

Molekulare Analysen zur Selbst-/Nichtselbsterkennung bei Urochordaten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Ulrich Kürn



Kiel

Mai 2006

Referent/in:

Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas C. G. Bosch

Korreferent/in:

Prof. Dr. Thomas Röder

Tag der mündlichen Prüfung.

17. Juli 2006

Zum Druck genehmigt:

Kiel, den 19. Juli 2006

Gez. Prof. Dr. J. Grotemeyer der Dekan

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Publikation vorbereitet:

Khalturin K., Kürn U., Pinnow N., Bosch T.C. Towards a molecular code for individuality in the absence of MHC: screening for individually variable genes in the urochordate *Ciona intestinalis*. Dev. Comp. Immunol. (2005), 29(9):759-773.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	vi
1	Einleitung	1
1.1	Selbst-/Nichtselbsterkennung.....	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem von Wirbellosen und Wirbeltieren	2
1.1.2	Das adaptive Immunsystem von Gnathostomen.....	4
1.1.3	Die Evolution des adaptiven Immunsystems.....	5
1.1.4	Alloimmunität und Selbststerilität als Teil der Selbst- /Nichtselbsterkennung	8
1.2	Urochordaten als Modellorganismen in Immunologie und Entwicklungsbiologie.....	10
1.2.1	Immunologie der Urochordaten.....	11
1.2.2	Selbst-/Nichtselbsterkennung in Urochordaten	13
1.2.2.1	Selbst-/Nichtselbsterkennung in kolonialen Urochordaten	13
1.2.2.2	Selbst-/Nichtselbsterkennung in solitären Urochordaten	14
1.2.2.2.1	Gewebeunverträglichkeit in solitären Urochordaten	14
1.2.2.2.2	Selbststerilität in solitären Urochordaten.....	15
1.2.3	Urochordaten als Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie.....	18
1.3	Ziele dieser Arbeit.....	19
2	Ergebnisse	20
2.1	Identifikation potentieller ciCD94-1 Interaktionspartner mittels des „Yeast Two-Hybrid“ Systems.....	20
2.1.1	Kontrolle der Spezifität der Interaktion der möglichen ciCD94-1 Liganden.....	22
2.1.2	Datenbankanalyse der Expression und Homologie der potentiellen Liganden	24
2.1.3	Überprüfung des Expressionsprofils von pL2 und pL6 durch RT-PCR... 26	
2.1.3.1	Untersuchung der möglichen Co-Lokalisation von ciCD94-1 und seinen potentiellen Liganden im Genom von <i>Ciona intestinalis</i>	26
2.2	Suche nach Individuen-spezifischen Genen in Ovarien von <i>Ciona intestinalis</i>.....	28
2.2.1	Identifikation von <i>Ciona</i> Sequenzen mit Ähnlichkeiten zum Spermienrezeptor HrVC70 aus <i>Halocynthia roretzi</i>	31
2.2.1.1	Variabilität der <i>Ciona</i> Vc- Gene	32
2.2.1.1.1	Variabilität von Vc16.....	33
2.2.1.1.2	Variabilität von Vc182.....	34
2.2.1.1.3	Variabilität von Vc569.....	36

2.2.1.2	Vc16, Vc182 und Vc569 werden in <i>Ciona intestinalis</i> in Oozyten exprimiert...	38
2.2.1.3	Genstrukturen von Vc16, Vc182 und Vc569	40
2.2.2	Identifikation des hochvariablen Transmembranrezeptors vCRL1 in <i>Ciona intestinalis</i>	41
2.2.2.1	Proteinstruktur und genomische Organisation von vCRL1 aus <i>Ciona intestinalis</i>	41
2.2.2.2	Untersuchung zur Variabilität von vCRL1 zwischen verschiedenen <i>Ciona</i> Individuen	43
2.2.2.3	Variabilität von vCRL1 innerhalb eines Individuums	47
2.2.2.4	Expression von vCRL1 in Follikelzellen und Hämocyten von <i>Ciona intestinalis</i>	48
2.2.3	Identifikation eines zweiten Rezeptors mit CCP-Domänen	50
2.2.3.1	Vergleich von vCRL1 und vCRL2	50
2.2.3.2	Die Variabilität von vCRL2 zwischen und innerhalb einzelner <i>Ciona</i> Individuen ist mit der von vCRL1 vergleichbar	55
2.2.4	Die Variabilität ist in <i>Ciona</i> auf eine bestimmte Gruppe von Proteinen beschränkt	56
2.2.5	„Maximum likelihood“ Analyse der Sequenzen mit Hilfe des Programms Codeml	58
3	Diskussion	63
3.1	Systematische Analyse zur Identifikation von immunologisch relevanten Genen	63
3.2	Identifikation von ciCD94-1 und die Suche nach möglichen Interaktionspartnern mit dem „Yeast Two-Hybrid“ System	63
3.3	Selbst-/Nichtselbsterkennung in Invertebraten: Ein Prinzip und viele Mechanismen	65
3.4	Identifikation von variablen Proteinen in den Ovarien von <i>Ciona intestinalis</i>	67
3.4.1	Funktionelle und evolutive Bedeutung der <i>Zona pellucida</i> -Domänen enthaltenden Vc-Gene in <i>Ciona intestinalis</i>	67
3.4.2	Identifikation hoch variabler Rezeptoren mit Ähnlichkeit zu Komplementkontrollrezeptoren	70
3.4.2.1	Sind vCRL1 und vCRL2 zwei hochvariable Allele eines Gens?	71
3.4.2.2	vCRL 1, ein neuer Selbststerilitätsrezeptor in <i>Ciona intestinalis</i>	72
3.5	Basiert die Selbst-/Nichtselbsterkennung in <i>Ciona</i> auf variablen Komplementkomponenten?	75
4	Zusammenfassung	78
5	Material	80
5.1	Organismen	80

5.2	Medien.....	80
5.3	Puffer und Lösungen	82
5.3.1	Allgemeine Lösungen.....	82
5.3.2	Lösungen <i>in situ</i> Hybridisierung	84
5.4	Kits	84
5.5	Enzyme.....	85
5.6	Chemikalien.....	85
5.7	Radioaktive Substanzen	87
5.8	Vektor.....	88
5.9	Antikörper	88
5.10	Oligonukleotide	88
5.11	Geräte.....	91
5.12	Andere Materialien.....	93
5.13	Computerprogramme.....	93
5.14	Sequenzanalyse im Internet	94
6	Methoden.....	96
6.1	Hälterung der Tiere	96
6.2	Isolierung von Nukleinsäuren.....	96
6.2.1	Isolierung genomischer DNA	96
6.2.2	Isolierung von mRNA.....	97
6.2.3	Isolierung von Gesamt-RNA	97
6.2.4	Plasmid Isolierung aus <i>E. coli</i>	97
6.2.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	98
6.3	cDNA-Synthese.....	98
6.4	Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction)	98
6.4.1	Standard-PCR	99
6.4.2	„Nested“- PCR.....	99
6.4.3	„Hotstart“- PCR	100
6.4.4	„Touch-Down“- PCR.....	100
6.4.5	RT-PCR (semiquantitative PCR).....	100
6.4.6	5'RACE PCR mit der Splinkerettenmethode	101
6.4.6.1	Synthese der Splinkerette und ihre Ligation	102
6.4.6.2	Splinkeretten-PCR.....	103
6.4.7	3'RACE	104
6.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	104

6.6	Klonierung	105
6.6.1	Ligation in pGEM-T-Vektor (T/A-Klonierung)	105
6.6.2	Transfektion von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	105
6.6.3	Selektion positiver Klone	106
6.6.3.1	Kolonie-PCR	106
6.6.4	Herstellung von Bakterien Dauerkulturen	106
6.7	„Subtraktive Hybridisierung“	107
6.7.1	Erst- und Zweitstrang cDNA Synthese und Adaptorligation	108
6.7.2	Herstellung der cDNA-Bibliotheken mit Hilfe des QPix Robotersystems	109
6.8	„Yeast Two-Hybrid“ System	110
6.8.1	Charakterisierung der verwendeten Hefestämme und Vektoren	111
6.8.2	Herstellung der „Köder“-Vektoren	112
6.8.3	Herstellung der cDNA-Bibliothek	113
6.8.4	Herstellung kompetenter Hefezellen	114
6.8.5	Transformation kompetenter Hefezellen	114
6.8.6	Screening der cDNA-Bibliothek nach Interaktionspartnern	114
6.8.6.1	Screening der cDNA-Bibliothek durch Kreuzung	114
6.8.6.2	Screening der cDNA-Bibliothek durch Cotransformation	115
6.8.7	Identifikation möglicher Interaktionspartner	116
6.8.8	Isolierung der Plasmide aus Hefe	116
6.8.9	Kontrolle der Spezifität durch Cotransformation	117
6.8.9.1	β -Galaktosidase-Assay mit Cotransformanten	117
6.9	Sequenzierung	118
6.9.1	Sequenzierung mit dem LICOR-Plattensequenzierer	118
6.9.2	Sequenzierung mit dem MEGABace-Kapillarsequenzierer	118
6.10	Southern und Northern Blot Hybridisierung	120
6.10.1	Southern Blot	120
6.10.1.1	Restriktionsverdau der genomischen DNA	120
6.10.1.2	Auftrennung der DNA	120
6.10.1.3	Kapillar-Blot	120
6.10.2	Northern Blot	121
6.10.2.1	Gelauftrennung	121
6.10.2.2	Kapillar-Blot	121
6.10.3	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch „Random Primed Labelling“	121
6.10.4	Hybridisierung	122
6.11	In situ Hybridisierung	122

6.11.1	Sondensynthese.....	123
6.11.2	Hybridisierung von Gewebe	123
6.11.3	Hybridisierung der Parafinschnitte	125
6.12	Sequenzanalysen	127
6.12.1	Allgemeine Sequenzanalyse	127
6.12.2	Allgemeine Analyse der SSH-Datenbank	127
6.12.2.1	Analyse der Sequenzunterschiede zwischen Sequenzen aus den verschiedenen Datenbanken.....	127
6.12.2.2	Analyse der Proteinstruktur der Sequenzen der SSH-cDNA-Bank	128
6.12.3	Sequenzanalyse mit Codeml.....	129
7	Literatur	131
7.1	Publikationen.....	131
8	Anhang	141
8.1	Abbildungen	141
8.2	Sequenzen der potentiellen Kandidaten des „Yeast Two-Hybrid“- System	144
9	Danksagung	147
10	Erklärung.....	148

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
bd	Bande
bp	Basenpaare
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BLASTp	BLAST-Suche Protein gegen Protein
BLASTx	BLAST-Suche translatiert gegen Protein
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
CCP	Complement Control Protein
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
d	Tag
Da	Dalton
DP	Differentialprodukt
dATP	Desoxyadenosinnukleotidtriphosphat
dCTP	Desoxycytosinnukleotidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d. h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal Growth Factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST(s)	„Expressed Sequence Tag(s)“
EtOH	Ethanol
Evtl.	eventuell

G	Guanin
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde
HCl	Salzsäure
<i>in situ</i>	die natürliche Lokalisation
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
JGI	Joint Genome Institute
kb	Kilobasenpaare
kV	Kilovolt
l	Liter
M	molar
mA	Milliampère
MAB	Maleinsäurepuffer
MAB-B	Maleinsäurepuffer mit 1 % BSA
max.	maximal
MetOH	Methanol
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	mikromolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
min	Minute(n)
mol	Mol
mRNA	Messenger-RNA
ms	Millisekunde(n)
NaOH	Natronlauge
NBT	Nitrotetrazoliumblausäurechlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
Ω	Ohm
PAA	Poly-Acrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

rpm	„rounds per minute“
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raum-Temperatur oder Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SD-3	SD/-His/-Leu/-Trp
SD-4	SD/-His/-Trp/-Leu/-Ade
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n) oder sekundär
ss	singlestranded (einzelsträngige)
SSH	Suppression Subtractive Hybridization
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris/HCl-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'- Tetraethylendiamin
T _M	Schmelztemperatur der Primer
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit(s)
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht (weight) pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-glucuronid
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Selbst-/Nichtselbsterkennung

Selbst-/Nichtselbsterkennung ist eine universelle Fähigkeit aller Tiere, zwischen körpereigenen und körperfremden Bestandteilen zu unterscheiden und spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Bereichen des Lebens: (i) bei der Reproduktion, bei der die Gameten den geeigneten Partner für die Befruchtung erkennen müssen; (ii) bei der Erkennung potentieller Pathogene, die in der Lage sind, Krankheiten und die Zerstörung von Gewebe auszulösen; sowie (iii) bei der Erkennung von fremdem Gewebe (Histokompatibilität). Die Erkennung und Entfernung von fremdem Gewebe spielt insbesondere bei kolonial lebenden Organismen eine essentielle Rolle und erlaubt ihnen ihre Individualität zu erhalten.

