**(6):457-469
- Bradbury AF, Smyth DG (1987)** Biosynthesis of the C-terminal amide in peptide hormones. *Biosci Rep* **7**:907-916
- Brown AJ, Snyder F (1981)** Alkyldihydroxyacetone P Synthase: solubilization, partial purification, new assay method and evidence for a ping pong mechanism. *J Biol Chem* **257**(15):8835-8839
- Brown TA (1993)** Gentechnologie für Einsteiger. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Carpenter RC (1986)** Partitioning herbivory and its effects on coral algal communities. *Ecol Monogr* **56**:345-365
- Cairns C, McStay B (1995)** Identification and cDNA cloning of a *Xenopus* nucleolar phosphoprotein, xNopp180, that is the homolog of the rat nucleolar protein Nopp140. *J Cell Science* **108**:3339-3347
- Campbell NA (1997)** Biologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 649-651
- Capon RJ (2001)** Marine Bioprospecting - Trawling for Treasure and Pleasure. *Eur J Org Chem* **4**:633-645
- Chabot GG, Bouchard J, Momparler RL (1983)** Kinetics of deamination of 5-aza-2'-deoxycytidine and cytosine arabinoside by human liver cytidine deaminase and its inhibition by 3-deazauridine, thymidine or uracil arabinoside. *Biochem Pharmacol* **32**:1327-8
- Chomczynski P, Sacchi N (1987)** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159
- Cohen S, Chang ACY, Hsu L (1972)** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**:2110-2114
- Cooper JA, Esch FS, Taylor SS, Hunter T (1984)** Phosphorylation sites in enolase and lactate dehydrogenase utilized by tyrosine protein kinases in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **259**:7835-7841

- Crawford LV, Waring MJ (1967)** Supercoiling of polyoma virus DNA measured by its interaction with ethidium bromide. *J Mol Biol* **25**(1):23-30
- Datta SC, Ghosh MK, Hajra AK (1990)** Purification and properties of acyl/alkyl dihydroxyacetone-phosphate reductase from guinea pig liver peroxisomes. *J Biol Chem* **265**:8268-8274
- Dayhoff MO, Schwartz RM, Orcutt BC (1978)** A model of evolutionary change in protein. In: Dayhoff MO (ed) Atlas of protein sequence and structure. *Natl Biomed Res Foundation*, Washington, DC; pp 345-352
- de Hostos EL, Bradke B, Lottspeich F, Guggenheim R, Gerisch G (1991)** Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein b subunits. *EMBO J* **10**:4097–4104
- Delaloge S, Yovine A, Taamma A, Riofrio M, Brain E, Raymond E, Cottu P, Goldwasser F, Jimeno J, Villalona-Calero MA, Eckhardt SG, Weiss G, Hidalgo M, Beijnen JH, van Kesteren C, Rosing H, Campbell E, Kraynak M, Lopez-Lazaro L, Guzman C, Von Hoff DD, Jimeno J, Rowinsky EK (2002)** A phase I and pharmacokinetic study of ecteinascidin 743 on a daily x 5 schedule in patients with solid malignancies. *Clin Cancer Res* **8**:75-85
- De Risi JL, Iyer VR, Brown PO (1997)** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**:680-686
- de Silva ED, Scheuer PJ (1980)** Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge *Luffariella variabilis*. *Tetrahedron Lett*; **21**:1611-1614
- De Vet ECJM, van den Broek BT, van den Bosch H (1997)** Nucleotide sequence of human alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase cDNA reveals the presence of a peroxisomal targeting signal 2. *Biochim Biophys Acta* **1346**(1):25-29
- De Vet ECJM, Prinsen HCMT, van den Bosch H (1998)** Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a *Caenorhabditis elegans* homolog of mammalian alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase: evolutionary switching of peroxisomal targeting signals. *Biochim Biophys Res Commun* **242**:277-281
- De Vet ECJM, van den Bosch H (1998)** Nucleotide Sequence of Alkyl-dihydroxyacetonephosphateSynthase cDNA from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem Biophys Res Commun* **252**:629–633

- De Vet ECJM, Hilkes YHA, Fraaije MW, van den Bosch H (2000)** Alkyl-dihydroxyacetonephosphate Synthase: presence and role of flavin adenine dinucleotide. *J Biol Chem* **275**(9):6276-6283
- Dietzfelbinger HF, Kühn DG, Zafferani M, Hanauske AR, Rastetter JW, Berdel WE (1993)** Removal of breast cancer cells from bone marrow by *in vitro* purging with ether lipids and cryopreservation. *Cancer Res* **53**:3747-3751
- Ebermeier JC (1815)** Tabellarische Übersicht der Kennzeichen der Ächtheit und Güte der einfachen, zubereiteten und zusammengesetzten Arzneimitteln. JA Barth, Leipzig
- Emes RD, Ponting CP (2001)** A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. *Hum Mol Genet* **10**:2813-2820
- Esper EJC (1794)** Die Pflanzenthier in Abbildungen nach der Natur mit Farben erleuchtet nebst Beschreibungen. Raspesche Buchhandlung, Nürnberg
- Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A (2002)** The PROSITE database, its status in 2002 *Nucleic Acids Res* **30**:235-238
- Faulkner DJ (2000b)** Marine pharmacology. *Antoine van Leeuwenhoek* **77**:135-145
- Faulkner DJ (2002)** Marine natural products. *Nat Prod Rep* **19**:1-48
- Faulkner DJ (2000a)** Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *Nat Prod Rep* **17**:1-6
- Felsenstein J (1993)** PHYLIP, ver. 3.5. University of Washington, Seattle
- Fleming A (1929)** On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B influenzae. *Br Journal of Experimental Pathology* **10**:226-236
- Forth W, Henschler D, Rummel W (2001)** Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag
- Fraaije MW, van den Heuvel RHH, van Berkel WJH, Mattevi A (1999)** Covalent flavinylation is essential for efficient redox catalysis in vanillyl-alcohol oxidase. *J Biol Chem* **274**:35514-35520
- Frank MB (1997)** Ethanol Precipitation of Nucleic Acids In: Frank, MB (ed) *Molecular Biology Protocols*
- Fremisco JR, Glass DB, Krebs EG (1980)** Optimal spatial requirements for the location of basic residues in peptide substrates for the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **255**:4240-4245

