

**Funktionelle und morphologische Untersuchungen der
Silikataufnahme und Nadelbildung im marinen Schwamm
*Suberites domuncula***

Dissertation zu Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Pharmazie und Chemie
der Johannes Gutenberg Universität Mainz

Matthias Rothenberger
geb. in Mainz

Mainz 2005

Tag der mündlichen Prüfung:

1. Einleitung	1
1.1. Transportvorgänge und Mechanismen in biologischen Systemen	1
1.1.1. Transport durch Zellmembranen	1
1.1.2. Diffusion kleiner Moleküle durch den Phospholipid-Bilayer	1
1.1.3. Membrantransport über Transportproteine	2
1.2. Chemie und Transport von Bikarbonat	7
1.2.2. Transport von Bikarbonat	9
1.3. Chemie und Transport von Silikat biologischen Systemen	13
1.3.1. Chemie des Siliziums und der Silikate	13
1.3.2. Chemie des Silikats in wässriger Lösung	13
1.4. Silikat in biologischen System	14
1.4.1. Protozoen	16
1.4.2. Höhere Pflanzen (<i>Cyperaceae</i> , <i>Poaceae</i>)	19
1.4.3. Kieselalgen (<i>Diatomeae</i>)	19
1.4.4. Schwämme (<i>Porifera</i>)	23
2. Zielsetzung der Arbeit	26
3. Material	28
3.1. Chemikalien	28
3.2. Verbrauchsmaterialien	30
3.3. Geräte	31
3.4. Molekularbiologische Arbeitskits und Enzyme	32
3.5. Verwendete Computerprogramme und Internetdienste	32
3.6. Schwämme	32
3.7. cDNA Bank	33
3.8. Vektoren	33
3.9. Primer	33
3.10. Antikörper	34
4. Methoden	35
4.1. Dissoziation von Schwammzellen	35
4.1.1. Verwendete Lösungen	35
4.2. Bildung von Primmorphen	36
4.3. Isolation von Axialfilamenten aus dem Schwamm <i>Suberites domuncula</i>	37
4.4. Isolation der Silikatnadeln von <i>Suberites domuncula</i>	37
4.5. Isolation der Proteinfilamente aus Silikatnadeln	37
4.5.1. Verwendete Lösungen	37
4.6. Aufreinigung der Filamente durch Dialyse und Aufkonzentrierung mittels Membranen	38
4.7. Quantifizierung der Proteinfilament-Konzentration	38
4.8. Lyophilisierung von Schwammgewebe	39
4.9. Kritische Punkt Trocknung von Schwammgewebe	39
4.10. Fluoreszenzmikroskopie	40
4.10.1. Funktionsprinzip der Fluoreszenzmessung	40
4.10.2. Aufzeichnen der Fluoreszenzreaktion	41
4.10.3. Färbung mit Lysosensor [®] yellow/blue-DND-160 (PDMPO)	41
4.10.4. Blockierung des Anionentransportes durch das Stilbenderivat 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonat (<i>DIDS</i>)	42
4.11. Rasterelektronenmikroskopie (REM)	44
4.12. Transmissions- Elektronenmikroskopie (TEM)	44
4.12.1. Verwendete Lösungen	46
4.13. Immunogoldstaining und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	46
4.13.1. Gewebepräparation	46

4.13.2. Verwendete Lösungen	47
4.13.3. Antikörperbehandlung für das Immunogoldstaining	48
4.13.4. Verwendete Lösungen	49
4.14. Polymerase Kettenreaktion (PCR)	51
4.14.1. Standard PCR-Reaktion	52
4.14.2. PCR-Produktaufreinigung, Ligation/Transformation linearer DNA	53
4.14.3. Blau–Weiß Selektion rekombinater transformierter Zellen	55
4.15. PCR mit vektorspezifischen Primern (Checking-PCR)	55
4.16. Komplementieren von Klonen mittels PCR	56
4.17. DNA-Cycle-Sequencing (Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger)	56
4.17.1. Allgemeines Prinzip der Sequenzierung	56
4.17.2. Aufbau der Sequenzierreaktion	57
4.17.3. Instrumentelles Sequenzieren	58
4.17.4. PCR zur Sondenherstellung mittels Polymerase Kettenreaktion	59
4.18. <i>In situ</i> Hybridisierung	60
4.19. Verwendete Lösungen	62
4.20. Northern Blot	64
4.20.1. Allgemeines Funktionsprinzip	64
4.20.2. RNA-Isolation	64
4.20.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	66
4.20.4. RNA-Gelelektrophorese	66
4.20.5. Verwendete Lösungen	66
4.20.6. DIG-Markierung einer Sondensequenz für den Northern Blot	67
4.20.7. Ablauf des Northern Blotting	68
4.20.8. Verwendete Lösungen	70
4.21. Agarose Gelelektrophorese	71
4.21.1. Gelherstellung	71
4.21.2. Verwendete Lösungen	72
4.21.3. Färbung von DNA im Agarosegel	72
4.22. SDS-Gelelektrophorese	72
4.22.1. Gelherstellung für SDS-Gele	73
4.22.2. Färbung von SDS-Page Gelen	75
4.23. Western Blot	75
4.23.1. Entwicklung mit NBT/X-Phosphat	77
4.23.2. Verwendete Lösungen	77
4.24. Herstellung von polyklonalen Antikörpern	78
4.24.1. Immunisierung der Wirtstiere und Herstellung der Sera	78
4.24.2. Analyse des Antikörpertiters in immunisierten Kaninchen	79
4.24.3. Verwendete Lösungen	80
4.25. Phylogenetische Analyse und Sequenzanalyse	81
4.25.1. Analyse mittels Datenbanken	81
4.25.2. Sequenzanalyse mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	81
4.25.3. Analyse der Aminosäure-Sequenzhomologie (Protein-Alignment)	82
4.25.4. Erstellen von phylogenetischen Stammbäumen	83
5. Ergebnisse	84
5.1. Klonierung eines möglichen Kandidatengens für den Silikattransport im marinen Schwamm <i>Suberites domuncula</i>	84
5.1.1. Klonierung und Charakterisierung des NBCSA-Cotransporters	84
NBCSA_SUBDO	85
5.2. Analyse und Charakterisierung der Basensequenz und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz	87

5.3. Suche nach Sequenzhomologien zu bekannten Transportersequenzen zur weiteren Charakterisierung von <i>NBCSA_SUBDO</i>	97
5.4. Phylogenetische Analyse der Proteinsequenz von <i>NBCSA_SUBDO</i>	99
5.5. Analyse der <i>SDNBCSA</i> -Transporter RNA Transkripte	100
5.5.1. Analyse mittels Northern Blotting	100
5.5.2. Analyse mittels In situ Hybridisierung	101
5.6. Western Blotting	103
5.7. Untersuchung des Effekts von Silikat-Zugabe auf die spektralen Eigenschaften von Schwammzellen in Gegenwart des Fluoreszenzfarbstoffes PDMPO (LysoSensor® yellow-blue)	105
5.8. Untersuchungen mittels elektronenmikroskopischen Methoden	108
5.8.1. Transmissionselektronenmikroskopie	108
5.8.2. Entwicklung des Axilalfilamentes in <i>Suberites domuncula</i>	108
5.8.3. Nadelbildung in Sklerozyten	109
5.8.4. Morphologie der Silikatanreicherung	111
6. Diskussion	113
6.1. Silikatpolymerisation in <i>Suberites domuncula</i>	114
6.2. Klonierung und Analyse der putativen Transporter cDNA	119
6.3. Phylogenetische Analyse der Proteinsequenz von <i>NBCSA_SUBDO</i>	123
6.4. Weiterführende Untersuchungen und Funktionsanalysen des <i>NBCSA_SUBDOM</i> Transporters	124
6.4.1. Funktionelle Untersuchungen der Bifunktionalität durch die Zugabe von Silikat	124
6.4.2. Siliziumabhängige Genexpression des <i>NBCSA_SUBDOM</i> Transporters	127
1.1.1. Gewebeabhängige Genexpression des <i>NBCSA_SUBDO</i> -Transporters	131
6.5. Ausblick und Perspektiven für die weitere Erforschung der Silikatpolymerisation in <i>Demospongien</i>	137
7. Zusammenfassung	139
8. Literaturverzeichnis	141
9. Abkürzungsverzeichnis	148
9.1 Akronyme	148
9.2 Aminosäuren	149
9.3 Nukleotidbasen	149
10. Danksagung	150

1. Einleitung

1.1. Transportvorgänge und Mechanismen in biologischen Systemen

1.1.1. Transport durch Zellmembranen

Die Zellmembran stellt eine semipermeable Membran zwischen dem Inneren der Zelle und der extrazellulären Umgebung dar. Sie besteht in ihrer Grundstruktur aus einem Phospholipid-Bilayer, der für wasserlösliche Moleküle wie beispielsweise Glucose oder Aminosäuren undurchlässig ist. Ein Transport solcher kleiner polarer Moleküle wird durch Transportproteine gewährleistet, welche mit dem Phospholipid-Bilayer assoziiert sind. Der Transport von polaren Makromolekülen erfolgt über zytototische Mechanismen. Da die verschiedenen Zelltypen eine individuelle Zusammensetzung an zu transportierenden Molekülen besitzen, entstehen dadurch spezifische Sätze von Transportermolekülen.

1.1.2. Diffusion kleiner Moleküle durch den Phospholipid-Bilayer

Obwohl die Zellmembran formell für wasserlösliche Moleküle nicht permeabel ist, können kleine ungeladene polare Moleküle sie jedoch mittels Diffusion überwinden. Dazu gehören CO_2 , Harnstoff, Ethanol und O_2 . Der Diffusionsvorgang verbraucht keine Energie und erfolgt entlang des Konzentrationsgefälles dieser Verbindung, zu welchem die Diffusionsrate proportional ist. Transportvorgänge dieser Art zeigen eine Zunahme der Entropie (positiver ΔS Wert) und eine Abnahme der freien Energie (negativer ΔG Wert). Der Transport ist unspezifisch. Ein weiterer wichtiger Parameter für die Diffusionsrate eines Stoffes ist der Öl/Wasser-Verteilungskoeffizient, der er einen entscheidenden Beitrag für die Ausbildung des Konzentrationsgradienten leistet. Allgemein gilt, dass je lipidlöslicher die Substanz ist, d.h. je höher ihr Verteilungskoeffizient, umso höher ist auch ihre Diffusionsrate. Ist der Koeffizient allerdings zu niedrig, kann die Substanz nicht in die Membran eindringen. Bei einem zu hohen Verteilungskoeffizienten würde der Stoff in der Membran akkumulieren. Eine quantitative Betrachtung der passiven Diffusion erfolgt über das Ficksche Gesetz (Abb. 1.1). Dabei ist die Diffusionsrate proportional zum Konzentrationsgradienten ($c_2 - c_1$). Der Diffusionskoeffizient D ist umgekehrt proportional zur Viskosität der Lösung und proportional zur Diffusionsfläche A .

Der von diffundierenden Teilchen erzeugte osmotische Druck kann durch die van't Hoffsche Gleichung beschrieben und quantifiziert werden (Abb. 1.2).

$$(dM/dt) = D \times P \times (A/d) \times (c_2 - c_1)$$

Abb. 1.1: Ficksches Gesetz zur quantitativen Beschreibung des passiven Diffusionsverhaltens von Partikeln. (dM/dt) = pro Zeiteinheit diffundierende Stoffmasse, D = Diffusionskoeffizient, P = Verteilungskoeffizient zwischen Membran und Außenmedium, A = Diffusionsfläche, d = Dicke der Membran, $(c_2 - c_1)$ = Konzentrationsgradient.

$$P_o = (c \times b) \times R \times T$$

Abb. 1.2: Van't Hoff'sches Gesetz zur Beschreibung des osmotischen Drucks. P_o = Druck, cb = Produkt der Konzentrationen, R = allgem. Gaskonstante, T = absolute Temperatur.

Hierbei ist der osmotische Druck P_o das Produkt aus der Stoffkonzentration cb , der allgemeinen Gaskonstante R , und der absoluten Temperatur T . Je höher also die absolute Temperatur und die Konzentration des Stoffes ist, umso größer ist auch der osmotische Druck.

1.1.3. Membrantransport über Transportproteine

Transportproteine erlauben einen geregelten und steuerbaren Transport von Molekülen durch Membranen. Generell unterteilt man die zellulären Transportproteine in drei funktionell verschiedene Klassen (Tab. 1.1).

Transporterklasse		Charakteristika
1	ATP-getriebene Pumpen (ATPasen)	Aktiver Transport, hohe Transportrate
2	Kanalproteine	Energetisch begünstigt, schneller Umsatz
3	Transporter (Carrier)	Transport entlang Konzentrationsgefälle, niedrige Transportrate

Tab. 1.1: Einteilung der Transportproteine in verschiedene Klassen (Aus Lodish „Molecular Cell Biology“, 4th Edition 1999).

1.1.3.1. ATP-getriebene Pumpen (ATPasen)

ATPasen transportieren aktiv Moleküle durch Membranen entgegen eines chemischen Konzentrationsgradienten oder eines elektrischen Potentials. Da dieser Transport energieaufwendig ist, geschieht er unter Hydrolyse von ATP zu ADP + P als Energielieferant. Dadurch wird die Gesamtreaktion energetisch begünstigt. Bekannte Beispiele für diesen aktiven Transport sind ATPasen welche den niedrigen Calcium- und Natriumspiegel in praktisch allen tierischen Zellen gewährleisten oder einen niedrigen pH-Wert in Lysosomen aufrechterhalten. Dabei verbrauchen sie bis zu 30% des gesamten ATP des Organismus. Generell unterteilt man ATPasen in vier Klassen. Während die ATPasen der Klassen P, F und V nur Ionen transportieren, können durch die ATPasen der ABC (ATP binding cassette)-Superfamilie sowohl Ionen als auch kleine Moleküle transportiert werden (Tab. 1.2).

	ATPase	Transport	Beispiele
1	Klasse P	H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+}	Na/K-ATPase Zytoplasmamembran
2	Klasse F	H^+	Innere Mitochondrienmembran
3	Klasse V	H^+	Endosomale und lysosomale Zytoplasmamembran
4	ABC-Superfamilie	Ionen und kleine Moleküle	Zytoplasmamembran

Tab. 1.2: Einteilung der ATPasen in ihre verschiedenen Unterklassen und Substratmoleküle. (Aus Lodish „Molecular Cell Biology“, 4th edition 1999).

1.1.3.2. Kanalproteine

Kanalproteine transportieren Wasser oder andere spezifische Moleküle entlang ihres Konzentrationsgefälles oder elektrischen Potentialgefälles durch die Zellmembran. Dieser Transport ist energetisch begünstigt. Durch die Bildung von Poren wird ein schneller Transport gewährleistet. Einige Poren sind durchgehend offen, beispielsweise jene, die durch einen permanenten Kaliumionenfluß das Membranruhepotential verursachen. Andere Kanalproteine befinden sich in einem geschlossenen Zustand und werden nur auf ein

Aktivierungssignal hin geöffnet. Der Transport mittels Kanalproteinen hat eine fundamentale Bedeutung hinsichtlich der Funktion von Nervenzellen und deren Übertragungswege. Eingeteilt werden können die Kanäle in spannungsabhängige Kanäle, ligandengesteuerte Kanäle und Gap junctions (Tab. 1.3).

Spannungsabhängige Ionenkanäle sind verantwortlich für die Erzeugung und Weiterleitung von elektrischen Signalen an Zellmembranen (Aktions-, Synapsen- und Rezeptorpotentiale). Ihre Regulation erfolgt durch das Membranpotential. Die ligandengesteuerten Ionenkanäle stehen im Mittelpunkt der Signalübertragung an chemischen Synapsen. Sie werden in drei Unterklassen gegliedert. Für die erste Unterklasse steht stellvertretend der nikotinsche Acetylcholinrezeptor. Die zweite Unterklasse wird von den Glutamat-Rezeptoren gebildet, während die dritte Unterklasse die P2X-Rezeptoren umfasst und als physiologischen Liganden extrazelluläres ATP besitzt. Connexine, Gap junctions oder elektrische Synapsen bestehen aus Proteinuntereinheiten die sich zu einem Connexon zusammenlagern. In Vertebraten synchronisieren Connexine die Kontraktion der Herzmuskelzellen und der intestinalen Peristaltik. Auch für den Transport von kleinen Metaboliten und für die Embryogenese sind Connexine von Bedeutung.

Eine Selektivität bezüglich der transportierten Ionen wird über mehrere Faktoren erreicht. Die Energiedifferenz zwischen Bindungsenergie und Hydratationsenergie entscheidet darüber, ob ein Ion von einem Kanal über die Membran geleitet wird. Der Unterschied in der Hydratationsenergie ist also eine Grundlage der Ionenselektivität von Kanälen, welche nicht alleine durch die Ionengröße zu erklären ist. Die Beschaffenheit der Bindestelle entscheidet darüber, welches Ion geleitet wird. Dasjenige Ion, welches am besten in die geometrische Anordnung von Aminosäureresten der Bindestelle passt, hat die höchste Bindungsenergie und kann deshalb am leichtesten seinen Wassermantel abstreifen.

1.1.3.3. Membrantransport mittels spezifischen Carrierproteinen

Der Transport vieler Moleküle, Stoffe und Substanzen wird durch Membrantransportproteine vermittelt. Im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Molekülklassen binden hier nur wenige Substratmoleküle (bzw. nur ein einziges) an die jeweilige Zielstruktur. Nach der Bindung des Substrats erfährt der Transporter eine konformelle Änderung. Da jeder Transportvorgang mit einer konformellen Änderung einhergeht, liegt die Transportrate deutlich niedriger als bei ATPasen oder Kanalproteinen. Transporter können nach ihrer Funktionalität in verschiedene Typen unterteilt werden (Tab. 1.4).

Kanalklasse		Unterteilung	Ionen/Moleküle
1	Spannungsabhängig	Aufgrund des Substrates	Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-
2	Ligandengesteuert	Acetylcholin, GABA, Glycin, 5HT ₃	Na^+
		Glutamat	Ca^{2+}
		PX2	Kationen
3	Gap junction (elektrische Synapse)	Aufgrund des Expressionsmusters	Kleine Metabolite, Ionen

Tab. 1.3: Beispiele für Kanalproteine mit ihren dazugehörigen Unterscheidungsmerkmalen und den durch sie transportierten Molekülen.

Transportprotein		Transportiertes Molekül (Beispiel)	
1	Uniporter	Glucose, Ca^{2+} ,	
2	Cotransporter	Symporter	Aminosäuren, Citrat, H^+ , Na^+
		Antiporter	$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

Tab. 1.4: Einteilung der spezifischen Transporterprotein nach ihrer Funktionsweise.

1.1.3.3.1. Uniporter-vermittelter Transport (erleichterte Diffusion)

Die Zytoplasmamembran enthält eine Reihe verschiedener Uniporter, welche Aminosäuren, Nukleotide, einfache Zucker und andere kleine Moleküle entlang ihres Konzentrationsgradienten in und aus der Zelle transportieren. Dabei wird die Transportrichtung durch den chemischen Potentialgradienten bestimmt. Die Transport ähnelt einer Enzymreaktion, bei welcher eine bereits thermodynamisch begünstigte Reaktion noch weiter beschleunigt wird. Obwohl man den Transport auch als erleichterte Diffusion bezeichnet, unterscheidet sich dieser von der passiven Diffusion in wesentlichen Punkten.

Die Transportrate ist weitaus höher als die durch das Ficksche Gesetz vorausgesagte, da das transportierte Molekül nie mit dem hydrophoben Kern des Phospholipid-Bilayers in Kontakt kommt. Der Verteilungskoeffizient Öl/Wasser ist hier somit ohne Bedeutung. Auf diese Weise können bis zu 10^5 Moleküle pro Sekunde transportiert werden. Der Transport ist spezifisch.

Jeder Uniporter transportiert nur eine bestimmte Art von Molekülen oder eine damit eng verwandte Molekülgruppe. Allerdings gibt es auch Ausnahmen. So sind mittlerweile Carrierproteine bekannt, die mehrere hundert strukturverschiedene Substrate zu erkennen in der Lage sind, wie beispielsweise das Multidrug-Resistenzprotein p-Glykoprotein (Borst *et al.*, 1999). Der Transport wird durch eine limitierte Anzahl von Transportermolekülen ausgeführt und zeigt somit eine Sättigungskinetik. Daraus ergibt sich eine maximale Transportrate V_{\max} , die sich einstellt, wenn das Konzentrationsgefälle entlang der Membran sehr hoch ist und alle Transportermoleküle mit Substrat abgesättigt sind. Des Weiteren sind Reaktionen dieser Art spezifisch hemmbar und reversibel.

Ein sehr eingehend untersuchtes Beispiel für einen Uniporter ist die *GLUT 1* katalysierte Aufnahme von Glucose in Erythrozytenzellen (Scheepers *et al.*, 2004) oder der mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter (Montero *et al.*, 2004). Auch einige polyspezifische Transporter für organische Kationen funktionieren via Uniport (Koepsell *et al.*, 2003).

1.1.3.3.2. Cotransport durch Symporter und Antiporter

Neben dem aktiven Transport durch ATP-verbrauchende Pumpen und dem Transport durch Uniporter besitzen Zellen weitere Proteine, die dem Einwärts oder Auswärtstransport von Molekülen oder Substraten dienen. Diese Transporter nutzen die potentielle Energie, welche im elektrochemischen Gradienten von Natriumionen oder Protonen gespeichert ist, um den Transport einer weiteren Substanz anzutreiben. So kann der durch seinen Konzentrationsgradienten und seine Potentialdifferenz an der Membran energetisch begünstigte Transport von Natriumionen an den Transport von Molekülen wie Glucose, entgegen deren Konzentrationsgefälle, gekoppelt sein. Energetisch entspricht dies einem sekundär aktiven Transport, da zumindest die Aufrechterhaltung des primären Ionengradienten energieaufwendig ist. Werden transportierte und cotransportierte Moleküle in die gleiche Richtung transportiert spricht man von Symport. Findet der Transport in die entgegengesetzte Richtung statt, spricht man von Antiport. Eine große Anzahl sowohl von Symportern als auch Antiportern findet sich beispielsweise in der *SLC22* Transporterfamilie (Koepsell *et al.*, 2003). Unter ihnen befinden sich multifunktionelle Transporter sowohl für organische Anionen als auch für Kationen, wie die *OAT1/3* Transporter oder der *URAT1* Anionenaustauscher für Harnsäure.

Des Weiteren wird der Cotransport, abhängig davon, ob der Transport das Membranpotential verändert oder nicht, in elektroneutralen und elektrogeneren Transport unterteilt. Dies ist vom stöchiometrischen Verhältnis der transportierten Ionen abhängig. Interessanterweise ist es auch möglich, dass sich dabei die Richtung des Transporters ändert (Gross *et al.*, 2001b).

1.2. Chemie und Transport von Bikarbonat

1.2.1.1. Chemie des Bikarbonat Ions

Das Bikarbonat oder Hydrogenkarbonat Ion ist in Kombination mit der Kohlensäure das wichtigste Puffersystem in Metazoen. So nutzen die allermeisten, wenn nicht alle Zellen, den aktiven Transport von Bikarbonat, um den intrazellulären pH-Wert konstant zu halten. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass das Bikarbonat Ion, unabhängig von der pH-Regulation, eine Funktion bei der Modulation von intrazellulären Signalen haben könnte (Chen *et al.*, 2000).

Zusammen mit seinem Gegenion Natrium hat Bikarbonat ein Molekulargewicht von 84.00 g/mol. Das zentrale Kohlenstoffatom besitzt eine sp^2 Hybridisierung, so dass das Molekül eine flache Struktur aufweist. Der Schmelzpunkt liegt bei 270°C. Die Bindungslänge der C=O Doppelbindung beträgt 1,19 Å, die Bindungslänge der C-O Einfachbindung 1,43 Å (Abb. 1.3). Der van der Waals-Radius des Kohlenstoffatoms beträgt 1.7 Å. Die Kovalenzradien des Kohlenstoffatoms in seinen Verbindungen beträgt, abhängig von seiner Koordinationszahl 0,77 Å ($K_1=4$), 0,67Å ($K_2=3$) und 0,60 Å ($K_3=2$) (Holleman Wiberg, 1995).

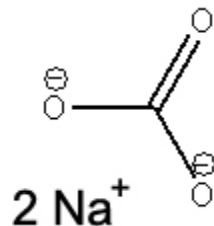


Abb. 1.3: Strukturformel des Hydrogenkarbonat-Ions mit Natrium als Gegenion.

Die Reaktionen von Bikarbonat in Organismen werden durch mehrere Enzymsysteme bestimmt. Neben der Aufnahme bzw. dem Transport von Bikarbonat ist die Umsetzung durch die Carboanhydrase entscheidend (Abb. 1.4).

Das ubiquitär vorkommende, zinkabhängige Enzym katalysiert formell die reversible Reaktion von Kohlendioxid und Wasser zu Bikarbonat und einem hydratisierten Proton.

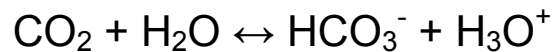


Abb. 1.4: Reaktionsgleichung des Enzyms Carboanhydrase.

Carboanhydrasen kommen in Archaeobakterien, Prokaryonten und Eukaryonten vor und werden dort von drei distinkten, evolutionär nicht verwandten Genfamilien codiert (Tab. 1.5).

	Genfamilie Carbonanhydrase	Hauptsächliches Vorkommen
1	α -CA	Vertebraten, Eubakterien, Algen, Zytoplasma grüner Pflanzen
2	β -CA	Eubakterien, Algen,
3	γ -CA	Archaeobakterien, einige Eubakterien

Tab. 1.5: Auflistung der verschiedenen Genfamilien der Carboanhydrase und ihr vorkommen innerhalb verschiedener Organismen (Mastrolorenzo et al., 2003).

In höher entwickelten Vertebraten wurden bisher 14 verschiedene Isoformen der Carboanhydrase beschrieben. Das primäres Unterscheidungsmerkmal ist die zytosolische oder membranständige Lokalisation (Mastrolorenzo *et al.*, 2003) (Tab. 1.6).

Auch gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen bezüglich eines Zusammenwirkens von Carboanhydraseaktivität und Anionentransport (Loiselle *et al.*, 2004). Dabei bilden die beiden Enzyme eine funktionelle Einheit (Metabolon), um den Anionentransport zu beschleunigen.

	Carboanhydrase Isoenzyme der α -CA Genfamilie	Subzelluläres Vorkommen
1	CA I	Zytosol
2	CA II	Zytosol
3	CA III	Zytosol
4	CA IV	Membrangebunden
5	CA V	Mitochondriel
6	CA VI	Wird in Saliva sezerniert
7	CA VII	Zytosol
8	CA-RP VIII	Wahrscheinlich Zytosol
9	CA IX	Membrangebunden
10	CA-RP X	Zytosol
11	CA-RP XI	Zytosol
12	CA XII	Membrangebunden
13	CA XIII	Zytosol
14	CA XIV	Membrangebunden

Tab. 1.6: Isoenzyme der α -CA Genfamilie höherer Vertebraten mit zugeordneter subzellulärer Lokalisation (Mastrolorenzo *et al.*, 2003).

1.2.2. Transport von Bikarbonat

Bikarbonat Transporter findet man in einer großen Anzahl verschiedener Organe und Gewebetypen. Dazu gehören bei wirbellosen Tieren (Invertebraten) die Gliazellen, bei Säugern Zellen der Leber, des Pankreas und der Parotis. Intensiv untersucht sind die Bikarbonat Transporter im menschlichen Auge und in der Niere von Säugern. In letzterer findet man eine hohe Dichte an Transportern, welche an den verschiedenen Mechanismen des Transports von Bikarbonat beteiligt sind. Dazu gehören die transepitheliale Sekretion, die transepitheliale Reabsorption, intrazelluläre Mechanismen der pH-Wert Regulierung und der Bikarbonattransport assoziiert mit der Exkretion nicht flüchtiger organischer Säuren (Aalkjær *et al.*, 2004).

Auf ihren physiologischen Eigenheiten basierend kann man die Bikarbonattransporter in drei Gruppen einteilen, die alle der gleichen Genfamilie *SLC4A* angehören (Tab. 1.7) (Aalkjær *et al.*, 2004).

Bikarbonattransporter	
1	$\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ Austauscher (AEs).
2	$\text{Na}^+ / \text{HCO}_3^-$ Cotransporter (NBCs).
3	Na^+ -abhängige $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ Austauscher (NDCBEs).

Tab. 1.7: Einteilung der Bikarbonattransporter in drei große Gruppen innerhalb der *SLC4A* Genfamilie (Aalkjær *et al.*, 2004)

Außerdem gibt es Hinweise auf die Existenz eines K^+/HCO_3^- Cotransporters (Hogan *et al.*, 1995), dessen Untersuchung an Calmaraxonen durchgeführt wurden. Auch bei diversen anderen Transportersystemen und Anionenkanälen wird die Fähigkeit zum Transport von Bikarbonat diskutiert. Unter anderem sind dies der apikale Anionentransporter *Pendrin* (Royaux *et al.*, 2001), der Sulfationentransporter *SUT 2* (Petrovic *et al.*, 2004), der Chlorid/Formiat und Anionentransporter *CFEX* (Jiang *et al.*, 2002), der Sulfationentransporter *DRA* (Melvin *et al.*, 1999) und das „*Bicarbonate Transporter Related Protein 1*“, *BRT1* (Parker *et al.*, 2001).

1.2.2.1. Cl^-/HCO_3^- Austauscher (AEs)

Die Cl^-/HCO_3^- Austauscher (AEs), die den reversiblen, elektroneutralen Antiport eines Chlorid (Influx) und eines Bikarbonat Ions (Efflux) regulieren, sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes in der Zelle, die intrazelluläre Chloridkonzentration, den Bikarbonat Metabolismus und die Regulation des Zellvolumens. Da der Transport elektroneutral verläuft, ist die Transportrichtung alleine von den Konzentrationsgradienten der beteiligten Ionen abhängig. Die Genfamilie der Cl^-/HCO_3^- Austauscher umfasst drei Mitglieder, *AE1*, *AE2* und *AE3* (Kopito, 1990). *AE1* (entspricht der Bezeichnung *band3*) ist hauptsächlich in der Erythrozytenmembran und in der Niere zu finden. Der erythrozytäre *band3* Transporter macht etwa 50% der integralen Membranproteine der Erythrozytenmembran aus und ist der am besten untersuchte Transporter dieser Familie. *AE2* Transporter findet man hauptsächlich in Niere, Magen und Lymphozyten, wohingegen *AE3* prävalent in Gehirn, Retina und Herz von Säugern zu finden ist.

Alle Transporter der Familie besitzen zwei Domänen. Eine 55kD Membrandomäne erfüllt die Funktion des Anionentransportes und durchzieht die Membran 12-14-mal. Dagegen ist die zytoplasmatische 45-110 kDa Domäne deutlich heterogener. Im *AE1* Transporter ist die zytoplasmatische Domäne des Transporters durch die Bindung an das fibröse Zytoskelettprotein Ankyrin mit der Plasmamembran verbunden.

Ein charakteristisches Merkmal der *AE*-Transporterfamilie ist seine sowohl kompetitive als auch nicht kompetitive Hemmbarkeit mit Stilbenderivaten wie z.B. 4,4'-diisothiocyanostilbendisulfonat (*DIDS*) (Abb. 1.5) und seinen Derivaten (z.B. H_2DIDS) (Cabantchik *et al.*, 1978). Dabei erfolgt eine kovalente Bindung des Inhibitormoleküles an einen einzelnen Lysinrest in der Membrandomäne.

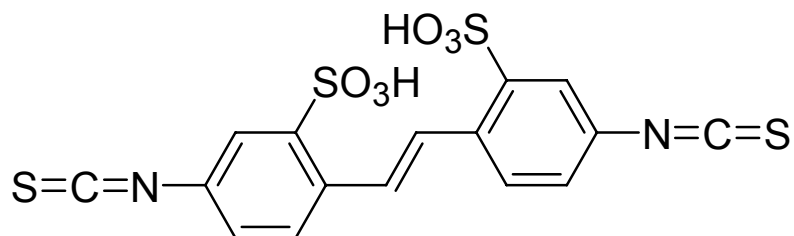


Abb. 1.5: Eindimensionale Strukturformel des Stilbenderivates 4,4'-diisothiocyanostilbendisulfonsäure (*DIDS*).

1.2.2.2. Na^+/HCO_3^- Cotransporter (*NBCs*)

Der Na^+/HCO_3^- Cotransporter wurde erstmals im Jahre 1983 beschrieben (Boron *et al.*, 1983). Der Transport kann in verschiedenen Stöchiometrien ablaufen, wodurch der Transport entweder elektrogen (das Membranpotential einer Zelle verändernd) oder elektroneutral ist. Der elektrogene Transport besitzt entweder ein 3:1 oder 2:1 Verhältnis zwischen transportiertem Bikarbonat und Natrium. Während ein stöchiometrisches Verhältnis von 3:1 energetisch einen Auswärtsstrom von Bikarbonat begünstigt, ist es bei einem Verhältnis von 2:1 genau umgekehrt und macht eine Aufnahme von Bikarbonat wahrscheinlich. Der Grund liegt darin, dass bei einem Verhältnis von 2:1 der Cotransport ein Gleichgewichtspotential (Ein Gleichgewichtspotential (E_m) stellt sich ein, sobald kein Ladungsfluss ($I=0$) mehr gemessen wird) besitzt, welches negativer ist als das Membranpotential und einen Influx begünstigt. Hingegen ist das Gleichgewichtspotential einer 3:1 Verteilung weniger negativ als das Membranpotential, was einen Efflux favorisiert. Triebkraft ist bei beiden Vorgängen das Bestreben des Systems zum Ladungsausgleich.

NBC Transporter mit einer 2:1 Stöchiometrie findet man beispielsweise in humanen Pankreaszellen (Gross *et al.*, 2001a). Einigen Mitgliedern der *NBC* Transporterfamilie ist es außerdem möglich, die Stöchiometrie des elektrogenen Transportes von 2:1 auf 3:1 (Muller-Berger *et al.*, 2001), oder von 3:1 auf 2:1 zu ändern (Gross *et al.*, 2001b). Diese interessanten Ergebnisse sind jedoch in *vitro* entstanden und es ist bisher nicht bekannt, ob und in welchem Ausmaß dies auf in *vivo* Vorgänge übertragbar ist. Während man bis vor kurzem davon ausging, dass *NBC* Transporter von nur einem Gen (*SLCA4*) codiert werden, gibt es mittlerweile Hinweise auf ein weiteres Gen (*SLCA5*), dessen Genprodukte *NBC* Transporter sind. Das *SLCA5* Genprodukt (*NBC4* oder *NBCe*) existiert in sechs verschiedenen Varianten, von denen derzeit nur zwei funktionell charakterisiert sind.

Demgegenüber beträgt die Stöchiometrie der elektroneutralen *NBC* Transporter 1:1. Erste Berichte über diese Transporter erfolgten 1991, was bedeutet, dass diese Art des Transports im Vergleich zu den elektrogenen Transportern erst relativ spät erkannt wurde. Der Transportmodus favorisiert einen Bikarbonat-Influx in die Zelle. Die das Membranpotential nicht verändernden, elektroneutralen *NBC* Transporter sind etwas weniger verbreitet als die elektrogenen Transporter. Gefunden wurden sie bisher in kleinen Arterien und im Herz (Lagadic-Gossmann *et al.*, 1992).

1.2.2.3. Na-abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher (*NDCBEs*)

Der Ionen-transport mittels der Na-abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher wurde zuerst 1976 in Neuronen beschrieben (Thomas, 1976). Es handelt sich um einen elektroneutralen Bikarbonatimport, was bedeutet, dass zwei Moleküle Bikarbonat mit Natrium cotransportiert werden, gekoppelt mit einem Efflux von Chlorid im Verhältnis 1:1 mit Natrium. Der erste Säuger-*NDCBE* wurde im Jahr 2001 kloniert und funktionell charakterisiert. Die physiologische Bedeutung dieser Art von Transportern in Säugern ist in einer universellen pH-Wert Regulation zu sehen, wobei eine Prävalenz für neuronale Strukturen beispielsweise im *Hippocampus* zu erkennen ist. Die Nettoreaktion besteht aus einem auswärtsgerichteten Transport von H^+ -Ionen, weshalb man im Englischen die vereinfachte Bezeichnung *Acid Extruder* verwendet. Gerade in ZNS-Regionen sind der pH-Wert und Bikarbonatkonzentration kritische Größen. Ein niedriger pH-Wert erniedrigt die spontane Aussendung von Nervenimpulsen, die Depolarisation von Membranpotentialen oder das Vorkommen epilepsieähnlicher Ereignisse. Ein hoher pH-Wert erzielt einen gegenteiligen Effekt.

Weiterhin wird in ZNS-Regionen Bikarbonat für die Neuritbildung benötigt (Grichtchenko *et al.*, 2001). Ein Inhibierbarkeit des Transportes durch das Stilbenderivat *DIDS* konnte auch hier nachgewiesen werden, was die Verwandtschaft zu den anderen Bikarbonattransportersystemen weiter untermauert.

1.3. Chemie und Transport von Silikat biologischen Systemen

1.3.1. Chemie des Siliziums und der Silikate

Das Silizium ist nach dem Kohlenstoff das am häufigsten vorkommende Element der Erdkruste, denn mehr als ein Viertel der Erdkruste besteht in seiner Masse aus Silizium. Da der Sauerstoff etwa die Hälfte der Masse der Erdkruste ausmacht, bedeutet dies, dass vier von fünf Atomen der Erdkruste entweder Sauerstoff oder Silizium sind.

Wegen seiner hohen Affinität zu Sauerstoff findet sich das Silizium im Gegensatz zum Kohlenstoff nie elementar, sondern nur gebunden in Form von Salzen verschiedener sich vom Anhydrid SiO_2 ableitender Kieselsäuren der Formel $m\text{SiO}_2 \times n\text{H}_2\text{O}$. In der Natur kommt SiO_2 häufig in Form von Quarz, Achat, Chalcedon, Flint und Opal vor. In den beiden quantitativ und qualitativ wichtigsten silikatverstoffwechselnden Organismen, den vielzelligen Schwämmen und den einzelligen Kieselalgen (Diatomeen), liegt das polymerisierte Silikat hydratisiert als nichtkristalliner Opal vor.

1.3.2. Chemie des Silikats in wässriger Lösung

Die einfachste wasserlösliche Form des Anhydrids der Kieselsäure ist die monomere Ortho-Kieselsäure, in der das Silizium mit vier Hydroxylgruppen einen Tetraeder bildet. Die Ortho-(Mono)-Kieselsäure findet sich in fast allen natürlichen Gewässern sowie in den Körperflüssigkeiten von Tieren und Pflanzen. So enthält Meerwasser zwischen $<3\text{-}150\mu\text{m}$ gelöstes Silizium, wobei speziell das Oberflächenwasser sehr siliziumarm ist (Nelson *et al.*, 1995). Die Konzentration von Silikat in humanem Blut ist mit $\sim 140\mu\text{M}$ vergleichsweise hoch (Geigy Scientific Tables 1984). Das durch biologische Prozesse dem Wasser entzogene SiO_2 (jährlich ca. 1 Kilotonne) wird durch Auflösen einer entsprechenden SiO_2 -Gesteinsmenge ständig ersetzt, wobei sich hauptsächlich amorphes, durch Verwitterung einiger Silicate gebildetes SiO_2 löst.

Der pK_{s1} -Wert der Ortho-Kieselsäure beträgt 9,8 (Iler, 1979). Die Bildung eines Hydrates erfolgt nicht. Bei 25°C und einer Konzentration von unter 100ppm ist die Ortho-Kieselsäure kondensationsbeständig, wohingegen sie bei Konzentrationen von über 100-200ppm bereits Autopolykondensationsreaktionen eingeht (Perry *et al.*, 2000). Dies liegt darin begründet, dass die Wasserabspaltung bei Säuren wie Perchlorsäure ($HClO_4$), Schwefelsäure (H_2SO_4) oder Phosphorsäure (H_3PO_4) ein endothermer, bei der Monokieselsäure jedoch ein exothermer Vorgang ist. Diese große Neigung zur Wasserabspaltung äußert sich in der intermolekularen Kondensation zweier Monokieselsäuremoleküle, da Silizium im Gegensatz zu Kohlenstoff nicht die Neigung zur Ausbildung von $p_{\pi}-p_{\pi}$ Doppelbindungen untereinander hat (geringere π -Orbital Überlappung als beispielsweise beim Kohlenstoff). Parallel mit der Molekülvergrößerung nimmt die Löslichkeit der Kieselsäuren ab. Da die Wasserabspaltung nicht wie im Falle der Phosphorsäure geordnet vor sich geht, sondern ungeordnet, bilden sich auf diesem Wege uneinheitlich gebaute amorphe Polykieselsäuren aus einbindigen Endeinheiten, zweibindigen Mitteleinheiten, dreibindigen Verzweigungseinheiten und schließlich auch vierbindigen Doppelverzweigungseinheiten. Die Ausbildung von sehr vielfältigen Strukturen wird durch die hohe Flexibilität der Si-O-Si Bindung ermöglicht. Die Polymerisationsreaktionen des Siliziums zeigen in ihrem Mechanismus eine deutliche pH-Abhängigkeit. Unter sauren Bedingungen bilden sich vermehrt kettenförmige Polymere. Die Polymerisationsreaktion findet hier eher am Ende der bestehenden Struktur statt, da kaum freien Hydroxylgruppen vorhanden sind. Im basischen pH-Bereich hingegen werden eher kugelige, verzweigte Polymere begünstigt. Dies ist möglich, da auch ein Angriff in der Mitte der Strukturen untereinander erfolgen kann. Biogenes Silikat kann in verschiedenen Strukturen erscheinen, welche durch mikroskopische Methoden in gelartige, kontinuierliche und partiell strukturierte Typen unterschieden werden können.

1.4. Silikat in biologischen System

Der Metabolismus von Silikat und die Formation von Silikat-Biopolymeren sind in verschiedenen Organismen zu beobachten. Dabei ergeben sich deutliche Unterschiede in der Bedeutung für den einzelnen Organismus. Bei folgenden Organismen ist Silikat als Metabolit und als Strukturelement von Bedeutung (Tab. 1.8).

Auch im humanen Organismus und bei Säugern spielt Silizium eine Rolle. In Ratten und Hühnern scheint es essentiell zu sein. In Studien über die Bioverfügbarkeit und die chemische Form in der Silizium in den Organismus aufgenommen wird, erwies sich die Monokieselsäure, vorkommend vor allem in Trinkwasser und Bier, als die bioverfügbarste Verbindung (Jugdaohsingh *et al.*, 2002).

Die physiologische Bedeutung ist in ihrer Gesamtheit noch nicht völlig geklärt, jedoch richtet sich das Interesse vor allem auf die Bedeutung von Silizium in Bezug auf Knochenwachstum und die Fähigkeit, Komplexe mit bestimmten Metallen zu bilden und deren Bioverfügbarkeit damit entscheidend zu verringern. Den Knochenmetabolismus betreffend scheint Silizium an der Vernetzung von Kollagen mit Proteoglycanen während der Knochenbildung beteiligt zu sein (Hott *et al.*, 1993). Im Tierversuch verringerte Siliziumgabe den Verlust an Knochendichte in ovariectomierten Ratten. Durch Bildung von Komplexen mit Aluminium verringert sich dessen Toxizität erheblich und erhöht dessen Ausscheidungsrate, was ebenfalls eine wichtige physiologische Rolle des Siliziums darstellen könnte (Bellia *et al.*, 1996). Obwohl es nicht wenige Studien zu Funktion und Aufnahme von Silizium in Säugerorganismus gibt, ist doch wenig über das Transportsystem bekannt, durch das Silizium aufgenommen wird.

	Organismus	Silikatstruktur
1	Protozoen (<i>Phaeodaria</i> , <i>Choanoflagellaten</i> und <i>Silikoflagellaten</i>)	Verkieseltes Mikroskelett (<i>Calymma</i>)
2	Höhere Pflanzen (<i>Cyperaceae</i> , <i>Poaceae</i>)	Silikateinschlüsse (<i>Phytolithe</i>)
3	Kieselalgen (Diatomeen)	Zellwände (<i>Epitheca</i> , <i>Hypotheca</i>)
4	Schwämme (<i>Porifera</i>)	Mega-und Mikroskieren (<i>Spiculae</i>)

Tab. 1.8: Auswahl von Organismen, die für die Silikatbiomineralisation von Bedeutung sind.

1.4.1. Protozoen

1.4.1.1. Phaeodaria (*Protozoa, Rhizopoda, Radiolaria, Phaeodaria*)

Die *Phaeodaria* bilden eine besondere Hauptgruppe (Legion der Klasse der *Radiolarien*). Der gesamte Körper dieser marinen Protozoen besteht aus einer einfachen Zelle, wobei der dazugehörige Weichkörper häufig von einfacher Gestalt ist und aus zwei Teilen besteht. Der innere Teil, die so genannte Zentralkapsel, wird von dem äußeren Teil, der *Calymma*, als einer Gallerthülle umzogen. Auf dieser wird eine verkieselte harte Schale abgeschieden, bestehend aus biogenem Opal (Abb. 1.6), der Spuren von Magnesium, Calcium und Kupfer enthält (Lee *et al.*, 2000). Das von vielen Protozoen abgeschiedene Silikat besitzt eine gelartige Phase, wie dies auch bei dem marinen Protozoen *Stephanoecca diplocostata* Ellis zu beobachten ist. Die meisten *Phaeodaria* sind Bewohner der Tiefsee. Genauere Angaben oder molekulare Daten über die Aufnahme und Transport von Silikat gibt es nicht.

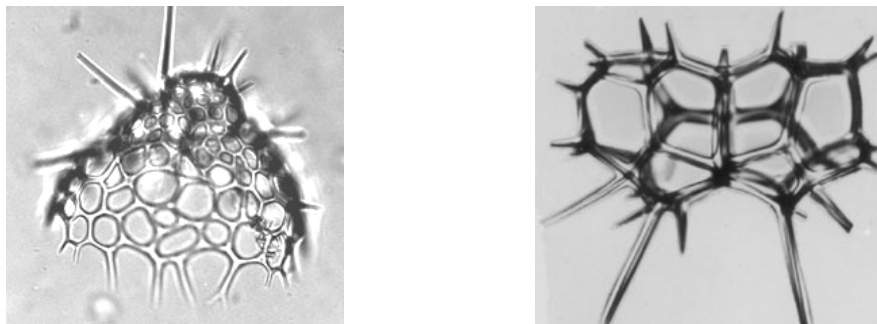


Abb. 1.6: Mikroskopische Darstellung zweier Phaeodaria .Links: *Ceratocyrtis hystrix* Rechts: *Lophospysis pentagona pentagona*. Aus Kurt Stübers online Bibliothek (http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/stueber_library.html).

1.4.1.2. Choanoflagellaten

Die Choanoflagellaten werden innerhalb der Protozoa als Ordnung Choanoflagellida geführt (Lee *et al.*, 2000). Sie sind eine Gruppe bestehend aus frei lebenden farblosen Monaden, selten größer als 10µm. Ihre Verbreitung in aquatischen Habitaten ist ubiquitär, wobei sie sessil als auch in flottierenden kolonialen Verbänden im Meer und Süßwasser zu finden sind. Charakteristikum ist eine am Vorderpol der Zelle liegende Reuse (Kragen) und eine einzige Geißel.