Theoretisch gibt es nur wenige Möglichkeiten für einen Organismus zwischen Selbst und Nichtselbst zu unterscheiden. Zum einen können „Selbstmarker“ exprimiert werden, die alle eigenen Zellen vor der Zerstörung schützen, während alle Zellen, die keine Selbstmarker besitzen, abgetötet werden. Die andere Möglichkeit besteht darin, fremde Zellen an bestimmten Merkmalen zu erkennen und zu zerstören.

Allerdings ist unser Wissen über die molekularen Wirkungsmechanismen der Selbst-/Nichtselbsterkennung sowohl phylogenetisch als auch funktionell sehr ungleich verteilt. Während über das angeborene Immunsystem von Wirbellosen und im speziellen über die Gewebeunverträglichkeit (Selbst-/Nichtselbsterkennung) in kolonialen Wirbellosen nur sehr wenig bekannt ist, ist unser Wissen über Säugetiere und speziell über ihr adaptives Immunsystem sehr ausgeprägt. Säugetiere machen jedoch nur einen kleinen Teil aller Tierspezies aus. Ein Grund für die ungleiche Verteilung der wissenschaftlichen Erkenntnisse scheint daher eine anthropozentrische Sichtweise gewesen zu sein, die dazu führte, dass ein großer Teil der Bemühungen der Erforschung des adaptiven Immunsystems der Gnathostomen gewidmet wurde (Khalturin, 2002). Erst in letzter Zeit rückte das angeborene Immunsystem und damit andere Taxa in den Fokus der Immunologen.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem von Wirbellosen und Wirbeltieren

Das angeborene Immunsystem spielt als einziger bekannter Verteidigungsmechanismus aller Wirbellosen und als erste unmittelbare Verteidigung in Wirbeltieren eine entscheidende Rolle im Schutz gegen mögliche Pathogene.

Dazu basiert das angeborene Immunsystem auf der dauerhaften Expression von Rezeptoren „PRRs“ (Pattern recognition receptors), die stark konservierte Strukturen „PAMPs“ (pathogen-associated microbial patterns) erkennen und eine entzündliche Immunantwort auslösen (Janeway et al., 2002; Beutler, 2004). Für das angeborene Immunsystem weisen viele Daten darauf hin, dass es sich schrittweise entwickelt hat (Kimbrel und Beutler 2001). Eine Gruppe der wohl am besten charakterisierten PRRs, die Toll-like Rezeptoren, ist schon früh während der Evolution entstanden, und existiert sowohl im Zweig der Protostomier (*Drosophila*) als auch in Deuterostomieren und frühen Metazoen (Cnidaria) (Abb. 1.1) (Bosch et al., 2006; Aikira et al., 2006).

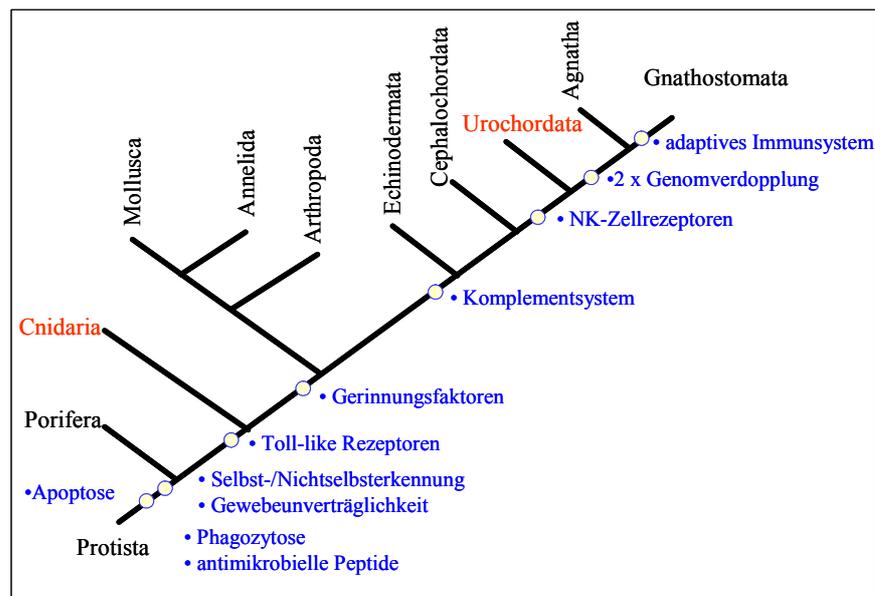


Abb. 1.1 Evolution des Immunsystems. Auftreten wichtiger Schlüsselkomponenten und Ereignisse während der Evolution des Immunsystems (modifiziert nach Khalturin, 2002)

Ursprünglich wurde Toll zuerst in *Drosophila* als entscheidender Rezeptor für das Wahrnehmen von Pilzinfektionen charakterisiert (Lemaitre et al., 1996). Mittlerweile wurden sowohl in *Drosophila* als auch in Säugetieren mehrere Toll-like Rezeptoren beschrieben, die in Säugetieren über LPS, Peptidoglycan und dsRNA verschiedenste PAMPs binden und erkennen können (Aikira et al., 2006). Allerdings spielt in *Drosophila* nur das ursprünglich identifizierte Toll in der Pathogenabwehr eine Rolle.

Alle anderen Toll-like Rezeptoren sind in Entwicklungsprozesse involviert (Beutler, 2004). Dies wirft die Frage auf, ob die ursprüngliche Funktion der Toll-like Proteine in der Entwicklung oder der Immunabwehr bestand.

Ein weiterer Bestandteil des angeborenen Immunsystems von Wirbeltieren, das zu verschiedenen Spezies der wirbellosen Deuterostomiern zurückverfolgt werden kann und die schrittweise Entwicklung des angeborenen Immunsystems verdeutlicht, ist das Komplementsystem. Das Komplementsystem basiert auf verschiedenen humoralen Bestandteilen, die miteinander interagieren können und über mehrere proteolytische Zwischenschritte zu einer entzündlichen Immunantwort, einer Opsonierung (Markierung) von Pathogenen oder ihrer Zerstörung (Lyse) führen (Janeway et al., 2002). Die Aktivierung des Komplementsystems kann über drei verschiedene Wege erfolgen: (i) den klassischen über Antikörperkomplexe; (ii) den alternativen über die Anlagerung von Komponenten des Komplementsystems an Pathogene; oder (iii) durch das Binden von „MBLs“ (Mannose-bindende Lektine) an Pathogene (Abb. 1.2). Eine zentrale Rolle innerhalb des Komplementsystems kommt dabei C3 zu, das in alle drei Aktivierungswege involviert ist (Abb. 1.2) (Janeway et al., 2002).

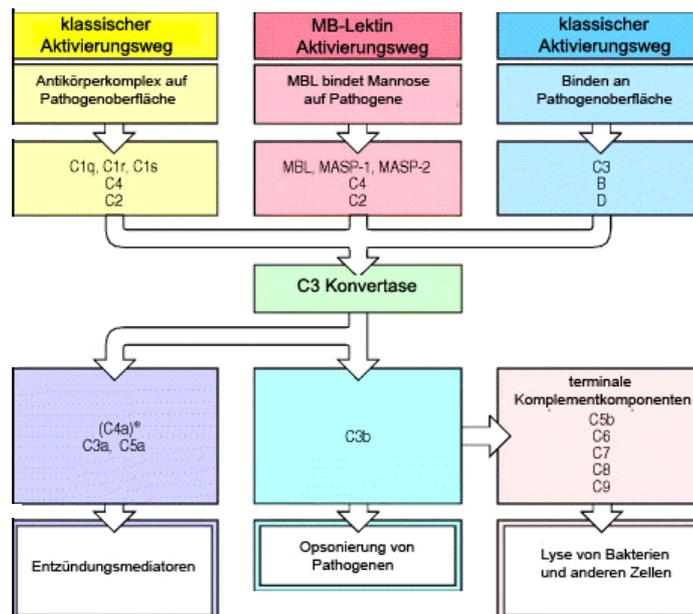


Abb. 1.2 Schematische Darstellung des Komplementsystems. (modifiziert nach Janeway et al., 2002)

Verschiedene Komponenten des Komplementsystems, wie z.B. homologe Proteine zu C3, Faktor B und Komplementrezeptor 3/4, wurden in der Seegurke *Stroglyocentrotus purpuratus* (Al-Sharif et al., 1998; Smith, 1999), dem Cephalochordaten *Branchiostoma belcherii* (Suzuki et al., 2002) und den Urochordaten *Halocynthia roretzi* und *Ciona intestinalis* (Nonaka und Azumi, 1999; Marino et al., 2002) identifiziert und charakterisiert (Abb. 1.1). In diesen Tieren wird das Komplementsystem nicht über den

klassischen Weg, sondern über den alternativen Weg oder durch Mannose-bindende Lektine (MBL) ausgelöst (Abb. 1.2) (Nonaka and Miyazawa, 2002).

1.1.2 Das adaptive Immunsystem von Gnathostomen

In höheren Organismen (Gnathostomen von den Knorpelfischen bis zu den Säugetieren) arbeiten das angeborene und das adaptive Immunsystem zusammen, um eine schnelle und effiziente Immunantwort zu erreichen (Abb. 1.3). Durch das adaptive Immunsystem sind diese Organismen in der Lage, Pathogene, die sich der unmittelbaren Zerstörung durch das angeborene Immunsystem entziehen konnten, zu einem späteren Zeitpunkt spezifisch zu bekämpfen. Zusätzlich ermöglicht das adaptive Immunsystem durch seine Gedächtnisfunktion bei einem zweiten Kontakt, die Pathogene sehr schnell und spezifisch zu bekämpfen (Janeway et al., 2002).

Dazu basiert das adaptive Immunsystem auf einer somatischen Rekombination von Gensegmenten, wodurch ein großes Repertoire an Lymphozyten erzeugt wird, die unterschiedliche Antigenrezeptoren exprimieren. Diese Rezeptoren werden verwendet, um antigene Strukturen auf Krankheitserregern zu erkennen und eine zelluläre Antwort, wie klonale Vermehrung, zelluläre Differenzierung und die Produktion von Antikörpern, zu erzeugen (Janeway et al., 2002). Innerhalb der adaptiven Immunantwort spielen drei Antigenrezeptoren eine zentrale Rolle: Immunoglobuline (Ig), T-Zellrezeptoren und die Moleküle des MHC („major histocompatibility complex“), welche aus einem antigenbindenden Teil und einem Teil mit anderen Funktionen bestehen.

Während der frühen Entwicklungsstadien der Vorgänger der T- und B- Lymphozyten werden verschiedene Gruppen von prototypischen Immunoglobulinen (Ig) mit V („Variable“), D („Diversity“) und J („Joining“) Gensegmenten so umgeordnet, dass verschiedene antigenbindende Regionen von T- und B-Zellrezeptoren entstehen. Bei der Rekombination der Gensegmente spielen zwei lymphoid spezifische RAG (recombination-activating gene) Proteine eine zentrale Rolle (Janeway et al., 2002). Da durch die Zufälligkeit dieser Rekombination auch Rezeptoren entstehen können, die autoreaktiv sind, müssen diese schon an ihrem Entstehungsort inaktiviert werden (Janeway et al., 2002).

1.1.3 Die Evolution des adaptiven Immunsystems

Einer der faszinierendsten Aspekte innerhalb der Immunbiologie ist die überraschend ungleichmäßige Verteilung von adaptivem und angeborenem Immunsystem innerhalb des Tierreichs. So gibt es keinen schrittweisen Wechsel vom angeborenen Immunsystem der Invertebraten zum adaptiven Immunsystem der Gnathostomen. Ebenso lassen sich in Agnathen keine der Schlüssel-moleküle des adaptiven Immunsystems der Gnathostomen, wie z.B. somatisch veränderbare T- und B-Zellrezeptoren, RAG-1, RAG-2 und MHC-Gene, finden (Abb. 1.1 und Abb. 1.3) (Cooper et al., 2006).