- Friedrich AB, Merckert H, Fendert T, Hacker J, Procksch P, Hentschel U (1999)** Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridisation (FISH). *Mar Biol* **134**:461-470
- Fusetani N (ed) (2000)** *Drugs from the sea*. Basel, Karger, 158 ff
- Garcia-Higuera I, Fenoglio J, Li Y, Lewis C, Panchenko MP, Reiner O, Smith TF, Neer EJ (1996)** Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* **5**(44):13985-94
- Gallagher BW, Hille R, Raile K, Kiess W (2001)** Apoptosis: live or die – hard work either way! *Horm Metab Res* **33**:511-519
- Gavel Y, von Heijne G (1990)** Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X- Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* **3**:433-442
- Gemsa D, Kalden JR, Resch K (1997)** Immunologie. Thieme Verlag Stuttgart
- Glaser KB, Jacobs RS (1986)** Molecular pharmacology of manolide: inactivation of bee venom phospholipase A₂. *Biochem Pharmacol* **35**:449-453
- Glass DB, Smith SB (1983)** Phosphorylation by cyclic GMP-dependent protein kinase of a synthetic peptide corresponding to the autophosphorylation site in the enzyme. *J Biol Chem* **258**:14797-14803
- Glass DB, El-Maghrabi MR, Pilkis SJ (1986)** Synthetic peptides corresponding to the site phosphorylated in 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as substrates of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* **261**:2987-2993
- Glauser M, Zanetti G, Baumgartner J, Cohen J (1991)** Septic shock In *Pathogenesis Lancet* **338**:732-736
- Göthel H (1997)** Farbatlas Mittelmeerfauna. Ulmer Verlag Stuttgart
- Grabley S, Thiericke R (1999)** Bioactive agents from natural sources: Trends in discovery and application. *Adv Biochem Eng Biotech* **64**; Springer Verlag Scheper T (Ed)
- Grand RJA (1989)** Acylation of viral and eukaryotic proteins. *Biochem J* **258**:625-638
- Grebenjuk VA, Kuusksalu A, Kelve M, Schütze J, Schröder HC, Müller WEG (2002)** Induction of 2',5'-oligoadenylate synthetase in the marine sponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium* by the bacterial endotoxin Lipopolysaccharide. *Eur J Biochem* **269**:1382-1392

- Greenberg JT, Guo A, Klessing DF, Ausubel FM (1994)** Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**:551-563
- Guillemot F, Billault A, Auffray C (1989)** Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **86**:4594-4598.
- Hajra AK, Horie S, Webber KO (1988)** The role of peroxisomes in glycerol ether lipid metabolism. *Prog Clin Biol Res* **282**:99-116
- Hamaguchi K, Geiduschek EP (1962)** The effect of electrolytes on the stability of desoxyribonucleate helix. *JACS* **84**:329-1337
- Hart JB, Lill RE, Hickford SJH, Blunt JW, Munro MHG (2000)** The halichondrins: Chemistry, biology, supply and delivery In Fusetani N (Ed) *Drugs from the sea*. Karger, Basel, pp 134-153
- Hattori M, Arai H, Inoue K (1993)** Purification and characterization of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **268**:18748–18753
- Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K (1994)** Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* **370**:216-218
- Henderson B, Poole S, Wilson (1996)** Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* **60**:316-41
- Henikoff S, Henikoff JG (1994)** Protein family classification based on searching a database of blocks. *Genomics* **19**:97-107
- Hettema EH, Distel B, Tabak HF (1999)** Import of proteins into peroxisomes. *Biochim Biophys Acta* **1451**:17-34
- Ho YS, Swenson L, Derewenda U, Serre L, Wei Y, Dauter Z, Hattori M, Adachi T, Aoki J, Arai H, Inoue K, Derewenda ZS (1997)** Brain acetylhydrolase that inactivates platelet-activating factor is a G-Protein like trimer. *Nature* **385**:89-93
- Hoffmann JA, Reichart JM, Hetru C (1996)** Innate immunity in higher insects. *Curr Opin Immunol* **8**:8-13
- Hofmann K, Stoffel W (1993)** TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biol Chem Hoppe-Seyler* **374** (166)