Wegen der hohen Zellteilungsrate, und dem damit verbundenen hohen Nahrungsbedarf, sind die Choanoflagellaten ein wichtiges Glied in der primären Nahrungskette. Viele sessile Arten leben solitär, andere in kolonialen Systemen. Bei den marinen Formen welche ein Gehäuse (*Lorica*) bewohnen, kann dieses aus miteinander verflochtenen Siliziumstäbchen bestehen (*Costae*). Aufgrund ihrer Ähnlichkeit in Bau und Funktion des Kragens, und durch die Fähigkeit Silikat zu metabolisieren, wird eine Verwandtschaft der Choanoflagellaten mit den Schwämmen intensiv erforscht und diskutiert. Weitere Nahrung enthält diese Annahme durch bestehende Ähnlichkeiten im genomischen Repertoire der beiden Spezies (King und Carroll, 2001) (Abb. 1.7).

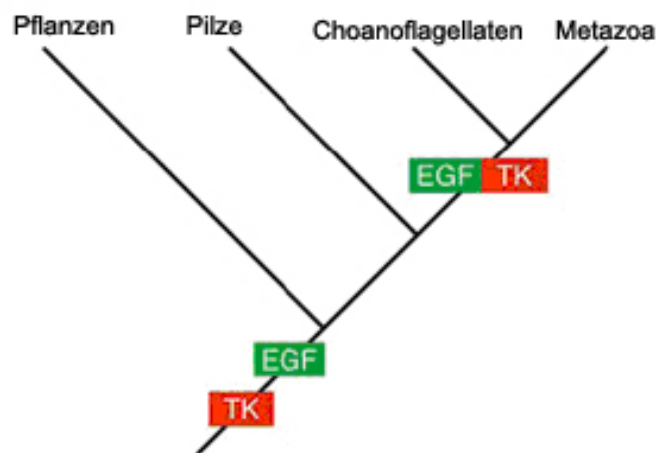


Abb. 1.7: Modell der Evolution der Choanoflagellaten und der genetischen Verteilung von Rezeptor Tyrosin Kinasen. Choanoflagellaten sind den Vielzellern (*Metazoa*) näher verwandt als den Pflanzen und Pilzen. Da sowohl Vielzeller als auch Choanoflagellaten Gene für Signalmoleküle vom Typ Rezeptor Tyrosin Kinase (RTK) besitzen, ist die erste RTK wahrscheinlich vor deren Divergenz (grüne und rote box) entstanden. Zytoplasmatische RTK findet man durchgehend in Eukaryonten. Ebenso wird das EGF-Motiv (*Epidermal Growth Factor*) sowohl in Tieren, Pflanzen und Protisten gefunden und entstand somit wahrscheinlich vor der Divergierung von Pflanzen, Tieren und Pilzen (King und Carroll, 2001).

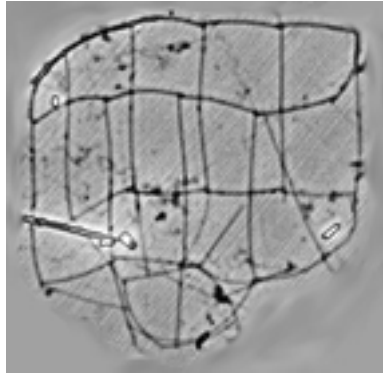


Abb. 1.8: Mikroskopische Darstellung eines Trockenpräparates des Choanoflagellaten *Cosmoeca ventricosa* mit klassischer Lorica. (Department of Marine Botany, Göteborg University, Sweden http://www.marbot.gu.se/SSS/classic/Cosmoeca_ventricosa.htm).

1.4.1.3. Silikoflagellaten

Silikoflagellaten sind im marinen Plankton vorkommende Chromisten. *Chromista* wiederum sind ein Phänomen der Natur (Abb. 1.9). Diese Gruppe enthält sowohl heterotrophe als auch photoautotrophe Spezies. Heterotrophe Chromisten wurden lange zu den Pilzen oder den Tieren gezählt, während man autotrophe den Pflanzen zuordnete. Anders als bei Pflanzen basiert die Photosynthese der Chromisten aber auf Chlorophyll C, und darüber hinaus finden sich noch andere Pigmente in den Zellen die bei Pflanzen nicht vorkommen. Zudem speichern Chromisten die gewonnene Energie auch nicht in Stärke, wie das bei Pflanzen der Fall ist.

Silikoflagellaten sind in der Lage, unter Beteiligung ihres Golgiapparates Silikat zu diversen Skelettstrukturen zu polymerisieren. Molekulare Daten über Mechanismen der Aufnahme und des Transports sind allerdings nicht vorhanden.

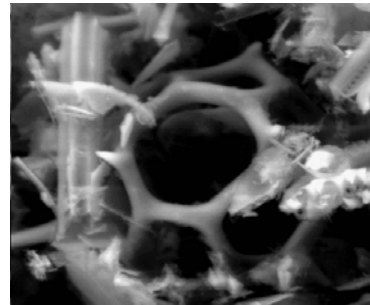
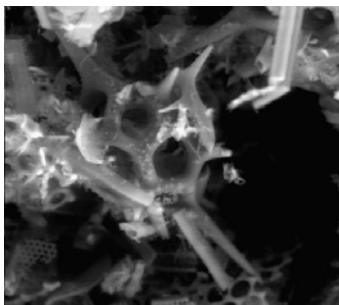


Abb. 1.9: Elektronenmikroskopische Darstellung zweier Silikoflagellaten mit Skelettstruktur aus hydratisiertem biogenem Silikat. Links *Cannopilus sphaericus*; rechts *Distephanus speculum*.

1.4.2. Höhere Pflanzen (*Cyperaceae*, *Poaceae*)

Bei höheren Pflanzen sind es vor allem die Familien der *Cyperaceae* (Riedgrasgewächse, Sauergräser), *Poaceae* (*Graminae*, Süßgräser) und *Equisetum*, bei welchen SiO_2 -Ausscheidungen bekannt sind. Zu den bekanntesten Süßgräsern zählen Weizen, Reis, Mais, Hafer, Roggen, Gerste und Bambus. Dabei können sehr hohe Silikatgehalte erreicht werden, wie dies bei Reis mit 11% oder Schachtelhalm (Familie *Equisetum*) mit 10% der Fall ist.

Die dabei vorkommenden SiO_2 Modifikationen bestehen in der Regel aus amorphem hydratisierten SiO_2 (Opal A), das einen deutlich höheren Strukturierungsgrad aufweist, als dies bei den Protozoen zu sehen ist. Die Strukturen sind aus Primärpartikeln mit verschiedener Oberflächenchemie aufgebaut und zeigen eine Vielfalt von Formen (blättrig, kugelförmig, faserig) und Größen. Auch wurden kristalline Anteile aus Pflanzen isoliert, wodurch man teilweise nur bedingt von durchgängig amorphen Biosilikat sprechen kann. Ein Beispiel dafür ist der Reis (*Oryza sativa*), dessen in den Spelzen vorkommendes Silikat bereits eine mittlere Ordnung (engl.: *mid range order*) aufweist. Charakterisiert werden können diese als *Phytolithe* bekannten Strukturen elektronenmikroskopisch. Die Aufnahme von Silikat scheint in bestimmten Gräsern wie dem Weizen (*Triticum arvense*) pH-Wert abhängig zu sein.

Auf der Suche nach molekularen Daten zur Aufnahme von Silikat in Pflanzen wurden bisher intensive Forschungen unternommen, unter anderem an gentechnisch veränderten Reispflanzen, da Reis einen überaus hohen Silikatanteil besitzt. Transformationsversuche mit RNA der Silikattransporter aus Diatomeen (siehe 1.4.3) blieben erfolglos, was darauf hinwies, dass sich die Transportsysteme der beiden Organismen auf molekularer Ebene unterscheiden. Trotzdem legten die Studien das Vorhandensein zweier oder mehrerer aktiver Silikattransportsysteme für Silikat in Reispflanzen nahe (Ma *et al.*, 2004).

1.4.3. Kieselalgen (*Diatomeae*)

Diatomeen sind einzellige eukaryotische Algen. Biologisch taxonomisch gehören sie zur Abteilung der *Heterokontophyta* und der Klasse *Bacillariophyceae* (*Diatomeae*).

Die Diatomeen sind mit 6000 Arten und 200 Gattungen äußerst formenreich und mitunter zu Bändern oder Fächern vereinigt. Schätzungsweise 20-25% der gesamten globalen organischen Kohlenstofffixierung wird durch das in Diatomeen enthaltene Chlorophyll vollzogen. Eine Sonderstellung nehmen die Diatomeen durch den Besitz zweier innerhalb der äußeren Plasmaschicht abgelegter Kieselsäureschalen ein, von denen eine (*Epitheca*) wie der Deckel einer Schachtel über die untere Hälfte (*Hypotheca*) greift.

Diese silifizierte Zellwand wird auch als Frustule bezeichnet und besteht aus kontinuierlichem Silikat, dessen Primärpartikel ähnlich wie bei Schwämmen (siehe 1.4) kleiner als 5nm sind.

Die Kieselhülle weist besonders auf den Schalenflächen äußerst verwickelt aufgebaute, oft in Reihen angeordnete Strukturen auf. Diese bestehen vielfach aus winzigen Kämmerchen, deren Decke oder Boden entweder offen oder geschlossen und dann von feinsten Poren oder Spalten durchsetzt ist (Abb. 1.10).

Die Kieselsäure ist nicht kristallin, sondern zeigt eine äußerst feine, polarisationsoptisch isotrope (nach allen Richtungen gleiche physikalische Eigenschaften aufweisend) Schaumstruktur. Diese bedingt zwischen unterschiedlichen Medien (Zytoplasma/Wasser) ein elektrostatisches Membranpotential, welches möglicherweise für die Stoffaufnahme von Bedeutung ist. Eine weitere Funktion, die der Frustule zugeschrieben wird ist ein gewisser Schutz gegen bestimmte Viren, Bakterien, Oomyceten, Chytriden und Parasiten (Holfeld, 2000; Baldi *et al.*, 1998; Mann, 1999). Neben Kieselsäure werden in der Zellwand auch Polysaccharide (Pektine), Proteine und fettartige Stoffe gefunden.

Unter anderem durch die bemerkenswerte Filigranität der silifizierten Zellwand, gehören die Diatomeen zu den am intensivsten untersuchten Organismen in Bezug auf Mechanismus der Silikatpolykondensation, den Metabolismus und Transport von Silizium. In den Sechziger und Siebziger Jahren begannen die ersten Experimente zur Aufklärung der Zellwandsynthese in Kieselalgenkulturen. Im Jahre 1985 konnte ein Zusammenhang zwischen der Genexpression bei Diatomeen und dem Angebot an Silizium gezeigt werden (Reeves und Volcani 1985). Mit diversen Methoden wie der Proteinisolation und Charakterisierung, Immunlokalisation oder Röntgenbeugung konnten weitere Einzelheiten des Silikatmetabolismus in Diatomeen ans Licht gebracht werden. Einige entscheidende Schlüsselfunktionen sind jedoch noch ungeklärt.

Ein absolutes Novum erbrachten die Untersuchungen zur Aufnahme bzw. dem Transport von Silikat. Im Jahre 1997 wurde der erste echte Silikattransporter aus der Diatomee *Cylindrotheca fusiformis* kloniert (Hildebrand *et al.*, 1997). Der Klon wurde *SIT 1* genannt und kodierte für ein 548 Aminosäuren langes Protein. Das Protein enthält 10 hydrophobe Membrandomänen und ein langes hydrophiles carboxyterminales Ende. Weitere Untersuchungen zeigten die Existenz einer ganzen *SIT*-Genfamilie mit insgesamt 5 Mitgliedern (Hildebrand *et al.*, 1998). Dabei ist die Aminosäuresequenz der transmembranen Regionen konservierter als die der C-terminalen Enden, welche eine hohe Tendenz zur Bildung von übergeordneten Strukturen hat, was häufig eine Interaktionsbereitschaft mit anderen Proteinen bedeutet (Hildebrand *et al.*, 1998).

In Analogie zu bereits bekannten Beispielen, wie dem *GLUT 4* Transporter wird auch bei der *SIT*-Transporterfamilie eine eventuelle Kontrolle der Aktivität und Lokalisation durch das C-terminale Ende diskutiert. Beim Transporter selbst handelt es sich um ein $\text{Na}^+/\text{Si}(\text{OH})_4$ Symporter der einen elektrogenen Transport mit dem Verhältnis $\text{Na}^+/\text{Si}(\text{OH})_4$ von 1:1 katalysiert. (Bhattacharyya und Volcani, 1980).



Abb. 1.10: Elektronenmikroskopische Darstellung einer Diatomeenspezies assoziiert mit dem Demospongium *Thedania anihilans*. Aufnahme aus dem Aquarium des Instituts für Physiologische Chemie der Universität Mainz.

1.4.4. Schwämme (*Porifera*)

Die Schwämme sind die ältesten vielzelligen rezenten Organismen (*Metazoa*) der Erdgeschichte. Sie sind sessile, ausschließlich im Wasser lebende Organismen, die durch ein System zahlreicher mikroskopisch kleiner Öffnungen (Ostien) Wasser aufnehmen und über Kanäle und Geiselskammern abfiltrieren. Fossile Funde von Schwämmen lassen auf ein Vorkommen schon vor ca. 700 Millionen Jahren schließen.

Die *Porifera* teilen sich in die Klassen *Calcarea* (Kalkschwämme), *Hexactinellida* (Glasschwämme) und *Demospongiae* (Hornkieselchwämme). Die ein Skelett aus Calciumcarbonat ausbildende *Calcarea* erfüllten bis vor rund 100 Millionen Jahren die Rolle der heutigen Korallen. Aufgrund des fehlenden Silikatmetabolismus spielen sie in den Betrachtungen der vorliegenden Arbeit jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Bei den *Hexactinellida* handelt es sich um typische Tiefseebewohner, die in einer Tiefe von bis zu 6000 Meter aufzufinden sind. Die Klasse der *Demospongiae* umfasst 61 Familien und beheimatet die größte Artenvielfalt innerhalb der *Porifera*.

In mindestens ebenso großem Maßstab wie die Diatomeen sind auch *Demospongiae* und *Hexactinellidae* in der Lage Silikat aus dem Wasser aufzunehmen und zu hoch differenzierten Formen zu polymerisieren (Abb. 1.12). Strukturell ähnelt das von Schwämmen polymerisierte Biosilikat dem der Diatomeen. Es handelt sich um eine aus Primärpartikeln aufgebaute kontinuierliche Silikatphase, die damit einen Übergangstyp zwischen der Gelphase der *Protozoa* und den Phytolithen der höheren Pflanzen darstellt. Der Silikatpolymerisation in Schwämmen liegen jedoch andere Mechanismen zugrunde als die, denen sich die Diatomeen bedienen.

Während bei Diatomeen noch offene Fragen in Bezug auf die Polymerisation von Silikat innerhalb der Zelle bestehen und der Weg, auf dem das Silikat in die Zelle gelangt weitgehend aufgeklärt ist, verhält es sich bei Schwämmen genau umgekehrt.

Die von Schwämmen polymerisierten Strukturen können ihrer Größe nach in Mikro- und Megaskleren unterteilt werden. Die Megaskleren haben dabei eine eindeutige Gerüstfunktion, wohingegen die endgültige Funktion der Mikroskleren noch zu klären ist. Ein weiteres Kriterium zur Charakterisierung von Silikatnadeln in Schwämmen ist die Anzahl und Stellung der Achsen. Bezogen auf die Anzahl der Achsen spricht man von Monaxonen, Diaxonen etc. Soll die Anzahl der Strahlen (Auswüchse) einer Sklere bezeichnet werden, spricht man von Monactinen, Diactinen etc. Bei den von *Suberites domuncula* gebildeten Spiculae handelt es sich vor allem um so genannte Tylostylen. Das Silikat wird bei Schwämmen um ein zentrales Proteinfilament (Axialfilament) innerhalb der Zelle polymerisiert (Shimizu *et al.*, 1998; Krasko *et al.*, 2000) (Abb. 1.13). Generell ist der Vorgang der Silikatpolymerisation ein komplexer Prozess, der von vielen Faktoren abhängig ist. Einen zentralen Einfluss auf die Nadelbildung hat die Konzentration von Silikat im umliegenden

Medium (Maldonado *et al.*, 1999), sowie die Beschaffenheit und Funktion der Zellmembranen des Schwammes. Die Zellen, die an der Sekretion der Silikatnadeln beteiligt sind, werden in Anlehnung an ihre produzierten Polymerisate in Megasklerozyten und Mikrosklerozyten unterteilt. Die meisten Mikroskleren werden intrazellulär in einen von einer Membran (Silikalemma) umgebenen Raum sezerniert. Da bei Megasklerozyten sowohl eine inter- als auch intrazelluläre Sezernierung beobachtet wurde, ist die Beteiligung von zwei Membranen, dem internen Silikalemma und der externen Zytoplasmamembran anzunehmen (Uriz *et al.*, 2000). Eine genauere Untersuchung von Sklerozyten ergibt einen Gradienten des Silikatgehaltes, der zur wachsenden Nadel hin ansteigt. So enthalten Mitochondrien, Vesikel, optisch dichte Zelleinschlüsse und das Zytoplasma von Sklerozyten, welche entfernt der wachsenden Nadel gelegen sind, nur etwa 10% Silikat, bezogen auf den Gehalt der Nadel selbst, während bei nadelnahen Aufnahmen dieser Strukturen bis zu 50-65% Silikat gemessen wurden (Uriz *et al.*, 2000). Obwohl der Mechanismus, nach welchem Schwämme ihre Silikatstrukturen herstellen in weiten Teilen bekannt ist, blieben doch einige Fragen offen, gerade bezüglich dem Ort der Initialisierung und Progression der Nadelbildung (Abb. 1.14).

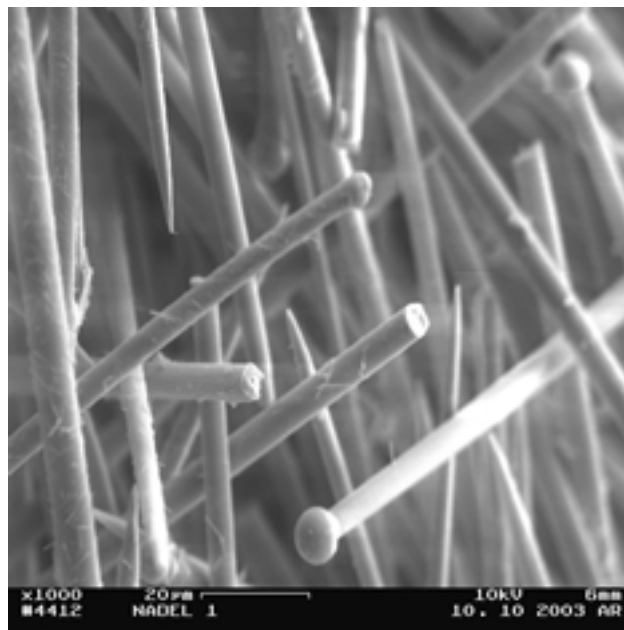


Abb. 1.12: SEM Aufnahme fertiger Nadeln des Schwammes *Suberites domuncula*. Vorherige Beseitigung der organischen Matrix durch Behandlung mit NaOCl 12%. Die Schwämme stammten aus dem Aquarium des Institutes für Physiologische Chemie der Universität Mainz.

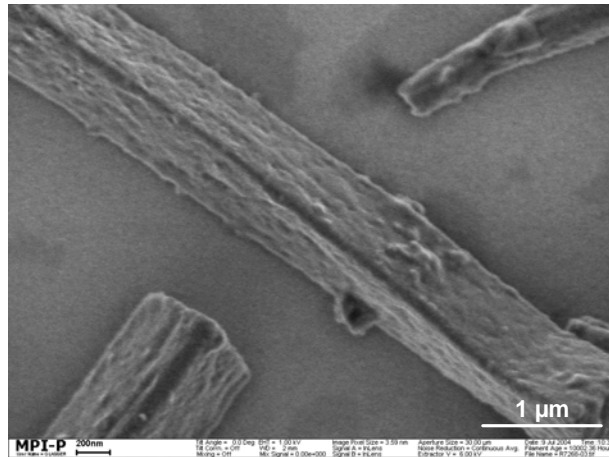


Abb. 1.13: SEM Aufnahme eines Axialfilaments des Schwammes *Suberites domuncula*. Vorherige Isolation des Filaments mittels Flusssäurepuffers. Die Schwämme stammten aus dem Aquarium des Institutes für Physiologische Chemie der Universität Mainz.

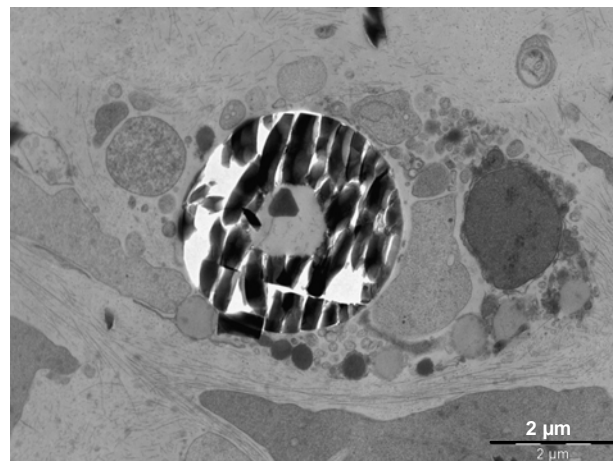


Abb. 1.14: TEM Aufnahme einer Silkatnadel des Schwammes *Suberites domuncula*. Querschnitt durch eine Gewebepräparation des Schwammes. Die Dicke des Präparates betrug ca. 60 nm. Die Schwämme stammten aus dem Aquarium des Institutes für Physiologische Chemie der Universität Mainz.

2. Zielsetzung der Arbeit

Die Biomineralisation von Silikat in Schwämmen (*Porifera*) ist ein bei Vielzellern einzigartiger Vorgang in der belebten Natur und erfordert ein hohes Maß an Regulation, um die große Vielfalt an bestehenden Strukturen und Formen in einer relativ kurzen Zeitspanne zu generieren.

Die bisher angestellten Untersuchungen auf diesem Gebiet konnten große Teile des Polykondensationsmechanismus innerhalb des Schwamms und der dabei beteiligten Moleküle identifizieren und aufklären. Unklarheit bestand jedoch in der Frage, ob die einfachsten bekannten Vielzeller in der Lage sind, Silikat aktiv mittels eines Transporters aus der Umgebung gezielt aufzunehmen, wie dies beispielsweise bei einzelligen Kieselalgen (Diatomeen) beobachtet werden konnte, oder ob andere Mechanismen dabei eine Rolle spielen.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, diese Fragestellung näher zu beleuchten. Dazu sollten durch molekularbiologische Methoden potentielle Transportermoleküle für die aktive Aufnahme von Silikat aus dem Hornschwamm *Suberites domuncula* isoliert werden. Zu diesem Zweck wurden Methoden gewählt, durch welche vorhandene DNA-Moleküle repliziert und unvollständige Gene anhand vorliegender Partialsequenzen vervollständigt werden können. Die dabei identifizierten Kandidaten konnten anschließend durch Sequenzvergleiche eindeutig charakterisiert und einer evtl. bereits vorhandenen Transportergruppe zugeordnet werden. Eine eingehende Analyse der erhaltenen Gen- und Aminosäuresequenzen sollte Aufschlüsse geben über Besonderheiten innerhalb der genetischen Ausstattung der Schwämme, die als ursprünglichste der bekannten Vielzeller auch von großem Interesse hinsichtlich der evolutionären Entwicklung der Arten vor und nach ihnen sind. Weiterhin sollten Untersuchungen dahingehend unternommen werden, ob das Prinzip des Silikattransportes in Schwämmen artspezifisch ist, oder auf molekularer Ebene denen anderer Organismen ähnelt. Funktionsstudien sollten danach zu einer weiteren Charakterisierung der möglichen Kandidaten führen. Insbesondere sollten die Untersuchungen klären, ob der Schwamm bzw. ein Modellsystem des Schwammes in der Lage ist seine Genexpression einem wechselnden Angebot an Silikat anzupassen. Dazu dienten Versuche mittels Northern Blotting, die die Expression von RNA bestimmter Gene im Vergleich zur Expression eines Referenz-Gens aufzeigten. Im Zuge dessen sollte neben der Regulierbarkeit auch die Hemmbarkeit des potentiellen Transporters, auch dessen Hemmbarkeit durch natürliche oder synthetische Inhibitoren gezeigt werden.

Dahingehend sollte ein Modellsystem entwickelt werden, mit dem es möglich ist, die Reaktion von Schwammzellen auf Silikatzugabe optisch zu verfolgen und spezifische Hemmstoffe zur weiteren Beschreibung der Transporterkandidaten zu testen. Des Weiteren sollte auch die Verteilung des potentiellen Transporters im betreffenden Gewebe von *Suberites domuncula* untersucht werden, um einen räumlichen und funktionellen Zusammenhang zwischen der Transporterdistribution im Gewebe und den sich bildenden, oder bereits gebildeten Silikatstrukturen zu analysieren. Dazu wurde schließlich die Technik der *In situ* Hybridisierung ausgewählt, die es möglich macht, die Expression ausgewählter Gene in Gewebeschnitten sichtbar zu machen. Ergänzend sollten morphologische Studien an präpariertem Schwammgewebe die Ergebnisse der Transportersuche mit noch offenen Fragen zum Ablauf der Silikatnadelbildung in Schwämmen verbinden. Diese Untersuchungen sollten mit Hilfe der Elektronenmikroskopie angestellt werden. Hergestellt und untersucht wurden sowohl Präparate für die Rasterelektronenmikroskopie (REM), als auch ultradünne Schnittpräparate für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM). Hierbei sollten verschiedene Präparationstechniken angewendet und die am besten dafür geeignete herausgesucht werden. Insbesondere sollte erstmals die Technik der Immunogoldmarkierung auf TEM-Schnitte des Schwamms *Suberites domuncula* angewendet werden, um morphologische Untersuchungen an Gewebe mit immunhistologischen Daten zu ergänzen.

3. Material

3.1. Chemikalien

Chemikalienliste	
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumperoxidisulfat	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Araldite® CY212 Epoxidharz	Serva, Heidelberg
Araldite® HY 964 Härter	Serva, Heidelberg
Blocking Reagenz	Roche, Mannheim
Borsäure	Roth, Taufkirchen
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Caseinhydrolysat	Roth, Karlsruhe
Coomassie brilliant blue	Serva, Heidelberg
<i>DIDS</i> (4,4-Diisothiocyanatostilbene-2,2-disulfonic acid disodium salt hydrate)	Sigma, Taufkirchen
DIG-Oligonucleotide-3'-End-Labeling-Kit	Roche, Mannheim
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylpyrocarbonat	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe
DNA Marker Gene Ruler	MBI-Fermentas
dNTP-Reagenz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formvar-Film für TEM-Grids	Serva, Heidelberg
Flüssiger Stickstoff	Linde, Wiesbaden
Flußsäure	Sigma, Taufkirchen
Freundsches Adjuvans	Sigma, Taufkirchen
Gelatine (aus Kaltwasserfischhaut)	Sigma, Taufkirchen
GelCode Färbereagenz Blau	Pierce, Bonn
<i>Gummi arabicum</i>	Sigma, Taufkirchen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hydrochinon	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe

LysoSensor yellow/blue (PDMPO)	Molecular Probes, Leyden (NL)
LR White Resin®	London Resin Company, Berkshire, (UK)
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Maleinsäure	Sigma, Taufkirchen
Meersalzmischung Tropic Marin®	TropicMarin, Rickmansworth, (UK)
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenkarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhypochlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Metasilikat	Sigma, Taufkirchen
Natriumperiodat	Sigma, Taufkirchen
Natriumphosphat	Roth, Karlsruhe
Nitroblau-Terazoliumchlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
Osmiumtetroxyd	Polyscience, Eppelheim
Ovalbumin	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Penicillin	Sigma, Taufkirchen
Phytoplankton „Marin Niedere Tiere Futter“	Amtra Aquaristik Rodgau
Poly-L-Lysin (MW: 70000-150000)	Sigma, Taufkirchen
Propylenoxyd	Sigma, Taufkirchen
Protein-Längenstandard SDS-PAGE	BioRad, München
Resin AG 501 X8 Ionentauscher	BioRad, München
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
RNA-Längenstandard 1,2,3	Roche, Mannheim
Röntgenfilmentwickler	Kodak, Stuttgart
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Roti-Quant Bradford Reagenz	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Salpetersäure	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 25%	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
Seewasser (sterilfiltriert)	Sigma, Taufkirchen
Stop-Lösung für TMB Substrat	Sigma, Taufkirchen
Streptomycin	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma, Taufkirchen
2,4,6, Tris-(dimethylaminomethyl)phenol	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe

Trinatriumzitat-Decahydrat	Sigma, Taufkirchen
TRizol- Reagenz	Life Technologies, Karlsruhe
Triton X	Sigma, Taufkirchen
Tween20 (Poly(oxyethylen) ₂₀ sorbitan-monolaurat	Roth, Karlsruhe
X-Phosphat	Sigma, Taufkirchen
Citronensäure	Roth, Karlsruhe

3.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialienliste	
Dialyseschlauch Servapor Ø 50mm	Serva, Heidelberg
Einwegspritzen	Braun, Melsungen
ELISA-Platten 96 well	Abgene, Hamburg
Falcon Reaktionsgefäße	Becton & Dickinson, New Jersey, (USA)
Feinpipetten	
100-1000µl	Gilson, Villiers, (F)
20-200µl	Gilson, Villiers, (F)
2,0-20µl	Gilson, Villiers, (F)
0,5-10µl	Gilson, Villiers, (F)
0,5-2,0µl	Gilson, Villiers, (F)
Filterpapier	Pharmacia, Freiburg
Fixogum Montagekleber	Marabu, Tamm
Glycergel Einbettungsmedium	Dako, Cambridge, (UK)
Hartgelatine kapseln	Plano, Wetzlar
Latexhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Mörser und Pistill, Porzellan	Roth, Karlsruhe
Nitrocellulosemembran	Schleicher & Schüll, Dassel
Nylon Netz 40µM Porengröße	Roth, Karlsruhe
Nylonmembranen pos. geladen	Roche, Mannheim
Objekträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm M	American National Can, Greenwich, (USA)
PCR Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf
PCR Reaktionsgefäße 0,5ml	Abgene, Hamburg
Petrischalen	NUNC, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Eppendorff, Hamburg
PVDF Membrane Hybond	Amersham, Freiburg
Reaktion Caps 1,5ml + 2,0ml	Eppendorff, Hamburg
REM Aluminium Probenräger	Plano, Wetzlar
REM Leit-Kohlenstoff	Plano, Wetzlar
REM Adhesive Kohleplättchen	Plano, Wetzlar
Steritop Filtereinheit 0,45µM	Millipore, Bedford, (USA)
TEM-Netzchen, Kupfer, 75 squares/inch	Plano, Wetzlar
Whatman 3MM Papier	Whatmann, über Fischer, Frankfurt
Lab-Tek® Chamber Slide™ System	Nunc, Wiesbaden
Zählkammer Neubauer	Merck; Darmstadt

3.3. Geräte

Geräteliste	
Fluoreszenzmikroskop AH3	Olympus, Planegg
Folienschweißgerät	Roth, Karlsruhe
Gefrierschrank -20° C	Liebher, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C	Snijders Scientific, Tilburg, (NL)
Gelschlitten für die Elektrophorese	Institutswerkstatt
Heizblock für Reaktionsgefäße Kamera C2400-87	Eppendorff, Hamburg
für das Umkehrmikroskop UApo40X/340	Hamamatsu, Herrsching
Kammer für Vertikalelektrophorese	Bio-Rad, München
Kritischer Punkt Trockner CPD 030	Bal-Tec Union Ltd., (Liechtenstein)
Laminar Flow	Slee, Mainz
Li-Cor 4200 LONGREADIR, Sequenziergerät	Licor, Bad Homburg
Mikroskopisches Objektiv UApo40X/340	Olympus, Planegg
Mini-Protean II Proteingelsystem	BIO-Rad, München
PA- Gelelektrophorese-Einheit Protean Mini	Bio-Rad, München
pH-Meter Typ CG 840	Scott, Mainz
Powersupply für Gelelektrophorese	Bio-Rad, München
Proteinelektrophoreseeinheit Mini Protean II	BioRad, München
Quecksilberlampe für Umkehrmikroskop UApo40X/340	Olympus, Planegg
REM Gerät DSM 962	Carl Zeiss, Oberkochen
Schüttelinkubator Certomat H/R	Braun, Melsungen
Semi-dry Blotting Apparatur TransBlot SD	BioRad, München
Spectrophotometer Smart Spec™3000	Bio-Rad, München
Sputtercoater SCD 005	Bal-Tec Union Ltd., (Liechtenstein)
Sterilisator	WTB Binder, Tuttlingen
Sunrise Absorbance Reader	Tecan, Crailsheim
TEM Gerät, Tecnai 12	FEI-Electron Optics, Eindhoven, (NL)
Thermoblock Unitech HB 130	Salmon Electronics, Luton, (UK)
Thermal Cycler „iCycler“	Bio-Rad, München
Transluminator/ Geldokumentationssystem	UVP Limited, Cambridge, (UK)
Ultracut S Schneidemaschine für TEM-Proben	Leica, Nussloch
Umkehrmikroskop Olympus IX70	Olympus, Planegg
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene, LaJolla, (USA)
Vortexer	IKA Labortechnik, Staufen
Waage PT 120	Sartorius, Göttingen
Waage R6	Mettler, Gießen
Wasserbad mit Schüttler, beheizbar	Köttermann, Hänsingen
Zentrifuge Sorvall RC 5B	Du Pont, Bad Nauheim
Tischzentrifuge 5415	Eppendorff, Hamburg

3.4. Molekularbiologische Arbeitskits und Enzyme

Arbeitskits- und Enzymliste	
Chemilumineszenz Blotting Substrate Labelling Kit	Roche, Mannheim
NovaBlue Kompetente Zellen	Novagen, Darmstadt
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche, Mannheim
pGEM-T Vektor System	Promga, Mannheim
PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim
Plasmid Isolation Kit	Roche, Mannheim
Thermo Sequenase Sequenzier Kit	Amersham, Braunschweig
SequaGel XR zwei Komponenten Gel	Biozym, Oldendorf
Synergy™ DNA Polymerase (inkl. Synergy™ Puffer)	GeneCraft, Lüdinghausen

3.5. Verwendete Computerprogramme und Internetdienste

Computerprogramme und Internetdienste-Liste	
BLAST Protein und Nukleotidsequenzvergleiche	www.ncbi.nlm.nih.gov
DNASIS	Hitachi, Yokohama, (Japan)
DNA Star	DNA-Star Inc.
Genebank	www.ncbi.nlm.nih.gov/
Imagestore 5000	UVP, Cambridge, (UK)
National Institute of Health	www.nih.gov/science/
Nucleotide Database	www.ebi.ac.uk/embl/
ProDom	http://protein.toulouse.inra.fr/
ProSite	www.expasy.org/prosite/
Spongebase Mainz	http://spongebase.genoserv.de/
SwissProt	www.expasy.org/sprot/sprot-top.html

3.6. Schwämme

Die verwendeten Schwämme der Gattung *Suberites domuncula* (*Porifera*, *Demospongiae*, *Hadromerida*) (Abb. 3.1) wurden in der nördlichen Adria nahe der Stadt Rovinj gesammelt. Sie stammen aus einer Tiefe von bis zu 40 Metern. Überführt nach Mainz wurden sie dort in Aquarien bei ca. 16° Wassertemperatur, definierten Lichtverhältnissen (Tageslichtlampen und weitgehend angepasster Tag-Nacht Rhythmus) und standartisierten Bedingungen in künstlichem Seewasser gehalten. Ihre Überlebensdauer dort beträgt mehrere Jahre.

Schwämme der Familie *Suberitidae* findet man im Mittelmeer, vor den Westindischen Inseln, im Atlantik und im Indischen Ozean. Die im Mittelmeer vorkommenden Exemplare leben in einer Symbiose mit dem Einsiedlerkrebs *Paguristes oculatus*, der das Schneckenhaus bewohnt, auf welchem der Schwamm siedelt.



Abb.3.1: Zwei Exemplare des untersuchten Schwamms *Suberites domuncula*. Die Bilder wurden in Aquarium des Instituts für Physiologische Chemie, Abteilung angewandte Molekularbiologie aufgenommen. Mit freundlicher Genehmigung von Professor W.E.G. Müller.

3.7. cDNA Bank

Die in dieser Arbeit verwendete cDNA Bank wurde von Dr. Michael Kruse aus der Arbeitsgruppe W.E.G Müller am Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie hergestellt. Der verwendete Vektor war der Lambda-Zap Vektor.

3.8. Vektoren

Klonierungsvektoren	
pGEM [®] -T	Promega, Madison, (USA)
pBK-CMV	Stratagene, Hamburg

3.9. Primer

Vektorspezifische Primer		
T ₃	5'CGG AAT TAA CCC TCA CTA AAG 3'	T _m =60°C
T ₇	5'GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'	T _m =64°C
SP ₆	5'TAG GTG ACA CTA TAG AAT ACT C 3'	T _m =60°C
BK	5'ACA GGA AAC AGC TAT GAC CTT G 3'	T _m =64°C
CMVF	5'CTT GAT TAC GCC AAG CTC 3'	T _m =58°C
CMVR	5'TAG GGC GAA TTG GGT ACA C3'	T _m =58°C
M13-20	5'GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'	T _m =52°C
Sequenzierprimer (IR800 markiert)		
T ₃	5'AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3'	T _m =56°C
T ₇	5'GTA ATA CGA CTC ACT ATA GG 3'	T _m =56°C

Tubulinprimer für Negativkontrollen		
Tubulin-SD44-Fwd:	GGA AGT CAT CTC AGA CGA A	T _m =53°C
Tubulin-SD44-Rev:	GGA TAT TCT TCA CGG ATC T	T _m =50,9°C

Genspezifische Primer des NBCSA-Anionen Transporters von <i>Suberites domuncula</i>		
Forward Primer		
band3_frw	TGT GGA CAC TAA AGT TAG TAC AGC	T _m =58°C
band3_fw_2	AAA CGA GTC CAA CAT CAT TCA AAA	T _m =58,1°C
band3_fw_3	AAT GGT TCT AAT CCC CGT GAC	T _m =57,9°C
Reverse Primer		
band3_rv	CAA ACA AAC AAA CAA ACA AAC AGT	T _m =56°C
band3_rv_2	GCC CAG CAG ACC ACA TAC TCC	T _m =63,7°C
band3_rv_3	GAG ATC TCT GCG AAT GAA GC	T _m =57,3°C

Sondenprimer für den Northern Blotting		
AE_prob_frw	AAA CGC ACA CAC TCT TCA AG	T _m =49°C
AE_prob_rv	AGA CCT CTC CTA AGT TCC AC	T _m =50°C

Sondenprimer für die In Situ Hybridisierung		
AE_prob_frw	AAA CGC ACA CAC TCT TCA AG	T _m =49°C
AE_prob_rv	AGA CCT CTC CTA AGT TCC AC	T _m =50°C

3.10. Antikörper

Antikörper	
Anti Rabbit IgG Peroxidase	Sigma, Taufkirchen
Anti-Digoxigenin-AP, Fabfragments (Schaaf)	Roche, Mannheim
Anti-rekombinant Silicatein AK ₃₁₄	Biotech Marin, Mainz
Anti-natives Silictein AK ₃₄₅	Biotech Marin, Mainz

4. Methoden

4.1. Dissoziation von Schwammzellen

Um Studien bezüglich des Aufnahmeverhaltens verschiedener Substanzen und anderer Charakteristika von Schwämmen durchführen zu können, ist es teilweise sinnvoll, nicht den gesamten Schwamm als Untersuchungsobjekt zu wählen. Als ein besser geeignetes Untersuchungssystem wurden Schwammzellen und die sich bei entsprechender Behandlung daraus entwickelnden Primmorphen verwendet (siehe 4.2).

Zur Zellisolation werden Schwammstücke von etwa 5cm^3 mit einem Skalpell in kleine Würfel geschnitten und in ein 50ml Falcontube überführt, welches mit 40ml CMFSW (calcium- und magnesiumfreies Seewasser) mit 2,5mM EDTA (Rottman *et al.*, 1987) gefüllt ist. Der Ansatz wird 30-60 Minuten auf einem Rollinkubator bei Raumtemperatur belassen. Danach wird der Inhalt des Falcontube durch ein Nylonnetz ($40\mu\text{m}$ Porendurchmesser) gedrückt und zweimal mit CMFSW ohne EDTA durch Zentrifugation gewaschen. Die Zentrifugationschritte werden bei $500\times g$ 5 Minuten durchgeführt. Das am Ende der Präparation entstehende Pellet kann mit verschiedenen Medien aufgenommen werden. Für die fluoreszenzmikroskopischen Versuche wurde das Pellet in Sigma Seewasser zu einer Gesamtdichte von 6×10^6 Zellen/ml aufgenommen.

4.1.1. Verwendete Lösungen

Calcium & magnesiumfreies Seewasser ohne EDTA	
460mM	NaCl
7,0mM	Na ₂ SO ₄
10,0mM	KCl
10,0mM	HEPES
4ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung
pH 8,5	

Calcium- & magnesiumfreies Seewasser mit EDTA	
460mM	NaCl
7,0mM	Na ₂ SO ₄
10,0mM	KCl
10,0mM	HEPES
2,5mM	EDTA
4ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung
pH 8,5	

Penicillin/Streptomycin -Lösung	
4,26g	Penicillin G
2,00g	Streptomycinsulfat
0,52g	NaCl
58,00ml	dest. Wasser
Aliquotieren zu 4,5ml	

4.2. Bildung von Primmorphen

Die für die Primmorphenbildung benötigten Schwammzellen wurden isoliert wie beschrieben (siehe 4.1).

Das finale Pellet wurde in Sigma Seewasser mit Antibiotika (Penicillin G 100 IU/ml, Streptomycin 100µg/ml) zu einer Suspension von $1,5-2,0 \times 10^6 \text{ xml}^{-1}$ Zellen aufgenommen. 60ml dieser Suspension wurden in eine Petrischale überführt und bei 16°C unter leichtem Schwappen gehalten, um das Aggregieren der Zellen mit dem Boden der Petrischale zu verhindern. Zwei Drittel des Mediums wurden täglich ersetzt. Direkt nach dem Überführen der Zellsuspension begannen die einzelnen Zellen untereinander zu aggregieren und Zellklumpen zu bilden. Als diese Primmorphenvorstufen eine Größe von ca. 0,5mm erreicht hatten, wurden sie in einem 15ml Falcontube mit 10ml Sigma Seewasser durch Schwerkraftseparation von Zelldebris befreit und erneut in frische Petrischalen mit antibiotikahaltigem Sigma Seewasser gegeben. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis sich keine weiteren Aggregate mehr bildeten und kein Zelldebris oder Fremdorganismen mehr im Medium beobachtet werden konnte (Müller *et al.*, 1999).

4.3. Isolation von Axialfilamenten aus dem Schwamm *Suberites domuncula*

Die Isolation der Axialfilamente von *Suberites domuncula* diente deren Charakterisierung mittels elektronenmikroskopischer Verfahren und Gelelektrophorese. Weiterhin diente das Filament als Antigen zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern (Cha *et al.*, 1998).

4.4. Isolation der Silikatnadeln von *Suberites domuncula*

Gefrorene Schwammstücke der Spezies *Suberites domuncula* wurden gewogen und in kleine Quader der Kantenlänge 5mm geschnitten. Die Stücke wurden in ein Becherglas gegeben, welches mit Eis gekühlt war und 500ml einer Mischung aus vier Teilen H₂SO₄ konz. und einem Teil HNO₃ konz. enthielt. Dort wurde unter gelegentlichem Umrühren die organische Matrix von den Silikatstrukturen gelöst.

Danach wurde der Inhalt des Becherglases auf 50ml Zentrifugenröhrchen verteilt und einmalig bei 2000 U/Minuten für 5 Minuten zentrifugiert. Die Nadeln wurden dann so lange mit dest. Wasser gewaschen, bis der pH-Wert des Überstands über 6,0 betrug. Dabei wurde zwischen den einzelnen Waschschritten nicht zentrifugiert, sondern die Nadeln etwa 20 Minuten zum Sedimentieren ruhengelassen. Abschließend erfolgte ein Waschschriff mit Aceton, nach welchem noch einmal 5 Minuten bei 2000 U/Minuten zentrifugiert wurde. Danach trockneten die Nadeln, in einer Petrischale ausgebreitet, für eine Stunde bei Raumtemperatur. Alternativ konnten Nadeln auch durch eine Inkubation mit NaOCl 12% über Nacht auf einem Rollinkubator hergestellt werden, was sich jedoch nur bei Schwämmen mit wenig organischer Matrix empfahl.

4.5. Isolation der Proteinfilamente aus Silikatnadeln

Die getrockneten Nadeln wurden in ein Becherglas aus Kunststoff überführt und dort mit einem Flußsäurepuffer überschichtet. Es wurden 100ml Flußsäurepuffer pro Gramm Nadeln verwendet. Die Inkubation wurde auf einem Laborshaker durchgeführt und dauerte 2-3 Stunden, bis die Nadelsubstanz vollständig in Lösung gegangen war. Es folgte die Aufreinigung und Aufkonzentrierung der Filamentsuspension.

4.5.1. Verwendete Lösungen

Fluoridpufferlösung	
5,0M	NH ₄ F
1,0M	HF

4.6. Aufreinigung der Filamente durch Dialyse und Aufkonzentrierung mittels Membranen

Die Dialyse diente dazu, durch Diffusionsvorgänge über eine semipermeable Membran niedermolekulare Moleküle aus wässrigen Lösungen hochmolekularer Substanzen abzutrennen.

Diese Membranen standen mit unterschiedlichen Ausschlussgrenzen (*cut off*) zur Verfügung. Die zur Aufreinigung der Axialfilament-Suspension verwendete Membran mit einem *cut off* (Ausschlussgrenze) von 12000 Da (Sigma, Taufkirchen) wurde zunächst in Dialyseflüssigkeit eingeweicht. Nach etwa 10 Minuten wurde der Dialyseschlauch mit einer Klammer an einem Ende verschlossen und am anderen Ende befüllt. Der Schlauch sollte blasenfrei, aber nicht zu prall gefüllt sein, da sich das Volumen innerhalb des Schlauches während der Dialyse beträchtlich erhöhte. Die Dialysedauer und das Volumen waren individuell zu wählen und richten sich nach der angestrebten Konzentration bzw. Reinheit des Dialysats.

Zur Entfernung des HF/NH₄F Puffers wurde eine Dialyse in 10l destilliertes Wasser gewählt. Das Wasser wurde 5 mal gewechselt und eine Dauer von 3 Stunden pro Dialysedurchgang nicht unterschritten. Die optimale Temperatur bei der Dialyse betrug 4°C. Danach wurde die Filamentsuspension mittels einer Membran des Porendurchmesser 0,45µm unter ständigem Rühren im Vakuum auf ein Volumen von 10ml reduziert und bei 4°C aufbewahrt.

4.7. Quantifizierung der Proteinfilament-Konzentration

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde die Methode von Bradford verwendet (Bradford 1976). Diese kolorimetrische Methode zur Identifikation und Quantifizierung von löslichen Proteinen beruht auf der Bildung eines Protein-Farbstoffkomplexes des in der Bradford-Lösung (Roti-Quant) enthaltenen Farbstoffes mit dem zu messenden Protein.

Für die Messung wurden zwei 100µl Aliquots der Proteinsuspension 20 Minuten bei 14000 U/Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10µl einer 8M Harnstofflösung mittels Vortexen in Lösung gebracht. Nach einem Verdünnungsschritt von 1:100 mit destilliertem Wasser wurde die Messlösung, bestehend aus 1µl Proteinlösung und 25µl Bradford-Reagenz bei einer Wellenlänge von 595nm spektrophotometrisch vermessen. Die Standardkurve wurde mit einer Verdünnungsreihe von BSA (Bovines Serumalbumin) hergestellt. Als Blindwert diente eine Lösung aus 1µl dest. Wasser und 25µl Bradford Reagenz. Die Messung wurde mittels eines Tecan Sunrise Absorbance Reader 3x durchgeführt und die Mittelwerte gebildet.