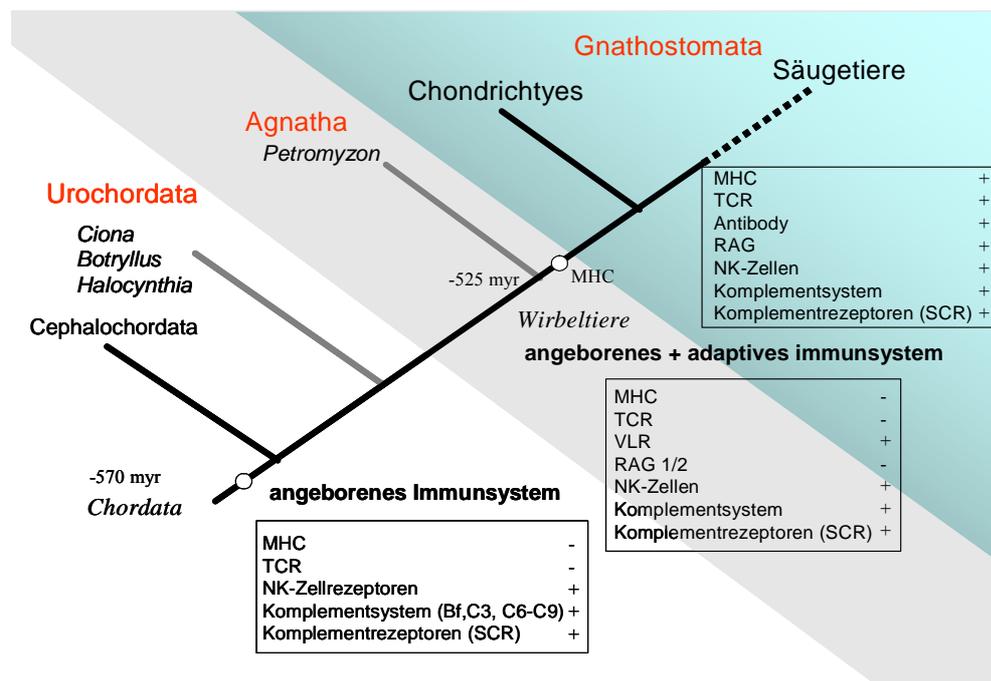


Abb. 1.3 Evolution des Immunsystems innerhalb der Chordaten. Entwicklung der Chordaten mit überraschend plötzlichem Auftreten des adaptiven Immunsystems in den Wirbeltieren (modifiziert nach Khalturin et al., 2004).

Dies ist besonders auffällig, da Chordaten einen monophyletischen Ursprung haben (Berrill, 1955; Delsuc, 2006) und man normalerweise davon ausgehen würde, Vorläufer dieses Systems in ursprünglicheren Chordaten zu finden. Das vermeintlich plötzliche Auftauchen des adaptiven Immunsystems (Klein, 1998) mit seinen drei Antigenrezeptoren führte zur Vorstellung des immunologischen „Big Bang“ (Janeway et al., 2002).

Trotz dieser anscheinend sprunghaften Entwicklung ist das adaptive Immunsystem der Gnathostomen tief mit dem angeborenen Immunsystem verbunden (Beutler, 2004). So werden antigenpräsentierende MHC-Klasse I und II Moleküle auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert (Janeway et al., 2002). Zusätzlich sind

Makrophagen, Zellen des angeborenen Immunsystems, für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort von entscheidender Bedeutung (Hoffmann et al., 1971; Dutton et al., 1970). Ein weiteres Beispiel für die Verknüpfung von adaptivem und angeborenem Immunsystem sind NK-Zellen (natural killer cells), die ebenfalls zum angeborenem Immunsystem gehören, aber Rezeptoren exprimieren, die bestimmte Typen von MHC-Klasse I Molekülen auf körpereigenen Zellen erkennen (McQueen und Parham, 2002; Steinle et al., 2001).

Auf Grund der starken Verknüpfung zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem, ist es trotz des Fehlens aller Schlüsselkomponenten des adaptiven Immunsystems in den Agnathen und Invertebraten eher unwahrscheinlich, dass solch ein komplexes System plötzlich auftauchte. Daher bleibt es offen, ob man die evolutive Entwicklung verschiedener Elemente des adaptiven Immunsystems bis in einfachere, heute noch lebende Organismen zurückverfolgen kann. Folgt man allerdings der Idee von Forey (1993) ist dieses eher unwahrscheinlich, da mit dem Aussterben der Ostracodermen wichtige Vorläufer des rekombinatorischen Immunsystems verloren gingen (Forey und Janvier, 1993, Cooper et al., 2006).

Versuche, den Ursprung des adaptiven Immunsystems durch das Suchen von homologen Genen („homolog hunting“) und Datenbankanalysen zu finden, stellten sich als sehr schwierig dar, da sowohl T-Zellrezeptoren, MHC-Moleküle als auch viele unveränderliche Rezeptoren von NK-Zellen Ig-like Domänen besitzen, die in vielen Proteinen innerhalb der Wirbellosen weit verbreitet sind (Klein, 2006).

Trotzdem konnten in letzter Zeit einige interessante variable Moleküle mit Ig-Domänen identifiziert werden, die potentiell eine Rolle in der Erkennung von Pathogenen spielen. Ein sehr interessantes Gen kodiert in *Drosophila* für Dscam (Down's syndrom cell adhesion molecule), ein Protein mit mehreren Ig-like Domänen, welches ursprünglich als wichtig für die Organisation der neuronalen Vernetzung der Nervenzellen in *Drosophila* entdeckt wurde (Schmucker et al., 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass Dscam ebenfalls in Hämocyten exprimiert wird, und dass Hämocyten, die kein Dscam exprimieren, eine eingeschränkte Fähigkeit zur Phagozytose von Bakterien aufweisen (Watson et al., 2005). Dabei kann variables Splicing in *Dscam* potentiell zu 18000 unterschiedlichen extrazellulären Domänen führen, die sowohl im Nervensystem als auch in Hämocyten exprimiert werden (Watson et al., 2005). Eine andere potentiell interessante und beeindruckend variable Genfamilie „VCBPs“ (V region-containing chitin-binding proteins) mit Ig-Domänen wurde in *Amphioxus* (Cephalochordata) entdeckt (Cannon et al., 2002). VCBP kodiert für ein Protein mit V Typ Ig-Domänen

und einer Chitin-Binde-Domäne und könnte eine Rolle bei der Patogenabwehr spielen (Cooper et al., 2006). Dies könnte darauf hindeuten, dass Wirbellose vielleicht andere Methoden verwenden, die nicht auf somatischer Rekombination beruhen, um eine Vielzahl variabler Pathogenrezeptoren zu produzieren.

Trotzdem scheinen diese variablen Proteine und andere Proteine mit Ig-like Domänen nicht der evolutive Ursprung des adaptiven Immunsystems zu sein, da sich die antigenbindende Domäne (peptide binding domain, PBD) der MHC-Moleküle nicht von Ig-like Domänen ableiten lassen, sondern aus anderen, unbekanntem Quellen hervorgegangen sind (Klein und O'hUigin, 1993). Deshalb ist die entscheidende Frage bei der Suche nach dem Ursprung des MHC-Komplexes nicht die Frage nach der Herkunft der Immunoglobulin-like Domänen, sondern die nach dem Vorläufer der PDB (Klein, 2006).

Allerdings wurde vor kurzem der wahrscheinliche Ursprung einer anderen Schlüsselkomponente des adaptiven Immunsystems gefunden. Neuere Erkenntnisse deuten daraufhin, dass die Kernregion von RAG-1 Ähnlichkeiten mit Transposasen der eukaryontischen *Transib* Superfamilie aufweist, die in Seegurken, Seeanemonen, Lanzettfischen und dem Süßwasserpolyphen Hydra gefunden wurden (Kapitonov und Jurka, 2005). Dies unterstützt die Hypothese, dass der Ursprung des V(D) J Rekombinationsmechanismus in einem Transposase ähnlichen Mechanismus lag (Cooper, 2006).

Kürzlich konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass auch kieferlose Wirbeltiere (Agnathen), obwohl sie keine der Schlüsselmoleküle des adaptiven Immunsystems der Gnathostomen aufweisen, ein adaptives Immunsystem besitzen. Allerdings beruht dieses nicht auf der Rekombination von Ig V, D und J Segmenten, sondern auf der somatischen Rekombination von unterschiedlichen LRR (leucine-rich-repeat) Elementen (Abb. 1.3). Das grundlegende Prinzip des Mechanismus der Rekombination konnte aber noch nicht aufgeklärt werden (Pancer et al., 2004; Alder et al., 2005). Dies wirft einige interessante Fragen auf:

- Wie konnten in zwei phylogenetisch nah verwandten Spezies zwei auf unterschiedlichen Mechanismen basierende, adaptive Immunsysteme entstehen?
- Was sind und waren die Schlüsselereignisse bei der Entstehung eines adaptiven Immunsystems?
- War der Einbau von Transposasen und Transposons ein Schlüsselereignis bei der Entstehung des rekombinatorischen Immunsystems?

- Besteht in Agnathen zwischen dem adaptiven Immunsystems und dem angeborenen Immunsystem ein ebenso hoher Grad an Vernetzung wie in Gnathostomen?
- Ist vielleicht in anderen Spezies, die sich entwicklungsgeschichtlich viel früher von den Wirbeltieren abgespalten haben, eine andere Form eines adaptiven Immunsystems entstanden?

1.1.4 Alloimmunität und Selbststerilität als Teil der Selbst-/Nichtselbsterkennung

In Metazoen ist die Fähigkeit zwischen Selbst und Nichtselbst zu unterscheiden nicht nur als Verteidigung gegen potentielle Pathogene, sondern oft auch zum Erhalt der eigenen Individualität wichtig (Buss, 1987). Sie kann selbst in stammesgeschichtlich einfachen Organismen wie Schwämmen und Nesseltieren beobachtet werden (Humphreys, 1994; Chadwick-Furman und Rinkevich., 1994). Dabei wird zwischen zwei Formen der Nichtselbsterkennung unterschieden, (i) der Selbststerilität, die für viele hermaphrodite Arten typisch ist, und (ii) der Alloimmunität, bei der transplantiertes Körpergewebe abgestoßen wird (Abb. 1.4).

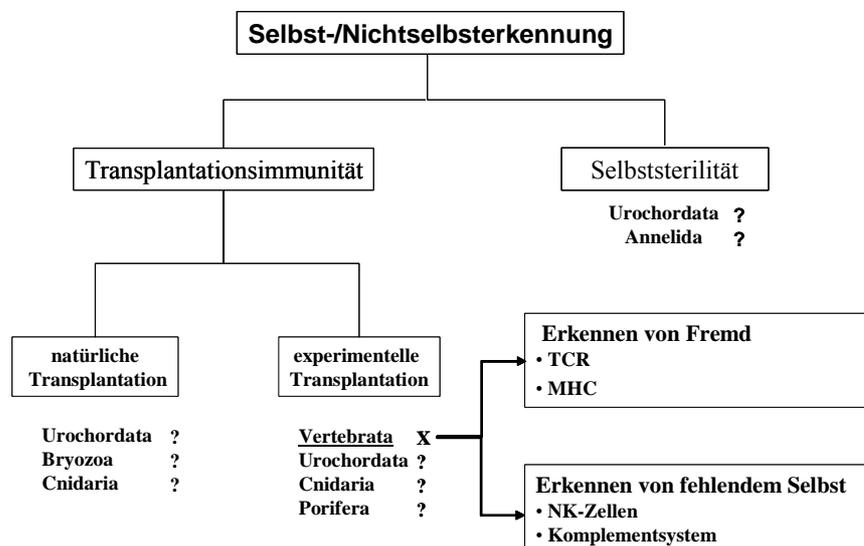


Abb. 1.4 Verschiedene Varianten der Selbst-/Nichtselbsterkennung innerhalb des Tierreichs (modifiziert nach Khalturin, 2002). ?: Mechanismus der Selbst-/Nichtselbsterkennung konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden.

Diese Transplantation kann sowohl natürlich auftreten als auch experimentell herbeigeführt werden. In vielen marinen Invertebraten, wie z.B. Cnidaria, Bryozoa und

Urochordata, die um beschränktes Hartsubstrat konkurrieren, ist die natürliche Transplantation von Gewebe ein häufig auftretendes Phänomen (Abb. 1.4) (Hughes et al., 2004; Humphreys, 1994; Chadwick-Furman und Rinkevich., 1994). Deshalb existieren in allen genannten Tiergruppen verschiedene Mechanismen, um die Übertragung von Zellen von einem Individuum in ein anderes zu unterbinden. Dadurch bewahren die Organismen ihre genetische Integrität und Individualität.

Obwohl das Phänomen der Gewebeunverträglichkeit schon sehr früh beschrieben (Bancroft, 1903) und auf zellulärer Ebene gut untersucht wurde (Rinkevich et al., 1998; Taneda et al., 1985), konnte in keinem wirbellosen Organismus der molekulare Wirkungsmechanismus vollständig aufgeklärt werden. Dies gelang bisher nur in Wirbeltieren mit ihrem auf MHC-Klasse Molekülen gestützten System (Janeway et al., 2002). Allerdings können Organismen dieser Tiergruppe keiner natürlichen Transplantation unterliegen, und so scheint dieser Mechanismus nur ein Nebeneffekt der allgemeinen Fähigkeit des adaptiven Immunsystems zu sein, alles Fremde zu erkennen.

Selbststerilität wurde sowohl für Vertreter des Pflanzen- als auch des Tierreichs beschrieben und tritt vor allem bei Arten auf, die gleichzeitig weibliche und männliche Gameten ausbilden. So wird dafür gesorgt, dass es nicht zu einer Verminderung der genetischen Vielfalt innerhalb einer Population sowie Degenerationserscheinungen kommt. In Pflanzen konnte die Wirkungsweise der Selbststerilität für verschiedene Arten aufgeklärt werden. So beruht die Selbststerilität in allen untersuchten Pflanzen auf dem Prinzip des fehlenden Selbst („missing self concept“), wobei sich der Wirkungsmechanismus zwischen verschiedenen Pflanzenfamilien unterscheidet. In Brassicaceen sind die variablen Liganden und Rezeptoren des S-Lokus für die Kontrolle der Selbststerilität verantwortlich. Diese unterscheiden sich von den Molekülen, die in den Papaveraceen für die Selbststerilität verantwortlich sind (Nasrallah, 2005). Für tierische Organismen wurden bisher nur wenige Moleküle gefunden, die potentiell für die Selbstunfruchtbarkeit verantwortlich sind (Khalturin et al., 2004; Sawada et al., 2004).