- Henderson B, Poole S, Wilson (1996)** Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev* **60**:316-41
- Henneberry AL, McMaster CR (1999)** Cloning and expression of a human choline/ethanolaminephosphotransferase: synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Biochem J* **339**:291-298
- Hooper JNA, Van Soest RWM (2002)** In: Systema Porifera: A guide to the classification of sponges, Kluwer/Plenum, New York
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo T, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S (1999)** Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product. *J Immunol* **162**:3749-3752
- Humphreys, T (1994)** Rapid allogeneic recognition in the marine sponge *Microciona prolifera*: implications for evolution of immune recognition. *Ann NY Acad Sci* **712**:342-345
- Humphreys, T, Reinherz, EL (1994)** Invertebrate immune response recognition, natural immunity and the evolution of positive selection. *Immunol Today* **15**:316
- Hunter T (1982)** Synthetic peptide substrates for a tyrosine protein kinase. *J Biol Chem* **257**:4843-4848
- Iorizzi M, Minale L, Riccio R, Higa T, Tanaka J (1991)** Starfish saponins, part 46 Steroidal glycosides and polyhydroxysteroids from the starfish *Culcita novaeguineae*. *J Nat Prod* **54**:1254-1264
- Irninger S, Egli CM, Braus GH (1991)** Different classes of polyadenylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**:3060-3069
- Iwanaga S, Kawataba S, Mitura Y, Seki N, Shigenaga T, Muta T (1994)** Clotting cascade in the immune response of horseshoe crab, S. 79-96 In: Hoffmann JA Jr., Janeway CA, Natori S (ed), Phylogenetic perspectives in immunity: the insect host defense. RG Landes Company, Austin, Texas
- Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss A, Berman J (1999)** Miltefosine, an oral agent for the treatment of indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* **341**:1795-1800
- Jiang Q, Akashi S, Myake K, Petty HR (2000)** Cutting Edge: Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR-4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* **165**(7):3541-3544

- Johansson MW, Söderhäll K (1996)** The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates. *Prog Mol Subcell Biol* **15**:46
- Karlson P, Doenecke D, Koolman J (1994)** Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 14. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Kasimir S, Schönfeld W, Alouf JE, König W (1990)** Effect of *Staphylococcus aureus* delta toxin on human granulocyte functions and platelet-activating factor metabolism. *Infect Immun* **58**:1653-1659
- Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (2001)** *Lehrbuch Medizinische Mikrobiologie*, Thieme Verlag Stuttgart
- Kim MH, Cooper DR, Olesky A, Devedjiev Y, Derewenda U, Reiner O, Otlewski J, Derewenda ZS (2004)** The structure of the N-terminal domain of the product of the lissencephaly gene Lis1 and its functional implications. *Structure* **12**:987-998
- Kim SH, Vlkolinsky R, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G (2001)** The reduction of NADH ubiquinone oxidoreductase 24- and 75-kDa subunits in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Life Sci* **68**(24):2741-50
- Kim YS, Ryu JH, Han SJ, Choi KH, Nam KB, Jang ICH, Lemaitre B, Brey PT, Lee WJ (2000)** Gram-negative bacteria binding protein, a pattern recognition receptor for lipopolysaccharide and β -1,3-glucan that mediates the signalling for the induction of innate immune genes in *Drosophila melanogaster* cells. *J Biol Chem* **275**:32721-32727
- Kishimoto A, Nishiyama K, Nakanishi H, Uratsuji Y, Nomura H, Takeyama Y, Nishizuka Y (1985)** Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **260**:12492-12499
- Kobayashi J, Ishibashi M (1993)** Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem Rev* **93**:1753-1796
- Kopp EB, Medzhitov R (1999)** The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Microbiol* **11**:13-18
- Kozak M (1978)** How do eukaryotic ribosomes select initiation regions in mRNA? *Cell* **15**:1109-1123
- Kozak M (1991)**. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* **266**:19867-19870
- Knippers R (2001)** Molekulare Genetik. 8. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart

- Kreil G (1984)** Occurrence, detection, and biosynthesis of carboxy-terminal amides. *Meth Enzymol* 106:218-223
- Kubaneck J, Whalen KE, Engel S, Kelly SR, Henkel TP, Fenical W, Pawlik JR (2002)** Multiple defense roles for triterpene glycosides from two Caribbean sponges. *Oecologia* 131:125-136
- Kume K, Shimizu T (1997)** cDNA Cloning and Expression of Murine 1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphate Acyltransferase
Biochem Biophys Res Comm 237:663-666
- Kube N, Waller U (2003)** Blaue Biotechnologie: Stand und Perspektiven der marinen Naturstoffe. Technologiestiftung Schleswig-Holstein
- Kültz D (1998)** Phylogenetic and functional classification of Mitogen- and Stress-activated protein kinases. *J Mol Evol* 46:571-588
- Lambert WT, Burke ST (2002)** Halichondrin B: Synthesis of a C1-C14 Model via Desymmetrization of (+)-Conduritol E. *Organic Letters* 5(4):515-518
- Lazarow PB, Fujiki Y (1985)** Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol* 1:489–530
- Lee SW, Tomasetto C, Sager R (1991)** Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (7):2825-2829
- Lee TC, Malone B, Snyder F (1986)** A new *de novo* pathway for the formation of 1-Alkyl-2-acetyl-sn-glycerols, precursors of platelet activating factor.
J Biological Chemistry 261(12):5373-5377
- Lee SY, Wang, R, Söderhäll, K (2000)** A Lipopolysaccharide- and β -1,3-Glucan-binding Protein from Hemocytes of the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus* Purification, Characterization and cDNA cloning *Journal of Biological Chemistry* 275(2):1337–1343
- Lee YK, Lee JH, Lee HK (2001)** Microbial Symbiosis in Marine Sponges. The *J Microbiology* 39(4):254-264
- Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtke H (1977)** RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions: A critical reexamination. *Biochemistry* 16:4743-4751
- Leonard NJ, McDonald JJ, Reichmann ME (1970)** Reaction of diethyl pyrocarbonate with nucleic acid components. *Proc Natl Acad Sci USA* 67:93
- Lesk AM (2003)** Bioinformatik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Lewin B (2002)** Gene. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