4.8. Lyophilisierung von Schwammgewebe

Die Lyophilisierung oder Gefriertrocknung ist ein Vorgang, bei dem einem gefrorenen Objekt im Vakuum Wasser bis zur Trockne entzogen wird. Wasser besitzt im gefrorenen Zustand noch einen Restdampfdruck, der darauf gründet, dass zwischen dem Eis und seinem umgebenden Gasraum ein Austausch von gasförmigen und festen Wassermolekülen stattfindet. Während der Lyophilisierung werden die in dem Gasraum übertretenden gasförmigen Wassermoleküle durch Kondensation an Kühlflächen oder durch Adsorptionen bzw. Trockenmittel entfernt. Infolge dessen nimmt die Eismenge kontinuierlich ab. Der Sublimationsvorgang wird durch das Anlegen eines Vakuums noch weiter unterstützt. Vor der eigentlichen Lyophilisierung musste das Objekt auf -20°C bis -50°C abgekühlt werden, um sämtliche Flüssigkeit zum Gefrieren zu bringen. Das Endprodukt der Lyophilisierung ist meistens porös und besitzt eine große innere Oberfläche.

Eine Lyophilisierung von Gewebestücken des Schwammes *Suberites domuncula* bot sich deshalb an, da auf diese Weise das Gewebe durch den Wasserentzug wenig kollabierte und man Präparate erhielt, die gut für morphologische Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie verwendet werden konnten.

4.9. Kritische Punkt Trocknung von Schwammgewebe

Die Kritische Punkt Trocknung war bei Gewebeproben ratsam, welche mittels Lyophilisierung keine guten Ergebnisse zeigten, oder generell empfindliche Strukturen beinhalteten.

Zur Probenentnahme wurden von den Schwämmen Gewebestücke entnommen und mittels Fischer-Fixierung (siehe 4.12) bis zum Abschluss der Ethanolreihe entwässert.

Danach folgte ein abschließender Inkubationsschritt mit Aceton für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Proben wurden danach in eine Druckkammer verbracht, wo sie CO_2 am kritischen Punkt ausgesetzt wurden. Der kritische Punkt kennzeichnet das Ende der Phasengrenze zwischen flüssigem und gasförmigem Zustand (Abb. 4.1). Oberhalb dieser Temperatur sind Flüssigkeit und Gas nicht mehr zu unterscheiden. Es liegt Dampf hoher Sättigung vor. Das Absenken der Temperatur lässt den Dampf zu Nebel kondensieren, der zu Anfang noch fein verteilt ist. Es bildet sich wieder eine Flüssigkeit-Gas-Grenzschicht. Das Ergebnis waren Proben, die völlig trocken waren und weniger kollabierte Strukturen auf Gewebeebene zeigten als gefriergetrocknete Objekte. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kritische Punkt Trockner handelte es sich um einen CPD 030 der Firma Baltec.

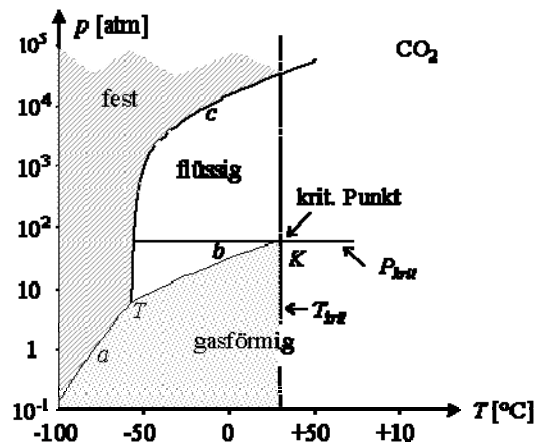


Abb. 4.1. Der kritische Punkt kennzeichnet das Ende der Phasengrenze zwischen flüssigem und gasförmigem Zustand. (Hier mit K bezeichnet bei 31° C, 75 atm). Oberhalb dieser Temperatur sind Flüssigkeit und Gas nicht mehr zu unterscheiden. Es liegt Dampf hoher Sättigung vor. Das Absenken der Temperatur lässt den Dampf zu Nebel kondensieren, der zu Anfang noch fein verteilt ist. Erst allmählich regnet der Nebel ab, und es bildet sich die Grenzlinie.

4.10. Fluoreszenzmikroskopie

4.10.1. Funktionsprinzip der Fluoreszenzmessung

Aus dem weißen Licht einer Xenon- oder Quecksilberdampf-Lampe wird durch einen Anregungsfilter die für die Anregung des Fluorochroms (fluoreszierender Molekülteil) geeignete Wellenlänge herausgefiltert.

Im Innern des Mikroskops wird dieses Licht von einem dichroischen Spiegel (auch dichromatischer Spiegel) auf das Präparat reflektiert. Dichroische Spiegel haben eine kritische Wellenlänge. Licht mit kleineren Wellenlängen wird reflektiert, Licht mit größeren Wellenlängen durchgelassen. Der Spiegel wird so gewählt, dass die kritische Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluorochroms liegt. So wird das Anregungslicht durch das Objektiv zum Präparat gelenkt, während das langwelligere Fluoreszenzlicht den Spiegel passiert und durch das Okular zum Auge gelangt. Eine möglichst vollständige Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht durch dieses optische System ist die Voraussetzung für eine gute Abbildung im Mikroskop.

Filtersätze mit geeigneten Kombinationen von Filtern und dichroischen Spiegeln können für jeden gebräuchlichen Fluoreszenzfarbstoff gekauft werden.

4.10.2. Aufzeichnen der Fluoreszenzreaktion

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzmikroskop handelte es sich um ein inverses Durchlichtmikroskop des Typs Olympus IX70 mit apochromatischen (Farbfehler korrigierend) Fluoreszenzlinse vom Typ UApo40X/340. Zur Messung der Fluoreszenzintensität wurden die Zellen dem Licht einer Quecksilberlampe (OSP-EXA, Olympus, Hamburg) der Wellenlänge 340nm ausgesetzt. Das emittierte Licht der Wellenlänge 445nm wurde mit einer bildverstärkenden CCD (charge-coupled-device) Kamera des Typs C2400-87 (Hamamatsu, Herrsching) abgebildet. Die Aufnahmen erfolgten als digitale 256x256 Pixelbilder im Datenbereich von 8 bit und wurden durch einen Argus 50 Imaging System (Hamamatsu, Herrsching) erstellt. Die Darstellung der Fluoreszenz erfolgte durch eine Pseudofärbung. Diese wurde wiedergegeben durch eine Farbskala von blau für eine niedrige Intensität über grün und gelb bis zu rot, das eine hohe Fluoreszenzintensität anzeigt.

4.10.3. Färbung mit Lysosensor[®] yellow/blue-DND-160 (PDMPO)

Der Fluoreszenzfarbstoff Lysosensor[®] yellow/blue wird hauptsächlich dazu verwendet, eine intrazelluläre pH-Änderung in lebenden Zellen zu erfassen (Diwu *et al.*, 1999).

Der Farbstoff mit der Summenformel $C_{20}H_{22}N_4O_3$ besitzt ein Molekulargewicht von 366,42. Der LysoSensor Farbstoff gehört zu den azidophilen Farbstoffen und akkumuliert in sauren Zellorganellen wie den Lysosomen aufgrund einer Protonierung der schwach basischen Seitenkette, welche ein sekundäres Amin beinhaltet.

Diese Protonierung führt auch zu einem Auflösen eines Fluoreszenzlöschungseffektes (Quenching) innerhalb der Molekülstruktur der Seitenkette, woraus eine pH-Wert abhängige Verstärkung der Fluoreszenzintensität resultiert. Der pKa Wert des Farbstoffes liegt bei 4,2. Die Absorptionsmaxima liegen pH-abhängig bei 329 bzw. 384 nm, die Maxima für die Emission bei 440 bzw. 540 nm.

Neben seiner Verwendung als pH Indikator kann der LysoSensor[®] yellow/blue auch als Indikator für eine Silikatpolymerisation verwendet werden (Shimizu *et al.*, 2001). Erste Versuche wurden an einzelligen Kieselalgen (Diatomeen) angestellt. Dabei zeigte sich, dass sich der Farbstoff in die neu synthetisierte silikathaltige Zellwand (Frustule) einlagern kann und dort eine grüne Fluoreszenz zeigt.

Zur Untersuchung der Biosilifizierung bzw. des Biosilikattransporters in isolierten Schwammzellkulturen wurden die Zellen nach der Isolation über Nacht bei 4° oder 17°C in mit Poly-L-Lysin beschichteten Zellkammern mit Quarzglasboden (Lab-Tek® Chamber Slide™ System, Nunc Wiesbaden) belassen, um eine Adhäsion der Zellen an den Kammerboden zu gewährleisten. Für die Messung wurden die Proben 2 Minuten vor dem Start der Aufnahmen einem Medium ausgesetzt, welches entweder 2µM oder 60µM Silikat enthielt. Nach 2 Minuten wurde den Zellen der Farbstoff LysoSensor® yellow/blue (Abb. 4.1) in einer Konzentration von 3µM zugesetzt und die Messung begonnen, welche für 16 Minuten angelegt war.

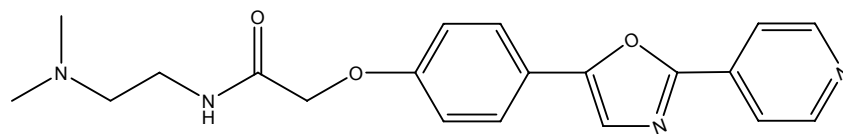


Abb. 4.1: Eindimensionale Strukturformel des Fluoreszenzfarbstoffes LysoSensor® DND-160 yellow/blue. (Bildnachweis, Fa. Molecular Probes, Leyden, Holland).

4.10.4. Blockierung des Anionentransportes durch das Stilbenderivat 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonat (DIDS)

Für eine Charakterisierung und Untersuchung von Transportermolekülen, Transportvorgängen und verwandten Vorgängen an isolierten Zellen oder Geweben sind Inhibitionsstudien sehr aufschlussreich. Durch sie können sowohl strukturelle Besonderheiten der untersuchten Moleküle als auch ihre eventuelle Zugehörigkeit zu bestimmten schon bekannten Molekülgruppen bestimmt werden.

Der in dieser Arbeit verwendete Inhibitor gehörte zu der Gruppe der Stilbenderivate. Seine genaue Bezeichnung ist 4-4'-diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonat bzw. -sulfonsäure, die allgemein und auch in der vorliegenden Arbeit mit *DIDS* abgekürzt wird. Das Stilbenderivat hat ein Molekulargewicht von 498,48 und kann mit seinen homobifunktionalen, negativ geladenen Sulfonsäuregruppen als vernetzendes Agens fungieren. Seine Isothiocyanatgruppen haben bei einem pH-Wert von 9,0-10,0 eine Affinität zu primären Aminen wie sie beispielsweise in der Aminosäure Lysin vorkommen. Die Fähigkeit, Anionentransport zu inhibieren wurde an verschiedenen Modellen untersucht. Dazu gehört neben anderen auch der erythrozytäre Anionentransporter band 3 (Garcia *et al.*, 1989), oder ein Oxalat-Chlorid Austauscher im Hummer (Gerencser *et al.*, 2004).

Unabhängig der Inhibition von Anionentransportvorgängen besitzt das Molekül die Fähigkeit, in niedrigen Dosen die erythrozytäre Ca^{2+} -ATPase unter bestimmten Umständen zu stimulieren (Santos *et al.*, 1999).

Die Bindung von *DIDS* (Abb. 4.2) wird durch seine negativ geladenen Sulfonsäuregruppen stabilisiert, unterstützt durch die hydrophoben Funktionalitäten der Stilbenstruktur. Die Bindung kann reversibel und irreversibel geschehen, wobei eine irreversible Bindung nicht unentbehrlich für den Hemmeffekt ist. Unabhängig von der Art der Bindung geschieht die Hemmung kompetitiv zum Substrat, was auf eine Interaktion an oder nahe der Substratbindestelle schließen lässt. In dieser Arbeit wurde der Farbstoff in einer Konzentration von $20\mu\text{M}$ zusammen mit der Silikatlösung zu den zu messenden Zellen gegeben.

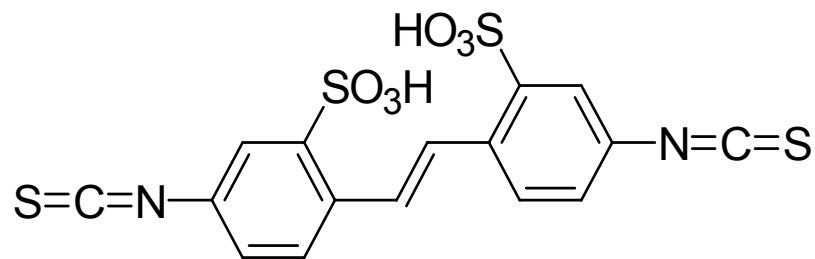


Abb 4.2: Eindimensionale Strukturformel des Silbenderivates 4-4'-diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonsäure (*DIDS*).

4.11. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die Technik des Rasterelektronenmikroskops eignet sich sehr für morphologische Untersuchungen an biologischen Proben verschiedener Präparation.

Wie beim Transmissions-Elektronenmikroskop TEM wird auch beim REM der Elektronenstrahl von einer beheizten Kathode als Strahlungsquelle erzeugt. Im REM wird jedoch nicht das ganze Objekt ausgeleuchtet, sondern der Elektronenstrahl wird auf einen kleinen Punkt an der Oberfläche des Objekts fokussiert. Die von diesem Punkt gestreuten Elektronen werden von einem Detektor gesammelt. Das dabei entstehende Signal wird verstärkt und auf einer Bildröhre als Punkt abgebildet. Ein Punkt auf dem Leuchtschirm der Bildröhre entspricht also einem Punkt auf der Oberfläche des Objektes. Mithilfe einer Ablenkeinheit wird ein elektrisches Feld über den Elektronenstrahl im Mikroskop und über den Elektronenstrahl in der Bildröhre angelegt. Dadurch werden beide Strahlen um einen genau definierten Betrag ausgelenkt; ein anderer Punkt auf dem Objekt wird beleuchtet und auf der Bildröhre abgebildet. Ein Rastergenerator führt den Elektronenstrahl des Mikroskops Punkt für Punkt über die Oberfläche des Objekts (deutsch: „rastern“, engl.: „scanning“), wodurch auf dem Leuchtschirm ein Bild der Oberfläche entsteht.

Ein Vergrößerungseffekt entsteht dadurch, dass über dem Elektronenstrahl der Bildröhre ein stärkeres elektrisches Feld angelegt wird als über den Strahl im Mikroskop. Um zu verhindern, dass sich das Präparat durch den Elektronenstrahl elektrisch auflädt, wird die gesamte Oberfläche mit einem dünnen Film einer leitenden Substanz (meistens Kohlenstoff oder Gold) bedampft. Bei modernen hoch auflösenden REM Geräten ist die Goldbedampfung nicht mehr nötig.

4.12. Transmissions- Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie ist ein sehr vielfältiges Verfahren zur Betrachtung biologischer Proben, vor allem auf zellulärer Ebene. Neben einfachen Schnitten können auch weiterführende Verfahren, wie das Negative staining, Immunogoldmarkierung oder Gefrierbruchtechniken mittels TEM in Bilder umgesetzt werden.

Die Strahlenquelle beim TEM-Gerät ist eine Kathode (z.B. ein Wolframdraht), die elektrisch aufgeheizt wird, sodass Elektronen emittiert werden. Die Elektronen werden in einem elektrischen Feld zur Anode hin beschleunigt (Anodenspannung ca. 100 kV) und verlassen die Strahlenquelle durch ein Loch. Im TEM-Gerät dienen Magnetlinsen zur Formung des Elektronenstrahls. Der Strahl wird zunächst durch zwei Kondensoren auf das Objekt fokussiert. Eine Blende in der Objektivlinse begrenzt den Strahl, indem sie stark gestreute Elektronen ausblendet.

Zwischenlinsen und Projektivlinsen weiten den Strahl auf, woraufhin sich eine hohe Endvergrößerung ergibt. Das Bild des Objekts wird auf einem Fluoreszenzschirm betrachtet. Vergrößerungen von 100-fach bis ca 800 000-fach sind einstellbar.

Im TEM muss ein hohes Vakuum erzeugt werden, denn die Elektronenoptik kann nur optimal eingestellt werden, wenn die Elektronen nicht mit Gasmolekülen Wechselwirkungen eingehen können.

Für die Probenaufbereitung stand eine große Auswahl von Methoden zur Verfügung. Die in dieser Arbeit aufgenommenen TEM Bilder wurden mit der so genannten *Fischer*-Fixierung vorbereitet. Das Einbettungsmittel bestand dabei aus dem Epoxidharz Araldite® CY212.

Dazu wurden kleine quadratische Schwammgewebestückchen mit einer Abmessung von etwa 2mm³ für eine Stunde in Fixativlösung 1 bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ konnten auch Primmorphie verwendet werden. Danach wurden die Proben 6x 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation in Fixativlösung 2 für eine Stunde und ein erneuter Waschschrift von 6x 10 Minuten mit dest. Wasser. Um die Proben zu entwässern, wurden diese mit einer Ethanolreihe ansteigender Konzentration jeweils 2x 10 Minuten pro Ethanolkonzentration inkubiert. Nun folgte die Inkubation der Proben mit Propylenoxyd, welches als Zwischenmedium vor der eigentlichen Einbettung diente. Die auf diese Weise vorbehandelten Proben wurden sodann mit 10ml einer Mischung aus zwei Teilen Propylenoxyd und einem Teil Araldite®-Mischung überschichtet und abgedeckt unter dem Abzug für ein Stunde und ohne Abdeckung über Nacht belassen. Die nächste Inkubation wurde am folgenden Tag mit 10ml unverdünnter Araldite®-Mischung durchgeführt und dauerte einen weiteren Tag, nach welchem die Proben dann in Silikonformen bei 60°C zwei Tage lang aushärteten.

Als die Proben ausgehärtet waren, wurden mittels eines speziellen Schneidegerätes (Ultracut S, Leica, Nussloch) Schnitte von etwa 60nm Dicke hergestellt und auf beschichtete TEM-Kupfernetzchen (*Grid*) mit 75 squares pro *inch* transferiert.

4.12.1. Verwendete Lösungen

Fixativlösung 1	
2,5% (v/v)	Glutaraldehyd
0,82% (m/v)	NaCl
0,1M	Phosphatpuffer nach Soerensen (Na ₂ HPO ₄)
pH 7,3-7,4	(Einstellen mit KH ₂ PO ₄ 0,2M)

Waschpuffer	
1,75% (m/v)	NaCl
0,1M	Phosphatpuffer nach Soerensen (Na ₂ HPO ₄)
pH 7,3-7,4	(Einstellen mit KH ₂ PO ₄ 0,2M)

Fixativlösung 2	
1,25% (m/v)	NaHCO ₃
2,00% (v/v)	OsO ₄
1,00% (m/v)	NaCl
0,1M	Phosphatpuffer nach Soerensen (Na ₂ HPO ₄)
pH 7,3-7,4	(Einstellen mit KH ₂ PO ₄ 0,2M)

Entwässerung über Ethanolreihe	
Ethanol 30%, 50%, 70%, 80%, 96%, 100%.	

Araldite[®]-Mischung	
51% (m/v)	Araldite CY 212
47% (m/v)	Araldite Härter HY 964
2% (m/v)	2,4,6, Tris(dimethylaminomethyl)phenol

4.13. Immunogoldstaining und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

4.13.1. Gewebepreparation

Die Immunogold Labelling Technik ist eine effiziente Methode, um Antigene präzise immunologisch in Gewebe zu lokalisieren.

Dazu verwendet man normalerweise ultradünn geschnittenes Material einer Dicke von ca. 60nm und inkubiert es mit einem spezifischen primären Antikörper. Danach erfolgt die Inkubation mit einem sekundären Antikörper, der mit sphärischen Goldpartikeln markiert ist.

Diese sind dann durch ihre hohe Elektronendichte als schwarze Punkte in der TEM-Aufnahme zu sehen.

Für die der eigentlichen Immunogoldfärbung vorausgehenden Fixierung der Probe wurde eine etwas veränderte Technik verwendet, als die für normale TEM-Aufnahmen des Schwammes *Suberites domuncula* (siehe 4.12). Zunächst begann die Inkubation in Fixativlösung für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur. Die Proben wurden dann mehrmals in Phosphatpuffer gewaschen und mittels einer Ethanolreihe mit aufsteigenden Konzentrationen entwässert. Dabei betrug jeder Entwässerungsschritt 2x5 Minuten. Danach erfolgte die Einbettung der Probe in Resinat (*LR-White Resin*, London Resin Company, Berkshire, England). Dabei wurde das Resinat zunächst im Verhältnis 1:1 mit absolutem Ethanol verdünnt angewendet. Im nächsten Schritt wurde die Verdünnung auf 1 Teil Ethanol und 2 Teile Resinat verringert, bis das Resinat in den beiden letzten Schritten unverdünnt angewendet wurde. Die einzelnen Inkubationsschritte dauerten jeweils 2 Stunden und wurden unter Lichtschutz durchgeführt, um ein zu rasches Polymerisieren zu verhindern. Abschließend wurde die Probe in eine transparente Hartgelatine kapsel gefüllt. Diese wurde für 3 Tage unter Luftausschluss bei 4°C unter indirektem UV-Licht belassen, wo sie vollständig auspolymerisierte.

4.13.2. Verwendete Lösungen

Fixativlösung	
3,0% (v/v)	Paraformaldehyd
0,1% (v/v)	Glutaraldehyd
0,1M	Phosphatpuffer nach Soerensen (Na_2HPO_4)
pH 7,3-7,4	(Einstellen mit KH_2PO_4 0,2M)

Waschpuffer	
0,1M	Phosphatpuffer nach Soerensen (Na_2HPO_4)
pH 7,3-7,4	(Einstellen mit KH_2PO_4 0,2M)

Entwässerung über Ethanolreihe	
Ethanol 30%, 50%, 70%, 80%, 96%.	

4.13.3. Antikörperbehandlung für das Immunogoldstaining

Nachdem die Proben in den Gelatinekapiteln vollständig ausgehärtet waren, wurden davon ultradünne Schnitte einer Dicke von etwa 60nm hergestellt. Dies geschah mittels eines extra dafür vorgesehenen Schneideapparats, welcher mit einer Diamantklinge ausgestattet war. Die Schnitte wurden dann auf beschichtete TEM-Netzchen (*Grids*) aus Kupfer gegeben und waren damit fertig für die Immunogoldmarkierung.

Für die eigentliche Markierung wurde eine feuchte Kammer mit einer Anzahl von Tropfen (20µl) destillierten Wassers beschickt, welche der Anzahl der zu bearbeitenden Netzchen entsprach. Die Netzchen wurden dann mittels einer Pinzette auf die Tropfen gelegt, wobei die Präparateseite nach unten zeigte. Nun wurden die *Grids* für 2 Minuten auf 20µl Tropfen Na-Periodatlösung gelegt, um die Schnitte leicht anzuätzen. Danach wurden die *Grids* 2x2 Minuten mit destilliertem Wasser wie oben beschrieben gewaschen. Als nächstes erfolgte die Behandlung der *Grids* mit 0,1% Tween 20 für 10 Minuten, wodurch die Benetzbarkeit der *Grids* erhöht wurde. Dann wurden die Netzchen in 50mM NH₄Cl-Lösung für 10 Minuten inkubiert und 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden alle unspezifischen Bindungen durch eine mind. 30 Minuten dauernde Inkubation mit 20µl Blocking Solution pro *Grid* abgesättigt. Nun folgte die Inkubation der *Grids* mit dem primären Antikörper in Blocking Solution. Diese dauerte 12-60 Stunden und wurde bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Die *Grids* wurden dann kurz mit PBS-Puffer abgespritzt und 5 Minuten mit 20µl PBS-Puffer gewaschen. Dann wurden pro *Grid* zwei 20µl Tropfen Immunogoldpuffer vorgelegt und die *Grids* auf einen der Tropfen aufgelegt. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären, goldgekoppelten Antikörper, welcher mit Immunogoldpuffer entsprechend verdünnt wurde. Die Inkubation dauerte 2 Stunden und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Abstoppen der Reaktion erfolgte eine Inkubation mit 20µl 0,15M PBS, kurzem Abspritzen mit PBS und abschließender 2x2 minütiger PBS Inkubation. Daraufhin wurden die Antikörper mit 1% Glutaraldehydlösung 5 Minuten fixiert. Die *Grids* wurden dann 2 mal mit dest. Wasser gewaschen, in Silikonhalter eingespannt, die Flüssigkeit mittels Löschpapier abgesaugt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Um später ein besseres Signal zu erhalten wurde der Goldmarkierung eine Silberverstärkung angeschlossen (Danscher 1981). Diese wurde in Dunkelheit bzw. bei Rotlicht durchgeführt. Es wurde erneut eine Reihe 20µl Tropfen dest. Wasser vorgelegt zusammen mit zwei Reihen Silberverstärkungslösung. Die *Grids* wurden in der Silberlösung 25 Minuten belassen, danach 2 mal mit dest. Wasser gewaschen und die aufliegende Flüssigkeit mit Filterpapier abgezogen. Daraufhin folgte die Kontrastierung mittels Uranylacetat.

Immunogoldpuffer Lösung

0,1% (m/v)	Ovalbumin
0,5% (m/v)	Cold Water Fish Gelatine
0,01% (v/v)	Tween 20
0,5M	NaCl
10mM	Phosphat Puffer pH 7,3

Diese dauerte 8 Minuten und wurde in der Dunkelheit durchgeführt. Abschließend erfolgte eine 2 minütige Inkubation in Bleicitratlösung und dreimaliges Waschen mit dest. Wasser und Absaugen der aufliegenden Flüssigkeit mittels Filterpapier.

4.13.4. Verwendete Lösungen

Natium-Periodat Lösung

Gesättigte klare Lösung (durch 0,45µm Filter filtriert)

Tween 20 Lösung

0,1% (v/v)	Tween 20
PBS Puffer	

PBS Puffer

137mM	NaCl
2,7mM	KCl
8,1mM	NaH ₂ PO ₄
1,8mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,3-7,4	

NH₄Cl Lösung

50mM	NH ₄ Cl
PBS Puffer	

Blocking Solution

0,5% (m/v)	Cold Water Fish Gelatine
0,1% (m/v)	Ovalbumin
PBS Puffer	

Phosphat Puffer 10mM

0.0371% (m/v)	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O
0.196 % (m/v)	NaH ₂ PO ₄ x 7 H ₂ O
pH 7,3	

Glutaraldehyd Lösung 1%

1,0% (v/v)	Glutaraldehyd
PBS Puffer	

Silberverstärkungslösung 1000µl (10 Grids=400µl)

600µl	Gummi arabicum Lösung
100µl	Citratpuffer
150µl	Hydrochinon Lösung
150µl	Silberlactat Lösung

Gummi arabicum Lösung

200ml	dest. Wasser
100g	<i>Gummi arabicum</i>

Citratpuffer

11,8g	Trinatriumzitat x H ₂ O
13,9g	Zitronensäure
50ml	dest. Wasser
Titration der 0,8M Natriumcitratlösung mit Zitronensäure bis pH 3,6	

Silberlactat

15ml	dest. Wasser
0,11g	Silberlactat (dunkel bei 4°)

Hydrochinon Lösung

15ml	dest. Wasser
0,85g	Hydrochinon

4.14. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Durch die Technik der Polymerase Kettenreaktion ist es möglich, ausgehend von selbst geringsten Mengen an DNA bestimmte Nukleotidsequenzen *in vitro* enzymatisch zu vervielfältigen, sofern die die Sequenz flankierenden Regionen bekannt sind (Mullis *et al.*, 1986, Saiki *et al.*, 1985).

Die Technik beruht auf der Verwendung zweier sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer, welche jeweils an einem Strang der DNA Doppelhelix der zu amplifizierenden Nukleinsäure komplementär binden. Die darauf folgende Reaktion wird von einer thermostabilen DNA-Polymerase (isoliert aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) getrieben, die unter Verbrauch der zur Reaktion zugegebenen DNA-Bausteine komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Der gesamte Reaktionsverlauf besteht prinzipiell aus drei Schritten und führt schließlich zu einer exponentiellen Vermehrung des flankierten Fragmentes. Nach n-Zyklen liegt das Fragment in 2^n Kopien vor.

Der erste Schritt der Reaktion ist eine Denaturierung des Doppelstranges der Ausgangs-DNA bei 95°C. Der zweite Schritt besteht in der Hybridisierung (annealing) der Oligonukleotidprimer mit der nun einzelsträngigen Nukleinsäure (Templat). Im dritten Schritt, der Elongation findet die Synthese der neuen DNA-Stränge statt, beginnend an den Oligonukleotidprimern und fortlaufend in 5'-3'Richtung. Die Dauer der Elongation richtete sich hierbei nach der Länge der zu amplifizierenden Fragmente, ausgehend von einer Polymeraseaktivität von ~1000 Nukleotiden pro Minute.

4.14.1. Standard PCR-Reaktion

Eine Standard PCR bestand aus folgenden Komponenten und Konzentrationen (siehe Standard-Pipettierschema), wobei im Einzelfall Abweichungen vorgenommen werden können.

Die hergestellten Nukleinsäuren können dann mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt werden. Durch Verwendung einer speziellen DNA-Polymerase ist es auch möglich, an die 5'Enden der neusynthetisierten DNA einen Adenosinüberhang anzuhängen. Durch diesen Anhang wird es möglich, das PCR-Produkt für eine spätere direkte Klonierung in Vektoren zu verwenden, die in geöffneter Form ein überhängendes Thymidin besitzen (siehe 4.14.2.2).

Standard-Pipettierschema	
5,0µl	10 x PCR-Puffer
2,5mM	MgCl ₂
10,0nmol	dNTPs
10,0pmol	forward-Primer
10,0pmol	reverse-Primer
1 U	<i>Taq</i> -Polymerase
1-5ng	Dann
<i>Aq. bidest.</i> ad 50µl	

PCR-Programm	
1x	95°C 2,5-5 Minuten (Anfängliche Denaturierung der Nukleinsäure)
30-35x	95°C 30 Sekunden (Denaturierung)
	T _m - 5°C (Annealing der Primer, Temperatur von Primern abhängig)
	74°C 60-180 Sekunden (Elongation)
1x	74°C 10 Minuten (Anhängen eines 3' Poly A Überhanges für die spätere Klonierung in pGEM-T)

4.14.2. PCR-Produktaufreinigung, Ligation/Transformation linearer DNA

4.14.2.1. Aufreinigung von PCR-Produkten

Erhaltene PCR-Produkte können vor ihrer Weiterverarbeitung aufgereinigt werden, um nachfolgende Prozesse wie die Ligation zu erleichtern und evtl. störende Reste des PCR Ansatzes zu entfernen. Verwendung fand das High Pure PCR Product Purification Kit der Firma Roche. Mittels diese Verfahrens wird das PCR-Produkt von dNTP Rückständen, Salzen und anderen Kontaminationen befreit.

4.14.2.2. Ligation von linearer DNA

Unter Ligation von DNA versteht man die Verknüpfung zweier (linearer) DNA-Moleküle durch Knüpfen einer Phosphodiesterbindung zwischen den beiden überhängenden Enden der Moleküle.

Die Überhänge werden entweder durch eine DNA-Polymerase erzeugt (z.B. *Taq*-Polymerase mit Adenosin-Überhang), durch Restriktionsenzyme nachträglich eingefügt, oder sie liegen in kommerziell erhältlichen Vektoren bereits vor. Katalysiert wird eine Ligation durch eine Ligase, die eine freie 3'-Hydroxylgruppe eines DNA-Moleküls mit einer freien 5'-Phosphatgruppe eines anderen Fragmentes verknüpft.

Bei der in der Arbeit angewendeten T-A Klonierung wurde an ein PCR-Produkt am 3'Ende eine einzelnes Nukleotid angehängt, was durch eine hohe Affinität der Polymerase zu dATP häufig ein Adenylat ist (Clark, 1988). Dieses Fragment wurde nun mit dem Vektormolekül inkubiert, welches einen 5'-Thymidin Überhang hat. Diese Konstellation ermöglichte die Verbindung der beiden Enden. Die daraus resultierenden rekombinanten Vektoren wurden dann durch Transformation von Bakterienstämmen vervielfältigt. Verwendet wurde das pGEM-T Vektorsystem der Firma Promega.

Ligationsansatz	
5µl	2x Ligase-Puffer
3µl	PCR-Produkt
1µl	pGEM-T Vektor
1µl	T4 Ligase

Der Ligationsansatz konnte entweder bei Raumtemperatur 2 Stunden stehengelassen werden, oder alternativ bei 4° im Kühlschrank über Nacht inkubiert werden.

4.14.2.3. Transformation von DNA Molekülen

Das Einschleusen von DNA Molekülen in dafür vorgesehene und vorbehandelte Bakterienstämme bezeichnet man als Transformation (Hanahan, 1983). *In vivo* kann dieser Vorgang auch durch Konjugation oder Infektion geschehen. Die direkte Aufnahme, die Transformation, wird in der Molekularbiologie unter anderem dazu verwendet, Plasmide in Bakterienzellen einzuschleusen, die dort, nachdem ihr Replikationsursprung erkannt worden ist, repliziert werden. Hierzu heften sich die DNA Moleküle an die Zellwand der Bakterien und werden mittels einer plötzlichen Erwärmung des Ansatzes auf 42°C (sog. *Heatshock*), dem eine kurze Inkubation auf Eis folgt, durch die Membran geschleust.

4.14.2.4. Transformationsansatz

Die für die Transformation verwendeten Zellen waren *E.coli*-K12 Zellen aus dem NovaBlue Singles™ Kit, mit einer garantierten Transformationseffizienz von $1,5 \times 10^8$ cfu/μg Plasmid. Für eine Reaktion wurden 50μl Zellen von -80°C auf Eis transferiert und dort 5 Minuten aufgetaut. Danach wurden 2ng aufgereinigtes Plasmid dazugegeben und mit der Pipettenspitze durch sanftes Rühren dispergiert. Dieser Ansatz wurde erneut 5 Minuten auf Eis belassen und danach in der Hitzeschockreaktion 30 Sekunden auf 42°C erwärmt, um dann zuletzt 2 Minuten auf Eis wieder abgekühlt zu werden. Nach der Zugabe von 250μl SOC-Medium wurden die Anätze 30 Minuten bei 37°C und 250 rpm auf einem Laborschüttler inkubiert und auf Selektionsplatten ausplattiert.

4.14.3. Blau–Weiß Selektion rekombinater transformierter Zellen

Um eine gelungene Transformation sichtbar machen zu können bedient man sich der blau–weiß Selektion.

Die verwendeten Vektoren (p-GEM-T, pBK-CMV u.a.) tragen zusätzlich zu einer Antibiotikaresistenz das Lac–Z Gen, welches für ein Fragment der β -Galaktosidase codiert und sich innerhalb der Multiple Cloning Site (Polylinker) des Plasmids befindet. Die β -Galaktosidase katalysiert den Abbau von Laktose zu Galaktose und Glucose (Ullmann *et al.*, 1967). Wird nun durch die Ligation ein DNA–Fragment eingebaut, wird dieses Gen zerstört, und es kommt nicht mehr zu einer Bildung reaktionsfähiger β -Galaktosidase.

Das in die Selektionsagarplatten eingebrachte Substratanalogon X–Gal (5–Brom–4–Chlor–3–indoyl– β -D-galactopyranosid) kann somit nach Induktion des Enzyms mittels IPTG (Isopropylthiogalaktosid) nicht zu dem blauen Farbstoff 5,5'–Dibrom–4,4'–dichlor–indigo umgesetzt werden. Die Kolonien bleiben weiß und kennzeichnen auf diese Weise ein vorhandenes Insert im Plasmid. Diese weißen Kolonien werden nun in ampicillinhaltigem LB-Medium vervielfacht und mittels einer Checking-PCR (siehe 4.16) auf ihre Länge getestet und weiterverarbeitet.

Zusammensetzung der Selektionsplatten (LB-Amp-IPTG-X-Gal)

LB-Agar (1,5% w/v) wird autoklaviert und auf 50°C unter ständigem Rühren abgekühlt. Danach werden pro Platte folgende Komponenten zugefügt:

0,01% (w/v)	Ampicillin
-------------	------------

0,5mM	IPTG
-------	------

0,02% (v/v)	X-Gal
-------------	-------

Das Einzelvolumen einer Platte beträgt 30ml

4.15. PCR mit vektorspezifischen Primern (Checking-PCR)

Die Checking-PCR ist eine Variante der PCR, bei der sowohl forward als auch reverse Primer vektorspezifisch sind. Sie dient der Überprüfung einer Ligation mit anschließender Transformation (siehe 4.14.2.3) und gibt Rückschluss über das Vorhandensein und die Größe des inklonierten Inserts im Plasmid.

Verwendet wurden zwei vektorspezifische Primer die den Polylinker des Vektors flankierten und 3µl einer Plasmidkultur als DNA-Templat. Die Plasmidkultur wurde hergestellt, indem man von der Transformationsplatte Bakterienplaques pickte und diese 30 Minuten in ampicillinhaltigem LB-Medium bei 37°C im Inkubator bei 250 rpm inkubierte. Der PCR-Ansatz bestand aus einer Standardrezeptur mit 10µl pro Ansatz. Der gesamte Reaktionsansatz wurde zuletzt auf ein Agarosegel aufgetragen, um das transformierte Fragment nachzuweisen.

4.16. Komplementieren von Klonen mittels PCR

Wenn eine Sequenz mittels PCR aus einer Genbank vervielfältigt wurde und festgestellt wird, dass es sich nur um einen Teil des gesuchten Gens handelt, ist es möglich, das Gen mittels PCR zu vervollständigen.

Hierzu wurden, nachdem das PCR Produkt sequenziert war, erneut Primer zu den flankierenden Enden der Sequenz erstellt. Der zweite Primer für diese PCR war entsprechend vektorspezifisch.

4.17. DNA-Cycle-Sequencing (Kettenabbruchsequenzierung nach Sanger)

4.17.1. Allgemeines Prinzip der Sequenzierung

Unter der Sequenzierung einer Nukleinsäure versteht man die Bestimmung ihrer Nukleotidreihenfolge. Das hier verwendete Verfahren nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) wird auch als Kettenabbruch oder Didesoxynukleotidverfahren bezeichnet. Ein infrarotmarkierter Primer bindet hierbei komplementär an einen DNA-Strang und dient als Ausgangspunkt für die enzymatische Neusynthese des Komplementärstranges.

Der Reaktionsansatz enthält als Besonderheit neben den gängigen vier Nukleotiden auch 2'-3'- Didesoxynukleotide in einem definiertem Verhältnis. Wird eines dieser Nukleotide in den Nukleotidstrang eingebaut, kommt es zum Kettenabbruch des Stranges, der nicht weiter verlängert wird. Diese Tatsache führt in jedem der vier Ansätze (dG/ddG, dA/ddA, dT/ddT, dC/ddC) zu einem Gemisch aus Fragmenten aller Kettenlängen, die am 5'Ende mit dem Sequenzierprimer beginnen und am 3'Ende eines der ddNTP-Bausteine tragen. Die Reaktionsansätze werden anschließend in definierter Reihenfolge auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die kürzesten Fragmente laufen hierbei am weitesten. Die Auftrennungskapazität des Gels ist so hoch, dass man ein Gemisch aus Fragmenten auftrennen kann, in welchem sich die Länge der einzelnen Fragmente in nur einem Nukleotid unterscheidet. Die Basenabfolge lässt sich deshalb direkt aus der Sequenzierreaktion ablesen.

4.17.2. Aufbau der Sequenzierreaktion

Bei der Herstellung der verschiedenen Ansätze werden nur einzelsträngige PCR-Produkte erzeugt. Diese sind durch einen fluoreszenzgelabelten genspezifischen oder vektorspezifischer Primer markiert. Verwendet wurde der Thermo Sequenase Kit mit fluoreszenzmarkiertem 7-deaza-dGTP.

Pipettierschema	
1,5µg	Matrizen-DNA
2,0pmol	IR-markierter Primer
18,75µl	<i>Aq. bidest.</i>

Dieser Mastermix wird auf vier einzelne PCR Gefäße verteilt (4,5µl) und mit 1,5µl des im Kit enthaltenen Terminationsmix versetzt, welcher alle restlichen Reagenzien für die Reaktion enthält.

Sequenzierprogramm	
1x	5 Minuten (Anfängliche Denaturierung der Nukleinsäure)
	95°C 30 Sekunden (Denaturierung)
30 x	Tm 30 Sekunden (Annealing der Primer)
	70°C 45 Sekunden (Elongation)
1x	95°C 3 Minuten (Abschließende Denaturierung)

Wenn die Cycle-Sequencing Reaktion beendet ist, wird der Reaktionsansatz mit 3,8µl Sequenzladepuffer versehen und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Um eine Renaturierung der Matrizen- DNA zu verhindern, wird der Reaktionsmix danach sofort lichtgeschützt für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Zusammensetzung des Ladepuffers	
95,0% (v/v)	Formamid
0,1% (v/v)	Xylencyanol
0,1% (w/v)	Bromphenolblau
10mM	EDTA
Aqua bidest	

4.17.3. Instrumentelles Sequenzieren

Das zur Sequenzierung verwendete Gerät war ein *Li-Cor 4200 LONGREADIR*. Mittels eines Lasers im Gerät wurden die infrarotmarkierten Primer zur Lichtemission angeregt und dann durch einen Scanner erfasst. Das Gel wurde mit einem Zweikomponentensystem (Sequagel XR) hergestellt. Es bestand zum einen aus der Acrylamidlösung und zum anderen aus einer Pufferlösung. Es wurden für einen Sequenzieransatz 24ml der Acryamidlösung mit 6ml der Pufferlösung zusammengegeben und durch einen Partikelfilter (0,45µm) filtriert. Danach wurde dem Gemisch 170µl einer 10%igen APS-Lösung (Ammoniumperoxidisulfat) zugegeben und kurz umgeschüttelt. Diese Gelmischung wurde nun zwischen zwei Glasplatten (41cm x 66cm) gegossen, die durch zwei seitliche Abstandhalterstreifen (0,25mm) einen schmalen Spalt einschlossen. Nachdem das Gel blasenfrei in den Spalt gelaufen war, wurde ein Spalt an der Oberkante mit einem Vorkamm versehen, der den Platz für den späteren Kamm (48 well shark-tooth comb) aussparte, welcher die Öffnungen für die Probenzugabe vorgab.

Nach der mindestens zweistündigen Polymerisation wurde ein 40 minütiger Vorlauf begonnen, in dem das Gel und der Sequenzierautomat aufeinander kalibriert wurden. In die Probenkammern wurden anschließend 1,3µl des Sequenziermixes aufgetragen und der Sequenziervorgang gestartet. Standardbedingungen waren hierbei 10 Stunden bei 1500 V. Die Pufferkammern wurden mit 1x TBE-Puffer beschickt.

Zusammensetzung des TBE-Puffers	
90mM	Tris-HCl, pH 8,3
90mM	Borsäure
2,0mM	EDTA

Die durch die Sequenzierung erhaltenen Signale, bzw. Banden wurden durch ein Image-Analyse Programm des Sequenzierautomaten in die jeweilige Sequenz übersetzt und konnten danach im FASTA Format abgespeichert werden, um sie später analysieren und charakterisieren zu können. Dies geschah mittels Computerprogrammen wie DNA-Star und BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (siehe 4.25), welcher die Sequenz mit bereits bekannten Sequenzen verglich (Altschul *et al.*, 1990). Dies war sowohl auf Nukleotidebene (BLASTN) als auch auf Proteinebene möglich (BLASTP). Auch konnte eine erhaltene Nukleotidsequenz zunächst in alle existierenden Leserahmen übersetzt und dann verglichen werden (BLASTX) (siehe 4.24.2).

4.17.4. PCR zur Sondenherstellung mittels Polymerase Kettenreaktion

Mit Hilfe dieser Technik können Nukleinsäurefragmente synthetisiert, markiert und später zum Nachweis in Hybridisierungsreaktionen beispielsweise im Northern Blot oder der *In situ* Hybridisierung, eingesetzt werden.

Für die Herstellung von DNA-Sonden wurde das PCR DIG Probe Synthesis Kit der Firma Roche verwendet. Die Markierung erfolgte während der PCR Reaktion, indem statt dem Nukleotid dTTP in einem bestimmten Verhältnis das markierte Nukleotid DIG-11-dUTP eingebaut wurde. Digoxigenin ist ein Steroidmolekül, das über seine Hydroxylgruppe leicht an Nukleotide addieren kann. Da das Digoxigenin mit hoher Affinität von einem im Kit enthaltenen Antikörper gebunden wird, welcher seinerseits mit dem Enzym Alkalische Phosphatase verbunden ist, konnte die so hergestellte Sonde mittels einer Substratreaktion der Alkalischen Phosphatase nach einer Hybridisierung nachgewiesen werden.

Als Sonden-Matrize wurde die DNA des Bikarbonattransporters von *Suberites domuncula* eingesetzt. Die Primer wurden im offenen Leserahmen der Sequenz an die Positionen 427 und 869 gesetzt, sodass ein markiertes Fragment mit einer Länge von 444 Nukleotiden entstand. Nach der PCR-Reaktion wurde jeweils ein Teil des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen und hinsichtlich Größe und Spezifität der Sonde überprüft. Zu beachten war hierbei, dass ein PCR-Produkt durch die DIG-Markierung langsamer im Gel läuft und das Fragment deshalb etwas größer erscheint. War im Gel nur eine Bande zu sehen, konnte der gesamte restliche Ansatz zur weiteren Verwendung aufgereinigt werden. Dazu wurde der Plasmid Purification Kit der Firma Roche verwendet. Zum Abschluss wurde die Konzentration der aufgereinigten Sonde spektroskopisch bestimmt.

Reaktionsansatz	
5,0µl	10 x Puffer (Synergy)
5,0µl	DIG-Mix
1,5µl	Primer forward
1,5µl	Primer reverse
2,0µl	NBCSA-DNA
1,0µl	Synergy Polymerase
34µl	<i>Aqua bidest.</i>

PCR-Reaktion	
1x	95°C 5 Minuten
	95°C 30 Sekunden
30-35x	T _m °C 30 Sekunden
	74°C 4 Minuten
1x	74°C 1 Minute

4.18. *In situ* Hybridisierung

Die Technik der *In situ* Hybridisierung (ISH) erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren (DNA, RNA) am Gewebeschnitt und birgt im Unterschied etwa zur PCR-Technik den Vorteil, dass eine positive Reaktion in Bezug zur mikroskopisch sichtbare Morphologie gesetzt werden kann (Polak and McGee 1998).

Bei der ISH werden radioaktiv oder nicht-radioaktiv markierte Nukleinsäure-Sonden gegen Nukleinsäuren des Zellkerns (DNA) und/oder gegen die mehrheitlich zytoplasmatischen Nukleinsäuren (RNA) eingesetzt. Werden zur Markierung Fluoreszenz-Farbstoffe (Fluorochrome) verwendet, spricht man von der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die Sonde ist dabei zu der im Gewebe gesuchten chromosomen- oder gen-spezifischen DNA-Sequenz komplementär. Die Hybridisierung findet bei der FISH am Arbeitskern der zu analysierenden Zellkomplexe, im so genannten Interphasekern statt.