1.2 Urochordaten als Modellorganismen in Immunologie und Entwicklungsbiologie

Urochordaten sind Organismen, die zwei morphologisch unterschiedliche Entwicklungsstadien durchlaufen. Ein kurzzeitiges pelagisches Larvenstadium wird dabei durch ein sessiles, filtrierendes Erwachsenenstadium abgelöst (Abb. 1.5). Larven der Urochordaten besitzen den prototypischen Körperbauplan der Chordaten mit einem dorsalen Neuralrohr und einem axialen Notochord (Abb. 1.5) (Satoh, 1994).

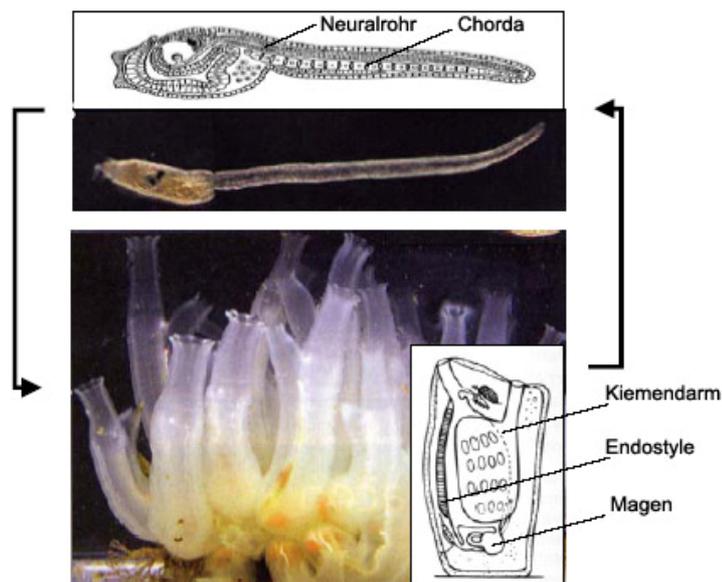


Abb. 1.5 Entwicklungszyklus des Urochordaten *Ciona intestinalis* (modifiziert nach Khalturin, 2002).

Adulte Urochordaten teilen ebenfalls wichtige Merkmale mit den anderen Chordaten. So entwickelt sich das Endostyl oder die Wimperngrube des Kiemendarms aus dem Prostigmata, einer homologen Struktur der Kiemenbögen. Dies führte zu der Annahme, dass Vertebraten und Urochordaten den gleichen monophyletischen Ursprung haben (Berril, 1955). Neuere Erkenntnisse deuten sogar darauf hin, dass sich die Urochordaten später als die Cephalochordaten von der Linie der Chordaten abgespalten haben und damit die nächsten lebenden Verwandten der Wirbeltiere sind (Delsuc et al., 2006). Damit nehmen sie eine Schlüsselposition für das Verständnis der Entwicklung der Wirbeltiere und ihres Immunsystems ein.

1.2.1 Immunologie der Urochordaten

Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, dass Urochordaten, genau wie andere Invertebraten, nicht in der Lage sind, Antigen-spezifische Antikörper zu synthetisieren (Janeway et al., 2002). Allerdings deuten viele Ergebnisse darauf hin, dass Urochordaten ein gut und einzigartig entwickeltes angeborenes Immunsystem besitzen (Iwanaga und Lee, 2005). In *Halocynthia roretzi* zeigen Hämozyten nach Stimulation verschiedene zelluläre Reaktionen wie z.B. Aggregation, Phagozytose, Zytotoxizität und eine Phenoloxidasereaktion (Takahashi et al., 1995; Cooper et al., 2002). Dabei spielt die Phagozytoseaktivität von Hämozyten eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität sowohl von Invertebraten als auch von Wirbeltieren. In Urochordaten kann sowohl Opsonin abhängige als auch unabhängige Phagozytose beobachtet werden. Dabei können C-type Lektine und C3 als Opsonine fungieren (Nonaka und Azumi, 1999).

Wie in allen untersuchten Organismen wurden auch in Urochordaten Toll-like Rezeptoren und Komponenten dieses Signalweges gefunden. Zusätzlich konnten auch ein mögliches TNF Gen (tumor necrosis factor), drei Gene mit Homologie zu TNF-Rezeptoren und drei Gene mit Ähnlichkeit zu Interleukin-1-Rezeptoren identifiziert werden (Azumi et al., 2003). Neben diesen Rezeptoren wurden in letzter Zeit mehrere bereits bekannte und unbekannte Genfamilien identifiziert, die ein hohes Maß an Variabilität aufweisen und möglicherweise in immunologische Prozesse involviert sind. Darunter befinden sich Homologe der VCBP Genfamilie aus *Amphioxus* (Azumi et al., 2003), ciS7, ein sekretiertes Protein mit mehreren EGF- (epidermal growth factor) Domänen und ciMeta2, ein Protein mit drei Thrombospondin-Domänen, das während der Metamorphose in *Ciona intestinalis* aktiviert wird (Khalturin et al., 2005).

Urochordaten besitzen ein hochentwickeltes Komplementsystem. So konnten in *Halocynthia roretzi* Homologe zu C3, MASP und Faktor B identifiziert werden (Nonaka and Azumi, 1999). Außerdem konnte biochemisch gezeigt werden, dass Urochordaten sowohl den alternativen als auch den Lektin-abhängigen Komplementaktivierungsmechanismus besitzen (Smith et al., 1999). Zusätzlich konnte durch eine computergestützte genomweite Suche nach möglichen immunologisch relevanten Genen gezeigt werden (Azumi et al., 2003), dass *Ciona intestinalis* über zahlreiche Homologe zu Proteinen, die in das Komplementsystem involviert sind, verfügt, wie z.B. Ficolin, MASP, Bf/C2, C3, C4, C5. Überraschenderweise konnte dabei auch ein Homolog von C1q identifiziert werden, das normalerweise in Säugetieren Antikörper bindet und in die Aktivierung des klassischen

Komplementsystems involviert ist (Dodds, 2002; Janeway et al., 2002). Allerdings kann C1q auch mit Mitgliedern der Pentaxin Genfamilie interagieren, welche in *Ciona intestinalis* gefunden wurde (Iwanaga und Lee, 2005). Die Zahl identifizierter möglicher Komplementkomponenten übertrifft in ihrer Anzahl sogar die 35 Gene des Komplementsystems der Säugetiere (Azumi et al., 2003). Verschiedene Erkenntnisse deuten darauf hin, dass zu Beginn der Wirbeltierentwicklung zwei aufeinander folgende Genomduplikationen stattgefunden haben (Corbo et al., 2001). Daher wird angenommen, dass die genetische Ausstattung der Urochordaten, jener der Wirbeltiere ähnelt, aber weniger komplex ist (Dehal et al., 2002). Für das Komplementsystem scheint dies jedoch nicht zutreffend, da aus noch nicht verstandenen Gründen diese Gruppe von Molekülen eine starke Zunahme erfahren hat (Khalturin et al., 2004).

Interessanterweise konnten in dem Genom von *Ciona intestinalis* mehrere mögliche Transmembranproteine identifiziert werden, die extrazelluläre Ig- oder CTL-Domänen und intrazelluläre ITIM- (immunreceptor tyrosine-based inhibitory motif) oder ITAM- (immunreceptor tyrosine-based activation motif) Domänen besitzen (Azumi et al., 2003). Diese Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regelung der Immunantwort in Wirbeltieren. Viele von ihnen werden auf NK-Zellen exprimiert (Ravetch und Lanier, 2000). Zusätzlich konnte für *Botryllus schlosseri* gezeigt werden, dass ein CD94/NKRP-1 Homolog (bsCD94-1) auf einem bestimmten Blutzelltypen exprimiert wird (Khalturin et al., 2002). Auch im Genom und den ESTs von *Ciona intestinalis* wurde ein CD94/NKRP-1 Homolog identifiziert, allerdings lässt sich der aus den Wirbeltieren bekannte Ligand der MHC-Klasse (HLA-E) nicht finden (Khalturin et al., 2004). Diese wichtigen Erkenntnisse und die Beobachtung, dass Hämozyten in verschiedenen Urochordaten, wie z.B. *Ciona intestinalis*, *Styela plicata* und *Halocynthia roretzi*, *in vitro* zytotoxische Aktivität gegen xenogene and allogene Zellen zeigen, deuten darauf hin, dass NK-Zellen schon vor der Abspaltung von Wirbeltieren und Urochordaten entstanden sind (Abb. 1.1 und Abb. 1.3) (Parrinello, 1996; Fuke, 1980). Da aber in Wirbeltieren identifizierte Liganden vieler Rezeptoren der NK-Zellen in Urochordaten zu fehlen scheinen, stellt sich die Frage, welche Moleküle als Interaktionspartner dienen und ob an Hand dieser neue Kenntnisse über die Evolution des adaptiven Immunsystems gewonnen werden können.

1.2.2 Selbst-/Nichtselbsterkennung in Urochordaten

Auf Grund der monophyletischen Herkunft von Wirbeltieren und Urochordaten wurde über lange Zeit angenommen, dass der Mechanismus der Selbst-/Nichtselbsterkennung in diesen Gruppen ähnlich wäre und die Selbst-/Nichtselbsterkennung in Urochordaten möglicherweise das ursprüngliche System darstellt (Saito et al., 1994; Burnet 1971). Darüber hinaus sind Urochordaten die den Wirbeltieren am nächsten verwandte Tiergruppe, deren Mitglieder eine natürliche Transplantation durchlaufen können. Aus diesem Grund hat sich *Botryllus schlosseri*, ein kolonial lebender Urochordat, zu einem wichtigen Modellorganismus für die Erforschung der Selbst-/Nichtselbsterkennung in wirbellosen Tieren und der Suche nach Vorläufern des MHC Komplexes entwickelt (Khalturin et al., 2003). Nach neueren Erkenntnissen ist es allerdings wahrscheinlich, dass das auf MHC-Molekülen basierende Selbst-/Nichtselbsterkennungssystem ein spezifisches Merkmal für alle Gnathostomen ist, während Agnathen und Wirbellose einen oder mehrere unterschiedliche Mechanismen zur Selbsterkennung besitzen (Khalturin et al., 2005).

1.2.2.1 Selbst-/Nichtselbsterkennung in kolonialen Urochordaten

Schon im Jahr 1903 publizierte Bancroft seine Ergebnisse über Fusionsversuche an dem kolonial lebenden hermaphroditen Tunikaten *Botryllus schlosseri* (Bancroft, 1903). Er zeigte, dass zwei Stücke aus einer einzelnen Botrylluskolonie fusionierten und eine Kolonie bildeten, während Teile von unterschiedlichen Kolonien nicht zusammenwachsen konnten (Bancroft, 1903). Allerdings erregte diese Arbeit nicht viel Aufmerksamkeit. Erst als Oka und Watanabe 1957 an *Botryllus primigenus* zeigten, dass diese Form von Selbsterkennung unter genetischer Kontrolle steht (Oka und Watanabe, 1957), rückte das Phänomen wieder in das Interesse der Wissenschaft. Mittlerweile hat sich *Botryllus spec.* zum am besten untersuchten wirbellosen Modellorganismus für Selbst-/Nichtselbsterkennung entwickelt. Klassische genetische Experimente haben gezeigt, dass die Selbsterkennung von einem einzelnen FU/HC Locus (fusibility/histocompatibility) mit mehreren kodominant exprimierten Allelen kontrolliert wird (Weissman et al., 1990; Scofield et al., 1982). Zusätzlich weisen Daten darauf hin, dass eine Verknüpfung zwischen dem FU/HC Locus und dem Locus besteht, der die Selbststerilität in *Botryllus* kontrolliert (Oka and Watanabe, 1967; Oka 1970; Saito et al., 1994). Interessanterweise sind Botrylluskolonien normalerweise für den FU/HC Locus heterozygot und im Gegensatz zur Selbst-/Nichtselbsterkennung in Wirbeltieren, reicht eine Übereinstimmung in einem Allel, um eine Fusion zu

ermöglichen (Khalturin et al., 2004). In verschiedenen *Botrylliden* führt eine Injektion von allogenem Blutplasma in das Blutgefäßsystem zu einer Abstoßungsreaktion (Taneda und Watanabe, 1982). Darüber hinaus kann eine abstoßungsspezifische Reaktion der Hämocyten durch eine Inkubation im Blutplasma von nicht kompatiblen Kolonien herbeigeführt werden (Ballarin et al., 1995). Dies zeigt, dass eine lösliche Komponente im Blutplasma von *Botryllus* als Selbst-/Nichtselbstmarker fungiert.