- Liang P (2002)** A decade of differential display. *Biotechniques* **33**:338-346
- Liang P, Averboukh L, Pardee AB (1993)** Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucl Ac Res Vol* **21**:3269-3275
- Liang P, Pardee AB (1992)** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**:967-971
- Lin R, Thompson S und Priess JR (1995)** pop-1 encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**:599-609
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M (1993)** Cloning the differences between complex genomes. *Science* **259**:946-951
- Mackie GO, Singla CL (1983)** Studies on hexactinellid sponges .I. Histology of *Rhabdocalyptus dawsoni* (Lambe, 1873). *Philos Trans R Soc Lond B* **301**:365-400
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J (1997)** Biology of microorganisms. Simon and Schuster, New Jersey
- Mancini A, Del Rosso F, Roberti R, Orvietani P, Coletti L, Binaglia L (1999)** Purification of ethanolaminephosphotransferase from bovine liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* **1437**:80-92
- Mangel A, Leitao JM, Batel R, Zimmermann H, Muller WE, Schroder HC (1992)** Purification and characterization of a pore-forming protein from the marine sponge *Tethya lyncurium*. *Eur J Biochem* **210**:499-507
- Marchaloni JJ, Schluter SF (1994)** Developement of immune system. *Ann NY Acad Sci* **712**:1-12
- Mattevi A, Fraaije MW, Mozzarelli A, Olivi L, Coda A, Berkel WJH (1997a)** Crystal structure and inhibitor binding in the octameric flavoenzyme vanillyl-alcohol oxidase: the shape of the active-site cavity controls substrate specificity. *Current Biol* **5**:907-920
- Mattevi A, Fraaije MW, Coda A, Berkel WJH (1997b)** Crystallization and preliminary X-ray analysis of the flavoenzyme vanillyl-alcohol oxidase from *Penicillium simplicissimum*. *Proteins* **27**:601-603
- Matzke A, Krug HF, Massing U (2000)** Synthetische Phospholipide als Antitumormitte: ein neues Konzept. *Nachrichten Forschungszentrum Karlsruhe* **31**:105-114
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T (1988)** Antifungal hydrolases in pea tissue. *Plant Physiol* **88**:936-942

- Mayer AMJ, Gustafson KR (2000)** Marine Pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds. *Int J Cancer*, **105**: 291-299
- McClintock JB, Bakre BJ (eds) (2001)** Marine chemical ecology. CRC, Boca Raton, Florida
- McCuskey R, Urbaschek R, Urbaschek B (1996)** The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* **32**:752-763
- Medzhitov R, Hurlburt PP, Janeway Jr CA (1997)** A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-397
- Medzhitov R, Janeway CA (1997a)** Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**:295-298
- Medzhitov R, Janeway CA (1997b)** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**:4-9
- Medzhitov R, Janeway CA (1998)** An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol* **10**:12-15
- Miletich JP, Broze GJ Jr (1990)** Beta protein C is not glycosylated at asparagine 329. The rate of translation may influence the frequency of usage at asparagine-X-cysteine sites. *J Biol Chem* **265**:11397-11404
- Misset JL, Marty M, Cvitkovic E (2001)** Ecteinascidin 743: a marine-derived compound in advanced, pretreated sarcoma-patients-preliminary evidence of activity. *J Clin Oncol* **19**:1248-1255
- Mittelman A, Chun HG, Puccio C, Coombe N, Lansen T, Ahmed T (1999)** Phase II clinical trial of didemnin B in patients with recurrent of refractory anaplastic astrocytoma of glioblastoma multiforme (NSC 325319). *Invest New Drugs* **17**:179-182
- Molina M, Cenamor R, Sanchez M, Nombela C (1989)** Purification and some properties of *Candida albicans* exo-1,3-beta-glucanase. *J Gen Microbiol* **135**:309-314.
- Montell C, Fisher EF, Caruthers MH, Berk AJ (1983)** Inhibition of RNA cleavage but not polyadenylation by a point mutation in the 3' consensus sequence AAUAAA. *Nature* **305**:600-605
- Morris, PJ (1993)** The developmental role of the extracellular matrix suggests a monophyletic origin of the kingdom Animalia. *Evolution* **47**:152-165
- Moscona AA (1968)** Cell aggregation: properties of specific cell-ligands and their role in the formation of multicellular systems. *Dev Biol* **18**:250-277