Alle wässrigen Lösungen wurden mit Dimethylpyrocarbonat (DMPC) behandelt, um störende RNAsen zu entfernen. Das verwendete Ausgangsmaterial bestand aus getrockneten, ca. 8–10µm dicken Schwammschnitten oder Zellen des Schwamms *Suberites domuncula*, die sich auf Objektträgern befanden (Perovic *et al.*, 2003). Diese wurden in Paraformaldehyd-Lösung (DMPC behandelt) 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

Die Fixierung wurde abgeschlossen, indem man 2-mal mit 1ml PBS-Puffer abspülte, um die Fixierlösung zu entfernen. Dem Fixieren schloss sich eine 30 Minuten lange Behandlung mit der Peptidase Proteinkinase K bei Raumtemperatur an, welche Proteinstrukturen abbaute und die Durchlässigkeit für die spätere Sondeninkubation erhöhte. Danach wurden die Schnitte 10 Minuten bei Raumtemperatur in Paraformaldehyd nachfixiert und die anhaftende Fixierlösung durch zweimaliges Spülen mit PBS-Puffer entfernt. Die anschließende Entfärbung beinhaltete fünf Schritte. Zunächst wurden die Schnitte in Ethanol ansteigender Konzentration (30%, 50%, 80%) jeweils 2 Minuten auf einem Laborschwapper behandelt. Es folgte eine gleichgeartete Behandlung mit Ethanol 100% und Isopropanol 100% bevor mit einer weiteren Ethanolreihe diesmal in absteigender Konzentration (80%, 50%, 30%) gewaschen wurde. Abschließend wurde mit 1x PBS Puffer rehydriert und die Proben mit Hybridisierungspuffer versetzt.

Es folgte die Aktivierung der Hybridisierungssonde. Dies geschah in Hybridisierungspuffer für 15 Minuten bei 95°C in einem Eppendorffgefäß, welches danach sofort für 5 Minuten auf Eis gestellt wurde, um eine Renaturierung der nun einzelsträngigen Nukleinsäure zu unterbinden. Für die Hybridisierung wurden pro Schnitt 70µl Hybridisierungspuffer inklusive Sonde auf das Präparat aufgetragen, mit Parafilm eingedeckelt und mit Fixogum Montagekleber an den Rändern luftblasenfrei versiegelt. Die so vorbereiteten Schnitte wurden über Nacht bei 40°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Schnitte 2 Minuten in 2xSSC-Puffer gewaschen, wobei die Temperatur der Pufferlösung 45°C betrug. Im nächsten Waschschrift wurden die Schnitte 3x20 Minuten in 0,2xSSC-Puffer gewaschen, ebenfalls bei 45°C. Das Waschen wurde abgeschlossen durch 2x5 minütiges Behandeln mit PBT-Lösung bei Raumtemperatur. Für die darauf folgende Detektion wurden die Proben zunächst 15 Minuten bei Raumtemperatur in Blocking-Reagenz inkubiert, um unspezifische Valenzen abzusättigen. Der Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragment) wurde in einer feuchten Kammer bei einer Temperatur von 37°C für 1 Stunde in einer Verdünnung von 1:100 in Blocking-Reagenz auf das Präparat gegeben. Vor der abschließenden Substratreaktion wurden die Schnitte 2x5 Minuten bei Raumtemperatur in PBT-Lösung gewaschen, danach nochmals 1x 5 Minuten in P3-Puffer, ebenfalls bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Substratlösung im Dunkeln durchgeführt. Dabei wurde mit NBT/X-Phosphat-Lösung bei 37°C 30-60 Minuten inkubiert und die Reaktion durch 5 minütiges Inkubieren mit PBS-Puffer abgestoppt. Es folgte die Einbettung der Schnitte in Glycergel™ bei einer Temperatur von 50°C.

4.19. Verwendete Lösungen

Blocking-Reagenz	
2,0% (w/v)	PTW
Blocking-Reagenz	

BSA-Stocklösung	
10,0% (w/v)	BSA
Aqua dest.	

Calcium- & magnesiumfreies Seewasser ohne EDTA	
460mM	NaCl
7,0mM	Na ₂ SO ₄
10,0mM	KCl
10,0mM	HEPES
pH 8,5	

DMPC Behandlung wässriger Lösungen	
0,1% (v/v)	Dimethylpyrocarbonat
Über Nacht stehen lassen und autoklavieren	

NBT/X-Phosphat	
87,5µl	NBT
112,5µl	X-Phosphat
25,0ml	P3-Puffer

NBT-Stocklösung	
75mg/ml	NBT
70,0% (v/v)	DMF

P3-Puffer	
100,0mM	TRIS/HCl
100,0mM	NaCl
50,0mM	MgCl ₂

PBS 10x Stocklösung	
136,0mM	NaCl
2,60mM	KCl
6,46mM	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
1,46mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,2	

PBT-Lösung	
0,1% (v/v)	Triton X
20% (m/v)	BSA
PBS-Puffer	

Paraformaldehyd-Lösung	
4% (v/v)	Paraformaldehyd
7,0mM	PBS-Puffer
pH 7,5	

Proteinkinase-K Lösung	
0,1% (m/v)	Proteinkinase-K
PBS-Puffer	

PTW-Lösung	
0,1% (v/v)	Tween 20
PBS-Puffer	

SSC 10x Puffer	
3,0M	NaCl
0,3M	Trinatriumcitrat x 2H ₂ O
dest. Wasser	
pH 7,0	

X-Phosphat-Lösung	
5% (m/v)	X-Phosphat
DMF	

4.20. Northern Blot

4.20.1. Allgemeines Funktionsprinzip

Der Northern Blot ist eine Methode zur Identifizierung und Größenbestimmung von transkribierter RNA. Die Methode leitet sich von der im Jahr 1975 von Edwin Southern vorgestellten Technik zur Identifizierung von DNA ab. Bei dem Verfahren werden mittels Gelelektrophorese getrennte RNA Moleküle auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert (geblottet) und dort immobilisiert (Alwine *et al.*, 1977, Thomas, 1980). Durch Hybridisierung einer markierten Nukleinsäure-Sonde mit der Zielsequenz und einer darauf folgenden Chemilumineszenzreaktion kann das gesuchte Fragment bis in den Nanogrammbereich hin detektiert werden (Li *et al.*, 1987). Des Weiteren kann man mit dieser Methode Aussagen über die Quantität der sowohl gewebespezifischen, als auch entwicklungsstadienspezifischen Genexpression treffen.

4.20.2. RNA-Isolation

Der Prozess der RNA-Isolation und das Arbeiten mit RNA allgemein, beispielsweise im Northern Blot oder der *In Situ* Hybridisierung, war mit einem erhöhten Aufwand an Vorbereitung und Schutz vor Kontamination verbunden.

Das liegt vor allem an der leichten Hydrolysierbarkeit der RNA durch RNAsen. Dies sind extrem stabile Enzyme, die im Allgemeinen keine Cofaktoren brauchen und häufig durch Kontamination mit an Händen und Staub haftenden Bakterien schon in kleinsten Mengen RNA-Moleküle fragmentieren und zerstören.

Aus diesem Grund mussten alle Arbeitsmaterialien durch Sterilisation oder Behandlung mit RNase-Inhibitoren von vorhandenen RNAsen befreit werden. Alle Lösungen wurden 30 Minuten mit 0,1% (v/v) Dimethylpyrocarbonat (DMPC) versetzt und anschließend autoklaviert. Dies war notwendig, um das DMPC, welches unter anderem Purine in den RNA-Molekülen durch Carboxymethylierung verändern kann, zu inaktivieren.

Zur RNA Isolierung begann man mit der Probenentnahme mittels eines sterilen Skalpells. Das entnommene Gewebestück des Schwammes wurde in Aluminiumfolie gewickelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das so behandelte Gewebestück wurde mittels eines Hammers zerkleinert und in einen vorgekühlten, sterilen Porzellanmörser gegeben, worin es dann unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff mittels eines Pistills vollständig homogenisiert wurde. Das so hergestellte grobe, tiefgefrorene Pulver wurde in ein 50ml Falcongefäß gegeben, mit 6ml TRIZOL[®] Reagenz überschichtet und 30 Sekunden gevortext. TRIZOL[®] ist eine monophasische Lösung, die unter anderem nukleaseinhibierendes und proteindenaturierendes Phenol und Guanidinisothiocyanat enthält. Die flüssige Phase wurde zu 1ml aliquotiert und danach 10 Minuten bei 4°C und 14000 x g zentrifugiert. Der entstehende Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 200µl Chloroform versetzt. Danach wurde 15 Sekunden gevortext und 3 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die darauf folgende Zentrifugation für 10 Minuten bei 4°C und 14000 x g ergab eine Trennung der Lösung in zwei Phasen. Zur Fällung der in der oberen wässrigen Phase gelösten RNA wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 30 Minuten mit 500µl Isopropanol bei Raumtemperatur stehengelassen. Es folgte eine weitere Inkubation von 12 Minuten bei 4°C und 14000 x g. Das daraus resultierende RNA-Pellet wurde nach dem Verwerfen des Überstandes mit ca. 1ml Ethanol 75% überschichtet und gevortext. Danach wurde erneut für 5 Minuten bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde das Pellet in 50µl DMPC behandeltem Aqua bidest. aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung von RNA Isolationen erfolgte bei -80°C. Die Verwendbarkeit dieser Proben betrug etwa 6 Monate.

4.20.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung wurde mittels UV-Absorptionsspektroskopie durchgeführt. Die Messung beruht auf dem Lambert Beer'schen Gesetz, nachdem die Absorption in einer verdünnten Lösung proportional zu deren Konzentration verläuft

Nukleinsäuren wurden bei einem Absorptionsmaximum von 260nm gemessen. Einer Extinktion von 1 entsprach nach dem Einbeziehen der jeweiligen Verdünnung der Messlösung 50µg/ml doppelsträngige DNA, 40µg/ml RNA und 33µg/ml Oligonukleotid. Der Quotient aus den Messungen von Nukleinsäuren bei den Wellenlängen 260nm und der Proteine bei 280nm ist ein Maß für die Reinheit der Messlösung und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.20.4. RNA-Gelelektrophorese

Vor dem eigentlichen Vorgang des Blottens wurde die RNA elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Auftrennung entsprach technisch weitgehend der Auftrennung von DNA in Agarosegelen. Allerdings wurden veränderte Puffer verwendet und im gesamten Ablauf ist auf RNase-freies Arbeiten zu achten. Für die Gelherstellung wurden 500mg Agarose in 5ml 10x MOPS-Puffer und 42,3ml Aqua bidest. (DMPC behandelt) in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurden 2,7ml deionisiertes Formaldehyd zugegeben und die so erhaltene Lösung in die Gelschlitten gegossen. 5µg der zu untersuchenden RNA bzw. 100ng des RNA-Markers wurden mit RNA-Probenpuffer im Verhältnis 1:4 versetzt, 20 Minuten bei 65°C denaturiert und nach dem Abkühlen auf Eis in die Geltaschen pipettiert. Die darauf folgende Elektrophorese erfolgte bei 3V/cm² Gelfläche mit 1x MOPS-Laufpuffer der unten genannten Zusammensetzung.

4.20.5. Verwendete Lösungen

RNA-Probenpuffer	
45,5% (v/v)	deionisiertes Formamid
15,0% (v/v)	deionisiertes Formaldehyd
10,0% (v/v)	10% MOPS-Puffer
10,0% (v/v)	Glycerol
0,1% (v/v)	Bromphenolblau

MOPS-Puffer 10x	
0,2M	N-Morpholinopropansulfonsäure
0,05M	Natriumacetat
0,01M	EDTA
Aqua bidest. pH7 (DMPC behandelt)	

Deionisiertes Formaldehyd	
5% (w/v)	Formaldehyd
Mit Ionenaustauscher 45 Minuten rühren und abfiltrieren.	

4.20.6. DIG-Markierung einer Sondensequenz für den Northern Blot

Die nicht-radioaktive Markierung von Nukleinsäuren mit Digoxigenin ist ein effektives System zur Markierung und zum Nachweis von DNA, RNA und Oligonukleotiden für die verschiedensten Anwendungsbereiche.

Die Herstellung der DIG-markierten Sonde für einen Northern Blot unterscheidet sich von der DIG-markierten Sonde für die *In Situ* Hybridisierung. Die Markierung der *NBCSA* Transportersonde erfolgte mit dem DIG DNA Labeling Kit der Firma Roche. Mit dieser Markierungsmethode wird ein Digoxigenin-11-dUTP an das 3'-Ende eines Oligo-Nukleotids angehängt. Dieses lässt sich dann immunologisch mit einem enzymgekoppelten Anti-DIG-Antikörper durch eine chemilumineszente Nachweisreaktion detektieren.

Die Sondenherstellung erfolgte durch eine PCR-Reaktion mit den genspezifischen Primern AE_prob_fwd und AE_prob_rv. Die Sequenz wurde in den Vektor pGEM-T einkloniert, ligiert, transformiert und das Plasmid schließlich isoliert.

Pipettierschema	
2,0µl	10x NTP
2,0µl	10x Transkription buffer
1,0µl	RNAse Inhibitor
2,0µl	T7 RNA Polymerase
1,0µg	linearisierte Plasmid-DNA
13,0µl	dest. Wasser (DMPC)

Im Gegensatz zur *In Situ* Sonde, welche doppelsträngig ist, entsteht für den Northern Blot eine einsträngige Sonde.

Der Ansatz wurde sanft gemischt und kurz auf einer Tischzentrifuge anzentrifugiert. Es folgte eine Inkubation von 2h bei 37°C. Anschließend wurden 2µl DNase I (10U/l) zugegeben, um noch vorhandene DNA zu beseitigen. Die Inkubationsdauer betrug 15 Minuten bei 37°C. Zuletzt wurde die Reaktion durch Zugabe von 2µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) beendet. Die so behandelten Sonden wurden bei -20°C gelagert.

4.20.7. Ablauf des Northern Blotting

Vor dem Hybridisieren der Zielsequenz mit der DIG-markierten Sonde wurde die durch Gelelektrophorese aufgetrennte RNA vom Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert.

Die treibende Kraft dabei sind Kapillarkräfte, die zur Übertragung der RNA auf die Membran führen. Das Agarosegel wird dazu mit den Taschenöffnungen nach unten auf eine Lage Whatman 3MM Papier gelegt, welches in mit 20x SSC Puffer befüllte Pufferkammern beidseitig eintaucht. Die auf die genaue Größe des Gels zugeschnittene Nylonmembran wird dann luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit zwei weiteren Lagen Whatman 3MM Papier bedeckt. Darüber wird eine 8-10cm dicke Schicht aus zugeschnittenem Zellstoffpapier gelegt, die abschließend mit einer tarierten Glasplatte und einem Gewicht von etwa 1000g beschwert wird. Der gesamte Aufbau wird zuletzt mit Frischhaltefolie umwickelt und somit das Gel vor dem Austrocknen geschützt (Abb. 4.4).

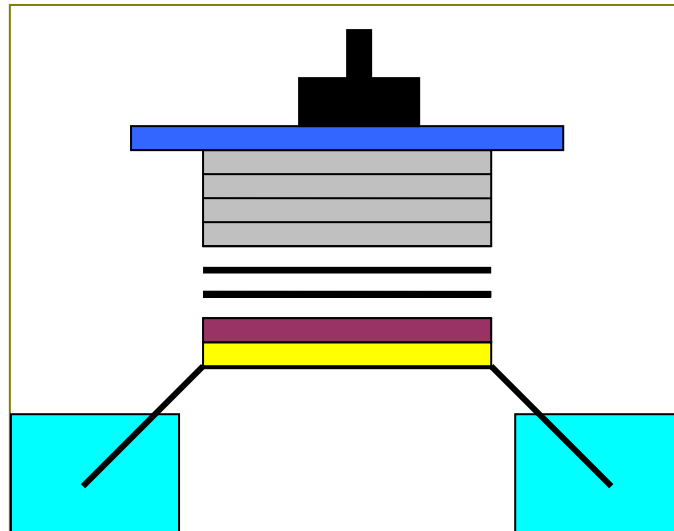


Abb. 4.4: Schematisierter Aufbau eines Northern-Blot. Beschwert durch ein Gewicht (schwarz) dessen Druck durch eine Glasplatte (dunkelblau) verteilt wird, ein Streifen Whatmann Papier (schwarz) beidseitig in Flüssigkeitsbehälter mit 20 x SSC Puffer (hellblau) gelegt. Darauf wird das RNA-Gel (gelb) platziert und mit der positiv geladenen Membran (dunkelrot) bedeckt. Danach werden noch 2 Lagen Whatmann Filterpapier (schwarz) auf die Membran gelegt, gefolgt von einer 8 cm dicken Schicht aus zugeschnittenem Zellstoffpapier (grau).

Nach dem Transfer wurde die Membran getrocknet und die RNA mittels eines UV-Crosslinkers an der Membran fixiert. Dann wurde die Membran ca. 2 Stunden in auf 42°C vorgewärmter Prähybridisierungslösung (DIG-Easy-Hyb, 1ml/5cm²) inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der DIG-markierten Sonde (2µl/ml) welche vorher 10 Minuten bei 95°C denaturiert und dann auf Eis gelagert worden war. Die Sondeninkubation erfolgt über Nacht bei einer Temperatur von 42°C. Zur weitergehenden Bearbeitung wurde die Membran 2x5 Minuten bei Raumtemperatur mit 2x SSC/0,1% SDS (w/v) und 2x15 Minuten bei 42°C in 0,1x SSC/0,1% SDS (w/v) gewaschen. Darauf folgte eine Äquilibrierung mit P1-Puffer und eine 30 minütige Inkubation in P2-Puffer mit Anti-DIG-Antikörpern (Verdünnung 1:10.000, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase). Nach zwei 15-minütigen Waschschrritten mit P1-Puffer /0,1% (v/v) Tween[®] 20 und Äquilibrierung in P3-Puffer wurde mit der Detektion begonnen. Substrat für die alkalische Phosphatase war das Reagenz CDP-Star, mit dem die Membran gleichmäßig beträufelt und dann nach 5 Minuten in Folienbeutel eingeschweißt wurde. CDP-Star, ein Adamantyl-1,2-dioxethanarylphosphat, bildet bei der Nachweisreaktion das metastabile, bei Zerfall Licht emittierende Dioxethan-Phenolat-Anion. Das emittierte Licht kann durch die Belichtung eines aufgelegten Röntgenfilm visualisiert werden. Die Belichtungszeit richtet sich hierbei stark nach der Intensität des Signals und kann von nur 1 Sekunde bis zu 1 Stunde betragen.

P3 Pufferlösung	
100mM	Tris-HCl
100mM	NaCl
pH 9,5	

4.20.8. Verwendete Lösungen

SSC-Puffer 20x (autoklaviert)	
3,0M	NaCl
300mM	Trinatriumcitrat
pH 7,0	

Prähybridisierungspuffer	
2,0% (v/v)	Blocking Reagenz
50mM	Na ₃ PO ₄
0,1% (w/v)	N-Laurylsarcosin
5x	SSC
50% (v/v)	deionisiertes Formamid
7,0% (w/v)	SDS
pH 7,0	

Formamid deionisiert	
5% (w/v)	Ionenaustauscher
45 Minuten rühren und abfiltrieren	

P1 Pufferlösung (autoklaviert)	
100mM	Maleinsäure
150mM	NaCl
pH 7,0	

P2 Pufferlösung	
10% (w/v)	Blocking Reagenz
P1 Pufferlösung	

4.21. Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Nukleinsäuren, beispielsweise zur Kontrolle einer PCR, einer Klonierung oder einer Plasmidpräparation.

Im elektrischen Feld wandern Nukleinsäuremoleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. In einer elektrisch neutralen, festen Gelmatrix mit definierter Porengröße ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente im Gel reziprok proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes (Sambrook *et al.*, 1989). Mit einem einprozentigen Gel ist es möglich, Moleküle von etwa 0,5–10kb differenziert aufzutrennen, während ein zweiprozentiges Gel für kleinere DNA-Fragmente von etwa 50 Basen bis 2 kb geeignet ist.

4.21.1. Gelherstellung

Die verwendete Agarose ist ein aus Rotalgen gewonnenes Polysaccharid, bei welchem jeweils D-Galaktose und 3,6-Anhydrogalaktosereste alternieren.

Pulverförmige Agarose wurde in TBE-Puffer suspendiert und aufgeköcht, bis sie völlig gelöst war. Die Agarosekonzentration betrug je nach Größe des aufzutrennenden Fragmentes ein bis zwei Prozent. Die klare Lösung wurde auf etwa 60°C abkühlen gelassen und in eine horizontale Gelform gegossen, an deren oberen Ende ein kammförmiger Taschenformer eingesetzt war. Nach dem Ausgelieren der Agarose wurde der Taschenformer herausgezogen und das Gel in eine Horizontal-Elektrophoresekammer mit TBE Laufpuffer eingesetzt. Die aufzutrennende Probe wurde im Verhältnis eins zu zwei mit 6x Probenpuffer versetzt und in die ausgesparten Vertiefungen pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 10 V/cm Gellänge wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Lauffront des Laufpuffers im letzten Drittel des Gels angekommen war. Das im Laufpuffer enthaltene Bromphenolblau lief etwa im Bereich eines 300 bp großen linearen DNA-Moleküls, sodass die Elektrophorese nicht bis zum Ende des Gels laufen durfte, da sonst kleinere Nukleinsäuremoleküle nicht mehr erfasst werden konnten.

4.21.2. Verwendete Lösungen

Laufpuffer TBE	
10,78g/l	Tris HCl
0,089M	Borsäure
0,74g/l	Na-EDTA

Probenpuffer 6x	
40% (w/v)	Saccharose
1 Spatelspitze	Bromphenolblau

4.21.3. Färbung von DNA im Agarosegel

Die Färbung der durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte durch den sequenzunspezifisch interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid. Das Gel wurde für 10 Minuten in einer 1%igen Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend unter ultraviolettem Licht der Wellenlänge 260nm mit dem Bildverarbeitungssystem ImageStore 5000 der Firma UVP dokumentiert. Die Bilddatei wurde zur weiteren Bearbeitung gespeichert oder ausgedruckt. Die Nachweisgrenze der Ethidiumbromidfärbung lag bei ca. 10ng DNA/Bande.

4.22. SDS-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese lassen sich durch SDS denaturierte Proteine einer Probe entsprechend ihres Molekulargewichtes auftrennen, und bei gleichzeitiger Auftrennung eines standardisierten Proteinmarkers durch den Vergleich der Wanderungstrecken die Molekulargewichte der Proteine ermitteln.

Des Weiteren können derart aufgetrennte Proteine durch Transfertechniken auf Membranen transferiert werden, um sie dann beispielsweise immunologischen Nachweisverfahren zu unterziehen. Für die Trennung von Proteinen bis 500 kDa verwendet man fast ausschließlich die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Hierbei wird das Gel in einer radikalischen Polymerisation aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid in einem TRIS-Puffer hergestellt.

Die Porengröße des Gels ist durch Einstellung verschiedener Acrylamidkonzentrationen stark variabel. Um die verschiedenen Ladungen von Proteinen und damit die Wanderung der Proteine im Gel zu vereinheitlichen wird sowohl dem Gel, als auch dem verwendeten Ladepuffer SDS (Sodium-Dodecylsulfat) zugesetzt werden. Dieses anionische Detergens wird von einer großen Anzahl Proteine in einem konstanten Verhältnis von 1,4g SDS pro Gramm Protein, d.h. ein Molekül SDS pro zwei Aminosäurereste gebunden (Voet und Voet 1994). Durch Bindung an SDS wird die Eigenladung der Proteine negativiert. Es entstehen anionische Mizellen, welche die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes im Gel laufen lassen. Es ergibt sich auf diese Art eine direkte Beziehung zwischen dem Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichtes und der relativen Wanderungsstrecke der SDS-Mizelle (Weber und Osborn 1969). Anhand eines Proteinmarkers kann eine Abschätzung des Molekulargewichtes erfolgen. Des Weiteren werden Proteine durch SDS denaturiert.

Die Zugabe von Mercaptoethanol im Probenpuffer bewirkt zusätzlich eine reduktive Zerstörung von vorhandenen Disulfidbrücken und somit eine Trennung von derart verknüpften Proteinuntereinheiten. Eine deutlich schärfere Auftrennung der Proteine erreicht man durch Aufteilen des Polyacrylamidgels in ein Sammel- und ein Trenngel. Im Sammelgel wird eine niedrigere Acrylamidkonzentration, d.h. größere Porenweite, ein niedrigerer pH-Wert und eine geringere Salzkonzentration eingestellt als im Trenngel. Auf diese Art kommt es im Sammelgel zu einem Stapeln (Stacking) der Proteine im Gel, was im angrenzenden Trenngel zu einer geraderen Lauffront führt.

4.22.1. Gelherstellung für SDS-Gele

Das verwendete System zur Herstellung der Acrylamidgele der Maße 7,0cmx8,0cmx0,75mm und zum darauf folgenden Gellauf war das Mini-Protean II. Je ein Set Glasplatten wurde mit 0,75mm Platzhaltern (Spacern) in der vorbereiteten Gießvorrichtung befestigt. Zunächst wurde das Trenngel hergestellt und zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Das gegossene Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Grenzschicht zu erreichen und einen Ausschluss von Luftsauerstoff bei der Polymerisation zu gewährleisten. Nach 30 Minuten wurde der Alkohol entfernt und das Sammelgel nach Einsetzen eines Teflonkamms zum Aussparen der Geltaschen dazugefügt.

Das fertig auspolymerisierte Gel wurde nun senkrecht in die Gelkammer gestellt und die Apparatur mit SDS-Laufpuffer beschickt, sodass die Geltaschen mit Puffer gefüllt waren. Die Proteinprobe wurde nun im Verhältnis 1:5 mit Probenpuffer versetzt. Es wurden im Schnitt 10µg Protein pro Geltasche aufgetragen, welche eine Gesamtkapazität von ca. 35µl besaß.

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

Die so hergestellte Probe wurde 10 Minuten bei 95°C auf einem Heizblock denaturiert und auf Eis gestellt. Nach dem Befüllen der Gelkammern wurde eine Spannung von 90V, nach Erreichen der Trenngelfront von 120V angelegt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

4.22.1.1. Verwendete Lösungen

Trenngel 15%	
5,0ml	Rotiphorese Gel 30
2,5ml	Tris HCl 1,5M pH 8,8
0,05ml	SDS 10% (w/v)
2,3ml	Aqua bidest
0,1ml	APS 10% (w/v)
0,01ml	TEMED

Sammelgel 6,0%	
2,0ml	Rotiphorese Gel 30
2,5ml	Tris HCl 1,0M pH 6,8
0,05ml	SDS 10% (w/v)
2,3ml	Aqua bidest
0,1ml	APS 10% (w/v)
0,01ml	TEMED

SDS-Probenpuffer 5x	
250mM	Tris-HCl, pH 6,8
50% (w/v)	Saccharose
10% (w/v)	SDS
0,2% (w/v)	Bromphenolblau
12,5% (v/v)	β-Mercaptoethanol

4.22.2. Färbung von SDS-Page Gelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine konnten diese mittels Coomassie Brilliant Blau G250 detektiert werden. Dies ist ein Farbstoff, der Proteine unspezifisch bindet, jedoch nicht mit der Gelmatrix reagiert. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,1-2,0µg Protein. Das Gel wurde dazu in der Färbelösung etwa 30 Minuten belassen und danach mit einer Entfärbelösung solange auf einem Laborshaker entfärbt, bis sich die Proteinbanden blau vom Rest des Gels abhoben. Analog konnte auch das Reagenz Gel Code verwendet werden.

4.22.2.1. Verwendete Lösungen

Coomassie-Färbelösung	
0,1% (w/v)	Coomassie Brilliant-Blue R250
40% (v/v)	Methanol
10% (v/v)	Essigsäure

Coomassie-Entfärbelösung	
30% (v/v)	Methanol
10% (v/v)	Essigsäure

4.23. Western Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine können durch das sog. *Semi dry Blotting* (Westermeier *et al.*, 1989) quantitativ auf eine Trägermembran überführt und auf diesem Wege einer darauf folgenden Untersuchung und Charakterisierung mit immunologischen Methoden zugänglich gemacht werden. Die negativ geladenen Proteine werden mittels eines elektronengetriebenen Horizontaltransfers auf eine positiv geladene Membran transferiert und somit immobilisiert.

Zunächst wurde die positiv geladene PVDF-Membran auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und einige Sekunden in Methanol aktiviert, bevor sie dann für ca. 10 Minuten in Blotting-Puffer equilibriert wurde. Zwei Stapel von je acht Stücken Filterpapier gleicher Größe wurden kurz in Blotting-Puffer eingeweicht. Einer der Filterpapierstapel wurde luftblasenfrei auf die Anode der Blottingapparatur platziert und das Proteingel darauf gelegt. Die PVDF-Membran wurde ebenfalls luftblasenfrei auf das Gel gelegt und abschließend mit dem zweiten Stapel Filterpapier bedeckt. In dieser Sandwich-Anordnung wurde nach Aufsetzen der Kathode eine Spannung von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ angelegt und die Proteine für 1 Stunde auf die Membran geblotet.

Nach dem Blotting wurde die Spur des Molekulargewichtsmarkers abgeschnitten und zur Kontrolle mit Coomassie-Blue oder Amido-Schwarz Färbelösung etwa 1 Minute gefärbt. Es folgte eine Entfärbung bis die einzelnen Markerbanden klar auf der Membran zu erkennen waren. Für den späteren immunologischen Nachweis der Proteine auf der Trägermembran mussten zunächst alle vorhandenen freien Bindungsstellen der Membran blockiert, d.h. abgesättigt werden, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu unterbinden. Dazu wurde die restliche Membran über Nacht bei 4°C in Blocking Solution inkubiert. Anschließend wurden die Membranstücke 5x5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen und danach mit den spezifischen Primärantikörpern inkubiert. Die Primärantikörper wurden vorher mit der Blockierungslösung entsprechend verdünnt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper dauerte etwa 2 Stunden und wurde bei Raumtemperatur auf einem Laborschüttler in Quadripermschalen[®] durchgeführt. Nach dieser Inkubation wurde die Primärantikörperlösung abgeschüttet und die Membranstreifen 5x5 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen.

Zum Nachweis der im Falle eines positiven Ergebnisses gebundenen Primärantikörper dienten enzymgekoppelte Sekundärantikörper, welche gegen das spezifische Immunglobulin des Primärantikörpers gerichtet waren. Gängigerweise kommen Anti-Maus oder Anti-Kaninchen Antikörper zum Einsatz, die mit Alkalischer Phosphatase oder Peroxidase gekoppelt sind. Die gekoppelten Enzyme erlauben somit eine Detektion der Antikörper durch Umsetzen eines enzymespezifischen Farbstoffsubstrates. Die Sekundärantikörper wurden ebenfalls entsprechend in Blockierungslösung verdünnt auf die Membran gegeben, wo sie etwa 2 Stunden verblieben. Nach einem abschließenden Waschschrift mit 5x5 Minuten TBST und 1x5 Minuten TBS wurde der Sekundärantikörper mit dem jeweiligen Nachweissystem sichtbar gemacht.

4.23.1. Entwicklung mit NBT/X-Phosphat

Mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Anti-Kaninchen-IG-Antikörper wurden mit dem NBT/X-Phosphat System nachgewiesen. Unter alkalischen Bedingungen spaltet die alkalische Phosphatase 5'-Phosphatgruppen von Nukleinsäuren und Nukleotiden ab. Als Substrat diente in diesem System das X-Phosphat, das durch eine hydrolytische Spaltung in einen blauen unlöslichen Indigoniederschlag überführt wurde. Die dabei freigesetzten Protonen reduzierten NBT zu Diformazan, welches durch seine purpurviolette Farbe den Niederschlag noch weiter verstärkte.

4.23.2. Verwendete Lösungen

Blockierungslösung	
3% (v/v)	Blocking-Reagenz
TBS-Puffer	

Blotting-Puffer	
25mM	Tris-HCl, pH 9,0
192mM	Glycin
20% (v/v)	Methanol

TBS	
10mM	Tris-HCl, pH 8,0
150mM	NaCl

TBST	
0,1% (v/v)	Tween 20
TBS-Puffer	

Antikörper-Verdünnungslösung	
0,3% (v/v)	Blocking-Reagenz
TBST-Puffer	

Amidoschwarz-Färbelösung	
0,1% (w/v)	Amidoschwarz
40% (v/v)	Methanol
10% (v/v)	Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung	
80% (v/v)	Methanol
5% (v/v)	Essigsäure

4.24. Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Polyklonale Antikörper können gegen praktisch jedes Protein als Antigen durch eine wiederholte Injektion (Immunisierung) eines Wirtstieres wie Maus, Ratte oder Kaninchen erzeugt werden. Die so erhaltenen Antikörper können für verschiedene molekularbiologische Methoden verwendet werden, in denen das Antigen immunologisch nachgewiesen wird. Dazu zählen die Immunozytologie oder die Immunogoldfärbung bei der Elektronenmikroskopie.

4.24.1. Immunisierung der Wirtstiere und Herstellung der Sera

Bei der Immunisierung der Wirtstiere (Kaninchen) wurden aus Silikatnadeln von *Suberites domuncula* isolierte Proteinfilamente verwendet (siehe 4.5).

Zuerst wurde dem Kaninchen Blut abgenommen, um daraus ein Präimmenserum herzustellen. Dieses brauchte man für die späteren Versuche als Negativkontrolle, um unspezifische Bindungen von Immunglobulinen anzuzeigen. Die eigentliche Immunisierung wurde dreimal mit einem Abstand von einem Monat zwischen den einzelnen Schritten durchgeführt. Zusätzlich wurde dem Kaninchen Freund'sches Adjuvans gespritzt, ein Immunstimulans, was zu einer verstärkten Immunreaktion und somit letzten Endes zu einer erhöhten Ausbeute an Antikörper führt (Herbert *et al.*, 1978).

Die injizierte Lösung für die Erstimmunisierung bestand aus 0,5ml Proteinlösung einer Konzentration von 20ng/µl und dem gleichen Volumen Freund'schen Adjuvans complete.

Diese Lösung wurde dem Kaninchen an mehreren Stellen subkutan verabreicht. Die Lösung für die folgenden Immunisierungen (Booster) wurde in gleicher Weise, jedoch mit Freund'schem Adjuvans incomplete hergestellt und verabreicht. Um den Erfolg der Immunisierung kontrollieren zu können, wurden zwei Wochen nach der zweiten und dritten Injektion dem Kaninchen geringe Mengen Blut entnommen und der Antikörpertiter (siehe 4.24.2) bestimmt.

Nach der Feststellung des ausreichend hohen Titers wurden dem Kaninchen 20ml Blut abgenommen. Diese Blutprobe wurde zusammen mit der Blutprobe für das Präimmenserum 60 Minuten bei 37°C und danach 60 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein 5 minütiger Zentrifugationsschritt bei 14000 x g, bei welchem die festen Blutbestandteile vom Serum getrennt wurden. Dieses wurde entnommen und bei -20°C aufbewahrt.

4.24.2. Analyse des Antikörpertiters in immunisierten Kaninchen

Die Bestimmung des Antikörpertiters erfolgt über einen ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Dazu werden die entsprechenden ELISA-Platten mit dem als Antigen verwendeten Protein beschichtet und dann mit dem gewonnenen Serum inkubiert. Der gebundene Antikörper wird dann mit einem sekundären enzymgekoppelten Antikörper inkubiert, der einen Fluoreszenzfarbstoff bei Substratzugabe als Nachweisreaktion umsetzen kann.

Die ELISA-Platten wurden mit Proteinlösung der Konzentration 5µg/ml in Carbonatpuffer befüllt und für drei Stunden trocknen gelassen. Nicht gebundene Antikörper werden durch viermaliges Waschen mit PBS-Puffer beseitigt. Zur Blockierung unspezifischer Valenzen werden die beschichteten Wells mit 150µl BSA-Lösung (Bovines Serumalbumin) versehen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS-Puffer gewaschen und die Antikörperreaktion mit verschiedenen Konzentrationen für Präimmun- und Antiserum pipettiert. Die Verdünnungen reichten von 1:100 bis 1:2000, wobei für Serum nach dem dritten Boosterschritt eine Verdünnung von 1:500000 verwendet wurde. Das pipettierte Volumen betrug 100µl pro Well und die Inkubationszeit eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS-Puffer wurden in jedes Well 100µl eines mit Peroxidase gekoppelten Antikörpers in einer Verdünnung von 1:2000 in PBS-Puffer gegeben und eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Puffer wurden dann 100µl der Substratlösung (TMB) in jedes Well gegeben und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert, bevor die Reaktion mittels 25µl einer gebrauchsfertigen Stopp-Lösung angehalten wurde.

4.24.3. Verwendete Lösungen

Karbonat-Puffer	
0,1M	NaHCO ₃
pH 9,6	

Substratlösung	
1,25mM	Tetramethylbenzidin
2,20mM	Wasserstoff Peroxid

PBS Puffer	
137mM	NaCl
2,7mM	KCl
8,1mM	NaH ₂ PO ₄
1,8mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,2	

BSA-Lösung	
3,0% (w/v)	BSA
PBS-Puffer	
pH 7,2	

4.25. Phylogenetische Analyse und Sequenzanalyse

4.25.1. Analyse mittels Datenbanken

Sollen neue Aminosäure- oder Nukleotidsequenzen auf bestehende Homologien mit bereits bekannten Sequenzen geprüft werden, wird dieses gängigerweise anhand von Sequenzdatenbanken gemacht, welche eine große Anzahl bereits bekannter, durch umfassende Sequenzierungsprojekte erhaltene Sequenzen für ein Homologiescreening online anbieten.

Dieses Screening bietet die Möglichkeit, bestehende Homologien qualitativ und quantitativ zu erfassen und darzustellen. Zu den umfassendsten und bekanntesten Online-Datenbanken gehören „Genebank“ des National Center of Biotechnology (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), die „Nucleotide Database“ des European Molecular Biology Laboratory (EMBL, <http://www.ebi.ac.uk/embl/>) oder die Datenbank des National Institute of Health (NIH, <http://www.nih.gov/science/>). Eine mehr proteinsequenzorientierte Datenbank ist das „Swiss Prot“ des Swiss Institute for Bioinformatics (<http://www.expasy.org/sprot/sprot-top.html>). Auf diesen Seiten findet sich ebenfalls eine Vielzahl von „Protein-Tools“. Dies sind frei verfügbare Computerprogramme, die es ermöglichen, Nukleotid- und vor allem Aminosäuresequenzen genau zu charakterisieren und zu analysieren, etwa auf Vorkommen bestimmter Sequenzmuster oder Domänen.

Beispiele dafür sind „ProSite“ (<http://www.expasy.org/prosite/>) was ebenfalls auf der Seite ExPASy des Swiss Institute for Bioinformatics zu finden ist oder „ProDom“ (<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom/current/html/home.php>).

4.25.2. Sequenzanalyse mittels Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Das BLAST Programm ist ein Programm, um gezielt Homologien mit bereits bekannten Sequenzen zu suchen. Dazu wird die Sequenz, bei der Analyse als „Query“ bezeichnet, im *FASTA*-Format in das Suchfeld des Programms eingegeben. Eine Vielzahl von Parametern kann danach für die Konfiguration der Suche verändert und individualisiert werden. Wichtige Parameter sind die Einstellung des Filters, der die Toleranzgrenze für falsch positive Ergebnisse festlegt und die Wahl der Datenbank. Der Filter für falschpositive Ergebnisse sollte bei der Analyse von völlig neuen Sequenzen ausgeschaltet sein, da gerade bei der Suche nach phylogenetischen Verwandtschaften auch geringe Homologien von Bedeutung sein können. Nach dem Abschicken der Suchanfrage wird das Ergebnis als graphische Darstellung und das Alignment angezeigt. Um die Ergebnisse zu quantifizieren werden verschiedene Parameter verglichen. Der S-Wert (s für score) trifft eine Aussage, ob Bereiche mit identischen Resten, so genannte „high scoring segment pairs“ (HSP) gefunden wurden.

Somit steigt das Ausmaß der Übereinstimmung mit wachsendem S-Wert. Der E-Wert (expectation cut off value) hingegen bewertet die Signifikanz der ausgegebenen Homologien, d. h., es wird bewertet, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass die Homologien rein zufällig entstanden ist. Der E-Wert zeigt die Anzahl der Sequenzen, bei denen eine ebenso gute, oder bessere Homologien zu erwarten wäre, wenn die identische Datenbank mit einer rein zufällig ausgesuchten Sequenz durchsucht worden wäre (Lesk, *et al.*, 2002). Der E-Wert im englischsprachigen ist dem p-Wert im Deutschen äquivalent.

Je kleiner also der E-Wert der Sequenzanalyse, umso wahrscheinlicher ist das Vorhandensein einer echten Homologie. Ein E-Wert von $<0,005$ kann bereits als signifikante Homologien gewertet werden. Nimmt der E-Wert sehr kleine Werte an, ist dies ein eindeutiges Indiz für eine enge Verwandtschaft der beiden Sequenzen.

Es gibt drei geläufige Versionen, eine BLAST-Analyse durchzuführen Während der BLASTN ausschließlich Nukleinsäuresequenzen und der BLAST-P ausschließlich Aminosäuresequenzen miteinander vergleicht,. ermöglicht BLAST-X den Vergleich einer Nukleotidsequenz mit einer Aminosäuresequenz. Dabei wird die zu untersuchende Nukleinsäuresequenz zunächst in alle möglichen Leserahmen übersetzt und dann mit der Proteindatenbank verglichen.

4.25.3. Analyse der Aminosäure-Sequenzhomologie (Protein-Alignment)

Ein Alignment ist eine Hypothese für die positionelle Homologie zwischen Basenpaaren und Aminosäuren.

Das klassische Protein-Alignment besteht aus dem Vergleich von mindestens zwei Aminosäuren, mit dem Ziel eine vorhandene Sequenzhomologie zu erkennen und zu bewerten. Die Alignments in der vorliegenden Arbeit wurden mit den Computerprogrammen DNA-Star, DNAsis und Clustal W erstellt.

4.25.4. Erstellen von phylogenetischen Stammbäumen

Unter Phylogenie versteht man die Evolutionsgeschichte einer Art oder Artengruppe, besonders im Hinblick auf Abstammungslinien und die Beziehung zwischen Großgruppen von Organismen.

Bei der molekularen Phylogenie werden die Abstammungslinien auch von einzelnen Molekülen bestimmt, auf den Ebenen von DNA, RNA oder Proteinen. Die Ergebnisse der molekularen Phylogenie einzelner Moleküle können dann verwendet werden, um die Zusammenhänge der zugehörigen Organismen aufzuklären. Die molekulare Phylogenie stellt somit eine Weiterentwicklung der konventionellen Phylogenie dar, deren Ergebnisse auf äußerlichen, nicht molekularbiologischen Merkmalen beruhen. Die Rationale liegt dabei in der Annahme, dass die Nukleotidsequenz die Geschichte eines Gens bestimmt, sowie die Evolution eines Proteins durch seine Aminosäuresequenz determiniert ist (Rauhut, 2001).

Eine sehr geläufige Darstellungsweise phylogenetischer Verwandtschaft ist die in Form von verzweigten Baumdiagrammen, den so genannten „Phylogenetic Trees“. Die Darstellung eines solchen Baumes besteht aus durch Linien verbundenen Knoten (Nodes) und Zweigen (Branches). Die daraus resultierende Verzweigung des Baumes ergibt die Topologie. Die topologische Beziehung der durch die Knoten dargestellten Objekte (Organismen, Moleküle) wird durch die Zweige dargestellt. Die Länge der Zweige beschreibt nun wiederum die Anzahl der ausgetauschten Aminosäuren oder Mutationen zwischen zwei Knoten oder den zeitlichen evolutionären Abstand derselben.

Man unterscheidet phylogenetische Bäume in „rooted“ oder „unrooted“. Ist der Baum „rooted“, so wird der gesamte Baum auf einen gemeinsamen Vorläufer bezogen. Dieser stellt die Wurzel des Baumes dar. Wendet man das „*outgroup rooting*“ an, verwendet man als so genannte *outgroup* eine Sequenz oder Taxon, welches zu allen anderen Mitgliedern des Baumes ähnelt, aber mit ihnen weniger verwandt ist als diese untereinander. Damit stellt die *outgroup* eine Negativkontrolle innerhalb der phylogenetischen Analyse dar. Ist der Baum „unrooted“, spiegelt er lediglich die evolutionäre Beziehung der Teilnehmer untereinander wider, nicht aber deren Bezug zu einem gemeinsamen Vorfahren.

Mittels der Bootstrappingmethode, welche bei phylogenetischen Analysen am häufigsten angewendet wird ist es möglich, die Verlässlichkeit eines Datensatzes und damit auch des Phylogenetic Trees zu untersuchen. Damit gelingt es auch, die Häufigkeit eines bestimmten Clusters innerhalb des Trees zu untersuchen, wenn es zu Änderungen bei Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen kommt.

5. Ergebnisse

5.1. Klonierung eines möglichen Kandidatengens für den Silikattransport im marinen Schwamm *Suberites domuncula*

Aufgrund seiner Expressionsstruktur und Transporteigenschaften war der Natriumbikarbonat Transporter ein viel versprechender Kandidat, als Silikattransporter im marinen Schwamm *Suberites domuncula* fungieren zu können. Eine mögliche Bifunktionalität des Transporters wurde auch durch die chemische Ähnlichkeit von Carbonat und Silikat unterstützt.

5.1.1. Klonierung und Charakterisierung des *NBCSA*-Cotransporters

Das Gen des Natriumbikarbonat-Silikat Cotransporters wurde aus der cDNA Bibliothek des Institutes isoliert. Der ursprüngliche cDNA-Bank-Klon hatte eine Gesamtlänge von 3948 Basenpaaren und befand sich einkloniert in den Vektor pBKCMV. Deshalb war es möglich, ihn mit den Plasmidprimern T₃ und T₇ (siehe 3.9.1) zu amplifizieren. Um den Klon zu vervollständigen und um Fehler innerhalb der Sequenz auszuschließen wurden gegen geeignete Bereiche in der Sequenz Primer angefertigt (siehe 3.9.4). Mit den Primern band3_frw2, band3_frw3, band3_rv_2, band3_rv_3, und den dazugehörigen Bankprimern wurde eine erneute PCR-Reaktion durchgeführt. Die erhaltenen Fragmente wurden ligiert, transformiert und anschließend sequenziert (siehe 4.14.2).

Die daraus erhaltene Sequenz wurde einer Analyse mittels des BLAST-Algorithmus unterzogen. Hohe Homologien wurden hierbei unter anderem zu folgenden Sequenzen gefunden. „Putative sodium Bikarbonate cotransporter“ von *Rattus norvegicus* (Excession Nr. 6502527 Entrez PubMed) und „Sodium Bikarbonate cotransporter 3“ von *Homo sapiens* (Excession Nr.5051628 Entrez PubMed). Die größten Homologien bestanden zum humanen NBC-Cotransporter member 7 (NBC4-2_HOMO, Accession Number NP_003606). Der isolierten Sequenz wurde der Name *NBCSA_SUBDO* zugeteilt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Sequenz mit dieser Bezeichnung verwendet.