Mittlerweile konnten mehr als 1Mb des potentiellen FU/HC Lokus sequenziert und ein mögliches FU/HC Gen (*cFU/HC*) identifiziert werden (De Tomaso et al., 2005). Das *cFU/HC*-Protein besteht aus einem Signalpeptid gefolgt von einer EGF-, zwei Ig-Domänen, und einer Transmembranregion und zeigt eine hohes Maß an interindividueller Variabilität. Das Gen wird sowohl als Transmembranprotein als auch als sekretiertes Protein in Hämocyten und den Epithelien der Ampuli, nicht aber in den Geschlechtsorganen exprimiert. Fusionsexperimente haben gezeigt, dass durch Übereinstimmung und Unterschiede in *cFU/HC*-Allelen der Ausgang des Fusionsexperiments vorhersagt werden kann (De Tomaso et al., 2005). Allerdings wurde weder ein Homolog von *cFU/HC* (De Tomaso et al., 2005), noch eine mit dem FU/HC Lokus vergleichbare Region im *Ciona intestinalis* und *Ciona savignyi* Genom gefunden (De Tomaso und Weissman, 2003). Daraus ergibt sich die Frage, ob es sich bei dem auf *cFU/HC* basierenden Selbsterkennungsmechanismus aus *Botryllus* um einen für Urochordaten spezifischen oder um einen artspezifischen Mechanismus handelt.

Ebenfalls muss auf Grund bisheriger Kenntnisse davon ausgegangen werden, dass das *cFU/HC*-Protein trotz seiner Ig-Domänen kein Homolog oder Vorläufer von MHC-Klasse-Molekülen ist, was zusätzlich darauf hindeutet, dass der Selbst-/Nichtselbsterkennungsmechanismus in Gnathostomen keine wesentliche evolutive Gemeinsamkeit mit der Koloniespezifität in *Botryllus* hat (Klein, 2006).

1.2.2.2 Selbst-/Nichtselbsterkennung in solitären Urochordaten

1.2.2.2.1 Gewebeunverträglichkeit in solitären Urochordaten

Neben den recht gut untersuchten Selbst-/Nichtselbsterkennungsreaktionen in *Botryllus* zeigen auch viele nicht koloniale Urochordaten, obwohl sie keiner natürlichen Transplantation unterliegen, Gewebeunverträglichkeitsreaktionen während Transplantationsexperimenten (Abb. 1.4). So wurde in *Styela plicata* ein mit der Gewebeunverträglichkeit in Wirbeltieren vergleichbares Phänomen beobachtet (Raftos et al., 1987; Raftos, 1990). Allogenetische Tunikatransplantationen führen zu einer

Abstoßung, während isogenetische Tunikatransplantate toleriert werden. Interessanterweise scheint die Abstoßung von sekundären allogenen Tunikatransplantaten vom selben Tier schneller als bei der primären Transplantation zu erfolgen, was für ein Alloimmungedächtnis in *Styela* spricht (Raftos et al., 1987). Eine Abstoßung von allogenetischen Tunikatransplantaten konnte auch in *Ciona intestinalis* beobachtet werden (Reddy et al., 1975). In *Halocynthia roretzi* konnte eine andere Form von Gewebeunverträglichkeit gezeigt werden. Dabei kommt es beim Kontakt von Hämozyten aus zwei allogenen Tieren zu einer schnellen zytotoxischen Reaktion (ACR, „allogenic cytotoxic reaction“), bei der die Blutzellen lysiert werden (Arai et al., 2002). Diese Reaktion wird genetisch von polymorphen Allelen auf ein oder zwei Loci gesteuert (Fuke und Numakunai, 1985). Dies zeigt, dass auch in nicht kolonial lebenden Urochordaten gewebespezifische Selbst-/Nichtselbsterkennung auftritt. Einige Bestandteile der Steuerung der ACR scheinen auch in die Steuerung der Selbststerilität involviert zu sein (Fuke, 1990). Eine direkte Verbindung zwischen Selbststerilität und ACR konnten in *Halocynthia* durch Arai und Kollegen gezeigt werden (Arai et al., 2001). So sind monoklonale Antikörper gegen verschiedene Epitope in N-glykosidisch verknüpften Kohlenhydraten auf Glykoproteinen in der Lage, sowohl die ACR als auch die Befruchtung zu blockieren (Arai et al., 2001).

1.2.2.2 Selbststerilität in solitären Urochordaten

Die zweite Art der Selbst-/Nichtselbsterkennung in Form der Selbststerilität ist in solitär lebenden Urochordaten weit besser untersucht. *Ciona intestinalis*, *Halocynthia roretzi* und viele andere solitäre Urochordaten sind Hermaphroditen und haben einen gut belegten, aber auf molekularer Ebene nicht verstandenen Mechanismus zur Blockierung der Selbstbefruchtung (Murabe und Hoshi, 2002).

In den Deuterostomiern ist die Befruchtung ein präzise kontrollierter Mechanismus, bei dem das Spermium an die *Zona pellucida* bzw. die Vitellinhülle der Oozyte bindet und eine Akrosomenreaktion durchläuft. Bei der Akrosomenreaktion werden verschiedene Lysine vom Spermium freigesetzt, die für die Penetration der *Zona pellucida* benötigt werden (Sawada, 2002). Diese Bindung und Akrosomenreaktion ist in vielen marinen Invertebraten artspezifisch und wurde sehr gut für verschiedene Abalonearten untersucht (Swanson et al., 2001; Galindo et al., 2003). In *Halocynthia roretzi* scheinen jedoch Lysine keine Rolle bei der Penetration der Vitellinhülle zu spielen, sondern eher das 26S ähnliche Proteasom, welches während der Akrosomenreaktion freigesetzt wird (Sakai et al., 2003).

Schon im frühen 20. Jahrhundert fand Morgan heraus (Morgan, 1923), dass intakte Oozyten von *Ciona intestinalis* selbststeril sind. Durch Entfernung der Vitellinhülle oder Behandlung mit schwach saurem Meerwasser (pH 2-3) kann diese Blockierung der Selbstbefruchtung aufgehoben werden (Morgan, 1923; Murabe und Hoshi, 2002). Diese Ergebnisse konnten auch für *Halocynthia roretzi* bestätigt werden, wo schwach saures Meerwasser und Behandlung mit Proteasen ebenfalls zum Verlust der Selbststerilität führt (Fuke und Numakunai, 1996; Sawada et al., 2004). Daher scheint in beiden Spezies die Vitellinhülle der Ort der Selbst-/Nichtselbsterkennung zu sein. Diese Eigenschaft der Vitellinhülle basiert in *Ciona intestinalis* hauptsächlich auf ihrer Fähigkeit, das Binden von autologen Spermien zu verhindern (Kawamura et al., 1987). Allerdings scheint ein weiterer Mechanismus darin zu bestehen, gebundene autologe Spermien zu inaktivieren (Kawamura et al., 1987).

In *Ciona intestinalis* und *Halocynthia roretzi* werden die Oozyten erst in der letzten Phase der Oozytenreifung nach dem GVBD (germinal vesicle breakdown) selbststeril (Fuke et al., 1996; De Santis et al., 1991). Beim Erlangen der Selbststerilität spielen in *Ciona intestinalis* Follikelzellen, die die Eizelle umgeben (Abb. 1.6), eine entscheidende Rolle, da das Entfernen der Follikelzellen das Erlangen der Selbststerilität verhindert (De Santis et al., 1991; Pinto et al., 1995).

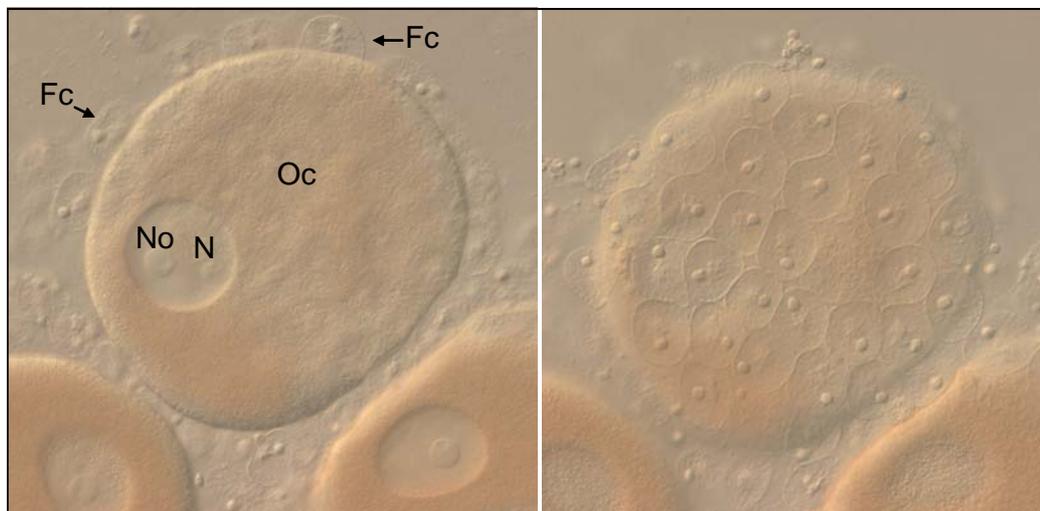


Abb. 1.6 Zwei Fokusebenen einer Oozyte mit Follikelzellen aus *Ciona intestinalis*. Fc: Follikelzellen; Oc: Oozyte; No: Nukleolus; N: Nukleus

Dieser Vorgang ist strikt Individuum-spezifisch, da die Selbststerilität nur auftritt, wenn Follikelzellen und Oozyten vom gleichen Tier stammen (Pinto et al., 1995). Für *Ciona intestinalis* wurde vorgeschlagen, dass an der Übertragung von Selbstdeterminanten *Cihsp 70* beteiligt ist. Dabei soll *Cihsp70* Peptide an die Zelloberfläche transportieren,

die durch die Aktivität des Proteosoms entstanden sind (Marino et al., 1998; Marino et al., 1999). Trotz dieser Beobachtungen konnte bisher in *Ciona intestinalis* kein Molekül als Kandidat für eine Schlüsselrolle in der Selbst-/Nichtselbsterkennung ermittelt werden. Allerdings konnte durch Kreuzungsexperimente gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Situation in *Botryllus* die Selbststerilität in *Ciona intestinalis* auf genetischer Ebene von mehreren Loci kontrolliert wird und daher mehrere Proteine an der Selbststerilität von *Ciona intestinalis* beteiligt sind (Murabe und Hoshi, 2002).

Im Gegensatz zur Situation in *Ciona intestinalis*, wo bisher kein Molekül für die Selbststerilität identifiziert werden konnte, wurde in *Halocynthia roretzi* ein Protein als Kandidat für die Selbst-/Nichtselbsterkennung identifiziert (Sawada et al., 2004). Das Protein HrVC70 wurde ursprünglich als Spermienrezeptor identifiziert, der durch ein Ubiquitin/Proteasomen System des Spermiums abgebaut wird und so die Penetration der Vitellinhülle ermöglicht (Sawada et al., 2002). Dabei wird HrVC70 als das Vorläuferprotein HrVC120 exprimiert, das ein Signalpeptid, 13 EGF-Domänen und eine Transmembrandomäne besitzt, und durch proteolytische Spaltung innerhalb der 13 EGF-Domäne zu HrVC70 prozessiert wird. HrVC70 setzt sich aus dem Signalpeptid und 12 EGF-Domänen zusammen (Abb. 1.7) (Sawada et al., 2004).

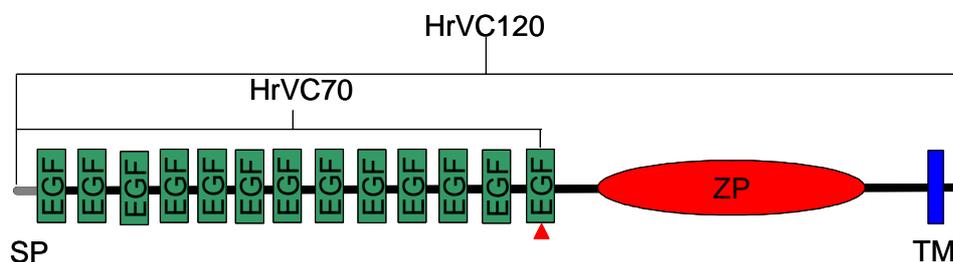


Abb. 1.7 Proteinstruktur von HrVC120 bzw. HrVC70. SP: Signalpeptid; ZP: Zona pellucida-Domäne; EGF: EGF (epidermal growth factor)-Domäne; TM: Transmembrandomäne; rotes Dreieck: proteolytische Schnittstelle

HrVC70 wird durch Behandlung der Oozyten mit schwach saurem Meerwasser aus der Vitellinhülle gelöst, was zur Aufhebung der Selbststerilität führt (Sawada et al., 2004). Eine Vorbehandlung von Spermien mit analogen und nicht mit autologen HrVC70 Molekülen führt zu einer Inhibition der Penetration der Vitellinhülle. Daher scheint HrVC70 an der Selbststerilität von *Halocynthia roretzi* beteiligt zu sein (Sawada et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Moment in Urochordaten nur wenige Moleküle bekannt sind, die in die Selbst-/Nichtselbsterkennung involviert sind. Ebenso herrscht noch keine eindeutige Meinung darüber, ob Selbst-/Nichtselbsterkennung

(Selbststerilität) in Urochordaten wie in Pilzen auf dem Erkennen von Nichtselbst basiert oder auf dem Erkennen von Selbst, wie in Pflanzen (Murabe und Hoshi, 2002). Allerdings deuten viele Daten darauf hin, dass Letzteres zutrifft (Khalturin et al., 2004).