- Motley AM, Hettema EH, Ketting R, Plasterk R, Tabak HF (2000)** Caenorhabditis elegans has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO Reports* **1**:40-46
- Müller WEG, Zahn RK (1973)** Purification and characterization of a species specific aggregation factor in sponges *Exp Cell Res* **80**:95-104
- Müller WEG, Zahn RK, Bittlingmeier K, Falke D (1977a)** Inhibition of herpesvirus DNA-synthesis by 9- β -D-arabinofuranosyladenosine *in vitro* and *in vivo*. *Ann New York Acad Sci* **284**, 34
- Müller WEG, Zahn RK, Beyer R, Falke D (1977b)** 9- β -D-Arabinofuranosyladenine as a tool to study herpes simplex virus DNA replication *in vitro*. *Virology* **76**, 787
- Müller WEG, Sobel C, Diehl-Seifert B, Maidhof A, Schröder HC (1987a)** Influence of the antileukemic and anti-human immunodeficiency virus agent avarol on selected immune responses *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Pharmacol* **36**(9):1489-94
- Müller WEG, Sladic D, Zahn RK, Bassler KH, Dogovic N, Gerner H, Gasic MJ, Schröder HC (1987b)** Avarol-induced DNA strand breakage *in vitro* and in Friend erythroleukemia cells. *Cancer Res* **47**(24 Part 1):6565-71
- Müller WEG, Müller IM, Gamulin V (1994)** On the monophyletic evolution of the Metazoa. *Brazil J Med Biol Res* **27**:2083-2096
- Müller WEG (1995)** Molecular phylogeny of Metazoa (Animals): Monophyletic origin. *Naturwissenschaften* **82**:321-329
- Müller WEG, Steffen R, Rinkevich B, Matranga V, Kurelec B (1996)** The multixenobiotic resistance mechanism in the marine sponge *Suberites domuncula*: its potential applicability for the evaluation of environmental pollution by toxic compounds. *Marine Biol* **125**:165-170
- Müller WEG, Schröder HC (1997)** Bioaktive Substanzen aus Schwämmen: Gene weisen den Weg bei der Suche nach neuen Arzneimitteln *Biologie in unserer Zeit* **27**:389-397
- Müller WEG (1998)** Origin of Metazoa: Sponges as living fossiles. *Naturwissenschaften* **85**:11-25
- Müller WEG, Koziol C, Müller IM, Wiens M (1999)** Towards an understanding of the molecular basis of immune response in sponges: the marine demosponge *Geodia cydonium* as a model. *Micro Res Tech* **44**:219-236

- Müller WEG (2001)** How was metazoan threshold crossed: the hypothetical Urmetazoa. *Comp Biochem Physiol [A]* **129**:433-460
- Müller WEG, Klemm M, Thakur NL, Schröder HC, Aiello A, D'Esposito M, Menna M, Fattorusso E (2004)** Molecular/chemical ecology in sponges: evidence for an adaptive antibacterial response in *Suberites domuncula*. *Mar Biol* **144**:19–29
- Müller WEG, Krasko A, Skorokhod A, Bünz C, Grebenjuk Müller WEG (2001)** How was metazoan threshold crossed: the hypothetical Urmetazoa. *Comp Biochem Physiol [A]* **129**:433-460
- Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp Quant Biol* **51**:263-273
- Munro MHG, Blunt JW, Dumdei EJ, Hickford SJH, Lill RE, Shangxiao L, Battershill CN, Duckworth AR (1999)** The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J Biotechnology* **79**:15-25
- Nagan N, Zoeller RA (2001)** Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* **40**:199-229
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R, Smith TF (1994)** The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**:297-300
- Nicole E, Faulkner NE, Dujardin DL, Tai CY, Vaughan KT, O'Connell CB, Wang YL, Vallee RB (2000)** A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* **2**:784-791
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y (1990)** A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl. Acids Res.* **18**: 6169
- Noda N, Tanaka R, Nishi M, Inoue S, Miyahara K (1993)** Isolation and characterization of seven lyso platelet-activating factors and two lyso phosphatidylcholines from the crude drug “Suitetsu”, (the Leech, *Hirudo nipponica*). *Chem Pharm Bull* **41**:1366-1368
- Noda N, Tsunefuka S, Tanaka R, Miyahara K (1992b)** Isolation of two 1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholines from the earthworm, *Pheretima asiatica* *Chem Pharm Bull* **40**:1349-1351
- Noda N, Tsunefuka S, Tanaka R, Miyahara K (1992a)** Isolation and characterization of eight 1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholines from the crude drug “Jiryu”, the earthworm, *Pheretima asiatica*. *Chem Pharm Bull* **40**:2756-2758

- Ofman R, Hogenhout EM, Wanders RJA (1999)** Identification and characterization of the mouse cDNA encoding acyl-CoA: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* **1439**:89-94
- Osenbach RK, Harvey S (2001)** Neuraxial infusion in patients with chronic intractable cancer and noncancer pain. *Curr Pain Headache Rep* **5**:241-249
- Osinga R, Tramper J, Wijffels RH (1999)** Marine bioprocessing engineering: from ocean to industry. TIBTECH vol 17, pp 303-304
- Osumi T, Tsukamoto T, Hata S, Yokota S, Miura S, Fujiki Y, Hijikata M, Miyazawa S, Hashimoto T (1991)** Aminoterminal presequence of the precursor of peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase is a cleavable signal peptide for peroxisomal targeting. *Biochem Biophys Res Commun* **181**:947-954
- Pancer Z, Kruse M, Schäcke H, Scheffer U, Steffen R, Kovács P, Müller WEG (1996)** Polymorphism in the immunoglobulin-like domains of the receptor tyrosine kinase from the sponge *Geodia cydonium*. *Cell Ad Com* **4**:327-339
- Patschinsky T, Hunter T, Esch FS, Cooper JA, Sefton BM (1982)** Analysis of the sequence of amino acids surrounding sites of tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* **79**:973-977
- Perovic-Ottstadt S, Adell T, Proksch P, Wiens M, Korzhev M, Gamulin M, Müller IM, Müller WEG (2004)** A (1-3)- β -D-glucan recognition protein from the sponge *Suberites domuncula*: mediated activation of fibrinogen-like protein and epidermal growth factor gene expression. *Eur. J. Biochem* **271**:1924-1937
- Pinna LA (1990)** Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* **1054**:267-284
- Polokoff MA, Wing DC, Raetz CRH (1981)** Isolation of somatic cell mutants defective in the biosynthesis of phosphatidylethanolamine. *J Biol Chem* **256**:7687-7689
- Proksch P (1994)** Defensive roles for secondary metabolites from marine sponges and sponge-feeding nudibranches. *Toxicon* **32**:639-655
- Proksch P, Ebel R (1998)** Ecological significance of alkaloids from marine invertebrates In: Roberts MF, Wink M (eds) *Alkaloides, biochemistry, ecology and medicinal applications*. Plenum, New York, pp 379-394
- Proksch P (1999)** Chemical defense in marine ecosystems In: Wink M (Ed) *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology*. Academic, Sheffield, pp 134-154