NBCSA_SUBDO

```

0
1 GGCACGAGGAAAGGTCTAGTGAGCTTTGTGTGGCTTACCAAAAAGAAAAAGTGAACTCT 00
60
0
61 CACTTTTAGAATCGTACGAAGGCTTACTCCATGGATAGTTGTCCTGAGCCAATTCAGTGA 120
1 M N P P E K L S V T N Y S R T D R H 18
121 ACAATTATGAACCCCCAGAAAAGTTATCTGTGACCAACTACAGTCGTACTGATCGTCAT 180
19 G N H E V Q M L D L P G S P Q F P R R S 38
181 GGAAACCACGAGGTACAGATGTTGGACCTGCCAGGAAGTCCACAGTTTCCACGGCGATCC 240
39 T S P S P P S M S T S S T P V R E G H S 58
241 ACATCACCGTCCCCTCCTTCCATGTCCACCTCCTCCACACCCGTGAGAGAAGGTCACTCT 300
59 P M F I E D G Y S T R S E A T G S D I T 79
301 CCCATGTTTATAGAAGATGGGTACAGTACCAGGAGTGAAGCAACGGGATCTGATATCACC 360
80 T S S P G K T S R R N K G A D L L N F V 99
361 ACGAGCAGTCCAGGAAAGACGTCTAGACGCAACAAGGGTGTGATCTTCTCAACTTTGTCT 420
100 T R K R T H S S S S T D G G K S T G T 119
421 ACTCGTAAACGGCACACTTCAAGCTCATCAACTGATGGAGGCAAAAGCACAGGTACC 480
120 R S S P S Q S S P S P G P I N K A V R I 139
481 AGATCATCTCCATCACAAAGTAGTCCCAGTCTGGACCTATCAATAAAGCCGTTTCGTATC 540
140 L M P S K S P T S S K K S D V D T K V S 159
541 TTGATGCCCTCAAGTCTCCCACCAGTAGCAAGAAGAGTGTGGACACTAAAGTTAGT 600
160 T A I G G H F S V A P K D M S V L E R I S 179
601 ACAGCCATTGGGCACCTTCTCTGTGGCTCCCAAGGACATGTCCGTTGGAGAGAATCTCT 660
180 K R A Q H H S K R V R K P H E V F V E L 199
661 AAACGAGCTCAACATCATTCAAACGAGTCCAGAAAACACATGAAGTATTTGTGGAGTTG 720
200 E E L R L D P S D E L E W E E T A R W I 219
721 GAAGAGTTAAGATTGGATCCATCTGATGAACTGGAGTGGGAGGAGACGGCTCGTTGGATA 780
220 K F E E D V E E G S G R W G R P H V S A 239
781 AAGTTTGAAGAAGATGTGGAGGAGGGTAGTGGTTCGATGGGGTAGACCACAGTGTCTGCT 840
240 L A F H S L V E L R R G L E K G L V M L 259
841 TTAGCATTTTCATAGTCTCTGTGGAACTTAGGAGAGGCTGGAGAAAGGCTGGTGTGTTG 900
260 D V E G G E D F P T I A D Q I V D T L V A 279
901 GATGTCGAGGGGAAGACTTCCCTACCATAGCTGATCAGATAGTGGACACTCTGGTAGCA 960
280 S G Q L P E K Q R E P V L R I L L K K H 299
961 TCTGGACAACTGCCAGAGAAGCAGAGAGAACCTGTCTGAGGATCTTGCTAAAGAAACAC 1020
300 K H S N D I T L W E K L K Q S A V D P D 319
1021 AAACACTCTAATGACATCACTCTATGGGAGAAGCTGAAGCAATCTGCTGTGGACCCAGAT 1080
320 G R L H H I G E G L R R I S H A H G L S 339
1081 GGACGTCTCCACCACATTTGGGGAGGGACTACGTCTGATAAGCCACGCCACGGACTATCG 1140
340 E L G G G S S S S V S K Q D Q S R R K S 359
1141 GAGCTAGGCGGAGGGAGTAGTTCATCAGTCAGCAACAAGATCAGTCCAGACGGAAGAGT 1200
360 L P D I T L Q E T N G S K E K E L S N S 379
1201 CTGCCAGATAAACACTCCAAGAGACCAACGGAAGTAAAGAGAAAGAACTAAGTAATTCA 1260
380 S S S K R R E F Q R I S S A P L L A E S 399
1261 TCTTCTTCAAAGAGGAGAGAATTTCAAAGAATTTCTTCTGCACCTCTACTGGCCGAGAGC 1320
400 S D E I P S P S S S P P V H G I L H I E 419
1321 AGTGATGAGATCCCCTCTCCCTCGTCTCTCCCCCGTCCACGGGATCCTTCACATTGAG 1380

```

420 N G S N P R D M H I S D K K V M F N I A 439
 1381 AATGGTTC TAATCCCCGTGACATGCACATATCAGATAAGAAGGTTATGTTCAATATTGCA 1440
 440 G G S S E E F F P V V S P G S S G F V S 459
 1441 GGAGGATCGTCTGAGGAGTTCCTTCTGCTAGTCTCTCCCGGAGCTCTGGTTTTGTGAGT 1500
 460 Q T G S T D V C N D T G T T R T Q P L K 479
 1501 CAAACAGGCTCCACAGATGTTTGTAAATGACACAGGTACTACACGGACTCAACCACTGAAG 1560
 480 K M T P K I S K L P L A P P E R Q I N S 499
 1561 AAGATGACTCCCAAGATTTCCAAGCTCCCCCTGGCCCCCAGAGAGACAAATAAATAGT 1620
 500 S S L K R K M S V I S L M N K I P D E A 519
 1621 TCATCACTCAAACGTAAGATGAGCGTTATCTCTCTAATGAACAAGATACCCGACGAGGCA 1680
 520 E S L T V L V G G V K F L R K P V V A F 539
 1681 GAGTCACTCACCGTACTTGTGGGCGGAGTCAAGTTCCTACGGAAACCACTCGTAGCATT 1740
 540 V R L D Q S H L L G D L T E V P V P L R 559
 1741 GTGAGATTGGATCAGAGCCACCTCCTCGGTGACCTGACTGAAGTCCCGTCCCATTGAGG 1800
 560 F I Y L L L G P E E G L C D Y H E V G R 579
 1801 TTCATTTACTCCTGCTAGGACCTGAAGAAGTCTCTGTGACTATCACGAGGTCGGACGA 1860
 580 A M A T L M S D S H F H D T A Y C A V C 599
 1861 GCTATGGTACTCTCATGTCTGACTCGCATTTCATGACACTGCGTATTGTGCTGTCTGC 1920
 600 K E D F L D A M D K F L D D S I V L P P 619
 1921 AAAGAGGACTTTCTGGATGCCATGGACAAGTTTCTTGATGACAGCATCGTCCTTCCGCCA 1980
 620 G D W D Q E L L L P I M H E R N E L R R 639
 1981 GGAGATTGGGATCAGGAGCTTCTACTGCCAATCATGCATGAACGAAATGAACTCAGGAGG 2040
 640 R K Q H K V E E N Q R K V F S V D P L K 659
 2041 AGAAAACAACACAAAGTTGAAGAGAATCAGAGAAAGGTGTTTTCCGTTGATCCTCTCAAG 2100
 660 H S R K P C G G M W N D V K K L V K R Y 679
 2101 CACTCACGCAACCTTGCGGTGAATGTGGAATGATGTCAAGAACTAGTCAAGCGTTAC 2160
 680 P S D L K D A L H L Q P I I S I F F L Y 699
 2161 CCTAGCGACCTTAAAGATGCTCTCCACCTCCAACCAATCATCTCAATCTTCTTCTCTAC 2220
 700 V A F L A P A I A F G G L M E E I T K S 719
 2221 GTTGCCTTTCTTGTCTCTGCTATAGCCTTTGGTGGTCTGATGGAGGAGATCACCAAGAGT 2280
 720 Q I G G E T E T L L A T G L C G I V Y G L 739
 2281 CAGATAGGGAGACTGAGACTCTGTTAGCTACTGGTCTGTGTGGAATCGTGTATGGGTTG 2340
 740 F A V Q P L T V L A F T G P L I L F E T 759
 2341 TTTGCCGTTAACCTCTCACAGTGTGGCATTACAGGTCCACTTATCTTGTGTTGAGACG 2400
 760 V V Y R F A V D E L S I S Y I E W R S A 779
 2401 GTCGTCTATCGATTTGCAGTTGATGAGCTCTCTATATCATAACATAGAGTGGAGGTCAGCC 2460
 780 T G L W L M V I L M I A S F A E I S F L 799
 2461 ACTGGTCTGTGGTTGATGGTTATCTTAATGATAGCTTCATTTCGCAGAGATCTCTTTCTTG 2520
 800 I K Y F T R F S E E I F T G I I C L F F 819
 2521 ATCAAGTACTTTACTCGTTTTAGTGAAGAAATCTTCACAGGCATCATTGTCTGTTTTTC 2580
 820 I F E A C L S I Y H I F E R N P L C G I 839
 2581 ATTTTTGAAGCATGTCTAAGCATTACACATATTTGAACGTAACCCTCTCTGCGGTATT 2640
 840 D Y P C G E A S H M T N T C Q P I H E D 859
 2641 GACTATCCTTGTGGTGAAGCTTCTCACATGACCAACACATGTGAGCCTATACACGAAGT 2700
 860 D N H S N E S Y H D D H D S M V F M N D 879
 2701 GACAACCACTTAACGAGAGTTACCATGATGACCACGACAGTATGGTTTTTATGAACGAT 2760
 880 S I D D V H A P V L P S G F R I C N Q P 899
 2761 TCAATAGATGATGTTTCATGCTCCAGTTTTGCCATCAGGATTTAGAATCTGTAATCAACCA 2820
 900 N T F L W S L M L C V F T F F I A F F L 919
 2821 AACACCTTCTCTGGTCACTCATGTTGTGTGTCTTCACGTTCTTTATTGCTTCTTTTTG 2880

920	R K L R H G K F L G K Q G R R L V S D F	939
2881	AGAAAAC TACGACATGGCAAGTTCCTTGGTAAACAGGGCCGTAGACTGGTCAGTGACTTT	2940
940	G M L T A I L L M V A L S Y G L R H L I	959
2941	GGGATGCTCACTGCCATCTTGTGATGGTTGCTCTATCTTATGGTCTGAGGCACTTAATT	3000
960	A V E K L T V P P N Y A N S N I T R G W	979
3001	GCAGTTGAAAACTCACCGTTCCTCCAAATTATGCTAACAGTAACATTACCAGAGGATGG	3060
980	F I H P F N G A I S I G E G F G A I I P	999
3061	TTTATACATCCGTTCAATGGGGCTATCAGTATAGGGGAGGGATTTGGAGCTATCATACT	3120
1000	A F L L A L L I F I E S Q L T V L L V S	1019
3121	GCATTCTTGCTGGCTCTACTGATCTTCATCGAGAGTCAACTCACTGCTCTGCTAGTAAGC	3180
1020	K P D H K L E K G V G T M C S L I V A I	1039
3181	AAACCAGATCACAACTAGAAAAAGGAGTTGGTACCATGTGCTCTCTGATAGTCGCCATC	3240
1040	L T G V C G L L G I P W V C G A S V R S	1059
3241	CTAACTGGAGTATGTGGTCTGCTGGGCATTCCCTGGGTGTGTGGTGCCTCTGTGAGGTCT	3300
1060	I Q H L Q A L S V F T T K N P P G E K P	1079
3301	ATTC AACACTTGCAAGCTTTGAGTGTGTTTACAACAAAGAACCACCTGGAGAGAAACCA	3360
1080	K L L F I R E Q R V T T I V V H V L I L	1099
3361	AAGCTTCTGTTTATCAGAGAACAGAGAGTCACCACCATTGTTGTCCATGTTCTTATCCTT	3420
1100	L T P L A Y P V L A L I P I S V T L G V	1119
3421	CTCACTCCGCTAGCTTACCCCGTACTAGCTCTCATCCCGATCTCTGTGACTCTTGGTGTG	3480
1120	F F Y L A Y A S L S G V Q L T K R I K L	1139
3481	TTCTTCTACCTTGCCCTATGCCTCACTCAGCGGGGTGCAGCTGACAAAAAGAATTAACCTT	3540
1140	V I T P S K H H P N V H Y V R K V R T W	1159
3541	GTCATCACTCCATCCAAACATCACCCAAATGTTCACTATGTTCAGGAAGGTACGGACATGG	3600
1160	K M H L Y T F I Q V V C I A C L F G L K	1179
3601	AAGATGCATCTCTACACGTTTATTC AAGTCGTGTGCATTGCTTGTCTGTTTGGATTGAAG	3660
1180	N S P A G M L Y P V V I V A L I P L R W	1199
3661	AACTCGCCAGCTGGTATGCTGTATCCCGTTGT CATAGTAGCACTCATTCCATTGAGATGG	3720
1200	I L G K F F F S H D E I E A L D S E E D	1219
3721	ATACTGGGAAAGTTTTTCTTCTCACACGACGAAATAGAAGCTCTGGACAGTGAAGAGGAC	3780
1220	F P E E H D I H G G G G E F E E F E A H	1239
3781	TTTCCTGAAGAACACGATATACACGGAGGTGGTGGAGAGTTTGAAGAATTTGAAGCTCAC	3840
1240	V P Y *	1242
3841	GTTCCCTTATFAAACAAATTTCTCTAATTTGACTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTTCT	3900
3901	AATTTGCTGAAAGATATAAAATTTTACTGTGTATGTTTTATCAAGCTGTTTATTATGAAAA	3956

AAAAAAAAAA

Abb. 5.1: Basensequenz und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz von NBCSA_SUBDO. Der 3'untranslatierte Bereich ist rot, der 5'untranslatierte Bereich ist blau gekennzeichnet. Das Startcodon ATG ist grün gekennzeichnet. Der Stern vor Beginn des 5'untranslatierte Bereichs zeigt das Stopcodon und damit das Ende des offenen Leserahmens an. Die Sequenz der Sonde für In Situ Hybridisierung (siehe 5.5.2) wird von den verwendeten Primern (magenta) eingeschlossen. Der forward primer liegt an Position 427 der Sequenz des NBCSA_SUBDO Transporters, der reverse primer an Position 860. Der reverse primer ist invers und rückwärts in der Sequenz eingezeichnet.

5.2. Analyse und Charakterisierung der Basensequenz und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz

Der gesamte cDNA Klon besaß eine Länge von 3959 Basenpaaren, exklusiv des Polyadenylat-Endes. Der offene Leserahmen (ORF) hatte eine Ausdehnung von 3726 Basenpaaren (Nt₁₂₈₋₁₃₀-Nt₃₈₅₁₋₃₈₅₃). Das daraus entstehende potentielle Protein hatte eine Länge von 1241 Aminosäuren, wobei das Startmethionin nicht mitgezählt wurde. Die

Aminosäuresequenz ist von einem 126 Basenpaaren langen 5'untranslatierten und einem 104 Basenpaaren langen 3'untranslatierten Bereich, an den der Polyadenylatschwanz grenzt umgeben.

Die Region um das Startmethionin zeigt deutliche Abweichungen von der für Wirbeltiere optimalen Basenabfolge, der so genannten *Kozak*-Sequenz (G C C A/G C C ATG G, Kozak, 1991). An Position Nt₁₃₀ (+1) befindet sich statt einem A ein G. An der Position Nt₁₂₄ (-3) ist ein A vorhanden und an Position Nt₁₂₀ (-5) befindet sich ein C. Der 3'untranslatierte Bereich enthält kein eindeutiges Polyadenylierungssignal (A A T A A A, Zarkower *et al.*, 1986). Diese Tatsache entspricht einem bereits häufiger zu sehenden Phänomen in Schwammgensequenzen (Pfeifer *et al.*, 1993). Weitere signifikante Sequenzbereiche bezogen auf den 3'UTR (untranslatierter Bereich) und den 5'-UTR (untranslatierter Bereich) konnten bei der Sequenzanalyse nicht gefunden werden.

Auffällig ist dabei das Fehlen eines ATTTA Motivs im 3'-UTR (untranslatierter Bereich). Das Vorhandensein eines solchen Motivs ist ein Hinweis auf eine kurze Halbwertszeit der entsprechenden m-RNA (Boerboom und Sirois 1998). Die prozentuale Basenzusammensetzung des 5'-untranslatierten Bereiches, des ORF und des 5'- Endes sind in Tabelle 5.1 zusammengestellt.

Nukleotid	5'-UTR	ORF	3'-UTR
A	31,75	26,78	22,12
T	25,40	26,65	52,88
C	19,05	23,54	9,62
G	23,81	23,03	15,38
A+T	57,14	53,44	75,00
G+C	42,86	46,56	25,00

Tab. 5.1: Prozentuale Basenzusammensetzung des 5'-untranslatierten Bereiches des ORF (Open Reading Frame) und des 3'-untranslatierten Bereiches (Analyse nach <http://paris.chem.yale.edu/cgi-bin/extinct.pl>).

Wie aus der Tabelle 5.1 zu entnehmen ist, übersteigt im 5'-UTR (untranslatierter Bereich) der Gehalt an den Basen A und T den von G und C, was bei eukaryotischer DNA gegen den allgemeinen Trend verläuft (Pesole *et al.*, 2001).

Die aus der Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz umfasst eine Größe von 1241 Aminosäuren. Das Molekulargewicht errechnet sich zu 138264 Da. Der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH-Wert von 6,81. Die theoretische Halbwertszeit der Sequenz errechnet sich auf 30 Stunden, bezogen auf Säugerreticulocyten (Bachmair *et al.*, 1986). Der Instabilitätsfaktor des Proteins überstieg mit einem Wert von 56,60 den Richtwert von 40, sodass das Protein als instabil eingestuft wurde (Guruprasad *et al.*, 1990). Die PROSITE-Analyse (Bairoch *et al.*, 1992) der Sequenz ergab folgende Angriffsstellen für posttranslationale Modifikationen:

- 1) Glycosylierungsstelle für Asparagin (ASN) Glykosylierung durch Oligosaccharid-Transferasen (Konsensus: N-{P}-[ST]-{P}-[N=Glycosylierungsstelle]; Marshall *et al.*; 1972) (Tab. 5.2)

Position	Sequenz
11-14	NYSR
368-371	NGSK
377-380	NSSS
419-422	NGSN
467-470	NDTG
497-500	NSSS
860-863	NHSN
863-866	NESY
877-880	NDSI
973-976	NITR

Tab. 5.2: Liste der möglichen Glykosylierungsstellen für Asparagin innerhalb der Proteinsequenz des NBCSA_SUBDO-Transporters.

Eine N-Glykosylierung findet fast ausnahmslos an Asparaginresten statt und wurde zuerst in *Halobacteria* beobachtet. In einer dreiteiligen Reaktion werden zunächst zwei N-acetylglucosaminreste und fünf Mannosereste auf Dolicholphosphat übertragen. Nachdem dieser Komplex in das Innere des Endoplasmatischen Reticulums gelangt ist, entsteht dort ein mit vierzehn Resten glykosylierter Dolicholphosphatkomplex, der schließlich Asparaginreste an ihrer Konsensussequenz glykosyliert. Die Modifikation ist bisher nur für ein Glykoprotein aus Vertebraten geschildert, nämlich das Laminin. Trotzdem findet sich die Proteinsequenz in der Mehrzahl der bekannten Proteine.

2) Phosphorylierungsstelle für die Casein Kinase II (Konsensus: [ST]-x-(2)-[DE] [S/T ist die Phosphorylierungsstelle], Pinna *et al.*, 1990) (Tab. 5.3).

Position	Sequenz
13-16	SRTD
68-71	TRSE
73-76	TGSD
108-111	SSTD
151-154	SDVD
172-175	SVLE
243-246	SLVE
267-270	TIAD
305-308	TLWE
313-316	SAVD
349-352	SKQD
358-361	SLPD
363-366	TLQE
398-401	SSDE
441-444	SSEE
771-774	SYIE
791-794	SFAE
865-868	SYHD
879-882	SIDD
988-991	SIDE
1018-1021	SKPK
1206-1209	SHDE
1215-1218	SEED

Tab. 5.3: Liste der möglichen Phosphorylierungsstellen für die Casein Kinase II innerhalb der Proteinsequenz des NBCSA_SUBDO-Transporters.

Die Casein Kinase 2 ist ein vornehmlich nukleär vorkommendes Enzym. Ebenfalls lokalisiert ist es im ER und dem Golgiapparat. Obwohl die Gesamtheit seiner Funktionen noch nicht vollständig geklärt ist, wird es mit der Regulation vielerlei Prozesse in Verbindung gebracht, einschließlich Wachstum, Proliferation und Differenzierung.

3) Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase C (Konsensussequenz: [ST]-x-[RK] [S/T]; Woodget *et al.*, 1986) (Tab. 5.4)

Position	Sequenz
15-17	TDR
67-69	STR
85-87	TSR
86-88	SRR
99-101	TRK
147-149	SSK
148-150	SkK
178-180	SkR
185-187	SkR
214-216	TAR
228-230	SGR
354-356	SRR
380-382	SSK
381-383	SKR
429-431	SDK
471-473	TTR
481-483	TPK
500-502	SLK
660-662	SRK
1055-1057	SVR
1069-1071	TTK
1133-1135	TKR
1157-1159	TEK

Tab. 5.4: Liste der möglichen Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C innerhalb der Proteinsequenz des NBCSA_SUBDO-Transporters.

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen ist die wichtigste Modifikation zur Steuerung von Enzymaktivität. Die Protein Kinase C findet sich in der Signalkaskade wieder, die von Rezeptoren ausgelöst wird die G_q-gekoppelt sind. Ligandenbindung an dem Rezeptor führt zu einer Aktivierung des G-Proteins, was wiederum die Phospholipase C aktiviert. Diese spaltet Phosphoinositoldiphosphat zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ diffundiert durch das Zytosol und bewirkt letztlich einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration.

Dies ist das Signal für die Proteinkinase C aus dem Zytosol an die Membran zu binden, wo sie von DAG aktiviert wird.

4) Phosphorylierungsstelle für cAMP und cGMP abhängige Proteinkinase. (Konsensussequenz: [RK] (2)-x-[ST] [S/T ist die Phosphorylierungsstelle], (Fremisco *et al.*,1980) (Tab. 5.5).

Position	Sequenz
36-39	RRST
100-103	RKRT
329-332	RRIS
355-358	RRKS
478-481	KKMT
503-506	RKMS

Tab. 5.5: Liste der möglichen Phosphorylierungsstellen für cAMP und cGMP abhängige Proteinkinase innerhalb der Proteinsequenz des NBCSA_SUBDO-Transporters.

Die cAMP-abhängige Proteinkinase oder Proteinkinase A vermittelt die Effekte der cAMP Kaskade. Aktiviert wird die Kinase durch einen gestiegenen cAMP Spiegel, bedingt durch die Aktivierung der Adenylatcyclase. Deren Aktivierung ist wiederum das Resultat der Ligandenbindung eines G_s gekoppelten Rezeptors.

5) Sulfatierungsstelle für Tyrosin (Konsensussequenzen: Anwesenheit einer sauren Aminosäure im Abstand von zwei Positionen zum Tyrosin, Anwesenheit von mindestens drei sauren Aminosäureresten im Bereich von Position -5 bis +5 der Sequenz, wobei Position +1 die Lokalisation des Tyrosins beschreibt, Anwesenheit von nicht mehr als einer basischen und drei hydrophoben Aminosäureresten im Bereich von -5 bis +5, Anwesenheit von schleifeninduzierenden Aminosäuren (Prolin oder Glycin) im Bereich von -7 bis -2 und von +1 bis +7 oder zumindest die Anwesenheit von zwei oder drei Asparagin Serin oder Asparaginsäure im Bereich von -7 bis +7. Des Weiteren ist die Abwesenheit von disulfidbrückegebundenen Cysteinresten im Bereich von -7 bis +7 und die Abwesenheit von N-glykosylierten Bereichen nahe des Tyrosins ein Konsensusmerkmal. Rosenquist *et al.*, 1993) (Tab. 5.6).

Position	Sequenz
59-73	PMFIEDGYSTRSEAT

Tab. 5.6: Liste der möglichen Sulfatierungsstelle für Tyrosin innerhalb der Proteinsequenz des NBCSA_SUBDO-Transporters.

Die Sulfatierungsreaktion ist typisch für Glucosaminoglycane, was einen Großteil ihrer negativen Ladung ausmacht. Ebenso können auch Tyrosinreste kurz bevor sie den Golgi-Apparat verlassen sulfatiert werden. In beiden Fällen ist der Donor der Phosphatgruppe 3'-Phosphoadenosinphosphosulfat (PAPS), welches vom Zytosol in das Lumen des trans-Golgiapparates transportiert wird.

6) Zweiteilige „Nuclear Targeting“ Sequenz (Konsensussequenz: Anwesenheit Vorhandensein einer Platzhalterregion (Spacer) bestehend aus 10 Aminosäureresten beliebiger Zusammensetzung. Vorhandensein von mindestens drei basischen Aminosäuren (Arginin oder Lysin) in Position 5 zur Spacer-Position, Dingwall *et al.* 1986) (Tab. 5.7).

Position	Sequenz
87-103	RRNKGADLLNFVTRKRT
661-677	RKPCGGMWNDVKKLVKR

Tab.5.7: Liste der möglichen Stellen der „Zweiteiligen nuclear targeting Sequenz“ innerhalb der Proteinsequenz des NBCSA_SUBDO-Transporters.

Da die Aufnahme von Proteinen in den Kern sehr selektiv ist, benötigen Peptide eine Signalsequenz. Diese kann überall innerhalb des Peptides liegen und besteht typischerweise aus einem Bereich von 4-8 positiv geladenen Aminosäuren mit einem benachbarten Prolinrest. Da solche Bereiche meist in zwei Blöcken vorkommen, spricht man von zweiteiligen (bipartite) Bereichen.

7) N-Myristoylierungsstelle (Konsensussequenz: G-{EDRKHPFYW}-x-[STAGCN]-{P} [G ist die Myristoylierungsstelle], Towler *et al.*, 1988) (Tab. 5.8).

Position	Sequenz
74-79	GSDITT
112-117	GGKSTG
250-255	GLEKGL
341-346	GGGSSS
342-347	GGSSSV
343-348	GSSSSV
470-475	GTTRTQ
665-670	GGMVND
733-738	GIVYGL
939-944	GMLTAI
1029-1034	GTMCSL
1129-1134	GVQLTK

Tab.5.8: Liste der möglichen N-Myristoylierungsstelle innerhalb der Proteinsequenz des NBCSA_SUBDO-Transporters.

Die Verknüpfung von Proteinen mit Fettsäuren während der Translation dient der Verankerung der Proteine auf der Innenseite der Zellmembran. Eine Myristoylierung geschieht vorzugsweise an aussenliegenden, terminalen Glycinresten. Da Glycin die zweite Aminosäure in einer Polypeptidkette darstellt, wird vor der Verknüpfung mit Myristinsäure das Initiator-methionin proteolytisch entfernt.

8) Erkennungsstelle für Proteinamidierung (Konsensussequenz: x-G-[RK]-[RK] [x ist die Amidierungsposition], Kreil *et al.*, 1984) (Tab. 5.9).

Position	Sequenz
930-933	QGRR

Tab.5.9: Liste der möglichen Erkennungsstellen für Proteinamidierungen innerhalb der Proteinsequenz des NBCSA_SUBDO-Transporters.

Die Amidierung der Vorstufen von Peptidhormonen oder anderen aktiven Peptiden fungiert als eine Schnittstelle für Peptidvorstufen (Peptide Precursor). Generell können alle Aminosäuren amidiert werden, jedoch stellen hydrophobe Aminosäuren wie Valin oder Phenylalanin weitaus bessere Substrate dar als geladene Aminosäuren. Die C-terminale Amidierung konnte bisher nicht bei Einzeller und Pflanzen gezeigt werden.

Es wurde eine weitere Proteinanalyse angefertigt, die zusätzliche Hinweise auf die Struktur des Proteins geben sollte (RAO ARGOS-Algorithmus, PC/GENE 1995). Die Analyse konnte folgende 10 Sequenzen als potentielle Transmembranhelices ausfindig machen (Tab. 5.10). Die Bewertung der transmembranen Bereiche als primär und sekundär erfolgte über ihren Amphibilitätsfaktor (Kyte *et al.*, 1982). Dabei wurden primäre Helices vornehmlich in stark apolaren Bereichen der Aminosäuresequenz ausgemacht. Sekundäre Helices besitzen einen hydrophileren, oder zumindest amphiphilen Charakter und erlauben eine Voraussage bezüglich der Funktion der Transmembranregion zum Beispiel als Kanalprotein.

Nr.	Sequenzbeginn aa	Sequenzende aa	Länge aa
1	690	712	22
2	725	760	35
3	778	799	21
4	809	826	17
5	900	918	18
6	938	954	16
7	983	1017	34
8	1027	1054	27
9a	1088	1110	22
9b	1113	1133	20
10a	1162	1177	15
10b	1182	1205	23

Tab. 5.10: Anzahl und Zusammensetzung der Transmembranhelices in der Aminosäuresequenz von NBCSA_SUBDO (RAO ARGOS-Algorithmus, PC/GENE 1995). Die Bezeichnung „a“ und „b“ rühren von verschiedenen Nomenklaturen innerhalb der bestehenden Literatur her, die teilweise Überlappungen berücksichtigt.

Der *k-NN* Wert der Sequenz ergibt sich zu 9/23 und sagt somit eine Lokalisation innerhalb der Plasmamembran von 87% voraus (*Nearest Neighbor*) (Horton *et al.*, 1997).

5.3. Suche nach Sequenzhomologien zu bekannten Transportersequenzen zur weiteren Charakterisierung von *NBCSA_SUBDO*

Eine Homologiensuche mittels einer BLAST-Analyse ergab, dass die Schwammsequenz die höchsten Homologien zum humanen Na/HCO₃ Cotransporter der Transporterfamilie 4 zeigt (Accession number NP_003606) (Abb.5.2). Die hohe Homologie spiegelte sich einem e-Wert (siehe 4.25.4) von e⁻¹⁵⁵ wieder.

Die Gesamthomologien der beiden Sequenzen waren überaus hoch. 46% der Aminosäuren waren ähnlich (vergleichbare physiko-chemische Eigenschaften) und 28% der Aminosäuren identisch. Die beiden Konsensus-Sequenzen für Anionentransporter fanden sich in der Schwammsequenz zwischen den Aminosäuren (AS) AS₆₆₅-AS₆₇₃ und AS₈₁₃-AS₈₂₂ (Reithmeier 1993). Auch alle zusätzlichen konservierten oder ähnlichen Bereiche bezüglich der Aminosäuresequenz von Metazoen-Bikarbonattransportern waren mit deutlichen Homologien in der Schwammsequenz auffindbar (Romero *et al.*, 1999). Die transmembranen Helices 9 und 10 der Schwammsequenz enthalten zwei hydrophobe Signaturen. Die bei höheren Metazoen ausgedehnte extrazelluläre Schleife im Bereich zwischen den Helices 5 und 6 ist in der Schwammsequenz deutlich kürzer. Dafür besitzt die Sequenz eine ausgedehnte intrazelluläre Schleife zwischen den Helices 4 und 5.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal neben dem Vorhandensein einer Elektrogenität, der pH-Wert Abhängigkeit, der Natrium- und Bikarbonatabhängigkeit ist die kompetitive Hemmbarkeit des Transporters mittels Stilbenderivaten wie *DIDS* (4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbendisulfonat). Die Schwammsequenz *NBCSA_SUBDO* besitzt vier Bindestellen, welche weitgehend mit bereits identifizierten *DIDS*-Bindestellen übereinstimmen (Romero *et al.*, 1999, Virkki *et al.*, 2003). Diese liegen an den Positionen AS₇₆₃-AS₇₆₆, AS₈₂₆-AS₈₂₈, AS₁₀₂₇-AS₁₀₃₆ und AS₁₁₇₆-AS₁₁₈₀. Die Bindestellen an AS₇₃₆-AS₇₆₆ und AS₈₂₆-AS₈₂₈ werden von Virkki als *disrupted* bezeichnet, was eine Unterbrechung des Motivs im Vergleich zu der Bezugssequenz anzeigt.

```

NBCSA SUBDO MNPPEKLSVTNYSRTDRHGNHEVQMLDLPGPSQFPFRSTSESPSPSSTSPVREGHSPMFIIDGYSIRSEATGSDIT 78
NBC4-2_HOMO -----MERFRLEKKLPGDEEAVVDLGKTSSTVNPKFEKBELESRAVYICVHV 50

NBCSA SUBDO TSSPGKTSRRNKGADLLNFVTRKRTHSSSSSTDDGGKSTGTRSSPSQSSPSGPKAVRILMPSKSPSTSSKKSVDVTK 156
NBC4-2_HOMO FS---KESRRRHRHRGHKHHHRRRKDKESDKEDG-----RSPSPYDTPSQRVQFILGTEDDDEE----- 106

NBCSA SUBDO VSTAIGHFSVAPKDMSVLERISKRAQHHSKRVRKPHVVFVLEBELRLDPSDELEWEETARWIKFEEDVEEGSGRWGRP 234
NBC4-2_HOMO -----HIPHDLFTEMDEL CYRDGEEVWEKETARWLKFEEDVEDGGDRWSKP 152
*****

NBCSA SUBDO HVSAIAFHSLVELRRGLEKGLVMLDVEGEDFPTIADQIVDTLVASGQIPEKQREPVLRILLKHKHSSNDITLWEKCLKQ 312
NBC4-2_HOMO YVATLSLHSLFELRSCILNGLVMLDMRASTLDEIADMVLDNMIASGQIDESIENVREALLKRHHHON-----EKRFT 225

NBCSA SUBDO SAVDDPGRLLHIGEGLRRISSHAGLSELGGSSSSSVSKQDQSRKSLPDITQETNGSKEKEISNSSSSKRREFQORIS 390
NBC4-2_HOMO SRIPLVRSFADIGK---KHSDFHLLERNCEG----LSASRHSIRRTGLSASNLSLRGESPPLSLGLHLLPSSR-----A 291

NBCSA SUBDO SAPLLAESDEIPSPSSSPPVHGILHIENGSNPRDMHISDKKVMFNLAGGSSEEFFVVPVSGSSGFVSQTGSTDVCND 468
NBC4-2_HOMO GTPAGSRCTTPVPTPQNSPSSPSISRLTSRSSQK--SQRAPELLVSPASDDIPTVVIHPEDELEAALKGEEQKNE 367

NBCSA SUBDO TGTRTRQPLKMKTPKISKLPAPP---ERQIN-----SSSLKRMKSVISLNMNKIPDEAESLTVLVCQGVKFKRKPVV 536
NBC4-2_HOMO E-NVDLTPGILASPSQAPGNLDNSKSGEIKGNSSGSSRENSTVDFSKVDMNFMRKIPGTGAASNVLVGEVDFLTERPII 444

NBCSA SUBDO AFVRLDQSHLLGDLTEVPVPLRFIYLLGLPEEGLCDVHEVGRAMATLMSDSHPHDTAYCAVCKEDFDLAMDKFLDDSI 614
NBC4-2_HOMO AFVRLAPAVLLTGLTEVPVPTRELFLLGLGPAKAPQVHEIGRSIATLMTDEIFHDVAKAKDRNDLGLGIDFLDQVT 522
*****

NBCSA SUBDO VLPPGDWDQELLLPIMHERNELRRRQKHVKEENQRKVSVDP-----IKHSRKPCCGMWNVKLVKRVPSDL 682
NBC4-2_HOMO VLPPGEWDPSIRIEPPKSVPSQEKRIIPVFHNGSTPTLGETKEAAHAGPEIORTGRLFGGILLDIKRPKAPFLSDF 600
[~cons1~]

NBCSA SUBDO KDALHLQPIIISIFFLYVAFLABATAFGGLMEIITKSKUGETETLLATGLCGTVYGLFAVQPLTVLAFGLPILIFETVV 760
NBC4-2_HOMO KDALSLLQCLASLFLYCACMSVITTEGGLIGATEGRISAEBSLFGASLTGLAYSFLAGQPLTILGSGPVLVFEKIL 678
{TM1-----TM1} {TM2-----TM2}
*****

NBCSA SUBDO YRFVAVLELSISYIEWRSATGLWLMVILMIASFAEISFLIKYFTRFSEEIFTGLICLFIFEACLSTIYHIFERNPLCGI 838
NBC4-2_HOMO YKFCRD-YQLSYLSLRTSISGLWTSFICIVLVATDASSLVICYITRFTEEAFAALICTIFIYEALEKFLDGETYAFN-M 754
{TM3-----TM3} {TM4 [~cons2~] TM4}

[DIDS] ***** [DIDS]
NBCSA SUBDO DYPCEGASHMINTCQPIHEDDNHSNESYHDD--HDSMVFMMDSIDDVHAPVLPSPGFRI CNQ----PNTFLWLSMLC 908
NBC4-2_HOMO HNNLDKLTISYCVCTEPPNPSNETLAQWKKDNITAHNLSWRNLTIVSECKKLRGVFLGSACGHGHPYIPDVLVFCVILF 832
{TM5-----TM5}

NBCSA SUBDO VFTFFIAFFLRKLRHCKFLGKQGRRLVSDFGMLTALLMVALSYGLRHLIABVKLTVEPNVANSNITRGWFLIEFNGA 986
NBC4-2_HOMO FTTFPSSFLKQFKTKRYFPPTKVRSTISDFAVFLTIVIMVTIDYLVG--VPSEKLVHVEKFEPTHPERGWIISELG-D 907
-----TM5} {TM6-----TM6} {TM7}

NBCSA SUBDO ISIGEGFGAIIAPAFLLALLIFIESQLTVLLVSKPDHKLKGVG-TMCSLIVAILTGVCGLLGIPWVCCASVRSIQHILQ 1063
NBC4-2_HOMO NPWWTLLIAAIPALLCTILIFMDQQTAVIINRKEHKLKKGAGYHLDLIMVGVMLGVGSVMGLPEWVFAATVLSISHVN 985
-----TM7} {TM8-----TM8}
*****

NBCSA SUBDO ALSVFTKKNPGEKPKLFIREFQVTLIVVHVLILTLPLAYVFLALIPISVTLGVFFVLAYASLSGVQLTKRIKLVIT 1141
NBC4-2_HOMO SLKVESECSAPGEQPKFLGIREQVTLIMLIFLLMGLSVFMTSVLKFLPMPVLYGVFLVMGVSILKGIQLFDRIKLFGM 1063
{TM9a-----TM9a} {TM9b-----TM9b}
*****

NBCSA SUBDO PSKHHPNVHYVRKVRTWKMHLYTFIQVVCIAFLGLKNSPAGMLYPVVIVALIPLRMILGKFFSHDETEALD---SE 1216
NBC4-2_HOMO PAKHCPLDIYLRVYVPLWKVHIFTVIQLTCLVLLWVIVKVSAAAVVFPMMVLALVVRKLM-DLCTKRELSWLDLMP 1140
{TM10a----TM10a} {TM10b-----TM10b}
***** [DIDS]

NBCSA SUBDO EDFPEHDIHGGGE-----FEEFEAHVPY----- 1241
NBC4-2_HOMO SKKKKEDDKKKKKEEBAERMLQDDDDTVHLPHEGGSSLLQIPVKALKYSPDKPVSVKISFEDEPRKKYVDAETSL 1214

```

Abb. 5.2: Na⁺/HCO₃⁻ [Si(OH)₄] Cotransporter (NBCSA)-verwandte Sequenz aus *Suberites domuncula*. Alignment der Aminosäuresequenz aus der Sequenz von NBCSA_SUBDO und der Sequenz mit den höchsten Homologien, dem humanen NBC-Cotransporter NBC4-2_HOMO, (Accession Number NP_003606). Die gleichen oder ähnlichen Sequenzbereiche sind schwarz unterlegt. Die transmembranen Bereiche (TM), die Anionen Exchanger Consensusbereiche (cons) und die putativen DIDS Bindestellen sind innerhalb der Sequenz markiert.

5.4. Phylogenetische Analyse der Proteinsequenz von *NBCSA_SUBDO*

Mittels der phylogenetischen Analyse ist es möglich, eine Einordnung der Sequenz in die evolutionäre, phylogenetische Stellung innerhalb des Tierreichs zu finden. Es können auf übersichtliche Weise Verwandtschaftsbeziehungen erstellt und quantifiziert bzw. bewertet werden (siehe 4.24.4). Die Analyse beruht auf BLAST Analysen der Sequenzen, die dann mittels PAM-Substitutionsmatrices (Dayhoff *et al.*, 1978) und der Bootstrapping-Methode (Felsenstein, 1993) ausgewertet wurden. Für die Erstellung der Graphen der Stammbäume wurde das Programm Treeview 1.6.6. verwendet.

Die bisher bekannten und klonierten NBC-Transporter stammten ausnahmslos von Metazoen. In der vorliegenden phylogenetischen Analyse wurden das putative N-terminale zytoplasmatische Ende der Sequenz und die Transmembranregionen getrennt behandelt.

Die N-terminale zytoplasmatische Domäne von *NBCSA_SUBDO* zeigte die höchsten Sequenzhomologie zum humanen NBC-Cotransporter member 7 (NBC4-2_HOMO, Accession Number NP_003606, (Abb. 5.3). Zwischen diesen beiden Sequenzen bestand eine Gesamthomologie von 46% ähnlichen und 28% identischen Aminosäuren. Die Sequenzen zweier Anionentransporter aus Invertebraten waren phylogenetisch weniger verwandt. Es handelte sich um einen Na⁺-getriebenen Anionentransporter (NAE_DROME) aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und einen NBC Transporter aus dem Nematodenwurm *Caenorhabditis elegans* (NBCI_CAEEL). Eine weitere deutliche Abnahme der Sequenzhomologien war in Bezug auf Proteine zu sehen, die eine entferntere phylogenetische Verwandtschaft besaßen. Darunter fielen das Bre5p Protein (BRE5p_YEAST) aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und das pflanzliche Pentatricopeptid (PRP) aus der Kresse *Arabidopsis thaliana* (Abb. 5.3).

Die Untersuchung der Transmembrandomänen der Schwammsequenz *NBCSA_SUBDO* kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Auch hier lag die höchste Homologie bei Aminosäuresequenzen von Metazoen, also Vielzellern und zwar speziell der Sequenz des humanen NBC-Transporters NBC4-2_HOMO (Accession number NP_003606) und des Anionentransporters SLC4A3 (AESLC4A3_HOMO, Accession number AAN34393.1) sowie des Na⁺ abhängigen Anionentransporters aus *Drosophila melanogaster* (NAEr_DROME) und des Bikarbonat-Cotransporters aus *Caenorhabditis elegans* (NBCr_CAEEL). Dabei wurden eine Ähnlichkeit von ca. 45% und eine totale Sequenzhomologie von ca. 28% beobachtet. Die Homologie mit Sequenzen aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und mit pflanzlichen Sequenzen war jedoch gering. Abbildung 5.3 zeigt eine detaillierte Verwandtschaftsanalyse der Sequenzen von Vielzellern und Einzellern an.

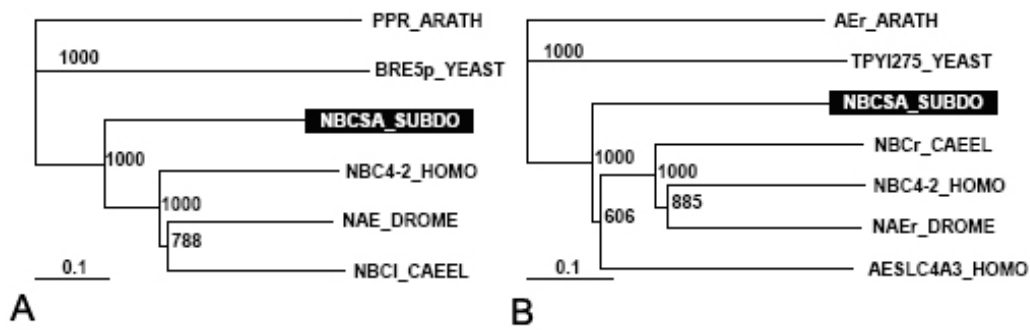


Abb. 5.3: (A) Phylogenetische Analyse des N-terminalen Endes von NBCSA_SUBDO und NBC-Cotransporter. (B) Phylogenetische Analyse der Transmembranregionen der beiden Sequenzen. Die phylogenetischen Diagramme wurden mit den pflanzlichen Sequenzen von *Arabidopsis Thaliana* als Outgroup erstellt. Die Längenskala indiziert eine evolutionäre Distanz von 0,1 Aminosäuren pro Position innerhalb der Sequenz.

5.5. Analyse der SDNBCSA-Transporter RNA Transkripte

5.5.1. Analyse mittels Northern Blotting

Die Analyse mittels Northern Blot wurde aus zwei verschiedenen Gründen durchgeführt. Zunächst sollte analysiert werden, ob der aus der cDNA-Bank stammende Klon des Bikarbonattransporters in seiner gesamten Länge isoliert worden ist.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Genexpression des NBCSA_SUBDO induzierbar ist und auf die Zugabe von Silikat von Silikat reagiert.

Die aus dissoziierten Schwammzellen hergestellte Primmorphe eines Schwammes wurden in Sigma-Seawater® 5 Tage lang mit verschiedenen Silikatkonzentrationen inkubiert. Eine Vergleichskultur enthielt konstant 2µM Silikat, was in etwa der in der natürlichen Umgebung des Schwammes vorkommenden Silikatkonzentration entspricht, wogegen die zweite Kultur mit 60µM Silikat gehalten wurde. Diese Konzentration entsprach der experimentell bestimmten optimalen Konzentration für die Nadelbildung in *Suberites domuncula* (Krasko et al., 2000). Nach der Isolation der RNA und Größenseparation der erhaltenen RNA-Moleküle wurde ein Northern Blot durchgeführt. Als Sonden dienten dabei markierte Nukleinsäuren, die mittels genspezifischen Primern aus der cDNA von SDNBCSA hergestellt wurden (Forwardprimer: AE_prob_frw AAA CGC ACA CAC TCT TCA AG, Reverseprimer: AE_prob_rv AGA CCT CTC CTA AGT TCC AC) und eine Sonde aus schwammeigenen β-Tubulin (SDTUB) als Negativkontrolle (Forwardprimer: Tubulin-SD44-Fwd: GGA AGT CAT CTC AGA CGA A, Tubulin-SD44-Rev: GGA TAT TCT TCA CGG ATC T).

Zunächst wurde nach einer teilweisen Dissoziation von Schwammgewebe mittels 2,5mM EDTA-Lösung eine Präparation von Silikatnadeln des Schwammes hergestellt, an welcher die unmittelbar an den Nadeln anliegenden Zellen noch vorhanden waren. Mit diesem Material wurde eine *In situ* Hybridisierung durchgeführt. Nach Behandlung der Präparation mit der Antisense-Sonde der *SDNBCSA*-DNA zeigte eine große Anzahl der betroffenen Zellen ein positives Signal. Eine Kontrolle, in welcher die markierte Sense-Sonde der *SDNBCSA*-DNA zur Inkubation verwendet wurde, zeigte keine Färbung der Probe (Abb. 5.6 A, B).

Eine weitere *In situ* Analyse (Abb. 5.6 C, D) wurde mit einer anderen Probenvorbereitung durchgeführt, um die Lokalisation der positiven Signale innerhalb des Gewebes zu analysieren. Hierzu wurden Primmorphen-Kulturen von *Suberites domuncula* aus dissoziierten Zellen des Schwammes hergestellt. Gewebeschnitte dieser Primmorphe wurden mit der Antisense-Sonde der *SDNBCSA*-DNA hybridisiert, die Sense-Sonde wurde als Negativkontrolle verwendet. Primmorphe die nach 5 Tagen ohne zusätzliche Silikatzugabe untersucht wurden, zeigten nur bei einer kleinen Anzahl von Zellen eine deutlich positive Reaktion. Bei Primmorphen die während der 5 Tage mit einem Zusatz von 60µM Silikat gehalten wurden, konnte eine stäbchenförmige bzw. nadelförmige Anordnung von Zellklustern beobachtet werden, die durch die Färbung der entsprechenden Bereiche sichtbar wurde.