1.2.3 Urochordaten als Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie

Urochordaten spielen nicht nur auf Grund ihrer phylogenetischen Position eine wichtige Rolle beim Verständnis der Entstehung der Wirbeltiermerkmale, sondern auch auf Grund ihres einfachen Aufbaues und ihrer ähnlichen Embryonalentwicklung. Eine zentrale Rolle kommt dabei *Ciona intestinalis* zu, einem solitär lebenden Urochordaten, der ein kosmopolitisches Verbreitungsgebiet besitzt.

So sind die Zellbewegungen während der Gastrulation und Neurulation vergleichbar mit denen der Wirbeltiere. Aber im Gegensatz zu den Wirbeltieren besitzen Urochordatenembryos nur wenige hundert Zellen. Die Larve von *Ciona intestinalis* besteht aus 2600 Zellen mit nur 36 Muskelzellen, 40 Notochordzellen und 330 Zellen des Zentralnervensystems mit weniger als 100 Neuronen (Meinertzhagen and Okamura, 2001; Corbo et al., 2001). Dieser einfache zelluläre Aufbau und die Tatsache, dass in Urochordaten die Zelllinien schon früh während der Entwicklung determiniert sind, führte dazu, dass wie für *Caenorhabditis elegans* Zelllinien für mehrere Gewebe komplett kartiert wurden. Dies wäre für andere Chordaten nicht zu bewerkstelligen (Corbo et al., 2001).

Zusätzlich zu dem einfachen zellulären Aufbau besitzt *Ciona intestinalis* mit einer haploiden Genomgröße von zirka 160 Mb und nur ungefähr 15500 Genen (Simmen et al., 1998) ein relativ kleines Genom. Dies und die Tatsache, dass viele Gene wie z.B. die Hox-Gene (Di Gregorio et al., 1995) nur in einer Kopie vorliegen, unterstützt die Vermutung, dass das Urochordatengenom den Zustand des Chordatengenoms vor seiner Vergrößerung darstellt (Corbo et al., 2001). Eine andere Eigenschaft, die Urochordaten und insbesondere *Ciona intestinalis* als Modellorganismus interessant macht, ist, dass viele Gene das gleiche Expressionsprofil wie in Vertebraten aufweisen (Corbo et al., 2001). Dies impliziert, dass das Genom von Urochordaten anscheinend das ursprüngliche genetische Repertoire der Chordaten darstellt und dank seiner geringen Redundanz entscheidende Vorteile bei der funktionellen Analyse vieler Gene besitzt (Corbo et al., 2001).

Diese wichtige Rolle als Modellorganismus führte dazu, dass mit dem Genom von *Ciona intestinalis* und *Ciona savignyi* zwei Genome von Urochordaten sequenziert wurden, und *Ciona intestinalis* mit zusätzlichen 686395 sequenzierten ESTs (expressed

sequence tags) zu den genetisch am besten untersuchten Modellorganismen gehört (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Bei NCBI verfügbare molekulare Daten für verschiedene Urochordaten (nach NCBI Stand 01.05.2006; National Center for Biotechnology Information).

Organismus	Zahl der ESTs	Genomprojekt
<i>Ciona intestinalis</i>	686395	Ja
<i>Molgula tectiformis</i>	106863	Nein
<i>Ciona savignyi</i>	84302	Ja
<i>Halocynthia roretzi</i>	4192	Nein
<i>Botryllus schlosseri</i>	191	Nein

1.3 Ziele dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in zwei Projekten versucht, die molekularbiologischen Kenntnisse über die Selbst-/Nichtselbsterkennung in Urochordaten zu erweitern

- (1) Auf der Grundlage der wahrscheinlichen Existenz von NK-Zellen und verschiedener zu NK-Zellrezeptoren homologer Proteine in Urochordaten sollte versucht werden, über die Identifikation potentieller Interaktionspartner von ciCD94-1 neue Erkenntnisse über die Signaltransduktion möglicher NK-Zellrezeptoren in ancestralen Chordaten zu gewinnen.
- (2) Über einen neuen Versuchsansatz sollte unter Verwendung einer Hochdurchsatz-Methode versucht werden, Gene zu isolieren, die an der Selbststerilität von *Ciona intestinalis* beteiligt sind.

2 Ergebnisse

2.1 Identifikation potentieller ciCD94-1 Interaktionspartner mittels des „Yeast Two-Hybrid“ Systems

Dieser Arbeit vorausgehende Untersuchungen haben gezeigt, dass nicht nur *Botryllus schlosseri* (Khalturin et al., 2003) sondern auch *Ciona intestinalis* ein mögliches Homolog des NK-Zellrezeptors CD94 besitzen (Khalturin et al., 2004).

Bisher konnten allerdings keine Homologe des ursprünglich in Wirbeltieren als Ligand identifizierten HLA-E und des Corezeptors NKG2 in *Ciona intestinalis* gefunden werden. Diese spielen in Wirbeltieren bei der Erkennung von Selbst durch NK-Zellen eine wichtige Rolle, so dass sich die Frage stellt, ob und wie ciCD94-1 eine Rolle als möglicher NK-Zellrezeptor in der Selbsterkennung bei *Ciona* spielt. Daher ist es von Interesse, Informationen über die Liganden bzw. den möglichen Corezeptor von CD94 in Urochordaten zu bekommen.

Meine Aufgabe war es nun, mögliche Interaktionspartner von ciCD94-1 in *Ciona intestinalis* zu finden.

Um die potentiellen Interaktionspartner für ciCD94-1 in *Ciona intestinalis* zu identifizieren, wurde ein „Yeast Two-Hybrid“ System etabliert. Das System ermöglicht durch den Einbau des zu untersuchenden Gens (ciCD94-1) in einen „Köder“-Vektor, dieses als Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne (DNA-BD) des Transkriptionsfaktors GAL4 in Hefe zu exprimieren. Mit diesem Konstrukt kann anschließend eine cDNA-Bank, die in ein „Beute“-Plasmid kloniert und in Hefezellen transformiert wurde, auf mögliche Interaktionspartner durchsucht werden. Hefezellen, die mögliche Interaktionspartner exprimieren, können anschließend mit Hilfe der Expression von Reportergenen durch Wachstum auf Selektionsmedien oder einer β -Galactosidase abhängigen Farbreaktion selektiert werden.

Da die Interaktion der Fusionsproteine innerhalb des Zellkerns erfolgen muss und weiterhin die Auswirkung einer Transmembrandomäne innerhalb des Fusionsproteins bzw. das Fehlen einzelner Domänen nicht abgeschätzt werden konnte, wurden drei verschiedene ciCD94-1-DNA-BD Fusionsproteine durch den Einbau von PCR-Fragmenten hergestellt. Diese kodieren für (i) das fast vollständige ciCD94-1 Protein von Aminosäure 8 bis 279 (Abb. 2.1 A); (ii) die C-Typ-Lektin Domäne (CTLD) von Aminosäure 75 bis 279 (Abb. 2.1 B); und (iii) ciCD94-1 ohne Transmembrandomäne von Aminosäure 28 bis 279 (Abb. 2.1 C). Die Tests der drei Fusionsproteine auf

Selbstaktivierung der Transkription der Reportergene und Toxizität für Hefezellen verliefen negativ, so dass alle Konstrukte für die weiteren Experimente verwendet werden konnten.

Mit diesen Konstrukten wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Für die drei Experimente wurde eine cDNA-Bank aus der mRNA von zwei ganzen Tieren hergestellt. Im Experiment A wurde diese cDNA-Bank durch eine Cotransformation mit Konstrukt A (Abb. 2.1 A) auf mögliche Interaktionspartner durchsucht. Für Experiment B wurde ein Kreuzungsexperiment mit Konstrukt B (Abb. 2.1 B) und für Experiment C mit Konstrukt C durchgeführt.

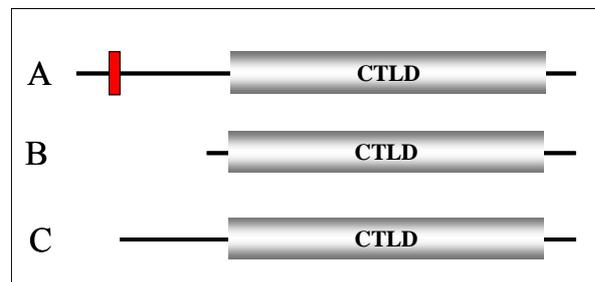


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der für die Konstrukte verwendeten Bereiche von ciCD94-1.
Rot: Transmembrandomäne, CTL D: C-Typ Lektin Domäne

Die Selektion der möglichen Interaktionspartner erfolgte im Versuch A auf Selektionsmedium SD-3. Diesem Selektionsmedium (SD-3) fehlt mit Histidin nur eine der zwei zur Selektion geeigneten Aminosäuren. Dadurch können auch Hefezellen wachsen, deren Fusionsproteine nur eine schwache Interaktion aufweisen. In den Versuchen B und C wurde neben SD-3 auch SD-4 Selektionsmedium verwendet. Diesem fehlen beide zur Selektion geeigneten Aminosäuren (Histidin, Adenin), so dass eine stärkere Interaktion der Fusionsproteine nötig ist, um ein Wachstum der Hefezellen zu ermöglichen.

Während der drei Versuche wurden insgesamt 155 Klone analysiert. Dabei wurden 12 mögliche Interaktionspartner identifiziert (Tab. 2.1), die im Folgenden als pL1-12 bezeichnet werden. Alle 12 identifizierten potentiellen Liganden wurden einer Blastx-Suche unterzogen und auf Fusion im falschen Leserahmen mit der GAL4-Aktivationsdomäne des „Beute“-Plasmids untersucht. Durch die Sequenzanalyse wurde ein Klon (pL9) identifiziert, der eine Fusion in einem Leserahmen aufwies, der nicht für das eigentliche Protein, sondern für ein kurzes Peptid im falschen Leserahmen kodierte. Dieser konnte daher als falsch positiver Kandidat ausgeschlossen werden. Unter den verbliebenen 11 potentiellen Liganden befindet sich ein Kandidat (pL1), der in allen

drei Experimenten gefunden wurde und mit 106 Klonen den Hauptanteil aller potentiell positiven Klone bildet (Tab. 2.1). Der potentielle Ligand pL4 bildet mit 27 Klonen die zweitgrößte Fraktion der untersuchten Klone und wurde in zwei unabhängigen Experimenten (B, C) identifiziert (Tab. 2.1). Zwei weitere Kandidaten (pL2, pL3) wurden ebenfalls in zwei Experimenten (B, C) gefunden (Tab. 2.1). Alle anderen potentiellen Interaktionspartner wurden entweder in Experiment B oder C identifiziert (Tab. 2.1).

Tab. 2.1 Identifizierte potentielle Liganden für ciCD94-1. Gelb gekennzeichnet: falsch positive Kandidaten; E-Wert nach Blastx gegen die NCBI NR Proteindatenbank; Die Expression wurde anhand der EST-Datenbank (<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html>) ermittelt. Ov: Ovar, B: Hämocyten, Ho: Hoden, jT: juvenile Tiere, aT: adulte Tier, N: Neuronalkomplex, E: Embryo, H: Herz

Bezeichnung	Anzahl der gefundenen Klone	Bester Treffer im Blastx gegen die NR Proteindatenbank von NCBI	E-Wert	Expression in unterschiedlichen Geweben	Experiment
pL 1	106	Trypsin	5e-40		A,B,C
pL 2	2	keine signifikanten Treffer		Ov, B, V, aT, E	B,C
pL 3	4	Fibronectin	2e-10	B, H, Ov	B,C
pL 4	27	Gaba-Rap	2e-34	E, H, N, V, B, aT	B,C
pL 5	1	APR-3	9e-5		B
pL 6	1	von Willibrand Factor	1e-5	jT	B
pL 7	2	DUF59	6e-46	E, Ov, B, V	B
pL 8	1	Ring finger Protein 127	2e-75	Ho, V, jT	B
pL 9	3	Il-17D	1e-4		C
pL 10	5	Tektin A1	1e-91	aT, Ho, jT	C
pL 11	2	keine signifikanten Treffer			C
pL 12	1	keine signifikanten Treffer			C

2.1.1 Kontrolle der Spezifität der Interaktion der möglichen ciCD94-1 Liganden

Da beim Durchsuchen von cDNA-Banken mit dem „Yeast Two-Hybrid“ System oft falsch-positive Kolonien auf Grund unspezifischer Protein-Protein Interaktionen, Mutationen innerhalb der Hefezellen oder einer DNA-Bindeaktivität der Fusionsproteine an die Promotorregion der Reportergene auftreten, wurden mehrere Kontrollversuche durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden die Plasmide der möglichen Interaktionspartner mit dem ciCD94-1-Konstrukt cotransformiert, welches zur Identifikation in Experiment A, B und C führte (Abb. 2.1, Tab. 2.1). Dies wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich das ursprüngliche Wachstum der Hefezellen

mit den ciCD94-1 auf Selektionsmedium reproduzieren lässt. Um die Spezifität der durch das „Yeast Two-Hybrid“ System identifizierten Interaktion zu überprüfen, wurden die potentiellen Liganden mit HyDKK1/2/4-A, einem sekretierten Protein aus *Hydra* (Augustin et al., 2006), das mit keinem der Proteine interagieren sollte, als Negativkontrolle cotransformiert. Zusätzlich wurde als eine weitere Negativkontrolle ein Teil der möglichen Interaktionspartner mit einem leeren „Köder“-Vektor cotransformiert (Tab. 2.2).