- Procksch P, Edrada RA, Ebel R (2002)** Drugs from the seas – current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**:125-134
- Pryer NK, Salama N R, Schekman R, Kaiser CA (1993)** Cytosolic Sec13p complex is required for vesicle formation from the endoplasmic reticulum in vitro. *J. Cell. Biol.* **120**:865-875.
- Rauhut R (2001)** Bioinformatik, Wiley-VCH, Weinheim
- Read RC, Wyllie DH (2001)** Toll receptors and sepsis. *Curr Opin Crit Care* **7**(5):371-375
- Reiner O, Carrozzo R, ShenY, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey CT, Ledbetter DH (1993)** Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeat *Nature* **364** (6439):717-721
- Reiswig HM, Mackie GO (1983)** Studies on hexactinellid sponges. III. The taxonomic status of Hexactinellida within the Porifera. *Philos Trans R Soc Lond B* **301**:419-428
- Remick, D (1995)** Applied molecular biology of sepsis. *J Crit Care* **10**:198-212
- Renooji W, Snyder F (1981)** Biosynthesis of 1-Alkyl-2-Acetyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin (platelet activating factor and a hypotensive lipid) by cholinephospho- transferase in various rat tissues. *Biochim Biophys Acta* **563**:545-556
- Richter G (1907)** Wer hat zuerst die *spongia usta* gegen den Kropf empfohlen? *Arch Klein Chirurgie* **82**:952
- Rietschel E, Holst O, Brade I, Müller-Loennies S, Marnat U, Zahringer U, Beckmann F (1986)** Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* **216**:39-81
- Rietschel ET, Brade H, Brade L, Brandenburg K, Schade U, Seydel U, Zahringer U, Galanos C, Luderitz O, Westphal O, Labischinski H, Kusumoto S, Shiba T (1987)** Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity. *Prog Clin Biol Res* **231**:25-53
- Rietschel ET, Brade L, Lindner B, Zahringer U (1992)** Biochemistry of lipopolysaccharides In: Morrison, DC und Ryan, JL (eds) *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides*, vol 1, p3-41, Molecular biology and cellular biology CRC Press Inc Boca Raton, Fl
- Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Müller-Loennies S, Mamat U, Zähringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Hauschildt S, Loppnow H, Schönbeck U, Flad HD, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann RR (1996)** Bacterial endotoxin: chemical constitution,

biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **216**:39-81.

Rinehart KL (2000) Antitumor compounds from tunicates. *Med Res Rev* **20**(1):1-27

Rinehart KL Jr, Gloer JB, Hughes RG Jr, Renis HE, McGovren JP, Swynenberg EB, Roux MM, Pain A, Klimpel KR, Dhar AK (2002) The lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*) *J Virol* **76**:7140-7149 Erratum in: *J Virol* (2002) **17**:8978

Rychilk W (1995) Priming efficiency in PCR. *Biotechniques.* **18**(1):84-86; 88-90

Rychilk W, Rhodes RE (1989) A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **17**(21):8543-8551

Rychilk W (1993) Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction, in PCR Protocols. *Methods in Molecular Biology* **15**:31. B. A White, B. A. (Ed.) Humana Press Inc. Totowa, NJ.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491

Saiki R. K. (1989). PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Erlich, H. A., ed.) S. 17, Stockton Press, New York

Sakellaris H, Pemberton JM, Manners JM (1990) Genes from *Cellvibrio mixtus* encoding β -1,3-endoglucanase. *Appl Environ Microbiol* **56**:3204–3208

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning I-III. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, polymerase. *Science* **239**:487-491

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* **74**(12):5463-5467

Santavy DL, Willenz P, Colwell RR (1990) Phenotypic study of bacteria associated with the caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl Environ Microbiol.* **56**(6):1750-1762.

Sapir T, Elbaum M, Reiner O (1997) Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO* **16**:6977-6984

- Sapir T, Eisenstein M, Burgess HA, Horesh D, Cahana A, Aoki J, Hattori M, Arai H, Inoue K, Reiner O (1999)** Analysis of lissencephaly-causing LIS1 mutations *Eur J Biochem* **265**:181-188
- Sarin PS, Sun D, Thornton A, Müller WEG (1987c)** Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus/lymphadenopathyassociated virus) by Avarol and Avarone. *J Nat Canc Inst* **78**:663-666
- Sarma AS, Daum T, Müller WEG (1993)** Secondary metabolites from marine sponge. Ullstein-Mosby Verlag, Berlin: Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt
- Sarma AS (2004)** Marine sponge metabolites: Avarol, Avarone and congeners – biological properties and synthetic studies. Vortrag im Institut für physiologische Chemie der Universität Mainz am 30.04.2004
- Sasaki S, Shionoya A, Ishida M, Gambello MJ, Yingling J, Wynshaw-Boris A, Hirotsume S (2000)** A LIS1/NUDEL/Cytoplasmic Dynein HeavyChain Complex in the Developing and Adult Nervous System. *Neuron* **28**:681-696
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995)** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**:467-470
- Schröder HC, Brümmer F, Fattorusso E, Aiello A, Menna M, de Rosa S, Batel R, Müller WEG (2003)** Sustainable production of bioactive compounds from sponges: primmorphs as bioreactors *In: Marine Molecular Biotechnology Sponges*, Müller WEG (ed) Springer Verlag, Heidelberg
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998)** SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signalling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:5857-5864
- Schwartz DA (2002)** The genetics of innate immunity. TL Petty, 44th Annual Aspen Lung Conference
- Segar R, Krebs EG (1995)** Protein Kinases 7. The Mapk Signaling Cascade. *FASEB* **9**(9):726-735
- Shin BA, Kim YR, Lee IS, Sung CK, Hong J, Sim CJ, Im KS, Jung JH (1999)** Lyso-PAF analogues and Lysophosphatidylcholines from the marine sponge *Spirastrella abata* as inhibitors of cholesterol biosynthesis. *J Nat Prod* **63**:1554-1557