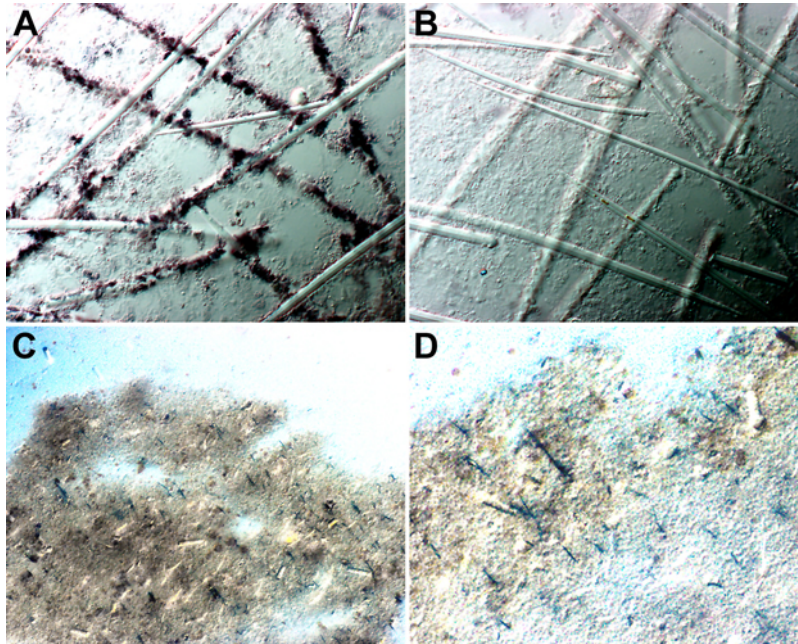


Abb. 5.6: In Situ Hybridisierung zur Lokalisierung von Zellen, die das SDNBCSA-Transportergen exprimierten. (A). Silikatnadeln von *Suberites domuncula* isoliert durch EDTA-Behandlung der Zellen. Durch In situ Hybridisierung mit einer markierten SDNBCSA Antisense-Sonde zeigen die Zellen, welche eng an den Nadeln liegen eine positive Reaktion in Form einer dunklen Färbung (Vergrößerung 160x). (B). Gegenkontrolle durch Hybridisierung mit dem Sense Strang von SDNBCSA (Vergrößerung 160x). (C) Schnittpräparat durch einen Primmorphen, kultiviert ohne Zugabe von Silikat. (D). Schnittpräparat eines Primmorphen kultiviert mit einem Silikatzusatz von 60 μ M. Die Kultivierung dauerte 5 Tage (Vergrößerung 40x). In D sind stäbchenförmige Zellkluster zusehen, welche mit der Antisense SDNBCSA eine dunkle Färbung ergeben (Vergrößerung 160x).

5.6. Western Blotting

Um das innerhalb dieser Arbeit für elektronenmikroskopische Studien und zur Antikörperherstellung isolierte Axialfilament des Schwammes *Suberites domuncula* zuvor auf Identität und Verunreinigung zu prüfen, wurde mit dem isolierten Material (siehe 4.5) eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot angefertigt. Verwendet wurde dabei der Antikörper gegen das isolierte Axialfilament des Schwammes (siehe 4.24).

Für die SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel wie beschrieben hergestellt (siehe 4.22.1). Nach dem Auftragen von 10 μ g Protein pro Geltasche wurde die Elektrophorese mit 90V bis zum Erreichen der Trenngelfront und danach mit einer Spannung von 120V bis zum Ende durchgeführt. Die Färbung erfolgte mittels *Coomassie Blue* Färbung (siehe 4.22.2) (Abb.: 5.7).

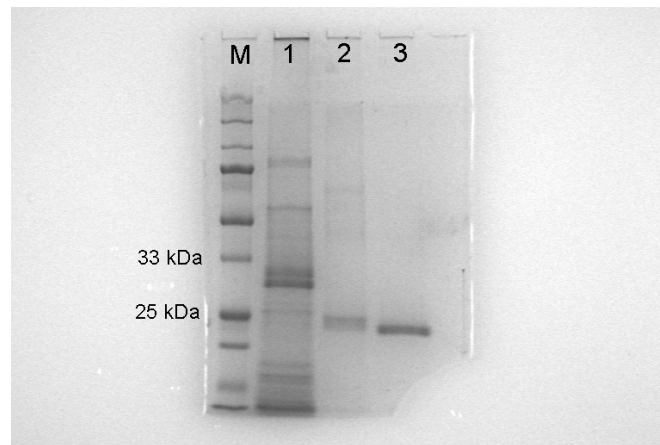


Abb. 5.7: SDS-Gelelektrophorese von isolierten Axialfilamenten. Verschiedene Proben wurden zum Vergleich nebeneinander aufgetragen. M: Proteinmarker, 1: Schwammextrakt aus *Suberites domuncula*, 2: rekombinant hergestelltes Silicatein α , 3: gereinigtes, isoliertes Axialfilament aus *Suberites domuncula*.

Auf das Gel wurde zusätzlich zu der Probe neben einem Proteinmarker auch ein Schwammextrakt aus *Suberites domuncula* und rekombinant hergestelltes Silicatein α aufgetragen. Die Banden der drei Proben zeigten eine unterschiedliche Laufhöhe. Die Signale aus dem Schwammextrakt lagen am höchsten, da das Silicatein dort in nativer Form vorlag und die Signale somit teilweise unprozessierte Formen des Proteins darstellten. Als zweithöchstes Signal wurde das rekombinante Silicatein α detektiert. Der Grund für den Größenunterschied gegenüber dem isolierten Proteinfilament war die Herstellung des Antikörpers, da das Protein noch zusätzliche Sequenzen besaß, wie ein zur Aufreinigung verwendeter Oligohistidin-Rest.

Um die Proteinbanden auf ihre Antikörperspezifität, auf ihr Molekulargewicht und damit indirekt auf ihre Identität zu prüfen, wurde erneut ein Gel wie oben beschrieben hergestellt und für einen Western-Blot im *Semi dry* Verfahren verwendet (siehe 4.23). Nach dem Transfer wurde die Markerbande abgeschnitten und separat mittels Amidoschwarz-Färbung visualisiert. Als Primärantikörper gegen das native Silicatein wurde der Antikörper gegen das isolierte Axialfilament von *Suberites domuncula* verwendet. Die Entwicklung erfolgte wie beschrieben mittels NBT/X-Phosphat (siehe 4.23.1) (Abb. 5.8).

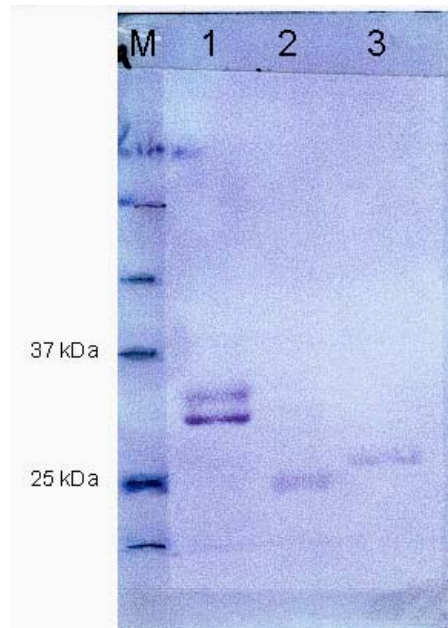


Abb. 5.8: Western-Blot zur Identifizierung von aus *Suberites domuncula* isoliertem Axialfilament. M: Proteinmarker, 1: Schwammextrakt aus *Suberites domuncula*, 2: gereinigtes, isoliertes Axialfilament aus *Suberites domuncula*, 3: rekombinant hergestelltes Silicatein α .

5.7. Untersuchung des Effekts von Silikat-Zugabe auf die spektralen Eigenschaften von Schwammzellen in Gegenwart des Fluoreszenzfarbstoffes PDMPO (LysoSensor[®] yellow-blue)

Mittels eines Fluoreszenzassays sollte der Einfluss einer Silikatzugabe auf kinetische Vorgänge in isolierten Zellen von *Suberites domuncula* dargestellt werden. Durch die Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes LysoSensor[®] yellow/blue (PDMPO) war es möglich, eine Aussage über eine eventuelle Aufnahme von Silikat in die Schwammzelle zu treffen, oder zumindest eine Reaktion der Zellen auf Silikatanreicherung auch kinetisch zu verfolgen. In dem Versuchsaufbau wurden dissoziierte Schwammzellen einer Dichte von $6 \times 10^6 \text{ xml}^{-1}$ bei 17°C mit und ohne 2 minütige Vorinkubation mit $60 \mu\text{M}$ Na-Metasilikat unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 445 nm im Pseudocolor-Modus betrachtet. Dabei wurde eine geringe Fluoreszenzintensität durch eine blaue Färbung angezeigt, ansteigend über grün und gelb bis zu einer hohen Intensität, die mit roter Färbung dargestellt wurde. Als Fluoreszenzindikator wurde nach 2 Minuten der pH-sensitive Farbstoff PDMPO (LysoSensor[®] yellow-blue) in einer Konzentration von $3 \mu\text{M}$ dazugegeben.

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde der Einfluss der Temperatur auf den gleichen Prozess untersucht. Dabei wurden die Zellen 12 Stunden lang auf 4°C gehalten, um den Zellstoffwechsel an diese niedrige Temperatur anzupassen. Dann wurde analog verfahren.

Um eine mögliche Hemmbarkeit des Aufnahmeprozesses zu prüfen und eine weitere Charakterisierung der Vorgänge und des möglichen Transporters zu unternehmen, wurden die Versuche mit der Zugabe des Stilbensulfonsäurederivates *DIDS* in einer Konzentration von 20µM wiederholt. Die Ergebnisse des Fluoreszenzessays sind in Abbildung 5.9 gezeigt und in Abbildung 5.10 quantifiziert.

Ein nur geringfügiger Anstieg der Fluoreszenzintensität von blau nach rot war in Zellen ohne zusätzlichen Silikatzusatz bei einer Temperatur von 17°C zu beobachten (Abb. 5.9 A). Wurden die Zellen jedoch mit 60µM Silikat vorinkubiert, konnte man einen starken Anstieg der Fluoreszenzintensität von blau nach rot bereits nach 6 Minuten Inkubation mit 3µM LysoSensor® beobachten (Abb. 5.9. B). Daraus konnte geschlossen werden, dass die isolierten Schwammzellen von *Suberites domuncula* auf die Zugabe von Silikat mit einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes LysoSensor® intrazellulär reagieren können.

Die aufgrund dessen durchgeführte quantitative Analysen sollten die Auswirkung der Temperatur und der Zugabe eines spezifischen Hemmstoffes (*DIDS*) auf diesen Effekt untersuchen. Hier ergab der Essay bei 4°C ein niedriges Level an Fluoreszenzintensität, der etwa bei 0,02 arbitrary units lag. Dieses Ergebnis war weitgehend unabhängig von einer Vorinkubation mit Metasilikat oder der Zugabe des Inhibitors *DIDS*.

Wurde hingegen die Farbstoffreaktion bei einer Temperatur von 17°C durchgeführt, zeigte sich eine deutliche Reaktion, welche durch Co-Inkubation mit *DIDS* inhibierbar war. Die Farbreaktion ohne Zugabe von zusätzlichem Silikat bei 17°C fiel deutlich schwächer aus und bewegte sich im Rahmen von 0,020 bis 0,025 arbitrary units nach 16 Minuten. Der Anstieg der mit Silikat vorbehandelten Proben bei 17°C bewegte sich dagegen im Bereich von 0.10 arbitrary units.

Um quantifizierbare Aussagen über die Hemmbarkeit des Transportvorgangs treffen zu können, wurden sämtliche Versuche parallel mit einer Zugabe von 20µM *DIDS* durchgeführt. Das Ergebnis war eine jeweils nur sehr schwache Fluoreszenzreaktion nach 16 Minuten und darüber hinaus. Keine Unterschiede in den Ergebnissen wurden bei den Versuchen mit *DIDS* und unterschiedlichen Temperaturen (4°C und 17°C) gemessen. Diese Ergebnisse legten eine Hemmbarkeit der Transportvorgänge durch einen spezifischen Inhibitor nahe.

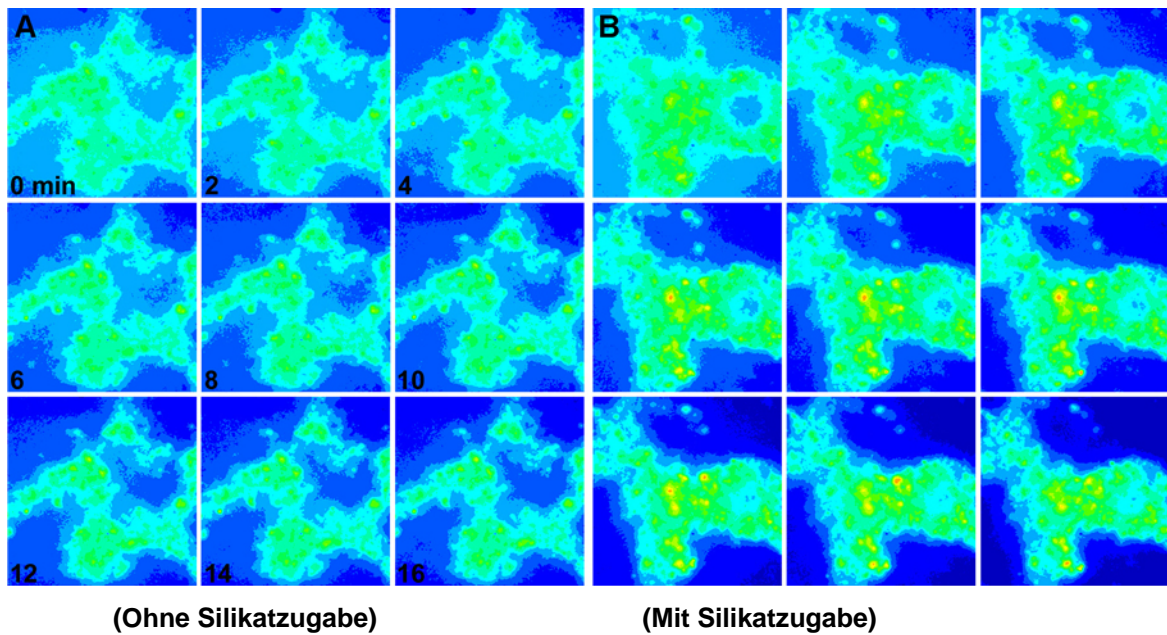


Abb. 5.9: A: Isolierte Schwammzellen von *Suberites domuncula* ohne zusätzliche Zugabe von Silikat, gemessen bei 17° und nach 2 minütiger Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff LysoSensor®. B. Isolierte Schwammzellen von *Suberites domuncula* mit zusätzlichen 60µM Silikat (als Na-Metasilikat) aufgenommen unter gleichen Bedingungen. Die Fluoreszenzwellenlänge beträgt 445nm. Die Intervalle der Aufnahmen betragen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 16 Minuten. Die Vergrößerung ist x 30.

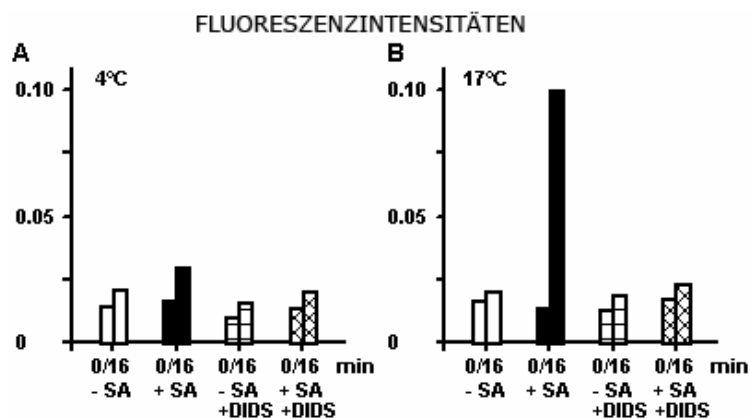


Abb. 5.10: Effekt einer Silikatzugabe auf die Fluoreszenzemission von LysoSensor® in Schwammzellen von *Suberites domuncula*. Die Zellen werden in Abwesenheit (-SA, weiße Balken) oder mit zusätzlichem Silikat (+SA, schwarze Balken) inkubiert. In einem weiteren Versuchsaufbau wird der Transportinhibitor DIDS (20µM) zum Zeitpunkt t= 0 Minuten zu Zellen ohne (-SA+ DIDS, gestreifte Balken) und mit zusätzlichem Silikat (+SA+DIDS, rautig gemusterte Balken) gegeben. Nach 2 Minuten wurde der Fluoreszenzfarbstoff LysoSensor® zugegeben und die Messung 16 Minuten bei 445nm durchgeführt. Die Versuche wurden sowohl bei 4° (A) oder bei 17° (B) durchgeführt.

5.8. Untersuchungen mittels elektronenmikroskopischen Methoden

5.8.1. Transmissionselektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Studien wurden aufgenommen, um ein besseres Verständnis der Bildung von Silikatnadeln des Schwammes zu gewinnen. Da dieser Vorgang, von seiner Initiation bis zur fertigen Nadel ein sehr hohes Maß an Kontrolle voraussetzt, steht er in direktem Zusammenhang mit dem Vorhandensein eines Silikattransportsystems, dessen Expression und Lokalisation.

5.8.2. Entwicklung des Axialfilamentes in *Suberites domuncula*

Die bisherigen Theorien der Axialfilamententwicklung gingen davon aus, dass der axiale Kanal der Schwammnadeln völlig von einem Filament, bestehend aus dem Protein Silikatein ausgefüllt wird (Uriz *et al.*, 2000). Die vorliegenden Studien wurden am Modellsystem der Primmorphe von *Suberites domuncula* angefertigt, um gerade die Phase die Entstehung und Reifung des axialen Filaments beobachten zu können.

Aus den Primmorphen wurden 60nm dicke Schnitte angefertigt und im TEM untersucht. Die beobachtete Nadelbildung begann um eine nach außen homogene Röhre aus Protein, dem Axialfilament. Um diese Röhre waren mehrere elektronendichte Strukturen sichtbar, resultierend aus der beginnenden Nadelbildung (Abb.5.8 A und B). Mit fortschreitender Nadelbildung reduzierte sich der Durchmesser des axialen Filaments von 2,5µm (Abb.5.8 A und B) zu etwa 0,8µm (Abb.5.8 E und F). Gleichzeitig vergrößerte sich der Durchmesser der wachsenden Nadel auf ~5µm (Abb.5.8 C und D). In diesem Stadium der Entwicklung waren die Nadeln bereits extrazellulär anzutreffen (Abb.5.8 E und F). Im darauf folgenden Stadium der Nadelentwicklung konnten zwei verschiedene Strukturen innerhalb des Axialkanals unterschieden werden. In der ersten Struktur wurde der Axialkanal von Membranstrukturen dominiert und es war nur ein verhältnismäßig kleines Axialfilament zu sehen. Dabei hatte das 0,2-0,8µm große Filament die gleiche Elektronendichte wie das während der initialen Phase der Nadelentwicklung (Abb.5.8 A und B). Unter den zellulären Strukturen waren viele 10-15nm lange runde Fibrillen zu erkennen (Abb.5.8 D), wobei diese Strukturen direkt mit den Silikatstrukturen verbunden waren (Abb.5.8 E und F). Im zweiten davon unterscheidbaren Strukturmuster besaß der ca. 0,8µm messende Axialkanal ein im Durchmesser 0,4µm betragendes elektronendichtes Filament mit zusätzlichen zellulären Strukturen zwischen Filament und Silikatnadel (Abb.5.8 G und H).

In diesem Stadium betrug der Durchmesser der Nadel 3-5 μ m. Im verwendeten Primmorphen Untersuchungssystem blieb der Durchmesser der Nadeln unverändert und unter dem in nativen Schwämmen gemessenen Wert von 7 μ m. Im darauf folgenden Entwicklungsschritt wurde der Axialkanal fast vollständig durch das homogene Filament ausgefüllt (Abb. I und J). Die Nadel befand sich zu diesem Zeitpunkt extrazellulär im Mesohyl und war mit Kollagenfasern assoziiert.

5.8.3. Nadelbildung in Sklerozyten

Eine ebenfalls häufig diskutierte Frage bezüglich der Nadelbildung ist, ob sich diese ganzheitlich oder auch nur zum Teil intra- oder extrazellulär vollzieht. Um diese Frage einer eventuellen Kompartimentierung analysieren zu können, wurden weitere TEM-Analysen angefertigt und ausgewertet.

Als Untersuchungsobjekt wurden erneut Primmorphe des Schwamms *Suberites domuncula* gewählt. Die 60nm dünnen Schnitte wurden unter dem TEM auf Hinweise untersucht, welche auf eine Kompartimentierung in Verbindung mit der Synthese der Nadeln hindeuteten. In der Initialphase der Silikatnadelbildung bildeten die Sklerozyten längliche Strukturen aus (Abb. 5.9 A). Die Sklerozyten waren dabei in das Mesohyl eingebettet und haben keinen Kontakt zu den benachbarten Zellen (Abb. 5.9 A und B). Bei einer höheren Vergrößerung war zu erkennen, dass die betreffenden Zellen jeweils in der Lage waren, mehrere Nadeln zur gleichen Zeit zu synthetisieren, wobei die beobachtete Länge der Nadeln bei etwa 0,7-8 μ m und der Durchmesser bei bis zu 0,9 μ m lag (Abb. 5.9 C). Anhand der Aufnahmen wurde deutlich, dass sich die Nadelbildung gerade am Anfang in Vesikeln vollzieht (Abb. 5.9 C). Nach Erreichen einer Größe von etwa 5 μ m begann sich der Zellkörper der Sklerozyten zu kontrahieren, bis er die Nadel fast vollständig eng umschloss (Abb. 5.9 D).

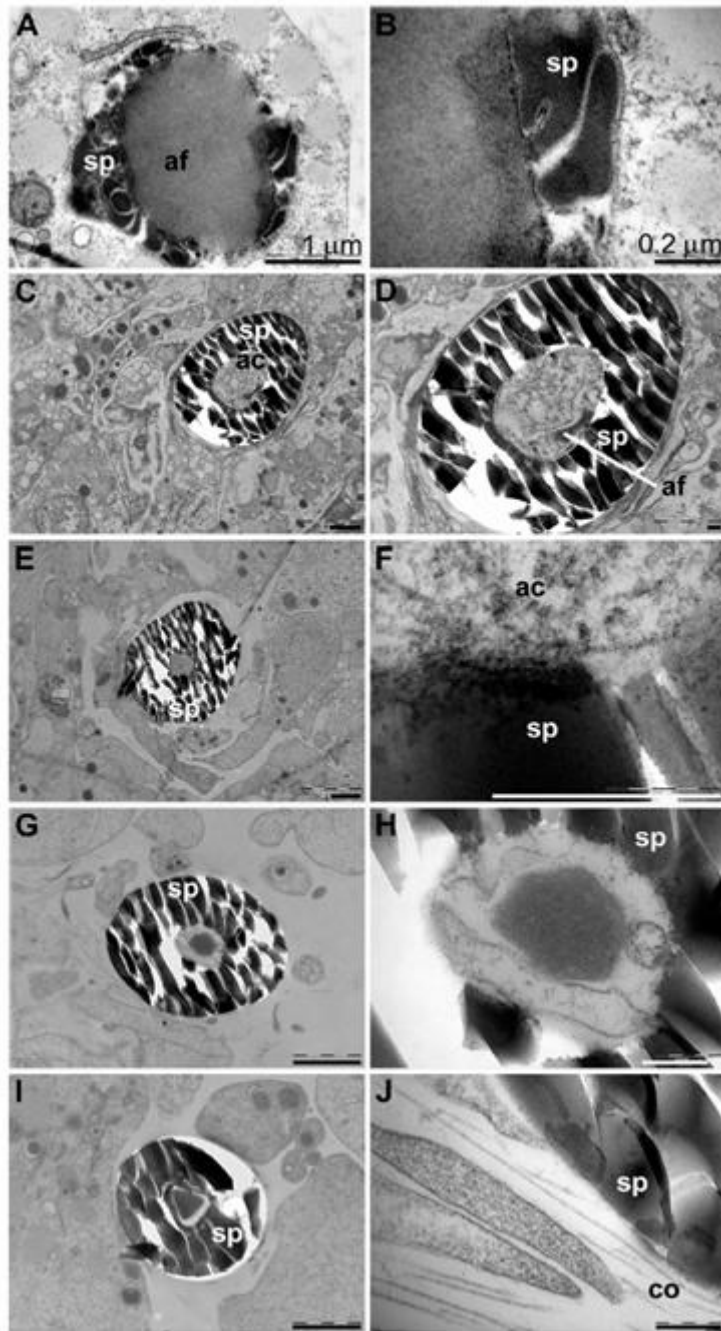


Abb. 5.8: TEM-Analyse der Entwicklung des Axialfilamentes in Nadeln von Primmorphen aus *Suberites domuncula*. Initiale Phase des Wachstums der Nadel (sp) mit homogenem elektronendichten Filament (af) (A und B). Im weiteren Verlauf der Entwicklung sind im Axialkanal (ac) der Nadel Membranstrukturen zu sehen (C-D) und (E-F) (Axialfilament markiert in D). Höhere Vergrößerungen zeigen eine enge Assoziierung der Membranstrukturen des Axialkanals mit der inneren Oberfläche der Nadel (F). Das eigentliche Axialfilament ist im Axialkanal von Membranstrukturen umgeben (G und H). Im letzten Stadium der Entwicklung besteht das Filament aus einem homogenen Kern, welcher den zentralen Kanal nicht völlig ausfüllt. Im Extrazellularraum besteht eine Assoziation zu Kollagenfaser (co) (I und J). Vergrößerung: linke Bildspalte 1µm Skalierung, rechte Bildspalte 2µm Skalierung.

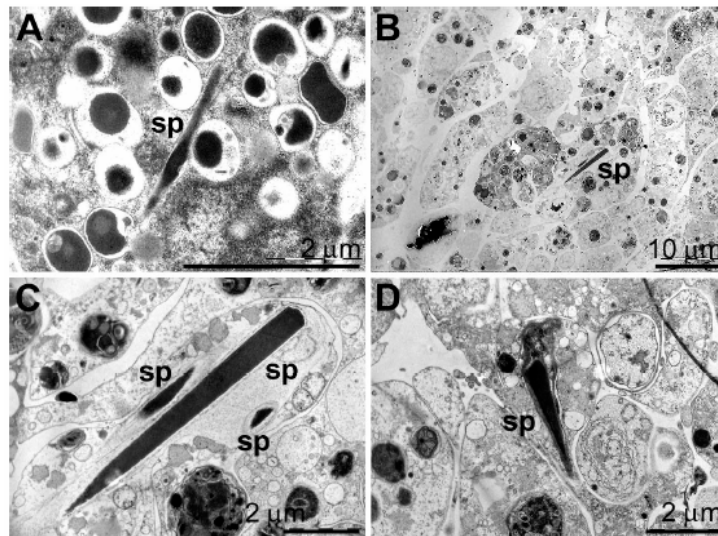


Abb. 5.9: TEM-Analyse der Nadelbildung in Primmorphen von *Suberites domuncula*. Ein lang gezogener Sklerozyt steht am Beginn der Bildung der Nadel (sp) in der Initialphase, eingebettet in das Mesohyl (A). Die Nadel wächst und reift innerhalb des Sklerozyten. Es kann die Bildung mehrerer Nadeln innerhalb einer Zelle beobachtet werden (B und C). In einer späteren Phase der Nadelbildung kann die Kontraktion des Sklerozytenzellkörpers beobachtet werden (D).

5.8.4. Morphologie der Silikatanreicherung

Da die Bildung von komplexen Silikatstrukturen in Organismen einen hohen Grad an Regulierung auf verschiedenen Ebenen voraussetzt, war es von großem Interesse zu visualisieren, an welchen Stellen innerhalb des Schwamms einzelne oder mehrere dieser Kontrollmechanismen angreifen oder bereits angegriffen haben. Eine sehr geeignete Technik dafür ist die Immunogold-gekoppelte Transmissions-Elektronenmikroskopie. Sie kann alleine oder in Ergänzung anderer immunologischer Methoden angewendet werden. In dieser Arbeit wurde die Technik auf Gewebeschnitte eines adulten Schwammes der Spezies *Suberites domuncula* angewendet. Die Proben wurden wie in 4.13 beschrieben aufbereitet und mit polyklonalen Antikörpern gegen natives, mittels Flusssäurepuffer isoliertes Silikatein der gleichen Spezies markiert. Bei Betrachtung der Bilder im Transmissionsmikroskop erscheinen gebundene Antikörper als schwarze Punkte in dem abgebildeten Gewebe.

Wie in der Abbildung 5.10 zu sehen ist, erhielt man bei der mit Präimmunserum als Negativkontrolle behandelten Probe (Abb. 5.10 A) fast keine Signale an extra- und intrazellulären Strukturen. Bei den mit Anti-Silikatein Antikörpern PoAb-Silic behandelten Proben, wurden hingegen deutliche Signale in Form von schwarzen Pünktchen sichtbar. Sie konzentrierten sich vor allem auf die Bereiche der Oberfläche der Silikatnadel. Die innere Oberfläche des Axialkanals und dessen äußere Oberfläche wurden ebenfalls von der Färbung erfasst (Abb. 5.10 B und C). Bei einer höheren Vergrößerung wird die Färbung der inneren und äußeren Oberfläche noch deutlicher abgebildet (Abb. 5.10 C).

Eine zusätzliche intensive Färbung durch die Anti-Silicatein Antikörper war im Axialfilament der Nadel zu sehen, welches sich im Zentralkanal der Nadel befand (Abb. 5.10 B und D).

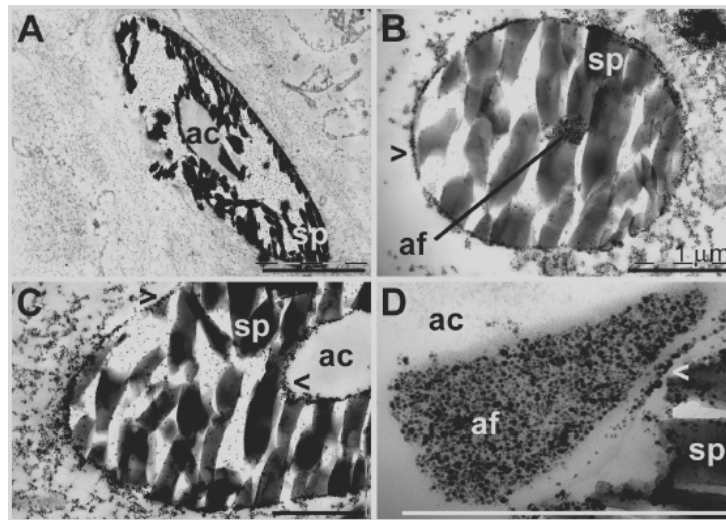


Abb. 5.10: Immunogold gekoppelte TEM-Aufnahmen von Querschnittpräparaten der Silikatnadeln von *Suberites domuncula*. Als Kontrolle wurde das Präimmunserum der PoAb-Silic Antikörper Herstellung verwendet. Die Signalverteilung wurde anhand eines nanogoldmarkierten sekundären Antikörpers visualisiert. Zu sehen ist die Negativkontrollen mittels Präimmunserum (A). Inkubation mit PoAb-Silic Antikörper und sekundärem Nanogoldantikörper (B,C,D). Sehr intensive Färbung ist zu sehen auf der Oberfläche der Nadel (sp) und des Axialfilamentes (af) (B). Bei höherer Vergrößerung ist die Färbung der inneren und äußeren Oberfläche der Nadel (>, <) zu erkennen (C und D). Ebenfalls wird die starke Reaktion des Axialfilaments in der Immunogoldfärbung deutlich (D). Die Skalierung der Längenmaßstäbe beträgt auf allen Bildern 1 μ m.

6. Diskussion

Der Begriff der Biomineralisation beschreibt eine Form der Chemie, die in einzigartiger Weise die Synthese von Stoffen verschiedenster Zusammensetzung mit dem Ziel kombiniert, funktionalisierte anorganische Materialien in organischen Systemen herzustellen.

Eine große Bandbreite von Organismen bedient sich dieser Mechanismen zur Synthese von Strukturen mit verschiedensten Funktionen, die vielfältiger sind als nur die reine Strukturgebung. Beginnend mit Bakterien und einfachen Einzellern, über die ersten Metazoen (*Porifera*), bis hin zu den Säugetieren werden Biomineralien für die verschiedensten Zwecke synthetisiert. Dazu gehört neben dem Schutz gegen Fraßfeinde auch die Fortbewegung, das Schneiden und Mahlen von Nahrung, die Regulation des Auftriebs bei aquatischen Organismen, die optische und magnetische Orientierung sowie Schwerkraftorientierung und die Speicherung (Mann, 2001).

Unabhängig der bestehenden großen Unterschiede der Biomineralisation bezogen auf die verwendeten Elemente und Mechanismen gibt es gemeinsame Prinzipien, denen die Biomineralisation unterliegt. Die Biomineralisation beinhaltet eine selektive Extraktion und Aufnahme von bestimmten Elementen aus der Umgebung, und deren Inkorporation in funktionelle Strukturen unter strikter biologischer Kontrolle (Mann, 2001). Nur mit einem hohen Maß an Regulierung an den verschiedensten Stellen der meist stufenweisen Biosynthesewege ist es dem jeweiligen Organismus möglich, die Bildung der hochkomplexen Kompositstrukturen zu erreichen, wie dies vor allem bei Schwämmen oder Diatomeen der Fall ist. Auch muss eine pathogene bzw. unkontrollierte Kristallbildung oder Polykondensation unterbunden werden, wie beispielsweise bei der Bildung von Nierensteinen in Säugern.

Die Erforschung der Biomineralisation beinhaltet das Studium der Bildung, Eigenschaften und Struktur von anorganischen Feststoffen, welche in biologischen Systemen abgelagert werden. Gleichzeitig können Erkenntnisse der Biomineralisation für Gebiete wie Paläontologie oder Taxonomie von großem Wert sein. So dient die Morphologie von Nadeln von Schwämmen der Charakterisierung der jeweiligen Spezies.

In der vorliegenden Arbeit sollten Teile der Mechanismen der Biomineralisation des marinen Schwammes *Suberites domuncula* genauer untersucht werden. Zentrale Aspekte der Silikatpolymerisation des Schwammes konnten in der Vergangenheit bereits aufgeklärt werden (Krasko *et al.*, 2000, Müller *et al.*, 1999). Als offene Frage blieb jedoch die Aufnahme von Silikat in die Schwammzelle und die damit verbundene Anreicherung des zentralen Baustoffes der Nadeln.

In direkten Zusammenhang stand auch die häufig diskutierte Frage, ob die Nadelsynthese intra- oder extrazellulär verläuft. Durch die Identifizierung eines möglichen Kandidaten für den Silikattransport und die Erweiterung morphologischer Studien an Schwammgewebe von *Suberites domuncula* sollte auf diese Fragen näher eingegangen werden.

6.1. Silikatpolymerisation in *Suberites domuncula*

Schwämme (*Porifera*) sind sessile, ausschließlich im Wasser lebende Metazoa, die durch ein System zahlreicher mikroskopisch kleiner Öffnungen, den *Ostien*, Wasser aufnehmen und über Kanäle und Geißelkammern filtrieren. Diese Ernährung durch passive Filtration liefert den Schwämmen Sauerstoff und Nahrung, aber auch die Bausubstanz für den Aufbau ihrer Skelettstrukturen. Diesbezüglich teilen sich die Schwämme in zwei Gruppen. Die erste, phylogenetisch jüngere Gruppe der Kalkschwämme (*Calcarea*) ist näher mit den Nesseltieren (*Cnidaria*) verwandt (Müller *et al.*, 1998) und besitzt Nadeln, die hauptsächlich aus Magnesium-Kalzit bestehen. Davon unterscheiden sich die Gruppen der *Hexactinelliden* und *Demospongien*, welche phylogenetisch älter sind und Silikat für ihre Skelettstrukturen verwenden (Abb. 6.1).

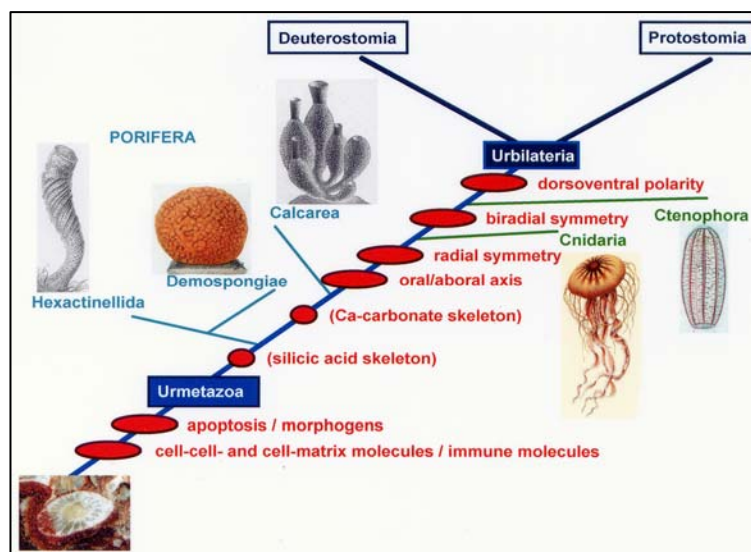


Abb. 6.1: Evolutionsdiagramm mit Einordnung der Schwämme (*Porifera*) zwischen dem putativen Urmetazoen und dem Urbilaterien (nach W.E.G. Müller).

Die Verwendung von amorphem Silikat anstatt kristalliner Strukturen kann verschiedene Gründe haben. Zum einen wird angenommen, dass zur Zeit des ersten Auftretens der Schwämme, vor ca. 500 Mio. Jahren, die Ozeane reicher an CaCO_3 waren als an NaCl (Holland, 1992). Diese „Soda-Ozeane“ hatten wahrscheinlich einen pH-Wert >9 .

Unter diesen Bedingungen konnte die Konzentration von gelöstem SiO₂ höhere Werte annehmen, als dies heute der Fall ist. Des Weiteren unterscheiden sich die Materialeigenschaften von amorphem Silikat und Kristallen. Durch das Fehlen von Bruchflächen und Ebenen wie in Kristallen, ist amorphes Silikat komplex modellierbar, ohne dabei Materialspannungen zu erzeugen. Das durch eine Polykondensation entstandene amorphe Silikatmaterial ist im Gegensatz zu amorphen Fällungen von CaCO₃ aufgrund der extrem hohen Aktivierungsenergie von ca. 800 kJmol⁻¹ für die Umwandlung zu Quarz stabil (Ostwaldsche Stufenregelung).

Der Mechanismus, mit welchem der Schwamm *Suberites domuncula* seine Silikatspicula herstellt, ist in den letzten Jahren intensiv beforscht und untersucht worden. Dabei gilt als gesichert, dass die Nadelbildung genetisch kontrolliert ist (Simpson, 1984). Durch Silikat werden bestimmte Gene im Schwamm, so genannte „Silica responsive genes“ (siehe Seite 132) in ihrer Transkriptionsrate erhöht. Dazu gehören Kollagen, Silikatein und Myotrophin (Krasko *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu Kollagen bzw. Spongin, welches auch unabhängig von der Nadelsynthese bevorzugt in so genannten Lophozyten hergestellt werden kann, findet die Synthese der Kollagenpolypeptide, welche direkt an der Nadelsynthese beteiligt sind, in Sklerozyten und Exopinacozyten statt (Weissenfels und Landschoff, 1977). Die Sklerozyten sezernieren des Weiteren auch das Axialfilament, während die Exopinacozyten das kollagenartige Spongin herstellen, welches dann bei der Nadelherstellung als organisches Rahmenwerk für die Nadeln dient (Hartman, 1969).

Dem Axialfilament kommt bei der Nadelherstellung der *Demospongien* eine entscheidende Bedeutung zu. Die molekulare Struktur und Funktion des Filaments konnte in zahlreichen Versuchen offen gelegt werden (Shimizu *et al.*, 1998, Cha *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass das Axialfilament von *Tethya aurantium* die Silikatpolymerisation auf seiner Oberfläche katalysiert. Das Axialfilament mit seiner Hauptkomponente Silikatein fungiert dabei als ein organisches Templat und unterstützt somit die generelle Beobachtung, dass die strukturelle Kontrolle eines Biomineralisationsvorganges eine bevorzugte Ablagerung durch molekulare Erkennung einer Oberfläche voraussetzt, welche häufig eine organische Matrix ist. Strukturell besteht das Silikatein bei *Suberites domuncula* aus 331 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 36,3 kD (Krasko *et al.*, 2000). Bei einer Analyse der Sequenzdaten fällt auf, dass eine hohe Homologie zu Cathepsin L, einem proteolytischen Enzym vom Typ der Papain-Proteasen besteht, welches im humanen Organismus lysosomal lokalisiert ist (Abb. 6.2).

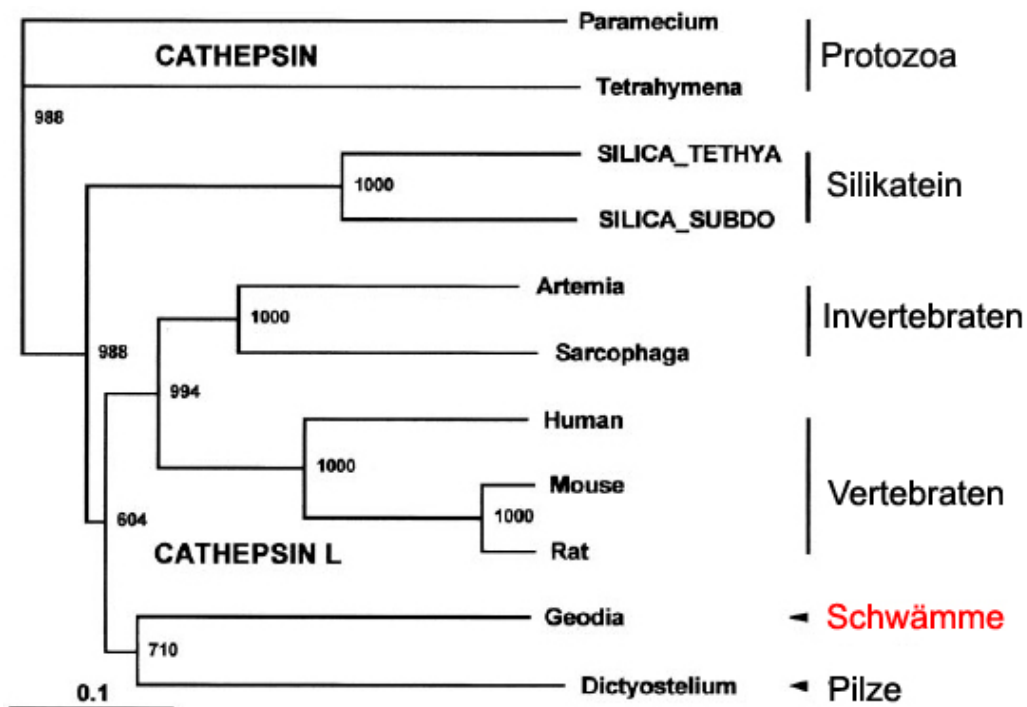


Abb. 6.2: Phylogenetisches Verwandtschaftsdiagramm der Silikateine von *Suberites domuncula* (SILICA_SUBDO) und *Tethya aurantii* (SILICA-TETHYA) mit verschiedenen Cathepsin L Sequenzen. *Dictyostelium discoideum* (*Dictyostelium*; X03344) (Schleimpilz), *Geodia cydonium* (*Geodia*; Y10527) (Schwamm), *Sarcophaga peregrina* (*Sarcophaga*; D 16533) (Fleischfliege), *Artemia franciscana* (*Artemia*) (Salinenkrebs), *Homo sapiens* (*Human*, X12451), *Mus musculus* (*Mouse*, M20495) und *Rattus norvegicus* (*Rat*, Y00697). Die beiden Cathepsine mit Verwandtschaft zum Protozoen *Tetrahymena thermophila* (*Tetrahymena*; L03212) (Ziliat) und *Parametium tetaurelia* (*Parametium*, X91754) wurden hier als Outgroup verwendet. Die Skalierung zeigt eine evolutionäre Verwandtschaft von 0,1 unterschiedlichen Aminosäuren pro Position in der Sequenz.

Durch seine filamentöse Form dient das Axialfilament nicht allein als Templat für die Polykondensation des angereicherten Silikats, sondern es hat auch großen Einfluss auf die übergeordnete Form der späteren Nadel. Vor dem Hintergrund, dass amorphe Mineralien aufgrund ihrer fehlenden molekularen Periodizität ein hohes Maß an Formbarkeit besitzen, stellt sich die Frage, wie letzten Endes die häufig überaus komplexen dreidimensionalen Strukturen zu Stande kommen. Zumindest für eine gewisse Zeit muss ein vektoriell Wachstum gewährleistet sein. Zusätzlich stellt sich die Frage einer Kompartimentierung, die einen Raum für die Erzeugung einer übersättigten Lösung bereitstellt. Gerade bei marinen Silikatbiomineralisierungen ist dies von Bedeutung, da die herrschenden Siliziumkonzentrationen weit unterhalb des Sättigungsbereiches liegen (Kennish, 1994). Bei *Suberites domuncula* wird dieser Raum durch das Silikalemma bereitgestellt, einer Membran, welche die wachsende Nadel mit dem innen liegendem Axialfilament umschließt (Uriz *et al.*, 2000).

Mit der Frage nach der Kompartimentierung ist auch die Frage verbunden, ob die Biomineralisation in Demospongien wie *Suberites domuncula* intra- oder extrazellulär verläuft, oder beides, und wie eine Nadelbildung von Statten geht, nachdem die Polykondensationsreaktion um das Axialfilament herum begonnen hat. Auf diesem Gebiet wurden bereits Untersuchungen angestellt, die jedoch einen intrazellulären Mechanismus mit einem extrazellulären Mechanismus nicht direkt korrelierten. Problematisch dabei war die endgültige Größe der Silikatstruktur, welche das Volumen einer einzigen Zelle deutlich überstieg. Nach der durch elektronenmikroskopische Studien verfestigten Annahme einer Kompartimentierung durch das Silikalemma als Biomembran, welche sowohl mit dem Axialfilament als auch mit der Zellmembran der Sklerozyten in Verbindung steht (Pisera, 2003), blieb die Frage nach dem Transport von Silikat zum Ort der Polymerisation am Filament bestehen. Durch eine Kompartimentierung um die Nadel herum entsteht ein durch eine Biomembran abgeschlossener Raum. Bei phylogenetisch den Schwämmen verwandten einzelligen Choanoflagellaten konnten als Kompartimente der Silikatpolymerisation elektronenmikroskopisch Vesikel beobachtet werden, welche dicht an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert waren und sich mittels Mikrotubuli dort fixierten (Mann, 2001).

Ionentransportvorgänge durch Membranen nehmen einen positiven Wert in Bezug auf die Änderung der freien Enthalpie ΔG an, was bedeutet, dass der Transport nicht spontan abläuft, es sei denn, er verläuft als Cotransport gekoppelt an einen sekundären Gradienten. So wird diese Art von Transport auch für Silikat nicht unwahrscheinlich und konnte in Form eines Natrium Cotransportes bei Diatomeen bereits gezeigt werden. In Studien, welche elektronenmikroskopische Methoden mit einer Elementaranalyse verbanden, konnten innerhalb von *Archaeozyten* und *Choanozyten* keine erhöhten Silikatkonzentrationen festgestellt werden (Uriz *et al.*, 2003). Aufgrund der gemessenen fehlenden zellulären Anreicherung führte dies zu der Annahme, dass Silikat durch Zell-Zell Verbindungen von Epithelzellen eindringen könnte. Basierend auf neueren Untersuchungen, die darstellen, dass der Schwamm ein echtes Epithel besitzt, welches neben Zelladhäsionsmolekülen auch spezialisierte Zell-junction Moleküle besitzt wurde diese Annahme jedoch zunehmend unwahrscheinlicher zugunsten einer Aufnahme durch einen distinkten Transporter (Adell *et al.*, 2003).