Tab. 2.2 Kontrolle der Spezifität der einzelnen Interaktionen durch Cotransformation. A: 1/1, B: 1/10 und C: 1/100 Verdünnung der Cotransformationen; X-Gal Test: Ergebnis des Tests auf β -Galactosidase-Aktivität; EBV: Cotransformation mit leeren „Köder“-Vektor; HyDKK: Cotransformation mit HyDKK1/2/4-A; ciCD94-1: Cotransformation mit ciCD94-1; +: gutes Wachstum bzw. Blaufärbung, /: schwaches Wachstum; -: kein Wachstum; gelb: falsch positive Kandidaten

pL	Wachstum auf SD-3									Wachstum auf SD-4									X-Gal Test
	mit EBV			mit HyDKK			mit ciCD94-1			mit EBV			mit HyDKK			mit ciCD94-1			
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3				-	-	-	+	+	-				-	-	-	+	+	-	-
4	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	/	-	-	+	+	+	+	+	+	/	-	-	+	+	+	-
8				-	-	-	+	+	/				-	-	-	+	/	-	+
9				/	+	+	+	/	+				+	+	+	+	+	+	
10				-	-	-	+	+	/				-	-	-	+	/	-	+
11				+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+
12				+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+

Mit Hilfe der Cotransformation konnten zwei weitere potentielle Interaktionspartner (pL 11, 12) eindeutig ausgeschlossen werden, da in den Positivkontrollen kein Wachstum auf Selektionsmedium auftrat und sich somit das Ergebnis der vorherigen Experimente nicht reproduzieren ließ (Tab. 2.2). Ein weiterer Kandidat (pL1) zeigte sowohl in der Negativkontrolle mit leerem „Köder“-Vektor als auch mit HyDKK1/2/4-A ein mit der Positivkontrolle vergleichbares Wachstum (Tab. 2.2) und konnte deshalb ebenfalls ausgeschlossen werden, da die beobachtete Interaktion in den Hefezellen unspezifisch war. Die Identifikation von pL5 lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls auf eine unspezifische Interaktion zurückführen, da pL5 nur mit HyDKK1/2/4-A auf SD-4 ein schlechteres Wachstum zeigte als mit ciCD94-1 (Tab. 2.2). Unter Einbezug beider Negativkontrollen zeigte pL2 das beste Ergebnis, da die Positivkontrolle auf dem stringenten SD-4 Selektionsmedium nicht nur eindeutig besser wuchs als beide

Negativkontrollen (Abb. 2.2), sondern auch eine β -Galactosidase-Aktivität zeigte (Tab. 2.2).

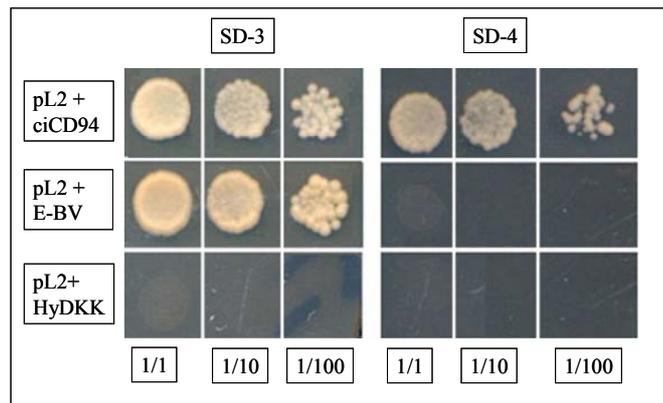


Abb. 2.2 Kontrolle der Spezifität der YTH-Interaktion für pL2 durch Cotransformation. Es wurden Cotransformationen mit ciCD94-1 (ciCD94), leerem „Köder“-Vektor (E-BV) und HyDKK1/2/4-A (HyDKK) durchgeführt. Es wurden verschiedene Verdünnungen 1/1, 1/10 und 1/100 der Hefezellen auf SD-3 und SD-4 Selektionsmedien aufgetragen.

Für die drei anderen Kandidaten (pL4, pL5, pL6) mit denen beide Negativkontrollen durchgeführt wurden (Tab. 2.2), konnte keine eindeutige Aussage über die Spezifität der Interaktion getroffen werden. In den Negativkontrollen mit leerem „Köder“-Vektor trat bei allen drei Kandidaten Wachstum auf Selektionsmedium und damit eine unspezifische Interaktion auf. Die unspezifische Interaktion ließ sich durch die Kontrolle mit HyDKK1/2/4-A aber nicht bestätigen, da in dieser Kontrolle kein Wachstum auftrat (Tab. 2.2).

Eine eindeutige Verifizierung bzw. Falsifizierung der verbliebenen Kandidaten durch weitere Kontrollen innerhalb des „Yeast Two-Hybrid“ Systems war daher nicht möglich.

2.1.2 Datenbankanalyse der Expression und Homologie der potentiellen Liganden

Um Anhaltspunkte zur Wahrscheinlichkeit einer *in vivo* Interaktion der potentiellen Liganden in *Ciona intestinalis* mit ciCD94-1 zu erlangen, wurden weitere Analysen zur Expression in *Ciona intestinalis* und zur Funktion homologer Proteine in anderen Organismen anhand von Datenbankanalysen durchgeführt. Da es sich bei ciCD94-1 potentiell um einen Transmembranrezeptor handelt, der nach einer RT-PCR in Blutzellen, in Gonaden, dem Siphon und dem Darm exprimiert wird (Abb. 2.3), sollte anhand der Expression und der Proteinstruktur bzw. der Homologie zu charakterisierten Proteinen, eine weitere Einschränkung der Kandidaten möglich sein.

Es wurde sowohl über eine Homologie- und Domänensuche als auch über eine Datenbankanalyse des Expressionsprofils vorhandener ESTs versucht, die Funktion bzw. die Lokalisation der potentiellen Interaktionspartner abzuschätzen. Die Ergebnisse der Datenbankanalysen sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Unter den sieben potentiellen Liganden befinden sich laut *in silico* Analyse vier Kandidaten, die eine starke Homologie zu Proteinen aus anderen Organismen aufweisen (Tab. 2.1). Für GABA-Rap (pL 4) und Tektin A1 (pL10) wurden bereits mögliche Funktionen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass GABA-Rap mit dem GABA Rezeptor und Mikrotubuli *in vivo* und *in vitro* interagieren kann (Nymann-Andersen et al., 2002). Nach der Anzahl der ESTs in den verschiedenen *Ciona* Geweben wird pL4 in allen untersuchten Embryonalstadien und in adulten Tieren im Neuronalkomplex, Herz, Blut und der Verdauungsdrüse exprimiert (Tab. 2.1).

Tektine konnten in verschiedenen Organismen charakterisiert werden. Sie sind dort am Aufbau der Mikrotubuli der Cilien und des Flagellums beteiligt (Matsuyama et al., 2005). Zu pL10 zugehörige ESTs wurden in *Ciona intestinalis* hauptsächlich in Hoden und ganzen adulten bzw. juvenilen Tieren gefunden (Tab. 2.1).

Der Kandidat pL7 zeigt eine starke Homologie zu uncharakterisierten Proteinen aus verschiedenen Organismen, die eine DUF59 Domäne besitzen (Tab. 2.1). Laut ESTs ist pL7 in *Ciona* schwach in verschiedenen Embryonalstadien, Ovarien, Blut und der Verdauungsdrüse exprimiert (Tab. 2.1).

Eine Blastx-Suche bei NCBI zeigt, dass pL8 Homologie zur „LON Peptidase N-terminal Domäne und Ring Finger 3 Isoform 1“ aus verschiedenen Organismen aufweist. Für pL8 sind nur wenige entsprechende ESTs vorhanden. Diese wurden überwiegend aus juvenilen Tieren, den Hoden und der Verdauungsdrüse adulter Tiere gewonnen. Klone von zwei der potentiellen Interaktionspartner (pL3, pL6) zeigten nur schwächere Homologien zu bereits bekannten Proteinen. pL3 weist eine schwache Homologie zu Fibronektin (Tab. 2.1) auf und wird laut ESTs vorwiegend im Blut, aber auch im Herz, den Ovarien und dem Neuronalkomplex exprimiert. pL6 zeigt eine schwache Homologie zu Proteinen mit von Willibrand-Faktor Domänen verschiedener Organismen (Tab. 2.1). In der EST-Datenbank konnten nur drei entsprechende ESTs aus juvenilen Individuen gefunden werden, so dass anhand dieser keine Aussagen über eine Expression in verschiedenen Geweben möglich ist.

Der Kandidat pL2 besitzt keine signifikante Homologie zu bereits bekannten Proteinen (Tab. 2.2). Allerdings weist der aus den ESTs und durch PCR-Techniken ermittelte gesamte Leserahmen von pL2 eine Transmembrandomäne, eine SCP-Domäne und ein

Signalpeptid auf. Laut den ESTs ist pL2 in verschiedenen Embryonalstadien aber auch in den Ovarien, dem Blut und der Verdauungsdrüse exprimiert.

2.1.3 Überprüfung des Expressionsprofils von pL2 und pL6 durch RT-PCR

Da für pL6 keine Lokalisation des Transkripts anhand der EST-Daten möglich war, und auch für pL2 nur wenige ESTs in adulten Tieren vorhanden waren, wurde versucht durch eine RT-PCR mit cDNA aus verschiedenen *Ciona* Geweben die Expression der zwei Kandidaten zu bestimmen. Durch die RT-PCR konnte gezeigt werden, dass pL6 in Hämozyten, dem Siphon, und dem Darm exprimiert wird (Abb. 2.3).

Die laut ESTs vorkommende Expression von pL2 im Gewebe adulter Tiere konnte durch die RT-PCR, die Signale im Blut, den Ovarien, dem Siphon und dem Darm zeigt, bestätigt werden (Abb. 2.3). Zusätzlich zeigt die RT-PCR, dass pL2 in allen untersuchten Geweben offensichtlich in zwei Isoformen exprimiert wird.

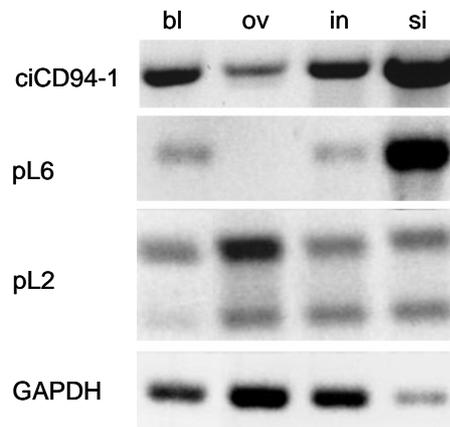


Abb. 2.3: RT-PCR für *ciCD94-1*, pL6 und pL9 in verschiedenen *Ciona* Geweben. bl: Hämozyten; ov: Ovar; in: Darm; si: Siphon; GAPDH: Ladekontrolle

2.1.3.1 Untersuchung der möglichen Co-Lokalisation von *ciCD94-1* und seinen potentiellen Liganden im Genom von *Ciona intestinalis*

Für mehrere Rezeptor-Liganden-Paare und im Besonderen für NKRP1 und seinen Liganden *Clrb* konnte eine Co-Lokalisation im Genom beschrieben werden (Iizuka et al., 2003). Daher wurde versucht, mittels der genomischen Datenbank von JGI v2.0 (Joint Genome Institute) Informationen über eine mögliche Co-Lokalisation von *ciCD94-1* und den potentiellen Liganden zu bekommen. Anhand der Genomdatenbank konnte *ciCD94-1* auf Chromosom 1 lokalisiert werden. Dort überspannt es mit sechs Introns eine ca. 7 kb große Region im Bereich von 1624 kb bis 1631 kb und spiegelt die typische Intron-/Exonsstruktur von *CD94* in Säugetieren wider (Khalturin et al., 2004)

Von den potentiellen Interaktionspartnern ist nur *pL4* eindeutig auf Chromosom 1 lokalisiert, wobei *pL4* mit einem Abstand von 3,7 Mb nicht in der unmittelbaren genomischen Region von *ciCD94-1* liegt. Alle anderen potentiellen Liganden lassen sich anderen Chromosomen oder Scaffolds zuordnen und sind somit nicht mit *ciCD94-1* colokalisiert. Somit gibt es keinen Hinweis auf eine genomische Co-Lokalisation eines potentiellen Rezeptor-Liganden-Paares.