- Shin SW, Park SS, Park DS, Kim MG, Kim SC, Brey PT, Park HY (1998)** Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, *Hyphantria cunea*, using PCR-based differential display and subtractive cloning. *Insect Biochem Mol Biol* **28**:827-837
- Silverman MH, Ostro MJ (1999)** Bacterial Endotoxin in Human Disease. XOMA (USA) LLC
- Sim SS (2001)** The involvement of phospholipase A2 in ethanol-induced gastric muscle contraction. *Eur J Pharmacol* **413**:281-5
- Smith HO, Wilcox KW (1970)** A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. *J. Mol.Biol.* **51**:379-391
- Snyder F (1997)** CDP-choline:alkylacetylgllycerol cholinephosphotransferase catalyzes the final Stepp in the de novo synthesis of platelet-activating factor. *Biochim Biophys Acta* **1348**:111-116
- Söderhäll K, Cerenius L (1998)** Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immun* **10**:23-28
- Sprague ER, Redd MJ, Johnson AD, Wolberger C (2000)** Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast *EMBO J* **19**:3016-3027
- Sritunyaluksana K, Söderhäll K (2000)** The ProPO and clotting system in crustacean. *Aquaculture* **191**:53-59
- Stafforini DM, Prescott SM, McIntyre TM (1987)** Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties.. *J Biol Chem* **262**:4223–4230
- Stamps AC, Elmore MA, Hill ME, Kelly K, Makda AA, Finnen MJ (1997)** A human cDNA sequence with homology to non-mammalian lysophosphatidic acid acyltransferases. *Biochem J* **326**:455-461
- Steel HC, Cockeran R, Anderson R (2002)** Platelet-activating factor and lyso-PAF possess direct antimicrobial properties in vitro. *APMIS* **110**:158-164
- Stremmler KE, Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. (1989)** An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. *J. Biol. Chem.* **264**:5331–5334
- Storch V, Welsch U (1991)** Kurzes Lehrbuch der Zoologie. Spektrum Akademischer Verlag
- Simpson TL (1984).** The cell biology of sponges. Springer, Berlin Heidelberg, New York

- Smith HO, Wilcox KW (1970)** A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. *J Mol Biol* **51**:379-391
- Steel D, Whitehead A (1994)** The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* **15**(2):81-88
- Subramani S (1998)** Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover and movement. *Physiol Rev* **78**:171-88.
- Tai CY, Dujardin DL, Faulkner NE, Vallee, RB (2002)** Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J Cell Biol* **156**:959–968.
- Tanaka R, Hashimoto A, Noda N and Miyahara K (1995)** Two 1-alkyl-2-acyl choline glycerophospholipids having an arachidonoyl or eicosapentaenoyl group, from the clam worm (*Marphysa sanguinea*). *Chem Pharm Bull* **43**:156-158
- Tanaka R, Ishizaki H, Kawano S, Okuda H, Miyahara K, Noda N (1997)** Fruiting-inducing activity and antifungal properties of lipid components in members of annelida. *Chem Pharm Bull* **45**:1702-1704
- Thakur NL, Hentschel U, Krasko A, Pabel CT, Anil AC, Müller WEG (2003)** Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for the defense. *Aquatic Microbial Ecol* **31**:77-83
- Thein S. L., Lynch J. R., Weatherall D. J. und Wallace R. B. (1986)** Direct detection of haemoglobin E with synthetic oligonucleotides. *Lancet* **1**:8472-8493
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994)** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**:4673-4680
- Towler DA, Gordon JJ, Adams SP, Glaser L (1988)** The Biology and Enzymology of Eukaryotic Protein Acylation. *Annu Rev Biochem* **57**:69-99
- Turon X, Galera J, Uriz MJ (1997)** Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *J Exp Zool* **278**:22-36
- Ulevitch R, Tobias P (1995)** Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin *Ann Rev Immunol* **13**:437-457
- Unger C, Eibl H, Breiser A, von Heyden HW, Engel J, Hilgard P, Sindermann H, Peukert M, Nagel GA (1988)** Hexadecylphosphatidylcholine (D 18506) in the topical treatment of skin metastases: a phase-I trial. *Onkologie* **11**:295-296