Nachdem das Vorhandensein eines Silikat-Transporters, obwohl noch nicht isoliert, sehr wahrscheinlich war, musste ein Kandidat gefunden werden, welcher für diese Aufgabe in Frage kam. Nahe liegend war hierbei zunächst bestehende Silikat-Transportersysteme in der belebten Natur auf Anwendbarkeit in Bezug auf *Demospongien* zu testen. In Frage kam dabei vor allem die *SIT*-Transporterfamilie der Diatomeen, welche die bisher einzigen, eindeutig als Silikattransporter identifizierten Transporter darstellten (Hildebrand *et al.*, 1998). Klonierungsversuche mittels PCR und degenerierter Primer gegen *SIT*-Transportersequenzen ergaben jedoch kein auswertbares Ergebnis. Dies war nicht verwunderlich, da Diatomeen zwar *Eukaryonten* sind, aber als einzellige Algen phylogenetisch den vielzelligen *Demospongien* kaum verwandt sind. Trotzdem waren die Daten aus den Untersuchungen der Diatomeen hilfreich bei der Suche nach einem geeigneten Transportersystem in Schwämmen. Ebenso wie Diatomeen leben Schwämme in einer Umgebung hoher Salinität bezogen auf das externe Milieu, wozu gerade Natriumionen einen großen Teil beitragen. Somit wurde die Möglichkeit eines Na-Cotransports mit in die Überlegungen einbezogen. Eine weitere Überlegung betraf die Spezifität des Transportes bezogen auf das Substrat. Aufgrund der molekularen Daten einiger einfacher Silikatverbindungen wurde deutlich, dass Ähnlichkeiten zwischen Sauerstoffverbindungen des Kohlenstoffs und des Siliziums bestehen. Kohlenstoff und Silizium gehören beide zur 4. Gruppe des Periodensystems. Trotz Unterschiede in Bezug auf ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften (Zhang *et al.*, 2002), bestehen doch viele Gemeinsamkeiten der beiden Elemente, aufgrund welcher sich Verbindungen des Silizium und des Kohlenstoffes ähneln. So beträgt die Bindungslänge einer C-O Doppelbindung 1,19 Å, die einer Si-O Doppelbindung 1,53 Å. Die Einfachbindung zwischen Kohlenstoff und Sauerstoff hat eine Länge von 1,43 Å, die von Silizium und Sauerstoff 1,77 Å. Da des weiteren aus Studien bekannt war, dass die von Diatomeen bevorzugt aufgenommene undissoziierte Kieselsäure zum Teil auch als Anion $[\text{SiO}(\text{OH})_3]^-$ vorliegt, (Del Amo *et al.*, 1999), konnte der Pool möglicher Silikattransporter weiter eingegrenzt und eine Aufnahme von Silikat durch den Schwamm in anionischer Form mit einem Mechanismus ähnlich der Diatomeen in Betracht gezogen werden (Riedel *et al.*, 1985) (Abb. 6.3). Als möglicher Kandidat wurde ein Bikarbonat-Transporter ausgewählt. Sinnvoll erschien dies auch vor dem Hintergrund, dass Anionentransporter, zu denen auch die Bikarbonattransporter gehören, nicht immer nur ein einziges Substrat transportieren, sondern dabei eine gewisse Varianz zeigen können. Ebenfalls trägt das fast ubiquitäre Vorkommen von Bikarbonattransportern der Tatsache Rechnung, dass bei *Demospongien* bis zu 70% der Biomasse aus Silikatnadeln besteht, was eine starke Präsenz von damit assoziierten Strukturen voraussetzt.

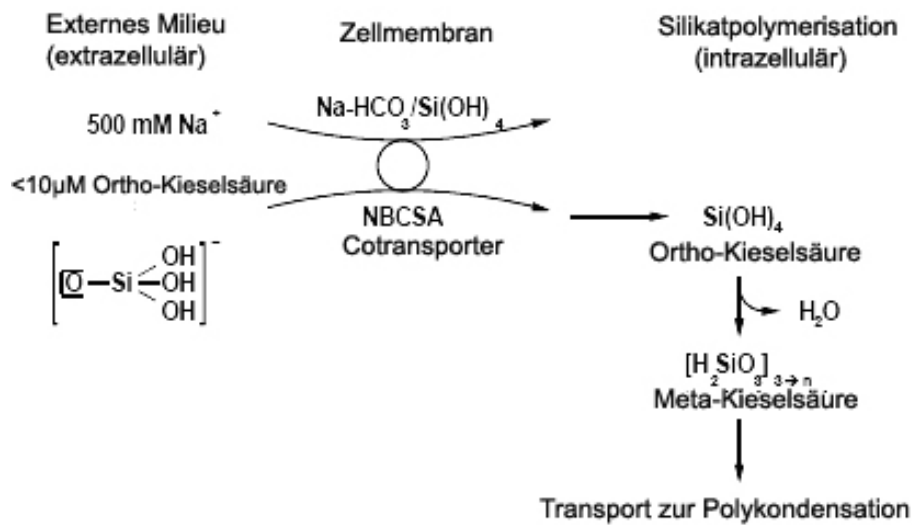


Abb. 6.3: Modellschema für den Silikat-Transport in die Zelle des Demospongien *Suberites domuncula* durch den NBCSA-Transporter. Der Transporter ermöglicht den Transport durch die Zellmembran und ermöglicht somit die selektive Anreicherung von Silikat im Plasmalemma. Im Zytoplasma erfährt die freie Kieselsäure eine gerichtete Polymerisation durch die erreichte Übersättigung. (Nach W.E.G. Müller, 2004).

6.2. Klonierung und Analyse der putativen Transporter cDNA

Bei der Suche nach einem Bikarbonat-Transporter konnte auf die cDNA Bank des Institutes für Physiologische Chemie, Abteilung Angewandte Molekularbiologie, zurückgegriffen werden (Kruse *et al*, 1997), woraus das Gen des Bikarbonat-Transporters auch isoliert wurde. Die cDNA war mittels genspezifischer Primer ansequenziert worden und lag im Vektor pbKcmV vor. Da der Klon nicht komplett von 5´bis zum Polyadenyl-Ende sequenziert vorlag musste die Sequenz noch vervollständigt und auf Richtigkeit der Basenabfolge geprüft werden.

Für die Vervollständigung des Klons wurden forward und reverse Primer angefertigt, welche innerhalb der Sequenz hybridisierten. Zusammen mit den dazu passenden Bankprimern konnten damit mehrere zusätzliche Sequenzfragmente erhalten werden, die auch noch nicht sequenzierte Bereiche umfassten. Ein Alignment aller dieser Sequenzfragmente ergab nun die vollständige Sequenz des Bikarbonat-Transporters aus *Suberites domuncula*, welchem der Name *NBCSA_SUBDO* zugeteilt wurde.

Da Bikarbonat-Transporter zwar alle der Genfamilie *SLC4A* bzw. *SLC5A* angehören, sich aber funktionell oftmals deutlich unterscheiden, musste durch einen Sequenzvergleich bestimmt werden, um welchen Subtyp von Bikarbonattransporter es sich handelte.

Dies war von besonderer Bedeutung, da die Subtypenzugehörigkeit einen deutlichen Einfluss auf die Transportstöchiometrie und somit auch auf die Transportrichtung haben kann. Eine Analyse mittels des BLAST-Algorithmus ergab die höchste Homologie zum Natriumbikarbonat-Transporter NBC-Cotransporter family member 7 (NBC4-2_HOMO, Accession Number NP_003606). Diese Homologie wurde wieder gespiegelt durch eine Gesamthomologie von 46% ähnlichen und 28% identischen Aminosäuren der beiden Sequenzen. Eine weitergehende Analyse umfasste die N- und C-terminalen Domänen, sowie die beiden allgemeinen Anionen Transporter Konsensusdomänen (Reithmeier, 1993) und die allgemeinen Homologiemerkmale in metazoen Bikarbonattransportern (Romero *et al.*, 1999), sowie der Transmembrandomänen. Auch die dort gefundenen Übereinstimmungen unterstützten die These, dass es sich bei der untersuchten Sequenz funktionell um einen Bikarbonat-Transporter handelte. Ebenfalls in der Sequenz vorhanden waren vier Motive zur Bindung des Stilbenderivates *DIDS*. Die Bindestellen lagen innerhalb der Transmembranregionen (Tab. 6.1).

<i>DIDS</i> Bindestelle	Position in Aminosäuresequenz	Besonderheiten
1	763-766	Bindestelle unterbrochen
2	826-828	Bindestelle unterbrochen
3	1027-1036	Bindestelle intakt
4	1176-1180	Bindestelle intakt

Tab. 6.1: Bindestellen für den Bikarbonat Transportinhibitor *DIDS*.

Der Sequenzvergleich der *DIDS*- Bindestellen ergab, dass zwei der vier Bindestellen im Vergleich zur Literatursequenz eine Unterbrechung zeigten, das Motiv jedoch eindeutig identifiziert werden konnte. In den Hemmungsversuchen mittels des Stilbenderivates konnte ein positives Ergebnis erzielt werden. Eine eventuell bestehende Beeinträchtigung der Funktion der Bindestelle durch die Unterbrechung der Sequenz ist deshalb nur schwer zu beurteilen.

Weiterhin wurde die Aminosäuresequenz auf mögliche Angriffspunkte für posttranslationale Modifikationen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.2 zusammengefasst.

Modifikation	Konsensus-Sequenz	Häufigkeit
Glycosylierungsstelle für Asparagin	N-{P}-[ST] -{P}-[N = Glycosylierungsstelle]	10
Phosphorylierungsstelle für Casein Kinase II	[ST]-x-(2)-[DE] [S oder T ist die Phosphorylierungsstelle]	23
Phosphorylierungsstelle für Proteinkinase-C	[ST]-x-[RK] [S oder T]	23
Phosphorylierungsstelle für cAMP und cGMP abhängige Proteinkinase	[RK] (2)-x-[ST] [S oder T ist die Phosphorylierungsstelle]	6
Sulfatierungsstelle für Tyrosin	Komplex	1
N-Myristoylierungsstelle	G-{EDRKHPFYW}-x-[STAGCN]-{P} [G ist die Myristoylierungsstelle]	12
Zweiteilige „nuclear targeting“ Sequenz	Komplex	2
Erkennungsstelle für Proteinamidierung	x-G-[RK]-[RK] [x ist die Amidierungsposition]	1

Tab. 6.2: Angriffspunkte für posttranslationale Modifikationen an der Proteinsequenz des NBCSA_SUBDO. Die Analyse wurde mittels PROSITE durchgeführt (Bairoch et al., 1992).

In der Prosite Analyse (Bairoch et al., 1992) fällt auf, dass Bindestellen für regulatorische Prozesse zahlenmäßig dominieren. Die Casein Kinase 2 besitzt 23 mögliche Phosphorylierungsstellen innerhalb der NBCSA_SUBDO Sequenz, was ein hohes Maß an Regulierbarkeit durch diese Art der Phosphorylierung wahrscheinlich erscheinen lässt. Die Casein Kinase 2 ist ein Enzym, welches in den betreffenden Spezies hochkonserviert erscheint. Es verwendet sowohl ATP als auch GTP als Phosphat-Donor, was sie von vielen anderen Proteinkinasen unterscheidet. Die Casein Kinase 2 besitzt ein weites Substratspektrum, wobei die Substrate häufig an metabolischen Prozessen beteiligt sind und durch Phosphorylierung gesteuert werden. Dies beinhaltet auch den Eingriff in die Regulation von Ionentransportvorgängen beispielsweise von Calcium (Kimura et al., 2003) oder Kalium (Bildl et al., 2004) und Prozesse während der Calcium Biomineralisation in Knochen (Salih et al., 1996).

Eine weitere, häufig vorhandene posttranslationale Modifikation ist die Phosphorylierungsreaktion durch die Proteinkinase C mit 23 festgestellten möglichen Phosphorylierungsstellen. Zur Familie der Proteinkinase C werden Serin/Threonin spezifische Proteinkinasen gerechnet, die zur Aktivierung die Cofaktoren Ca^{2+} , Phospholipid (z.B. Phosphatidylcholin und Diacylglycerol) benötigen, wobei auch Subtypen des Enzyms bekannt sind, welche nicht durch diese Cofaktoren stimuliert werden, aufgrund der Sequenzhomologie aber eindeutig der Proteinkinase C Familie zuzuordnen sind.

Die Regulierbarkeit durch Ca^{2+} und Diacylglycerol weist die Proteinkinase C als einen Bestandteil von Signalübertragungswegen aus, in deren Verlauf Phospholipase C aktiviert wird und die Botenstoffe Ins (3, 4, 5)/ Ca^{2+} sowie Diacylglycerol produziert werden. Eine Aktivierung der Proteinkinase C kann somit über zwei zentrale Signalwege erfolgen. Signalwege, die von Rezeptor-Tyrosinkinase ausgehen, leiten eine Stimulation der Proteinkinase C ein, indem Phospholipase C α aktiviert wird. Auch von G-Protein gekoppelten Membranrezeptoren kann über eine Aktivierung der Phospholipase C β ein aktivierendes Signal in Richtung auf die Proteinkinase C ausgesandt werden (Krauss, 1997).

Das Vorkommen von Mitgliedern der Proteinkinase C-Familie in marinen Schwämmen konnte bereits nachgewiesen und funktionell charakterisiert werden (Müller *et al.*, 1990). Allerdings geschah dies nicht im Hinblick auf Aspekte von Biomineralisationsvorgängen. Über die Regulierbarkeit von Bikarbonattransportern durch Proteinkinase C Aktivität in höheren Metazoen liegen jedoch Veröffentlichungen vor, welche eine Beeinflussung des *NBCSA_SUBDOM* Transporter in ähnlicher Weise nicht unwahrscheinlich erscheinen lassen (Ruiz *et al.*, 1996).

In ähnlicher Weise können die Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase A interpretiert werden, welche mit 10 möglichen Bindestellen ebenfalls relativ häufig anzutreffen ist. Von den Proteinkinasen ist die Proteinkinase A am besten untersucht und charakterisiert. Die Aktivität der Proteinkinase A wird durch cAMP kontrolliert, wobei in humanem Gewebe die zur Aktivierung führende Konzentrationsänderung an cAMP relativ gering ist. Eine 2-3 fache Erhöhung der cAMP Konzentration reicht oft aus, um den maximalen physiologischen Effekt zu erzeugen. Wie bei der Proteinkinase C liegen auch für die Proteinkinase A diverse Untersuchungen vor, welche den Einfluss des Enzyms auf Biomineralisationsvorgänge (Tintut *et al.*, 1998) und den Transport von Bikarbonat (Gross *et al.*, 2001b). In murinen Tubuluszellen scheint die Aktivität der Proteinkinase A in der Lage zu sein, die Stöchiometrie des Bikarbonattransportes zu beeinflussen. Der Einfluss auf den Bikarbonattransport im Allgemeinen scheint eher aktivierender Natur zu sein.

Eine weitere posttranslationale Modifikation der Aminosäuresequenz des *NBCSA_SUBDOM*-Transporters ist die Möglichkeit der N-Myristoylierung. Die Sequenz besitzt 12 Stellen für eine N-Myristoylierung und weist sich daher als membranständiges Protein aus. Vor dem Hintergrund, dass für eine Anreicherung von Silikat in *Demospongien* ein abgegrenztes Kompartiment zur Verfügung stehen muss, ist es auch wahrscheinlich, dass dieses durch eine Zellmembran (Silikalemma) begrenzt wird. Da es sich bei Bikarbonattransportern generell um membranständige Proteine handelt, ist dieses Ergebnis bei den *NBCSA_SUBDO*-Transporter nicht überraschend.

Anhand dieser Datenlage konnten bereits einige Schlussfolgerungen gezogen werden. Aufgrund einer hohen Homologie zu bereits sequenzierten Bikarbonat-Cotransportern konnte die Sequenz als solche identifiziert werden. Die entscheidenden Merkmale dieser Molekülklasse wurden in der Sequenz gefunden, wie beispielsweise die Transmembrandomänen oder die Bindestellen für den Transportinhibitor *DIDS*. Eine eingehende Analyse der Aminosäuresequenz bezüglich der Möglichkeit für posttranslationale Modifikationen konnte zeigen, dass die Sequenz ein hohes Maß an regulatorischen Eingriffsmöglichkeiten besitzt, was den Transporter als Silikattransporter günstig erscheinen lässt. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass es sich bei dem Transporter um ein membranständiges Enzym handeln muss, da man in der Sequenz mehrere Motive für eine Konjugation mit Fettsäuren finden konnte, was durch den *k-NN* Wert der Sequenz (Horton *et al.*, 1997) weiter unterstützt wurde, der eine Membranständigkeit des Proteins wahrscheinlich machte. Dieser statistische Algorithmus erlaubt, wenn er auf Proteinsequenzen angewendet wird, eine Vorhersage über die Lokalisation der Sequenz innerhalb der Zelle.

6.3. Phylogenetische Analyse der Proteinsequenz von *NBCSA_SUBDO*

Mittels der phylogenetischen Analyse wurde nun eine Einstufung der Transportersequenz innerhalb der evolutionären Entwicklung dieser Transporterklasse unternommen. Vor allem wurde auf Verwandtschaft zwischen metazoen und nicht-metazoen Transportersequenzen geachtet. Ein weiterer Aspekt der verwandtschaftlichen Analyse der Sequenz besteht darin, evtl. vorhandene Homologien auch zu anderen Transportsystemen zu verdeutlichen, die auf mischfunktionelle Transporteigenschaften hinweisen. Zwar konnte bisher noch keine Mischfunktionalität von Transportern in Bezug auf Bikarbonat und Silikat gezeigt werden, allerdings sind andere Beispiele durchaus belegt. So wurde im marinen *Cyanobacterium Synechococcus PCC7002* ein Transporter vom Typ einer Sulfatpermease (SulP) mit einer ausgeprägten Kapazität für den Transport von Bikarbonat kloniert (Price *et al.*, 2004).

In der phylogenetischen Analyse wurden die putativen N-terminalen und membranständigen Domänen getrennt analysiert. Dabei zeigte die N-terminale Domäne die höchste Ähnlichkeit zu der Sequenz des humanen NBC-cotransporters NBC4-2_HOMO (NP_003606). Der Grad an Verwandtschaft nimmt dann über den invertierten Na^+ -getriebenen Anionen-Exchanger aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (NAE_DROME) bis hin zu einem pflanzlichen PRP (Pentatricopeptide Repeat containing Peptide PRP_ARATH) aus der Kresse *Arabidopsis thaliana*.

Eine ähnliche Verwandtschaftsbeziehung konnte für den Bereich der Transmembrandomänen gezeigt werden. Auch hier konnte die höchste Homologie zum humanen Bikarbonat Co-Transporter NBC-2_HOMO nachgewiesen werden. Auch hier nahmen die Homologien über nicht-metazoen Sequenzen hin zu Sequenzen aus der Bäckerhefe und Pflanzen ab.

Das Ergebnis der phylogenetischen Analyse zeigte eine nähere Verwandtschaft der Schwammsequenzen zu höher entwickelten Organismen als die *Porifera*. Dieses Ergebnis war für Schwämme jedoch nicht ungewöhnlich. Ähnliches konnte beispielsweise auch für Mitglieder einer der größten eukaryotischer Proteinsuperfamilien, den Proteinkinasen gezeigt werden. So war bekannt, dass das Vorkommen von Protein-Tyrosin-Kinasen (PTKs) auf Metazoen und verwandte Choanoflagellaten beschränkt ist. Bei den dort untersuchten Src-Proteinen bzw. src-Genen konnte ebenfalls in phylogenetischen Analysen ein ähnlicher Verwandtschaftsverlauf wie oben beschrieben gezeigt werden (Cetkovic *et al.*, 2004). Auch ist bekannt, dass beispielsweise *C. elegans*, der als Nematode evolutionsgeschichtlich zwischen den Schwämmen und den Wirbeltieren steht und in phylogenetischen Studien als genetischer Vergleichspool häufig Verwendung findet, Gene nicht besitzt, die man bei Schwämmen wie *Suberites domuncula* und Wirbeltieren finden kann (Seack *et al.*, 2001).

6.4. Weiterführende Untersuchungen und Funktionsanalysen des NBCSA_SUBDOM Transporters

Nachdem das Kandidatengen kloniert und phylogenetisch eingeordnet worden war, wurden weitere Untersuchungen angestrebt, um den Transporter auch funktionell zu beschreiben und in das Gesamtbild der Demospongien Biomineralisation einzufügen.

6.4.1. Funktionelle Untersuchungen der Bifunktionalität durch die Zugabe von Silikat

Die funktionellen Studien wurden vor der Annahme geplant, dass es sich bei dem zu untersuchenden System um einen bifunktionalen Transporter handelt. Es wurden verschiedene Parameter gewählt, um den Vorgang zu charakterisieren und zu veranschaulichen. Wichtig war zunächst, die Bifunktionalität des Transporters durch einen Substratwechsel hin zu Silikat zu analysieren und demonstrieren. Weiterhin sollte die Temperaturabhängigkeit des Transporters untersucht werden, da es sich um eine proteinkatalysierte Reaktion handelt. Für die weitere Charakterisierung des Transporters wurden Studien zur Hemmbarkeit des Transporters angestellt.

Als Testsystem dienten bei diesen Versuchen durch Dissoziation isolierte Schwammzellen des Schwammes *Suberites domuncula* (Müller *et al.*, 1999). Die Schwämme wurden in den Gewässern vor Rovinj (Kroatien) gesammelt und in Mainz in einem standardisierten Verfahren bei 17°C, gehalten bei welchem es gelang, bis auf die Druckverhältnisse, eine weitgehend native Umgebung für die Schwämme bereitzustellen.

Für die Silikatanreicherung wurde Na-Metasilikat verwendet. Das Metasilikat, dessen Verwendung als Silikatquelle *in vitro* Studien mit erhöhten Silikatgehalten häufig Verwendung findet (Ramsohoye *et al.*, 1995), eignet sich aus verschiedenen Gründen auch für die Verwendung in der Schwammkultur. Das als Monomer vorliegende Metasilikat ist isoster zu Carbonat bzw. zum Hydrogencarbonat. Das zentrale Siliziumatom ist ebenfalls sp^2 hybridisiert, wobei sich diese Hybridisierung relativ leicht nach sp^3 verändern kann. So wird monomere ortho-Kieselsäure unter anderem dadurch hergestellt, dass man eine Na-Metasilikat Lösung über einen sauren Kationentauscher gibt (Tani *et al.*, 2002) (Abb. 6.4).

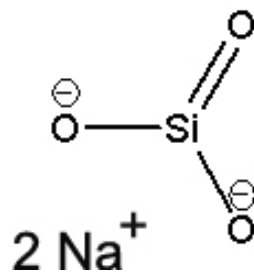


Abb. 6.4: Eindimensionale Strukturformel von Na-Metasilikat. Das Molekül liegt monomer vor.

Die Bindungslängen der Si=O Doppelbindung (1,53Å) und der Si-O Einfachbindung (1,77Å) sind etwas länger als die im Bikarbonat-Anion. Der van der Waals-Radius des Siliziums beträgt 2,1Å. Auch die Kovalenzradien des Siliziums in seinen Verbindungen sind etwas größer als die des Kohlenstoffs. In Tabelle 6.3 sind die räumlichen Unterschiede von Kohlenstoff zu Silizium nochmals zusammengefasst.

Merkmal [Å]	Kohlenstoff	Silizium
Van der Waals-Radius	1,7	2,1
Kovalenzradius K ₁ (4)	0,77	1,17
Kovalenzradius K ₂ (3)	0,67	1,07
Kovalenzradius K ₃ (2)	0,60	1,00
Länge der =O Bindung	1,19	1,53
Länge der –O Bindung	1,43	1,77

Tab. 6.3: Vergleich der Bindungslängen und Kovalenzradien der Elemente Kohlenstoff und Silizium und ihrer Komplexe. Die Abkürzung K steht für den Kovalenzradius, die tiefgestellte Nummer bezeichnet die Anzahl der eingegangenen Bindungen und die eingeklammerte Zahl entspricht der Koordinationszahl der Komplexverbindung.

Die Reaktion der isolierten Zellen auf eine Silikatanreicherung wurde mittels Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffs verfolgt. Der azidophile Fluoreszenzfarbstoff LysoSensor[®] yellow/blue wurde bereits in Silikat-Aufnahmestudien bei Diatomeen verwendet (Shimizu *et al.*, 2001). In diesen Studien wurde er alternativen Färbemethoden wie Rhodamin123 oder Bis-(cyclopentadienyl)-titanchlorid vorgezogen, da er gut wasserlöslich ist und sich gut in die neu entstehende Silika-Matrix inkorporieren kann. Der genaue Mechanismus ist, ähnlich wie bei Rhodamin 123, noch nicht exakt determiniert worden. Beide Farbstoffe sind in der Lage, die Zellmembran relativ leicht zu passieren. Es besteht die Möglichkeit, dass LysoSensor[®] nicht nur aufgrund seiner azidophilen Eigenschaften in der Zelle akkumulieren kann, sondern auch mit bereits vorhandenem Polysilikat mittels Wasserstoffbrücken oder kovalenten Bindungen interagiert.

Eine weitere Eigenschaft des Farbstoffes macht ihn für die Silikatstudien bei Schwämmen ebenfalls interessant. Sein pK_s-Wert liegt bei 4,2 und durch Protonierung des sekundären Amins in der Seitenkette des Moleküls wird ein Fluoreszenz-Quenching aufgehoben und es kommt zu einer pH-Wert abhängigen Verstärkung der Fluoreszenz. Damit ist es dem Molekül nicht nur möglich, in sauren Organellen zu akkumulieren, sondern auch eine pH-Wert Änderung innerhalb der Zelle anzuzeigen.

Die Bildung von Biosilikatstrukturen findet bei weitgehend neutralem oder sogar leichtsaurem pH-Wert statt, wenn man sich Untersuchungen bei Diatomeen als Beispiel nimmt, welche wie bei Schwämmen auch, eine Kompartimentierung voraussetzen (Perry *et al.*, 2003; Vrieling *et al.*, 1999). Dabei ist der Anteil an ionisierten Kieselsäuremonomeren gering. Bei denen durch Polymerisation zunächst entstandenen Oligomeren sinkt der pK_s-Wert der der Silanolgruppen und der Anteil der ionisierten Silanolgruppen steigt an. Die bei diesem Vorgang entstehenden Protonen können durch basische Moleküle wie den LysoSensor abgefangen werden und zu einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften führen.

In der Tat reagierte die Schwammzellkultur von *Suberites domuncula* mit einer deutlichen Änderung der Fluoreszenzintensität, sobald eine Vorinkubation mit 60µM Silikat bei 17°C durchgeführt wurde. Sie fiel deutlich geringer aus, als der Versuch bei 4°C erneut durchgeführt wurde. Die Kontrollversuche ohne Vorinkubation, durchgeführt bei 17°C und bei 4°C, zeigten beide nur eine sehr geringe Änderung der Fluoreszenzintensität.

Ergänzend wurden Studien über die Hemmbarkeit des Transporters mittels des Stilbenderivats *DIDS* (4,4'-diisothiocyanato-2,2'-stilbendisulfonat) durchgeführt. Dies war eine logische Konsequenz der Ergebnisse der Sequenzanalyse des *NBCSA_SUBDOM*-Klons. Die dort identifizierten Stilbenbindestellen konnten mittels der Zugabe des Hemmstoffes in Kombination mit den oben genannten Parametern der Temperatur und Silikatkonzentration erfolgreich in ihrer Funktion bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte für die Fluoreszenzversuche eine Hemmbarkeit der Transporterfunktion mittels Stilbenderivaten nahe gelegt werden. Dies trug zur weiteren Charakterisierung des *NBCSA_SUBDOM* Transporters und seiner Klassifizierung bei, nach welcher diese Art der Hemmbarkeit als transportertypisch gilt (Pimplikar *et al.*, 1988). Auch konnte ein Hinweis auf eine Silikataufnahme durch die Schwammzellen gewonnen werden, der sich anhand der Intensivierung der Fluoreszenzintensität des azidophilen Farbstoffes LysoSensor® verfolgen ließ. Ob dieser Anstieg durch eine direkte Inkorporation des Farbstoffes in eine entstehende Silikatmatrix, oder einen reinen pH-Effekt entstanden ist konnte an dieser Stelle noch nicht genau beantwortet werden.

6.4.2. Siliziumabhängige Genexpression des *NBCSA_SUBDOM* Transporters

Eine Reaktion biologischer Systeme auf Silikat verschiedener Genese und die damit verbundene Änderung der Genexpression ist bereits seit längerer Zeit Gegenstand der Forschung, sowohl im humanen als auch im übrigen Tierreich. So kann bei der pathologischen Reaktion auf kristalline Silikatpartikel im Zuge einer sich entwickelnden Silikose eine Veränderung der Genexpression unter anderem der mRNA von Interleukin 6 (IL-6), dem Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) und dem Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP-2) beobachtet werden (Rao *et al.*, 2004).

Auch physiologische Vorgänge mit oft anabolem Charakter sind häufig mit einer deutlichen Änderung von Genexpressionsmustern verbunden, wenn es zur Zufuhr des Substrats kommt. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Regelung der Genexpression durch das „lac operon“.

Auch bei marinen Demospongien konnte eine solche Veränderung des Genexpressionsmustern untersucht und beobachtet werden (Müller *et al.*, 2003). Dabei wurden die veränderten Expressionsmuster vor allem bei der Zugabe von Silikat und Eisen-Ionen beobachtet. Als Untersuchungssystem wurde wie in der vorliegenden Arbeit, ein Primmorphensystem des Schwammes *Suberites domuncula* verwendet, was die Ergebnisse weitestgehend vergleichbar macht.

Die in ihrer Expressionsänderung durch exogenes Silizium untersuchten Gene wurden unter dem Überbegriff „Silicon Responsive Genes“ (siehe S. 119) zusammengefasst und umfassten die Gene Silikatein (*SUBDOSILICA*), Kollagen (*SUBDOCOL1*) und im weiteren Sinne auch das Myotrophin (*SUBDOMYOL*). Eine Anreicherung einer Primmorphenkultur von *Suberites domuncula* mit 60µM Silikat über eine Zeitspanne von fünf Tagen resultierte in einer deutlichen Hochregulation der Gene Silikatein (*SUBDOSILICA*) und Kollagen (*SUBDOCOL1*) (Krasko *et al.*, 2000) (Abb. 6.5). Des Weiteren wurde die Hochregulation dieser beiden Gene durch Myotrophin nachgewiesen.

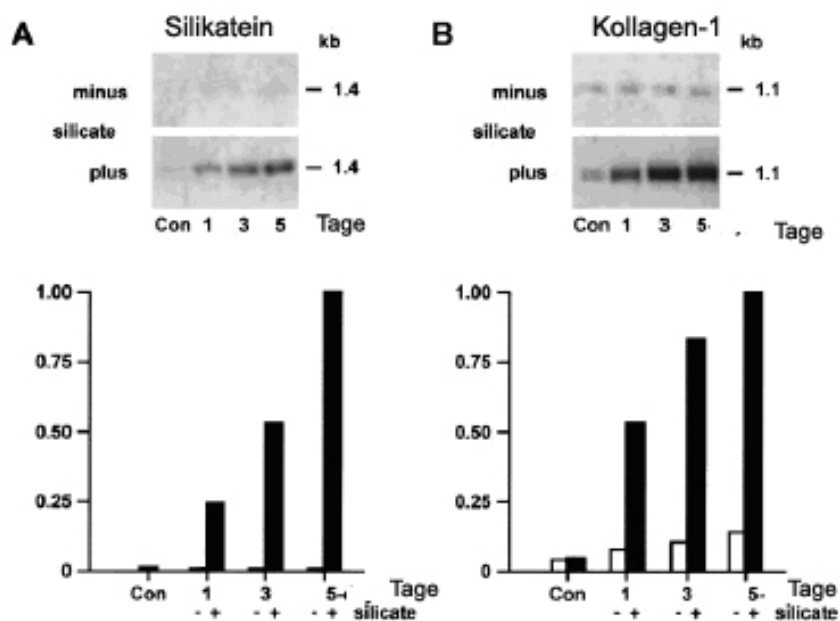


Abb. 6.5: Expressionslevel für Silikatein und Kollagen-1 in Primmorphen des Schwammes *Suberites domuncula*. Die aus isolierten Schwammzellen gebildeten Primmorphen wurden für fünf Tage mit (+ schwarze Balken) und ohne (- weisse Balken) 60µM exogenem Silikat kultiviert. Danach wurde aus den Primmorphen RNA isoliert und 5µg total RNA wurde nach Grössenseparation einem Northern-Blot unterzogen. Die Intensität der Banden wurde quantifiziert (Krasko *et al.*, 2000).

Auch die Zugabe von Eisen führte zu einer Veränderung der Genexpression in der Primmorphenkultur, welche sich nicht nur auf RNA-Ebene verfolgen lies, sondern auch makroskopisch sichtbar wurde. Die Eisensupplementierung führte sowohl zu einem Anstieg in der Spicula Syntheserate in der Primmorphenkultur, als auch zur einer Stimulation der Genexpression des Eisenspeicherproteins Ferritin (Chasteen *et al.*, 1999), des Proliferationsmarkers Septin (Xie *et al.*, 1999) und des Scavenger Rezeptors (Bansal *et al.*, 1999) (Abb. 6.6).

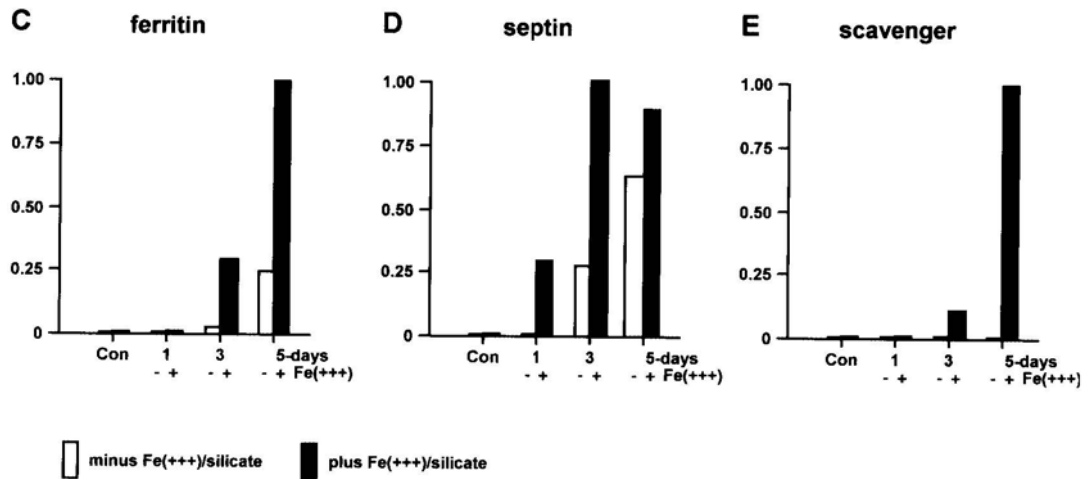


Abb. 6.6: Expressionslevel für Ferritin und Septin und Scavenger-receptor in Primmorphen des Schwammes *Suberites domuncula*. Die aus isolierten Schwammzellen gebildeten Primmorphen wurden für fünf Tage mit (+ schwarze Balken) und ohne (- weisse Balken) 30µM exogenem Fe³⁺ zusätzlich zu 60µM Silikat inkubiert. Danach wurde aus den Primmorphen RNA isoliert und 5µg total RNA wurde nach Grössenseparation einem Northern-Blot unterzogen. Die Intensität der Banden wurde quantifiziert (Krasko *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun ein vom Aufbau und Durchführung her vergleichbares Primmorphensystem etabliert, um die Veränderung der Genexpression des *NBCSA_SUBDO* Transporters als Antwort auf exogene Silikatzufuhr zu untersuchen.

Die im Ergebnisteil beschriebenen Resultate deuteten auf eine ähnlich positive Reaktion des Systems hin, wie sie auch bei Silikatein und Kollagen zu beobachten war (Abb. 6.7).

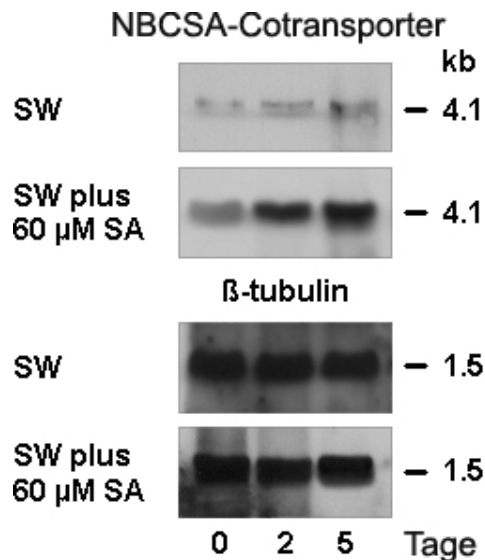


Abb. 6.7: „Steady state level“ der SDNBCSA-Expression im Gewebe von *Suberites domuncula*. Die Schwämme wurden mit und ohne Zusatz von Silikat (60μM Natrium-Metasilikat= SA) gehalten. Die entsprechende RNA wurde isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die erhaltenen Membranen wurden mit markierter cDNA-Sonde aus SDNBCSA und SDTUB (β-Tubulin) sondiert. Die Tubulinsonde soll die identische Auftragsmenge pro Geltasche demonstrieren. (SW= Seewasser).

Eine solche Reaktion schien auch vor dem Hintergrund plausibel, dass eine Nadelbildung innerhalb des Schwammkörpers binnen kurzer Zeit passiert und damit eine schnelle Anreicherung von Silikat am Ort der initialen Polykondensationsreaktion, dem vom Silikalemma abgegrenzten Raum bzw. des axialen Filaments nötig ist (Pisera, 2003).

Bei der bezüglich der Siliziumpolymerisation zweiten wichtigen Gruppe von Organismen, den Diatomeen konnten in Silikat-Hungerversuchen ebenfalls Ergebnisse über die Veränderung der Genexpression als Reaktion auf exogene Silikatzugabe erhalten werden (Hildebrand *et al.*, 1993). Neben einer Erhöhung des cAMP-Spiegels konnte festgestellt werden, dass verschiedene Gene eine Hochregulation durch Silikatzugabe erfuhren. Weitere Untersuchungen, die sich gezielt auf das Expressionsmuster der *SIT*-Transporterfamilie in Diatomeen bezogen, zeigten ebenfalls eine teilweise Hochregulation verschiedener Subtypen unter oben genannten Bedingungen (Hildebrand *et al.*, 1998). Die genau abgestimmte Kontrolle der Expression bestimmter Subtypen der Silikattransporter *SIT 1-5* scheint in Diatomeen ein Mittel zur koordinierten Aufnahme von Silikat in die Pflanzenzelle zu sein. Jedoch sind diese Daten aufgrund des großen phylogenetischen Unterschiedes nicht direkt auf die Demospongien übertragbar.

Wie Studien an humanen Zelllinien zeigten, sind aber auch höher entwickelte Metazoen in ihrer Genexpression teilweise regulierbar durch Silizium. So konnte gezeigt werden, dass durch die siliziumhaltige Substanz Zeolith A, die Proliferation und Differenzierung dieser Zelllinie induziert werden kann.

Als Marker für diesen Effekt wurden unter anderem die mRNA-Level des Osteoblasten Mitogens *TGF-beta* und die Aktivität der *Alkalischen Phosphatase* herangezogen (Keeting *et al.*, 1992).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Zellkulturen des Schwammes *Suberites domuncula* mit einer Erhöhung der Genexpression des *NBCSA_SUBDO* Transporters auf ein erhöhtes Siliziumangebot reagieren können. Reaktionen dieser Art konnten auch bei Diatomeen beobachtet werden, welche wie Schwämme in der Lage sind, binnen kurzer Zeit komplexe Strukturen aus polykondensiertem Silizium aufzubauen. Auch in höheren Metazoen ist eine Regulation der Genexpression durch Silizium nachgewiesen worden. Eine Erweiterung der so genannten „*Silicon responsive genes*“ der Demospongien, Silikatein, Kollagen und Myotrophin um das Gen des *NBCSA_SUBDO* Transporters könnte aufgrund dieser Ergebnisse sinnvoll sein.

1.1.1. Gewebeabhängige Genexpression des *NBCSA_SUBDO*-Transporters

Wesentlich für die weitere Funktionsanalyse des möglichen Silikattransporters war ebenfalls die Frage, von welchen Zellen des Schwammes *Suberites domuncula* der Transporter exprimiert wird. Diese Frage bezog sich zum einen auf den Zelltypus, als auch auf deren Lokalisation innerhalb des Schwammgewebes.

Im Schwamm können drei verschiedene Hauptgruppen von Zellen unterschieden werden: Die Epithelzellen (*Pinacozyten*), welche den Schwamm nach außen abschirmen, die Skelettzellen (*Collenzyten* und *Sklerozyten*), welche aus Protein und Silikat bestehende Stützstrukturen aufbauen und die kontraktile Zellen (*Myozyten*), welche koordinierte Kontraktion vermitteln. Des Weiteren besitzen Schwämme noch undifferenzierte Zellen (Amöboidzellen, *Archaeozyten*), welche sich permanent erneuern und in sämtliche anderen Zellen differenzieren können (Simpson 1984). Um eine Unterscheidung dieser somatischen Zellen untereinander und von Embryonalzellen zu ermöglichen, aus denen sie entstanden sind, wurden die Gene *Noggin* (ein Signalmolekül der Embryonalentwicklung), eine Caspase und Silikatein verwendet, welche bereits in Untersuchungen an Schwamm-Gemmulae (unter Selektionsdruck ausgebildete Dauerknospen) aufgrund ihrer differentiellen Expressierung als Marker verwendet werden konnten (Schröder *et al.*, 2004). Während Silikatein, als Markergen für die Skleroblasten bzw. Nadelherstellung, in der frühen Phase der Zelldifferenzierung innerhalb des Gemmules nicht exprimiert wird, konnte eine Expressierung in bereits höher differenzierten Schwämmen mittels *In situ* Hybridisierung gezeigt werden.

Auch konnte mittels *In situ* Hybridisierung Silikatein-Expression in Zellen nachgewiesen werden, welche sich nach nur teilweiser Dissoziation von Schwammgewebe noch direkt an den Nadeln befanden.

Ebenfalls durch eine solche teilweise Dissoziation von adultem Schwammgewebe wurde eine Expression des *NBCSA_SUBDOM*-Transporters in direkter Nähe zur Silikatnadel innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen. Diese räumliche Nähe von potentiell silikatanreichernden Transportern und dem Proteinfilament, welches durch seine besondere Oberfläche die Polykondensation bei genügend hoher Silikatkonzentration einleitet, legt eine funktionelle Kopplung der beiden Gene nahe. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch die zweite *In situ* Hybridisierung im Rahmen dieser Arbeit, in welcher statt dem teilweise dissoziierten Gewebe des adulten Schwammes nun die vornehmlich aus *Archaeozyten* entstandenen Primmorphen-Kulturen verwendet wurden. Auch das dort erhaltene Signalmuster zeigte eine Lokalisation in unmittelbarer Nähe zu den Silikatnadeln.

Eine ebenfalls silikatabhängige Expression scheint auch der Marker für Differenzierungsvorgänge von Zellen innerhalb des Schwammgewebes, das Gen *Noggin*, im Schwamm zu besitzen (Schröder *et al.*, 2004). Ein gemeinsames Vorkommen von silicatein-positiven und *noggin*-positiven Zellen konnte in den kanalumgebenden Regionen des Pinacoderms (äußeres Epithel) festgestellt werden, was für diesen Teil des Gewebes ein großes Differenzierungspotential erkennen lässt. Allerdings konnte zwischen dem Vorkommen eines Silikattransporters in dieser Region und der Ansammlung von auf Silikat reagierenden Zellen bzw. deren Abwanderung ins *Mesohyl* (inneres Gewebe) des Schwammes bisher noch keine Korrelation hergestellt werden.

Weitere Untersuchungen des Schwammgewebes wurden mittels der Elektronenmikroskopie unternommen. Die Untersuchung der Nadelbildung sowohl mittels der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) als auch mit der Rasterelektronenmikroskopie (REM) konnte bereits in der Vergangenheit wichtige Einzelheiten der Nadelmorphologie und deren Entstehung visualisieren (Uriz *et al.*, 2003a).

Durch meist oxidative Entfernung der organischen Matrix mittels Na-Hypochlorid oder oxidierenden Säuren konnten REM-Studien der Silikatstrukturen angestellt werden, welche dann taxonomisch und kladistisch strukturiert wurden (Uriz *et al.*, 2001). Durchgesetzt hat sich eine Einteilung der Nadeln zunächst nach ihrer Größe in Megaskleren, welche das Hauptgerüst des Schwammes bilden, und in kleinere Mikroskleren. Eine weitere Unterteilung wird anhand der Anzahl der Axen innerhalb der Skleren vorgenommen. Auf diese Weise ist es beispielsweise möglich, die *Demospongien* Nadeln (Monoaxone und Tetraxone) von denen der Glasschwämme (*Hexactinelliden*) (Monoaxone und Triaxone) zu unterscheiden.

Des Weiteren steht die Rolle des Proteins Silikatein und der die Nadel umgebenden Membran (Silikalemma) als formgebende Elemente für die Silikatnadeln außer Frage. Aus den unterschiedlichen Sklerentypen ergeben sich als übergeordnete Struktur die verschiedenen Skelett-Typen der Schwämme, welche im Englischen als hymedesmoid, plumose, axial, radiate, reticulate und arranged in strength confusion bezeichnet werden (Boury-Esnault und Rützler, 1997).

Um unterstützendes Bildmaterial für die Untersuchungen der genetischen Kontrolle der Silikatnadelbildung in *Demospongien* zu bekommen, sind TEM Aufnahmen von ultradünnen fixierten Gewebeschnitten unerlässlich. Diese Art der Probenaufbereitung führte auch zu einer genaueren Erörterung der Frage nach dem Bildungsort der einzelnen Nadeltypen. Während bisher für Mikroskleren eine intrazelluläre Sekretion als sicher galt (Custodio *et al.*, 2002) wird bei der Bildung von Megasklaren auch alternativ ein extrazellulärer Weg diskutiert (Uriz *et al.*, 2000).

Die bisher durchgeführten Versuche konnten jedoch keine zusammenhängende Beschreibung des Nadelbildungsprozesses erbringen. Gerade auch der Zusammenhang zwischen der Anreicherung von Silikat in dem durch das Silikalemma begrenzten Kompartiment und die Entwicklung des Axialfilaments bis zur fertigen Silikatnadel sind nur lückenhaft bekannt. Ebenfalls konnten verschiedene elektronenmikroskopische Aufnahmen von Axialkanälen nur unzureichend interpretiert werden und wurden häufig als Artefakt gewertet. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse führten zu der Entwicklung einer vollständigeren Arbeitshypothese der Polykondensation von Silikat im Demospongium *Suberites domuncula* (Abb. 6.8).

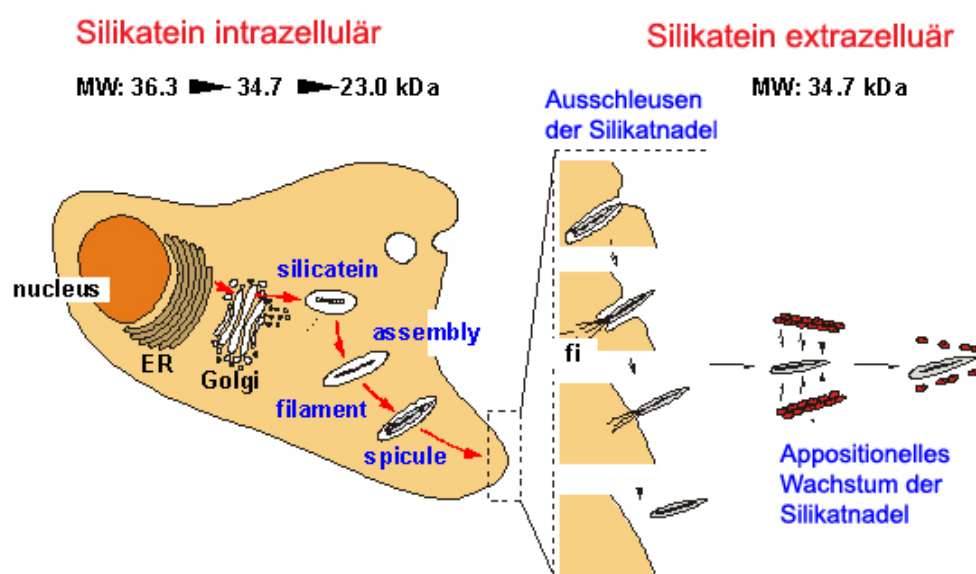


Abb. 6.8: Schematisierter Ablauf der Nadelbildung in *Suberites domuncula* (nach W. E. G. Müller, in press).

Die Voraussetzung für diese theoretischen Überlegungen war die Homologie des Silikatein zur humanen lysosomalen Cysteinprotease Cathepsin L (siehe Abb. 6.2) und der Rückschluss, dass das Silikatein im Schwamm *Suberites domuncula* eine ähnliche Prozessierung durchläuft.

Die initiale Phase der Nadelsynthese spielt sich somit in den nadelbildenden Zellen ab. Dort wird das Silikatein zu seiner reifen Form mit einem Molekulargewicht von 23 kDa prozessiert. Während dieser Reifung wird das Protein mehrfach und schrittweise phosphoryliert. Wahrscheinlich mit Hilfe weiterer Proteine beginnt sich das Silikatein zu Bündeln, dem späteren Axialfilament, zusammenzulagern. Um dieses Filament beginnt die erste Ablagerung von Silikat. Die dadurch entstandenen kleinen Nadelstrukturen werden dann aus der Zelle geschleust, was evtl. durch assoziierte Filamente unterstützt wird (fi). Diese Strukturen konnten im Axialkanal der Nadeln identifiziert werden. Im extrazellulären Raum wachsen die Nadeln zu ihrer endgültigen Größe durch appositionelles Wachstum. Das Silikatein existiert wahrscheinlich, ähnlich dem Cathepsin L, in verschiedenen Formen, welche während der Nadelentwicklung ineinander übergehen. (Abb. 6.8). Das ursprüngliche Enzym besäße damit ein Signalpeptid und ein Propeptidanteil. Beide Peptidanteile werden während der Reifung des Enzyms sukzessiv abgespalten bis ein aktives Silikatein mit einem Molekulargewicht von 23 kDa vorliegt. Die Regulierung der enzymatischen Silikateinaktivität über die Proteolyse des Proenzym ist eine für den Schwamm durchaus sinnvolle Variante. So ist gewährleistet, dass eine Aktivierung des Enzyms, ähnlich wie bei Cathepsin L, erst am Wirkungsort geschieht und eine ungerichtete Polymerisation von Silikat verhindert wird. Auch im Hinblick auf die zum Teil hochkomplizierten Nadelformen ist diese Art der Regulation für den Schwamm sinnvoll. Ob die Abspaltung des Propeptidanteils im Silikatein in Analogie zum Cathepsin L ebenfalls autokatalysiert ist, oder andere Mechanismen beteiligt sind bedarf weiterer Untersuchungen.

```

SILCAa SUBDO MLVTVVVLGGLGFASAA-----OPKFEFVEEWQLKSTHSEKMYESQLMELEERHL 49
SILCab SUBDO MSALKPVALCVVHTSLGIAESVVGKSKTAGLSDDGNYTAVTKSVRLTPVLEFEDWKOITTDHHRVYSDVRRERVDKYT 78
CATL SUBDO MKVLIISLVALSVAAP-----DFPEEWVAKQEBSEKEYTEELEELRRHT 45
CATL HUMAN LNPTLLIAAFLGLIASA-----TLTFDHSLEAGWTKRAMENELYGMN-EEGWERRA 50
{-signal-} (-propeptide-)

SILCAa SUBDO TWLSKKYIEQHNVNSH-IPGETLAMNFGDLSEIYANYLGOVRIEDKKSNGYSKTFQFDPLQ----- 112
SILCab SUBDO VWRANKEYIDQHNQNAQ--RLGYTLKMKRFGDLTKREFIEGYHCVDYQFTNASHLNKKKHTAFVDYGDVFRGGTGE 154
CATL SUBDO IWOSNKKFIDSHNSVSD--KFGYTLKMNKFGDLSEVFKQIYNGYIMQERANDKLFPTASPYME----- 107
CATL HUMAN VWERKMKMIELENEEYREGKHSFTLAMNFGDMTSEEFQVMNGFQNRKPRKGVFQEPFLFYE----- 113
-----propeptide-)

$ Ser #CK
SILCAa SUBDO -----DYPEAVDWRKCAVTAVKDCGDCGASTAFSAMGALCANALAKGNAVSLSEONLIIDCSIPYGNHCCGCGNNY 184
SILCab SUBDO GVRGVGNMPEPTMDWRTSGVVTKVKDCLRCSSYAFSAMASLEGINALSYGSLVTLSEONIVDCSVTYGNHCCAGCDVN 232
CATL SUBDO -----PAASVDWRKQKGVSEVKNCGCCSCWAFSATGSLGQHALKMKRLLVSLSEONLMDCSFRFNGHCKGCGIMD 178
CATL HUMAN -----APRSVDWREKCYVTPVKNCGCCSCWAFSATGALGECQFRKTCRLTSLSEONLVDCSGPQCNEGCNGCLMD 184
[~mature chain:~]
[~rec-silicatein~]

PKC+CK# #CK
SILCAa SUBDO DAFLLVLIANEQVDQDSAYPFVG-----KQSSCNVNSKYKGTSMGSMVSKSGSESDLQAAVSNVGPVSVATDGANSAF 257
SILCab SUBDO RALLVVLNDGVDTWKGYPSGGDPYRSKOYSCKREROYRGASARGIVSLASGDENTLLTAVANSQPVSVYVDATSTSE 310
CATL SUBDO DAFRYVVISNHEGVDTESSYPYTA-----KDGYCRENQNNVGATETSYPDARGSESSLTQASAQIGPISVAIDASHRSF 251
CATL HUMAN YAFQVVDNCGLDSEESYFYEA-----TEESCKVNPKYSVANDTGFVDLPK-QKALMRAVAVTGPISVAIDAGHESF 256
[~mature chain:~]

+PKC $ His $ Asn
SILCAa SUBDO RFYYSQVYDSSRCSSSSINEMVVTGCGSYNGK---KVTLAKNSWGTNWCNSGYVMFAENKYNCCGIATDASVPTL 330
SILCab SUBDO QFYSDGVLNVFPCSSSILSHALVVTGCGKYSGO---DYVILVKNWGPVWCVRCYGRLARKNKCCGIATAASFPITL 383
CATL SUBDO QFYKNGVYYEPCSSSRLDGVLVVGCGTEGGQ---DYFIVKNSWGTWGMDCYIMSRNRRNCCGIASQASYPIV 324
CATL HUMAN LEYKEGVIYFEPDCSSSDMDGVLVVGCGPESTESDNNKYLVLVKNWCEWGMCGYVVMFAKDRRNCGCIASQASYPTV 333
[~mature chain:~]
[~Ser~] [~rec-silicatein~]

```

Abb. 6.8: Sequenzvergleich Silikatein. Die Sequenzen von Silikatein- α (SILCAa_SUBDO, accession number CAC03737.1) und Silikatein- β (SILCab_SUBDO, accession number AJ547635.1) wurden mit den Sequenzen von Cathepsin L aus *Suberites domuncula* (CATL_SUBDO, accession number AJ547635.1) und *Homo sapiens* (CATL_HUMAN, PO7711) aligniert. Konservierte Aminosäuren aller Sequenzen in Bezug auf ihre physico-chemischen Eigenschaften wurden schwarz unterlegt. Konservierte Bereiche von mindestens zwei Sequenzen wurden grau unterlegt. Die charakteristischen Bereiche der Sequenzen wurden markiert. Darunter fallen die katalytische Aminosäuretriade der Serine (\$), Histidine (\$) und Asparagine (\$), das Signalpeptid (signal), der Propeptidanteil (propeptide) und die Sequenz des reifen Enzyms (mature). Die Sequenz zur Herstellung des rekombinanten Enzyms wurde eingerahmt ([rec-silicatein]). Markiert sind auch existierende Serincluster ([~Ser~]) die Casein Kinase 2 (# CK) und die Phosphorylierungsstellen der Protein Kinase C (+ PKC).

Demnach wird wie bei anderen Metazoen auch die Biomineralisation durch organische Strukturen dirigiert. Das organische Axialfilament dient dabei als zentraler Kern der Nadeln, wohingegen extrazellulär Kollagen und Spongin als Strukturproteine für eine Skelettbildung im Schwamm Verwendung finden (Wiens *et al.*, 1999). Durch die Anwendung der Transmissionselektronenmikroskopie war es möglich, die Anfänge der Nadelbildung in fixierten Gewebepreparaten zu untersuchen. Danach scheint es dem einzelnen Sklerozyten möglich, mittels im Zytoplasma gebildeten Filamenten die Bildung mehrerer Nadeln zu initiieren. Da man ausgewachsene, fertige Silikatnadeln extrazellulär im Mesohyl des Schwammes vorfand (Simpson, 1984), war es wichtig zu untersuchen, welche Entwicklungen zwischen der Initiierung der Nadelbildung intrazellulär und dem Erscheinen der Nadeln extrazellulär liegen. Durch die in dieser Arbeit aufgenommenen Bilder konnte gezeigt werden, dass der Axialkanal zumindest zeitweise nicht vollständig mit Filament aus Silikatein ausgefüllt ist, wie bisher zumeist postuliert. Vielmehr konnten in im Axialkanal membranöse, teilweise sogar vesikuläre Strukturen identifiziert werden, was den intrazellulären Ursprung des organischen Anteils der Silikatnadel nahe legt. Während der

weiteren Prozessierung der Nadel verkleinert sich der Durchmesser des Axialkanals von ca. 1,0-1,5 μ M bis auf ca. 0,4 μ M. Diese beobachtete Reduktion geht konform mit der Annahme, dass das Silikateinfilament während der Progression der Silikatnadeln langsam kontrahiert bis es zuletzt enzymatisch inaktiv wird. Eine Erklärung hierfür könnte in einem fortschreitenden Alterungsprozess liegen, einhergehend mit einem Sol-Gel Übergang und einer Dehydratation der Silikatstrukturen in direkter Nähe des Filaments (Iler, 1979). Unterstützt wird diese These durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, die bei auspolymerisierten Nadeln ein nur dünnes Filament zeigen, welches durchgehend den Kontakt zum umhüllenden Polymer verloren hat. Die daraus resultierende Annahme, dass nur ein geringer Teil der Nadel direkt um das Filament entsteht, wohingegen der überwiegende Teil via Appositionswachstum auf der primären Struktur entsteht, konnte bisher nur ungenügend untersucht werden. Begründet wurde die Annahme, dass es sich bei Silikatnadeln um ein Kompositmaterial handelt unter anderem durch vorausgegangene elektronenmikroskopische Aufnahmen, die zeigen, dass Querschnitte von Schwammnadeln eine deutliche, an Jahresringe eines Baumes erinnernde Ringstruktur besitzen (Weaver *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels gegen natives Silikatein gerichteten Antikörpern gezeigt, dass sich Silikatein auch außerhalb des zentralen Kanals auf der Oberfläche der Silikatnadeln von *Suberites domuncula* nachweisen ließ, was die Annahme eines Appositionswachstums, ähnlich einer „Layer by layer Deposition“ in der synthetischen organischen Chemie (Descher, 2003) unterlegt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu Lage der Membranen während der Entstehung einer neuen Silikatstruktur konnten nun in Bezug zu den Ergebnissen der Klonierung eines Kandidatengens gesetzt werden. So ist der als membranständiges Protein identifizierte *NBCSA_SUBDOM* Transporter sehr wahrscheinlich in der Sklerozytenmembran und dem Silikalemma lokalisiert, d.h. genau dort, wo eine schnelle Anreicherung von Silikat in das betreffende Kompartiment in geregelter Art und Weise ablaufen muss. Dies würde auch mit der Bildung eines ersten Kompartiments für die Polymerisation durch Entstehung des Silikalemma mittels einer Invagination von Teilen des äußeren Sklerozytenplasmalemmas konform verlaufen, wie dies bereits postuliert wurde (Uriz *et al.*, 2000).

6.5. Ausblick und Perspektiven für die weitere Erforschung der Silikatpolymerisation in *Demospongien*

Die Erforschung der genauen Mechanismen, mit welchen Demospongien in der Lage sind, Silikat in großen Mengen anzureichern und zu vielfältigen Strukturen zu polymerisieren, hat vor allem das Ziel, im Sinne der Bionik Prinzipien der belebten Natur auf technische und großtechnische Abläufe anwendbar zu machen.

Mit der Entdeckung der Silikateine und der Untersuchung ihres Funktionsprinzips konnten bereits wichtige Schritte in diese Richtung getan werden (Cha *et al.*, 1999). Die hier dargelegten Ergebnisse der Entwicklung des Axialfilaments könnten behilflich sein, das genaue mechanistische Prinzip des Filaments weiter aufzuklären und bereits unternommene Versuche zur *in vitro* Übertragung des polymerisierenden Prinzips (Cha *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2002) weiter zu konkretisieren.

Hilfreich könnten auch weiterführende Studien der Aufnahme von Silikat mittels Antikörper gegen in Frage kommende Proteinstrukturen wie den *NBCSA_SUBDOM*-Transporter sein. Dies kann auch in Kombination mit elektronenmikroskopischen Methoden, wie dem Immunogold-Labeling stattfinden, da die Anwendbarkeit dieser Technik auf Schwammgewebe unter anderem in dieser Arbeit demonstriert werden konnte. Weitergehende Funktionsstudien, wie auch die Exprimierung des Transportergens in einem *Xenopus-Oocyten* System, sind ebenfalls denkbar.

Sollte es in Zukunft gelingen, Schwämme oder Schwammzellen erfolgreich transfizieren zu können, so wäre es möglich, den Vorgang der Biomineralisation beispielsweise durch gezielte *GFP*-Markierung der entscheidenden Zellen zu verfolgen. Versuche bei obligat photoautotrophen Algen liegen bereits vor (Zalavskaia *et al.*, 2001).

Ebenfalls könnte die Identifizierung eines anionentransporterverwandten Silikattransporters helfen, die Rolle des im Schwamm *Suberites domuncula* vorkommenden Enzyms Silikase (Schröder *et al.*, 2003) zu erweitern. Da sowohl bekannt ist, dass die der Silikase strukturverwandte Carboanhydrase 2 mit Anionentransportern ein beschleunigendes Metabolon bilden kann (Sterling *et al.*, 2001), als auch dass Silikat möglicherweise in bestimmten Fällen als Inhibitor der Carboanhydrase wirkt (Innocenti *et al.*, 2004), könnten Studien eines Zusammenhangs dieser Vorgänge interessant sein. Beispielsweise ist eine feedbackartige Hemmung des Enzyms durch freie Silikationen denkbar. Dies könnte als eine Steuerfunktion der Silikataufnahme durch ein eventuell vorhandenes Metabolon wirken. Des Weiteren wäre dies ein möglicher Regelmechanismus für Umbauprozesse innerhalb des schon bestehenden Silikatgerüsts des Schwammes, ähnlich dem System von Osteoclasten und Osteoblasten, wie man es in höheren Organismen vorfindet.

Auch die pharmazeutische Technologie kann von der Erforschung der *Porifera* profitieren. Eine besondere Relevanz entsteht dabei durch die Notwendigkeit moderner Darreichungsformen für Arzneistoffe in Form von Nukleinsäuren oder Peptiden, bzw. Proteinen und durch die Forderung einer variablen und steuerbaren Freisetzung konventioneller Arzneistoffe. Bereits bestehende Untersuchungen und Ergebnisse zur Herstellung und Charakterisierung von polymeren Arzneistoffträgern auf Silikatbasis können durch eine vollständige Aufklärung und anschließende Modifizierung der Polykondensationsmechanismen in Schwämmen wertvolle Ergänzungen erfahren. Bei Arzneistoffen auf Nukleinsäurebasis werden auf der Suche nach Alternativen zu viralen Vektoren bereits Nanopartikel auf Silikatbasis erforscht (Luo *et al.*, 2003) und auch auf der Suche nach geeigneten Materialien für eine Langzeitfreisetzung von Arzneistoffen in Knochenzement zeigen Silikatkompositmaterialien viel versprechende Eigenschaften (Xue *et al.*, 2004). Die templatgesteuerte Polykondensation von Silikat in Schwämmen könnte aufgrund der sanften und variablen Reaktionsbedingungen gerade für empfindliche Arzneistoffe Lösungen für die Darreichungsproblematik anbieten.

7. Zusammenfassung

Die für Metazoen einzigartige Fähigkeit, hochdifferenzierte Silikatstrukturen herzustellen und als Gerüstsubstanz zu verwenden, steht bei den *Porifera* in einem scheinbaren Gegensatz zu der niedrigen Konzentration an Silizium in dem die Schwämme umgebenden Medium. In der zweiten bedeutenden silikatpolymerisierenden Species, den einzelligen Kieselalgen (Diatomeen), konnte bereits ein Silikattransporter identifiziert werden, dessen Sequenzdaten jedoch aufgrund der phylogenetisch geringen Verwandtschaft der *Demospongien* mit den Diatomeen keine Verwendung finden konnte

Im Zuge der Suche nach einem Silikat-Transportsystem im Schwamm *Suberites domuncula* wurde ein potentielles Kandidatengen mittels molekularbiologischer Techniken aus einer cDNA Bank des Instituts isoliert, vervollständigt und analysiert.

Es zeigte sich, dass dieser Transporter durch seine Sequenzdaten der Familie der Bikarbonattransporter angehörte, und somit membranständig war. Seine Transportfunktion zeigte sich mittels spezifischer Inhibitoren hemmbar.

Damit der Schwamm in der Lage ist, eine regulierbare und schnelle Anreicherung von Silikat durchführen zu können, lag eine Annahme einer Induzierbarkeit der Transportergene durch das Substrat Silikat nahe. Mittels Northern-Blot Analyse konnte in einem Primmorphensystem des Schwammes eine Hochregulation der Transkription der Transportergene festgestellt werden.

Die Lokalisation der Exprimierung des Transporters innerhalb des Schwammgewebes konnte mittels *In situ* Hybridisierung untersucht werden und zeigte eine direkte Nähe zu den Polysilikatstrukturen des Schwammes.

Um Hinweise auf eine Bifunktionalität des Transporters aufgrund der Ähnlichkeit von Carbonat und Silikat zu erhärten, wurden fluoreszenzmikroskopische Studien an isolierten Zellkulturen des Schwammes durchgeführt. Es kam zu einer intensive Reaktion der Zellen auf Silikat als Substrat. Dieser Effekt konnte nicht nur durch einen spezifischen Transportinhibitor (*DIDS*) gehemmt werden, sondern zeigt auch eine deutliche Temperaturabhängigkeit.

Um den potentiellen Silikattransporter in Zusammenhang mit dem Gesamtmechanismus der Silikatnadelherstellung in Schwämmen zu bringen, wurden zusätzliche elektronenmikroskopische Studien angestellt. Hier konnte zunächst gezeigt werden, wie sich das die Polykondensation auslösende und dirigierende Proteinfilament des Schwammes bei der Nadelbildung entwickelt. Mittels einer darauf folgenden Immunogold-Markierung des Hauptaxialfilamentproteins des Schwammes in elektronenmikroskopischen Gewebepreparaten, konnte dessen Vorkommen nicht nur im Zentrum der Silikatnadel, sondern auch in den die Nadel umgebenden Strukturen nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit erreichten Ergebnisse und Folgerungen konnten zu einem besseren Verständnis der Silikatpolymerisation innerhalb der einfachsten rezenten Vielzeller beitragen und legen die Existenz eines aktiven Transportsystems für Silikat in *Demospongien* nahe. Eine Weiterführung der Studien dieser Vorgänge könnte die Transformation der Mechanismen der belebten Natur auf die organochemische und pharmazeutische Verfahrenstechnik erleichtern.

8. Literaturverzeichnis

- Aalkjaer, C.; Frische, S.; Leipziger, J.; Nielsen, S.; Praetorius, J. (2004)** Sodium coupled Bicarbonate transporters in the kidney, an update. *Acta. Physiol. Scand.* 181: 505-512.
- Adell, T.; Nefkens, I.; Müller, W., E., G. (2003)** Polarity factor in the demosponge *Suberites domuncula*: identification, expression and localization of the receptor in the epithelium/pinacoderm. *FEBS Lett.* 554: 363-368.
- Altschul, S., F.; Gish, W.; Miller W.; Myers, E., W.; Lipman, D., J. (1990)** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Alwine, J., C.; Kemp, D., J.; Stark, G., R. (1977)** Method for detection of specific RNA's in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridisation with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350-5354.
- Baldi, F; Malej, A.; Minacci, A.; Milanesi, C.; Vignani, R. (1998)** Is diatom lysis in extensive mucilage of Adriatic Sea due to a viral infection ?. Abstracts Algal Virus Workshop, 14-18 June, Department of Microbiology, University of Bergen, Norway.
- Bairoch, A. (1992)** Prosite: A dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucl. Acids Res.* 20: 2013-2018.
- Bachmair, A.; Finley, D.; Varshavsky, A. (1986)** In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234: 179-186.
- Bansal, P.; Mukherjee, P.; Basu, S., K.; George, A.; Bal, V.; Rath, S. (1999)** MHC class I-restricted presentation of maleylated protein binding to scavenger receptors. *J. Immunol.* 162: 4430-4437.
- Bellia, J., P.; Birchall, J., D.; Roberts, N., B. (1996)** The role of silicic acid in the renal excretion of aluminium. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 26: 227-33.
- Bhattacharyya, P.; Volcani, B., E. (1980)** Sodium-Dependent Silicate Transport in the Apochlorotic Marine Diatom *Nitzschia alba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6386-6390.
- Bildl, W.; Strassmaier, T.; Thurm, H.; Andersen, J.; Eble, S.; Oliver, D.; Knipper, M.; Mann, M.; Schulte, U.; Adelman, J., P.; Fakler, B. (2004)** Protein kinase CK2 is coassembled with small conductance Ca²⁺ activated K⁺ channels and regulates channel gating. *Neuron* 43: 847-858.
- Boerboom, D.; Sirois, J. (1998)** Molecular characterization of equine prostaglandin G/H synthase-2 and regulation of its messenger ribonucleic acid in preovulatory follicle. *Endocrinology* 139: 1662-1670.
- Boron, W., F.; Boulpaep, E., L. (1983)** Intracellular pH regulation in the renal proximal tubule of the salamander basolateral HCO₃-transport. *J. Gen. Physiol.* 81: 53-94.
- Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J. (1999)** The mutidrug resistance protein family. *Biochim. Biophys. Acta* 1461: 347-357.
- Boury-Esnault, N.; Rützler, K. (1997)** Thesaurus of sponge morphology. *Smith Contrib. Zool.* 596: 1-55.
- Bradford, M., M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Cabantchik, Z., I.; Knauf, P., A.; Rothstein, A. (1978)** The anion transport system of the red blood cell. The role of membrane protein evaluated by the use of 'probes'. *Biochim. Biophys. Acta.* 515: 239-302.
- Cetkovic, H.; Grebenjuk, V., A.; Müller, W., E., G.; Gamulin, V. (2004)** Src proteins/src genes: from sponges to mammals. *Gene.* 342: 251-61.
- Cha, J., N.; Shimizu, K.; Zhou, Y.; Christiansen, S., C.; Chmelka, B., F.; Stucky, G., D.; Morse, D., E. (1999)** Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 361-365.
- Cha, J., N.; Stucky, G., D.; Morse, D., E.; Deming, T., J. (2000)** Biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolymers. *Nature* 403: 289-292.

Chasteen, N., D.; Harrison, P., M. (1999) Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J. Struct. Biol.* 126: 182-94.

Chen, Y.; Cann, M., J.; Litvin, T., N.; Iourgenko, V.; Sinclair, M., L.; Levin, L., R.; Buck, J. (2000) Soluble adenyl cyclase as an evolutionarily conserved Bicarbonate sensor. *Science* 289: 625-628. (AN : 20377903).

Clark, J., M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalysed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerises. *Nucl. Acids Res.*: 9677-9686.

Dansch, G. (1891) Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry* 71: 1-16.

Dayhoff, M., O.; Schwartz, R., M.; Orcutt, B., C. (1978) A novel evolutionary change in protein. *Atlas of protein sequence and structure.* (Dayhoff, M.O., ed.). Natl. Biomed. Res. Foundation, Washington DC: 345-352.

Del Amo, Y.; Brzezinski, M., A. (1999) The chemical form of dissolved silica taken up by marine diatoms. *J. Phycol.* 35: 1162-1170.

Descher, G., Schlenoff, J., B. (2003) Multilayer Thin Films. Sequential Assembly of Nanocomposite Materials, Verlag Chemie, Weinheim.

Dingwall, C.; Laskey, R., A. (1986) Protein import into the cell nucleus. *Annu. Rev. Cell Biol.*: 367-90.

Diwu, Z.; Chen, C., S.; Zhang, C.; Klaubert, D., H.; Haugland, R., P. (1999) A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labelling acidic organelles of live cells. *Chem. Biol.*: 411-418.

Felsenstein, J. (1993) PHYLIP. Ver.3.5. University of Washington, Seattle, USA.

Fremisco, J., R.; Glass, D., B.; Krebs, E., G. (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.

Garcia, A., M.; Lodish, H., F. (1989) Lysine 539 of human band 3 is not essential for ion transport or inhibition by stilbene disulfonates. *J. Biol. Chem.* 264: 19607-19613.

Geigy Scientific Tables (1984) Physical Chemistry-Composition of blood. Vol. 3 Ciba Geigy, Basel.

Gerencser, G., A.; Robbins, F.; Zhang, J.; Ahearn, G., A. (2004) Electrogenic proton-regulated oxalate/chloride exchange by lobster hepatopancreatic brush-border membrane vesicles. *J. Exp. Biol.* 207: 571-578.

Grichtchenko, I., I.; Choi, I.; Zhong, X.; Bray-Ward, P.; Russell, J., M.; Boron, W., F. (2001) Cloning, Characterization, and Chromosomal Mapping of a Human Electroneutral Na⁺-driven Cl-HCO₃ Exchanger. *J. Biol. Chem.* 276: 8358-8363.

Gross, E.; Abuladze, N.; Pushkin, A.; Kurtz, I.; Cotton, C., U. (2001a) The stoichiometry of the electrogenic sodium Bicarbonate cotransporter pNBC1 in mouse pancreatic duct cells is 2 HCO₃⁻:1 Na⁺. *J. Physiol.* 531: 375-382.

Gross, E.; Hawkins, K.; Pushkin, A.; Sassani, P.; Dukkipati, R.; Abuladze, N.; Hopfer, U.; Kurtz, I. (2001b) Phosphorylation of Ser(982) in the sodium Bicarbonate cotransporter kNBC1 shifts the HCO₃⁻ : Na⁺ stoichiometry from 3 : 1 to 2 : 1 in murine proximal tubule cells. *J. Physiol.* 537: 659-65.

Guruprasad K.; Reddy B., V., B.; Pandit M., W. (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering* 4: 155-161.

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

Hartmann, W., D. (1969) New genera and species of coralline sponges (*Porifera*) from Jamaica. *Postilla (Yale University)* 137: 1-39.

Herbert, W., J.; Weir, D., M. (1978) Mineral-oil Adjuvants and the Immunization of Laboratory Animals. *Handbook of Experimental Immunology*, Oxford, England.

Hildebrand, M.; Volcani, B., E.; Gassmann, W.; Schroeder, J., I. (1997) A gene family of silicon transporters. *Nature* 385: 688-689.

Hildebrand, M.; Higgins, D., R.; Busser, K.; Volcani, B., E. (1993) Silicon-responsive cDNA clones isolated from the marine diatom *Cylindrotheca fusiformis*. *Gene* 132: 213-218.

Hildebrand, M.; Dahlin, K.; Volcani, B., E. (1998) Characterization of a silicon transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: sequences, expression analysis, and identification of homologs in other diatoms. *Mol. Gen. Genet.* 260: 480-486.

Hogan, E., M.; Cohen, M., A.; Boron, W., F. (1995) K⁺-and HCO₃⁻-dependent acid-base transport in squid giant axons II. Base influx. *J. Gen. Physiol.* 106: 845-862.

Holfeld, H. (2000) Infection of the single-celled diatom *Stephanodiscus alpinus* by the chytrid *Zygorhizidium*: Parasite distribution within host population, changes in host cell size, and host-parasite size relationship. *Limnology and Oceanography* 45: 1440-1444.

Holland, H.; D. (1992) Chemistry and evolution of the Proterozoic ocean. In: Schopf, J., W.; Klein, C. (eds) *The proterozoic biosphere*. Cambridge University Press, Cambridge: 169-172.

Holleman; Wiberg. (1995) *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 101. Auflage, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York.

Horton, H.; Nakai, K. (1997) Better Prediction of Protein Cellular Localization Sites with the *k* Nearest Neighbors Classifier. *Intelligent Systems for Molecular Biology* 5: 147-152.

Hott, M.; de Pollak, C.; Modrowski, D.; Marie, P., J. (1993) Short-term effects of organic silicon on trabecular bone in mature ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.* 53: 174-179.

Iler, R., K. (1979) *The chemistry of Silica*. Plenum Press, New York.

Innocenti, A.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C., T. (2004) Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of isoenzymes I, II, IV, V, and IX with anions isosteric and isoelectronic with sulfate, nitrate, and carbonate. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 15: 576-571.

Jiang, Z.; Grichtchenko, I., I.; Boron, W., F.; Aronson, P., S. (2002) Specificity of anion exchange mediated by mouse Slc26a6. *J. Biol. Chem.* 277: 33963-33967.

Jugdaohsingh, R.; Anderson, S., H.; Tucker, K., L.; Elliott, H.; Kiel, D., P.; Thompson, R., P.; Powell, J., J. (2002) Dietary silicon intake and absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 75: 887-893.

Keeting, P., E.; Oursler, M., J.; Wiegand, K., E.; Bonde, S., K.; Spelsberg, T., C.; Riggs, B., L. (1992) Zeolithe A increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *J. Bone. Miner. Res.* 7: 1281-1289.

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

Kimura, T; Kubo, T. (2003) Cloning and functional characterization of squid voltage-dependent Ca²⁺ channel beta subunits: involvement of N-terminal sequences in differential modulation of the current. *Neurosci. Res.* 46: 105-117.

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

Koepsell, H.; Endou, H. (2003) The SLC22 drug transporter family. *Eur. J. Physiol* 447: 666-676.

Kopito, R., R. (1990) Molecular biology of the anion exchanger gene family. *Int. Rev. Cytol.* 123: 177-179.

Kozak, M. (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870.

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

Krauss, G. (1997) *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.

Kreil, G. (1984) Occurrence, detection, and biosynthesis of carboxy-terminal amides. *Methods Enzymol.* 106: 218-223.

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

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

Kyte, J.; Doolittle, R., F. (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.

- Lagadic-Gossmann, D.; Buckler, K., J.; Vaughan-Jones, R., D. (1992)** Role of Bikarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J. Physiol.* 458: 361-384.
- Lee, J., J.; Leedale, G., F.; Bradbury, P. (2000)** An illustrated guide to the protozoa. Volume 1+2, 2nd Edition, Society of Protozoologists, Lawrence: 1-1432.
- Lesk, A., M. (2003)** Bioinformatik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Li, J., K.; Parker, B.; Kowalik, T. (1987)** Rapid alkaline blot-transfer of viral dsRNAs. *Anal. Biochem.* 163: 210-218.
- Loiselle, F., B.; Morgan, P., E.; Alvarez, B., V.; Casey, J., R. (2004)** Regulation of the human NBC3 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter by carbonic anhydrase II and PKA. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286: 1423-1433.
- Luo, D.; Han, E.; Belcheva, N.; Saltzman, W., M. (2003)** A self-assembled, modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 95: 333-341.
- Lupas, A.; Van Dyke, M.; Stock, J. (1991)** Predicting coiled-coiles from protein sequences. *Science* 252: 1162-1164.
- Ma, J., F.; Mitani, N.; Nagao, S.; Konishi, S.; Tamai, K.; Iwashita, T.; Yano, M. (2004)** Characterization of the Silicon Uptake System and Molecular Mapping of the Silicon Transporter Gene in Rice. *Plant Physiol.* 136: 3284-3289.
- Mann, D., G. (1999)** The species concept in diatoms. *Physiological reviews* 18. *Phycologia* 38: 437-495.
- Mann, S. (2001)** Biomineralization. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry, Oxford Chemistry Masters, Oxford, Great Britain.
- Marshall, R., D. (1972)** Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.* 41: 673-702.
- Mastrolorenzo, A.; Zuccati, G.; Massi, D.; Gabrielli, M., G.; Casini, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C., T. (2003)** Immunohistochemical study of carbonic anhydrase isozymes in human skin. *Eur. J. Dermatol* 13: 440-444.
- Melvin, J., E.; Park, K.; Richardson, L.; Schultheis, P., J.; Shull, G., E. (1999)** Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 274: 22855-22861.
- Montero, M.; Lobaton, C., D.; Hernandez-SanMiguel, E.; SantoDomingo, J.; Vay, L.; Moreno, A.; Alvarez, J. (2004)** Direct activation of the mitochondrial calcium uniporter by natural plant alkaloids. *Biochem J.* 23.Pt.
- Müller-Berger, S.; Ducoudret, O.; Diakov, A.; Fromter, E. (2001)** The renal Na-HCO₃-cotransporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes: change in stoichiometry in response to elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Pflugers Arch.* 442: 718-728.
- Müller, W., E., G.; Kruse, M.; Koziol, C.; Müller, J., M.; Leys, S., P. (1998)** Evolution of early Metazoa: phylogenetic status of the Hexactinellida within the phylum of *Porifera* (sponges). *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 21: 141-156.
- Müller, W., E., G.; Ugarkovic, D.; Gamulin, V.; Weiler, B., E.; Schröder, H., C.; (1990)** Intracellular signal transduction pathways in sponges. *Electron Microsc. Rev.* 3: 97-114.
- Müller, W., E., G.; Wiens, M.; Batel, R.; Steffen, R.; Schröder, H., C.; Borojevic, Radovan, Custodio, M. R. (1999)** Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. *Marine Ecology Progress Series*; Vol. 178: 205-219.
- Müller, W., E., G.; Krasko, A.; Le Penne, G.; Schröder, H., C. (2003)** Biochemistry and Cell Biology of Silica Formation in Sponges. *Microsc. Res. Tech.* 62: 368-377.
- Mullis, K., B.; Faloona, F.; Scharf, S., J.; Saiki, R., K.; Horn, G., T.; Ehrlich H., A. (1986)** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
- Nelson, D., M.; Tréguer, P.; Brezinski, M., A.; Leyneart, A.; Quéguiner, B. (1995)** Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Glob. Biochem. Cycles* 9: 359-372.
- PC/GENE Data Banks CD-Rom (1995)** Release 14.0. IntelliGenetics Inc., Mountain View, Canada.

Parker, M., D.; Ourmozdi, E., P.; Tanner, M., J. (2001) Human BTR1, a new Bicarbonate transporter superfamily member and human AE4 from kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 1103-1109.

Perry, C., C.; Keeling-Tucker, T. (2000) Biosilicification: the role of the organic matrix in structure control. *J. Biol. Inorg. Chem.* 5: 537-550.

Perry, C., C.; Belton, D.; Shafran, K. (2003) Studies of Biosilicas; Structural Aspects, Chemical Principles, Model Studies and the Future. *Silicon Biomineralization*, W.E.G. Müller (Ed.), Springer Verlag Berlin Heidelberg.

Pesole, G.; Mignone, F.; Gissi, C.; Grillo, G.; Licciulli, F.; Liuni, S. (2001) Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* Vol. 276: 73-81.

Perovic, S.; Schroder, H., C.; Sudek, S.; Grebenjuk, V., A; Batel, R.; Stifanic, M.; Müller, I., M.; Müller, W., E. (2003) Expression of one sponge Iroquois homeobox gene in primmorphs from *Suberites domuncula* during canal formation. *Evol. Dev.* 5: 240-250.

Petrovic, S.; Barone, S.; Xu, J.; Conforti, L.; Ma, L.; Kujala, M.; Kere, J.; Soleimani, M. (2004) SLC26A7: a basolateral Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger specific to intercalated cells of the outer medullary collecting duct. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* 286: 161-169.

Pfeifer, K.; Haasemann, M.; Gamulin, V.; Bretting, H.; Fahrenholz, F.; Müller, W., E., G. (1993) S-type lectins occur also in invertebrates: unusual subunit composition and high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiology* 3: 179-184.

Pimplikar, S., W.; Reithmeier, R., A. (1988) Identification, purification and characterization of a stilbenedisulfonate binding glycoprotein from canine kidney brush border membranes. A candidate for a renal anion exchanger. *J. Biol. Chem.* 263: 4485-4493.

Pinna, L., A. (1990) Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1054: 267-284.

Pisera, A. (2003) Some aspects of silica deposition in lithistid demosponge desmas. *Microsc. Res. Tech.* 62: 312-326.

Polak, J., M.; McGee, J., D. (1998) *In situ Hybridization*. Oxford University Press, Oxford, England.

Price, G., D.; Woodger, F., J.; Badger, M., R.; Howitt, S., M.; Tucker, L. (2004) Identification of a SulP-type Bicarbonate transporter in marine cyanobacteria. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 101: 18228-18233.

Ramsohoye, P.; Fritz, I., B. (1995) Influences of silicates and carnitine-silicate mixtures on the inhibition of aggregation of erythrocytes elicited by the presence of fibrinogen. *J. Cell Physiol.* 165: 145-154.

Rao, K.; Porter, D., W.; Meighan, T.; Castranova, V. (2004) The Sources of Inflammatory Mediators in the Lung after Silica Exposure. *Environmental Health Perspectives*, Vol.112, Number 17.

Rauhut, R. (2001) *Bioinformatik*. Wiley-VCH, Weinheim.

Reeves, C., D.; Volcani, B., E. (1985) Role of silicon in diatom metabolism. Messenger RNA and polypeptide accumulation patterns in synchronized cultures of *Cylindrotheca fusiformis*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1735-1744.

Reithmeier, R., A., F. (1993) The erythrocyte anion transporter (band 3). *Curr. Biol.* 3: 513-523.

Riedel, G., F.; Nelson, D., M. (1985) Silicon uptake by algae with known Si requirement II. Strong pH dependence of uptake kinetics parameters in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 21: 168-171.

Romero, M., F.; Boron, W., F. (1999) Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 699-723.

Rosenquist, G., L.; Nicholas, H., B. Jr. (1993) Analysis of sequence requirements for protein tyrosine sulfation. *Protein Sci.* 2: 215-222.

Rottmann, M.; Schröder, H., C.; Gramzov, M.; Renneisen, K.; Kurelec, B.; Dorn, A.; Friese, U.; Müller, W., E., G. (1987) Specific phosphorylation of proteins in pore complex-laminae from the sponge *Geodia cydonium* by the homologous aggregation factor and phorbol ester. Role of protein kinase C in the phosphorylation of DNA topoisomerase II. *EMBO J.* 3: 3939-3944.

Royaux, I., E.; Wall, S., M.; Karniski, L., P.; Everett, L., A.; Suzuki, K.; Knepper, M., A., Green, E., D. (2001) Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates Bicarbonate Sekundenretion. Proc Natl. Acad. Sci. USA 98: 4221-4226.

Ruiz, O., S.; Wang, L., J.; Qiu, Y., Y.; Kear, F.; Bernardo, A.; Arruda, J., A.; (1996) Regulation of the renal Na-HCO₃ cotransporter : VI Mechanism of the stimulatory effect of protein kinase C. Kidney Int. 49: 696-704.

Saiki, R., K.; Scharf, S., J.; Faloona, F.; Mullis, K., B.; Horn, G., T.; Erlich, H., A.; Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Sambrook, J.; Fritsch, E., F.; Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour N.Y. USA.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A., R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467.

Santos, F., T.; Scofano, H., M.; Barrabin, H.; Meyer-Fernandes, J., R.; Mignaco, J., A. (1999) A novel role of 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid as an activator of the phosphatase activity catalyzed by plasma membrane Ca²⁺-ATPase. Biochemistry 38: 10552-10558.

Scheepers, A.; Joost, H., G.; Schurmann; A. (2004) The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. JPEN. J. Parenter. Enteral Nutr. 28: 364-371.

Schröder, H., C.; Krasko, A.; Le Pennec, G.; Adell, T.; Wiens, M.; Hassanein, H.; Müller I., M.; Müller, W., E. (2003) Silicase, an enzyme which degrades biogenous amorphous silica: contribution to the metabolism of silica deposition in the demosponge *Suberites domuncula*. Prog. Mol. Subcell. Biol.33: 249-268.

Schröder, H., C.; Perovic-Ottstadt, S.; Wiens, M.; Batel, R.; Müller, I., M.; Müller, W., E., G. (2004) Differentiation capacity of epithelial cells in the sponge *Suberites domuncula*. Cell Tissue Research 316: 217-280.

Salih, E.; Ashkar, S.; Gerstenfeld, L., C.; Glimcher, M., J.; (1996) Protein kinases of cultured osteoclasts: selectivity for the extracellular matrix proteins of bone and their catalytic competence for osteopontin. J. Bone Miner. Res. 10: 1461-1473.

Seack, J.; Perovic, S.; Gamulin, V.; Schröder, H., C.; Beutelmann, P.; Müller, I., M.; Müller, W., E. (2001) Identification of highly conserved genes: SNZ and SNO in the marine sponge *Suberites domuncula*: their gene structure and promoter activity in mammalian cells¹. Biochim. Biophys. Acta. 1520: 21-34.

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

Shimizu, K.; Del Amo, Y.; Brzezinski, M., A.; Stucky, G., D.; Morse, D., E. (2001) A novel fluorescent silica tracer for biological silicification studies. Chem. Biol.11: 1051-1060.

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

Sterling, D., Reithmeier, R., A., Casey, J., R. (2001) A transport metabolon. Functional interaction of carbonic anhydrase II and chloride/Bicarbonate exchangers. J. Biol. Chem. 276: 47886-47894.

Sun, Q.; Beelen, T., P., M.; van Santen, R., A. (2002) PEG-Mediated Silica Pore Formation Monitored in Situ by USAX and SAXS: Systems with Properties Resembling Diatomaceous Silica. J. Phys. Chem. B. 106: 11539-11548.

Tani, M.; Liu, C.; Huang, P.; M. (2002) Oxalic acid perturbation of imogolite formation and the impact on cadmium adsorption. 17th WCSS 14-21 August, Thailand.

Thomas P., S. (1980) Hybridisation of denaturated RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201-5205.

- Thomas, R., C. (1976)** Comparison of the Na⁺ and H⁺ pumps in a snail neurone [proceedings]. J. Physiol. 263: 212P-213P.
- Tintut, Y.; Parhami, F.; Boström, K.; Jackson, S., M.; Demer, L., L. (1998)** cAMP Stimulates Osteoblast-like Differentiation of Calcifying Vascular Cells. J. Biol. Chem. 273: 7547-7553.
- Towler, D., A.; Gordon, J., I.; Adams, S., P.; Glaser L. (1988)** The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. Annu. Rev. Biochem. 57: 69-99.
- Ullmann, A; Jacob, F.; Monod, J. (1967)** Characterization by *in vitro* complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 24 : 339-343.
- Uriz, M., J.; Turon, X.; Becerro, M., A. (2000)** Silica deposition in Demosponges: spiculogenesis in *Crambe crambe*. Cell Tissue Res. 301: 299-309.
- Uriz, M., J.; CARBALLO, J., L. (2001)** Phylogenetic relationships of sponges with placochelae or related spicules (*Poecilosclerida*, *Guitarridae*) with a systematic revision. Zool. J. Linn. Soc 132: 41-428.
- Uriz, M., J.; Turon, X.; Becerro, M., A. (2003)** Silica deposition in Demosponges. Prog. Mol. Subcell. Biol. 33: 163-193.
- Uriz, M., J., Turon, X.; Becerro, M., A.; Agell, G. (2003a)** Silicious Spicules and Skeleton Frameworks in Sponges: Origin, Diversity, Ultrastructural Patterns, and Biological Functions. Microsc. Res. Tech. 62: 279-299.
- Voet D., Voet J., G. (1994)** Biochemie. VHC Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo. 97.
- Vrieling, E., G., Gieskes, W., W., C.; Beelen, T., P., M. (1999)** Silicon Deposition In Diatoms: Control By The pH Inside The Silicon Deposition Vesicle. J. Phycology 35: 548-559.
- Weaver, J., C.; Morse, D., E. (2003)** Molecular biology of demosponge axial filaments and their roles in biosilicification. Microsc. Res. Tech. 62: 356-367.
- Weber, K.; Osborn, M. (1969)** The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 : 4406-4412.
- Weissenfels, N.; Landschoff, H., W. (1977)** Bau und Funktion des Süßwasserschwamms *Ephydatia fluviatilis* L. (Porifera). IV. Die Entwicklung der monaxialen SiO₂-Nadeln in Sandwich-Kulturen. Zool. Jahrbuch Abt. Anat. 98: 355-371.
- Westermeier, R.; Gronau, S.; Schickle, H. (1989)** Semidry-Blotting von Proteinen aus SDS- und IEF-Polyacrylamidgelen. Pharmacia, Freiburg, Sonderdruck SD 072.
- Wiens, M.; Koziol, C.; Batel, R.; Müller, W., E. (1999)** Prolidase in the Marine Sponge *Suberites domuncula*: Enzyme Activity, Molecular Cloning, and Phylogenetic Relationship. Mar. Biotechnol. (NY): 191-199.
- Worley, K., C.; Smith, R.; Weise, B.; Culpepper, P. (1996)** BCM search launcher-an integrated interface to molecular biology data base search and analysis services available on the world wide web. Genome Res.6: 454-462.
- Woodget, J. R.; Gould, K. L.; Hunter, T. (1986)** Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements", Eur. J. Biochem 161: 177-184.
- Xie, H.; Surka, M.; Howard, J.; Trimble, W., S. (1999)** Characterization of the mammalian septin H5: distinct patterns of cytoskeletal and membrane association from other septin proteins. Cell Motil. Cytoskeleton 43: 52-62.
- Xue, J., M.; Shi, M. (2004)** PLGA/mesoporous silica hybrid structure for controlled drug release. Journal of Controlled Release 98: 209-217.
- Zaslavskaja, L., A.; Lippmeier, J., C.; Shih, C.; Erhardt, D.; Grossmann, A., R.; Apt, K., E. (2001)** Trophic Conversion of an Obligate Photoautotrophic Organism Through Metabolic Engineering. Science 292: 2073-2075.
- 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.
- Zhang, R., Q.; Lee, S., T.; Law, Chi-Kin; Li, Wai-Kee; Teo, Boon, K. (2002)** Silicon nanotubes: Why not. Chem. Phys. Let. 364: 251-258.

9. Abkürzungsverzeichnis

9.1 Akronyme	
Ak.	Antikörper
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Complementäre DNA
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-triphosphat
DIG	Digoxigenin
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
G	Gramm
G.cydonium	Geodia Cydonium
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
kDA	Kilodalton
L	Liter
LB	Lurea Bertani
m	Meter
M	Molar
mRNA	Messenger
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NBCSA-Transporter	Natriumbikarbonat-Silicic-Acid-Transporter
N-terminal	Aminoterminal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleic Acid
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfat
Tab	Tabelle
TBE	Tris Borate EDTA Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Poly(oxyethylen) ₂₀ Sorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Weight pro Volumen

9.2 Aminosäuren

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

9.3 Nukleotidbasen

Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U