- Unger C, Damenz W, EAM Fleeer, Kim DJ, Breiser A, Hilgard P, Engel J, Nagel G, Eibl H (1989)** Hexadecylphosphatidylcholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. *Acta Oncologica* **28**:213-217
- Unson MD, Holland ND, Faulkner DJ (1994)** A brominated secondary metabolite synthesized by the caynobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar Biol* **119**:1-11
- Vacelet J (1975)** Etude en microscopie electronique de l'association entre bacteries et spongiaires du genre Verongia (Dictyoceratida). *J Microsc Biol Cell* **23**:271-288
- Vacelet J, Donadey C (1977)** Electron microscope study of the association between sponges and bacteria. *J Exp Mar Ecol* **30**:301-314
- Varterasian ML, Pemberton PA, Hulburd K, Rodriguez DH, Murgo A, Al-Katib AM (2001)** Phase II study of bryostatin 1 in patients with relapsed multiple myeloma. *Invest New Drugs* **19**:245-247
- Velulesco V, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995)** Serial analysis of gene expression. *Science* **270**:484-487
- Vetvicka V, Sima P (1998)** Evolutionary mechanisms of defense reactions.
Basel: Birkhäuser Verlag
- Villalona-Calero MA, Eckhardt SG, Weiss G, Hidalgo M, Beijnen JH, van Kesteren C, Rosing H, Campbell E, Kraynak M, Lopez-Lazaro L, Guzman C, Von Hoff DD, Jimeno J, Rowinsky EK (2002)** A phase I and pharmacokinetic study of ecteinascidin 743 on a daily x 5 schedule in patients with solid malignancies. *Clin Cancer Res* **8**:75-85
- Vogel S (1977)** Current-induced flow through living sponges in nature. *Proc Nat Acad Sci USA* **74**:2069- 207
- Vogelstein B, Gillespie, D (1979)** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:615-619
- Vogler WR, Berdel WE (1993)** Autologous bone marrow transplantation with alkyllysophospholipid- purged marrow. *J Hematotherapy* **2**:93-102
- Wagner C, Steffen R, Koziol C, Batel R, Lacorn M, Steinhart H, Simat T, Müller WEG (1998)** Apoptosis in sponges: a biomarker for environmental stress (cadmium and bacteria). *Mar Biol* **131**:411-421
- Wall MA, Coleman DE, Lee E, Iniguez-Lluhi JA, Posner BA, Gilman AG, Sprang SR (1995)** The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* **83**:1047-1058

- Wehner G, Gehring W (1995)** Zoologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 626-632
- Weinbaum G, Burger MM (1973)** A two-component system for surface guided reassociation of animal cells. *Nature* **244**:510
- Weinheimer AJ, Spraggins RL (1969)** The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA₂ and its acetate, methyl ester) in the gorgonian Plexaura homomalla Chemistry of coelenterates XV. *Tetrahedron Lett* **15**:5185-5188
- West J, Tompkins CK, Balantac N, Nudelman E, Meengs B, White T, Bursten S, Coleman J, Kumar A, Singer JW, Leung DW (1997)** Cloning and expression of two human lysophosphatidic acid acyltransferase cDNAs that enhance cytokine-induced signaling responses in cells. *DNA Cell Biol* **16**:691-701
- Westheide W, Rieger R (1996)** Spezielle Zoologie Erster Teil: Einzeller und wirbellose Tiere. Gustav Fischer, Stuttgart, 75-119
- Wickens MP, Stephenson P (1984)** Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutations prevent mRNA 3' end formation. *Science* **226**:1045-1051
- Wiens M, Krasko A, Perovic S, Müller WEG (2003b)** Caspase-mediated apoptosis in sponges: cloning and function of the phylogenetic oldest apoptotic proteases from Metazoa. *Biochim Biophys Acta* **1593**:179-189
- Wykle RL, Malone B, Snyder F (1980)** Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J Biol Chem* **255**:10256-10260
- Wilkinson CR, Fay P (1979)** Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria. *Nature* **279**:527-529
- Wilkinson CR (1987)** Significance of microbial symbionts in sponges evolution and ecology. *Symbiosis* **4**:135-146
- Williams FE, Trumbly RJ (1990)** Characterization of TUP1, a mediator of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**:6500-6511
- Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AI, Godowski PJ (1998)** Toll-like receptor 2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**:284-286
- Yayli N, Findlay JA (1994)** Polar metabolites from the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. *J Nat Prod* **57**:84-89

Zarkower D, Stephenson P, Sheets M, Wickens M (1986). The AAUAAA sequence is required both for cleavage and for polyadenylation of simian virus pre-mRNA *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **6**:2317-2323

Zeeck A, Bach G, Terlau H (2001) Das medizinische Potential von Naturstoffen. *Internist* **42**:1422-1427

Zimmermann GA, Prescott SM, McIntyre TM (1992) Platelet-activating factor: a fluid and cell-associated mediator of inflammation. *In*: Gallin JL, Goldstein IM, Syderman R (eds) *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. Raven press, New York

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

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie der Johannes-Gutenberg-Universität zu Mainz in der Zeit von Mai 2001 bis August 2004 unter Anleitung von Professor angefertigt.

Herrn Professor danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die hervorragenden Arbeitsbedingungen. Die in allen Fragen gewährte Unterstützung trug wesentlich zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre bei. Desweiteren danke ich ihm dafür, mir die Möglichkeit eingeräumt zu haben, 6 Monate in der Abteilung für Naturstoffchemie des Pharmazeutischen Instituts der Universität von Neapel wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Herrn Professor und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe danke ich für die großartige Betreuung sowie die schnelle und zuverlässige Durchführung der quantitativen massenspektrometrischen Analysen.

Herrn Professor danke ich für die Bereitschaft, sich als Gutachter dieser Dissertation zur Verfügung gestellt zu haben. Des Weiteren danke ich den Herren Professoren für ihre Bereitschaft, sich als Prüfer zur Verfügung gestellt zu haben.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft, Kollegialität und die ständige Bereitschaft zu offener Diskussion.

Mein besonderer persönlicher Dank gilt meinen Eltern für die außerordentliche Unterstützung in allen Belangen.