Zusammenfassend konnten mit Hilfe des „Yeast Two-Hybrid“ Systems 12 mögliche Interaktionspartner von *ciCD94-1* identifiziert werden. Anhand der durchgeführten Kontrollen wurden fünf falsch-positive Kandidaten identifiziert und aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Eine vorläufige Charakterisierung der verbliebenen sieben Liganden zeigt, dass einige Kandidaten als *in vivo* Interaktionspartner in Frage kommen. Allerdings ist eine endgültige Beantwortung der Frage, ob einer der potentiellen Interaktionspartner auch *in vivo* mit *ciCD94-1* interagiert, derzeit noch nicht möglich. Dies kann nur über eine genaue Lokalisation der Proteine in *Ciona intestinalis* und eine zweite unabhängige Methode zur Identifikation von Protein-Protein-Interaktionen erreicht werden.

2.2 Suche nach Individuen-spezifischen Genen in Ovarien von *Ciona intestinalis*

Eine der grundlegenden Voraussetzungen für die Fähigkeit, Selbst von Nichtselbst zu unterscheiden, ist die Expression von variablen, Individuen-spezifischen Markern. Da *Ciona intestinalis* selbststeril ist, sollten daher Individuen-spezifische Marker in Ovarien und Hoden exprimiert werden.

Um Gene zu identifizieren, die ein hohes Maß an Variabilität aufweisen, und somit potentiell in die Selbststerilität von *Ciona intestinalis* involviert sind, wurde eine abgewandelte Form einer SSH-Methode (suppression subtractive hybridisation) verwendet (Khalturin et al., 2005). In der Regel wird diese Methode dazu genutzt, Expressionsmuster verschiedener Entwicklungsstadien zu vergleichen (Gehnikovich et al., 2005). Mit Modifikationen kann sie allerdings auch für die Identifizierung von variablen, Individuen-spezifischen Genen eingesetzt werden (Khalturin et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode dazu verwendet, das Transkriptom weiblicher Gonaden von drei *Ciona intestinalis* Individuen zu vergleichen (Abb. 2.4). Dabei werden Gene, die sich in ihrer Nukleotidsequenz stark unterscheiden oder Mitglieder einer Genfamilie sind, die nur in einem der verglichenen Individuen exprimiert werden, selektiv amplifiziert (Abb. 2.4) (Khalturin et al., 2005).

Vor der mRNA-Extraktion wurden die Gonaden aus drei verschiedenen Tieren präpariert und visuell überprüft, ob sie dem gleichen Entwicklungsstand entsprachen. Damit sollte eine Anreicherung von Entwicklungsgenen verhindert werden.

In Abbildung 2.4 ist der experimentelle Ablauf zusammengefasst. Durch die Subtraktion des Transkriptoms des Tieres 2 („driver“) von Tier 1 und Tier 3 („tester“) wurde eine für Tier 1 (SSH[1-2]) und eine für Tier 3 (SSH[3-2]) spezifische cDNA-Bank hergestellt (Abb. 2.4). Zusätzlich wurde eine für das Tier 2 spezifische cDNA-Bank durch die Subtraktion des Transkriptoms von Tier 3 erzeugt (Abb. 2.4). Insgesamt wurden in dem Experiment drei Individuen-spezifische cDNA-Banken hergestellt (Abb. 2.4), aus denen jeweils 768 Klone ausgewählt und sequenziert wurden. Die erhaltenen ESTs wurden mit Hilfe von TIGR Indices Clustering Tool (Pertea et al., 2003) analysiert. Für SSH [1-2] resultierten daraus 296 Contigs und 300 Einzelsequenzen, für SSH [3-2] 335 Contigs und 175 Einzelsequenzen und für SSH [2-3] 127 Contigs und 147 Einzelsequenzen (Tab. 2.3).

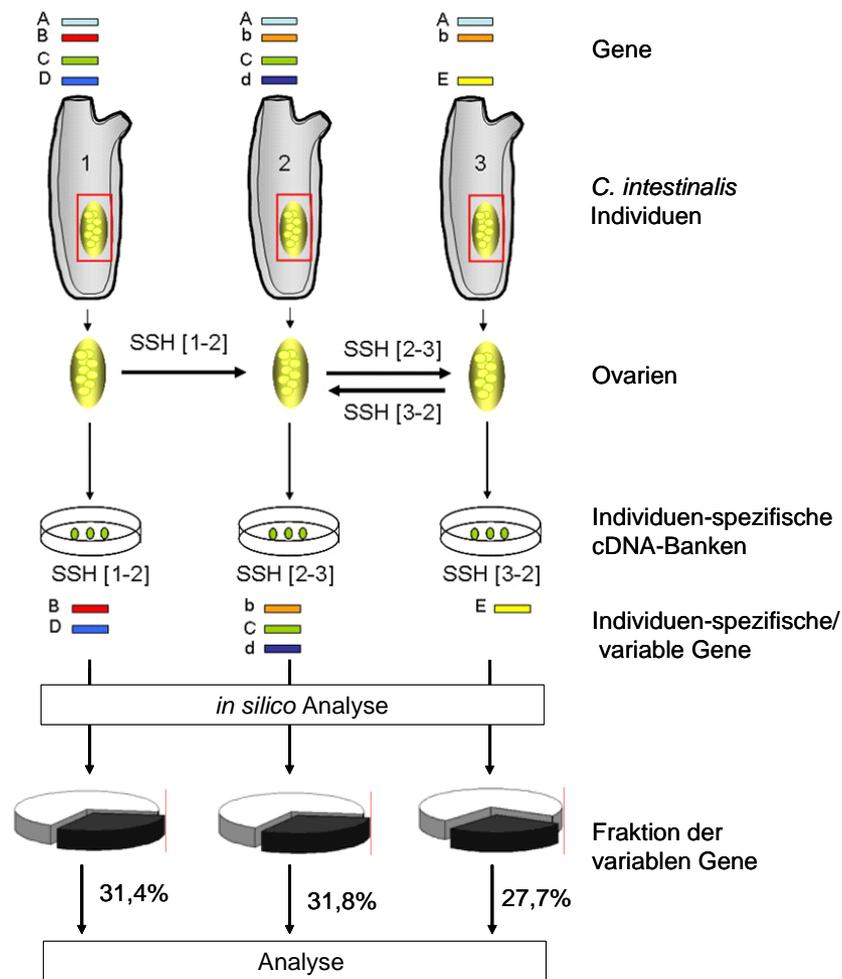


Abb. 2.4 Schema der SSH zur Identifikation von variablen Genen in *Ciona*. Aus den Ovarien von drei *Ciona* Individuen wurde mRNA isoliert. Durch die SSH wurde cDNA, die sich zwischen den Tieren unterscheidet, angereichert. Drei cDNA-Banken wurden erstellt und sequenziert. Danach erfolgte eine *in silico* Analyse der Sequenzen. Der Anteil variabler Gene wird durch das schwarze Segment im Kuchendiagramm dargestellt. Der exakte Wert wurde in Prozent angegeben. A, B, b, C, D, d, E: Gene und ihre Allele in verschiedenen Individuen; horizontale Pfeile: Richtung der Subtraktion; SSH [1-2], SSH [2-3], SSH [3-2]: cDNA-Banken z.B. SSH [1-2] zeigt an, dass die cDNA von Tier 1 als „tester“ und die cDNA von Tier 2 als „driver“ benutzt wurde.

Theoretisch sollten unsere Datenbanken nach der SSH überwiegend Sequenzen erhalten, die entweder variabel sind oder nur in einem der untersuchten Tiere exprimiert werden. Allerdings zeigten Ergebnisse aus vorherigen Versuchen innerhalb unserer Arbeitsgruppe, dass die SSH-Methode lediglich zu einer Anreicherung von Unterschieden führt (Augustin, 2004). Um daher falsch-positive Ergebnisse rasch identifizieren zu können, wurden die Sequenzen jeder cDNA-Bank mit denen der zwei anderen cDNA-Banken sowie den Sequenzen von *Ciona intestinalis* aus den öffentlichen Datenbanken verglichen. Durch diesen Vergleich konnten Unterschiede in

den Sequenzen aus den verschiedenen Datenbanken identifiziert und damit erste Hinweise auf variable Gene erhalten werden.

Für die weitere Analyse wurden nur Sequenzen verwendet, die eine Identität von unter 93% gegen die ESTs aus der öffentlichen Datenbank und einem Treffer innerhalb des *Ciona intestinalis* Genom aufwiesen. Sequenzen, die eine Identität von über 93% aufwiesen, wurden als falsch-positive Ergebnisse und Sequenzen ohne Treffer in den ESTs und dem Genom als Verunreinigungen oder schlechte Sequenzierungen gewertet. Durch dieses Vorgehen konnte die Anzahl der zu untersuchenden Sequenzen auf 212 in SSH [1-2], 192 in SSH [2-3] und 105 in SSH [3-2] reduziert werden (Tab. 2.3). Um die Anzahl der zu analysierenden Sequenzen weiter einzuschränken, wurden Sequenzen, die Treffer mit einem E-Wert von $E \leq 10^{-20}$ gegen bekannte Haushaltsgene aufwiesen (Tab. 2.3), ebenfalls nicht weiter berücksichtigt.

Tabelle 2.3: Ergebnisse der vorläufigen Analyse der SSH-Datenbanken. -: die Sequenzen wurden nicht weiter berücksichtigt

	SSH [1-2]	SSH [2-3]	SSH [3-2]
Contigs	296	335	127
Einzelsequenzen	300	175	147
gesamte Sequenzen	596	510	274
< 93 % ID gegen ESTs	226	192	105
keine Treffer im <i>Ciona</i> Genom	-14	-5	-18
Treffer mit $E \leq 10^{-20}$ gegen Haushaltsgene	-25	-25	-11
potentiell variable Gene	187	162	76

Die aus den SSH-cDNA-Banken erhaltenen ESTs, sind auf Grund eines Verdaus mit *RsaI* während des SSH-Experiments keine vollständigen Sequenzen. Daher wurde versucht, für alle Sequenzen aus den SSH-cDNA-Banken entsprechende vollständige Sequenzen aus der „Unigene Datenbank“ von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID=7719>) zu gewinnen. Mit den erhaltenen vollständigen Sequenzen und den verbliebenen Sequenzen der SSH-cDNA-Banken war es möglich, über eine „Hidden Markov Model“-Suche (HMM) (Eddy, 1998) potentielle Proteindomänen zu identifizieren. Anhand dieser Analyse wurden zwei Klassen von Sequenzen ausgewählt, die weiter untersucht wurden.

2.2.1 Identifikation von *Ciona* Sequenzen mit Ähnlichkeiten zum Spermienrezeptor HrVC70 aus *Halocynthia roretzi*

In den drei SSH-cDNA-Banken konnten mehrere Sequenzen ermittelt werden (Tab. 2.4), deren Gene strukturelle Ähnlichkeiten zu HrVC120, dem Vorläuferprotein des kürzlich identifizierten Spermienrezeptors HrVC70 aus *Halocynthia roretzi*, aufweisen (Abb. 2.5). Dieser spielt eine Rolle bei der Selbststerilität von *Halocynthia roretzi* (Sawada et al., 2004). HrVC120 umfasst 1162 Aminosäuren und besitzt ein Signalpeptid, eine *Zona pellucida*-Domäne sowie eine Transmembrandomäne und 13 EGF-Domänen (Abb. 2.5).

Die in den drei SSH-cDNA-Banken identifizierten Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu HrVc120 konnten anhand der Analyse der *Ciona* EST- und Genomdatenbank drei Genen zugeordnet werden. Diese werden im Folgenden *Vc16*, *Vc182* und *Vc569* genannt.

In den drei SSH-cDNA-Banken wurden insgesamt neun Sequenzen identifiziert, die sich dem Gen *Vc569* zuordnen lassen. (Tab. 2.4).

Tab. 2.4 Anzahl der identifizierten Klone von Vc16, Vc182, Vc569 in den verschiedenen SSH-Banken. ESTs-Gesamt: Summe der in den SSH-cDNA-Banken gefundenen Sequenzen.

	Vc16	Vc182	Vc569
SSH [1-2]	2	-	2
SSH [2-3]	3	1	3
SSH [3-2]	3	-	4
ESTs-Gesamt	8	1	9

Für *Vc569* wurde eine vollständige Sequenz (*Vc16-H*) von 2,8 kb ermittelt, die für ein Protein mit 894 Aminosäuren kodiert. Strukturell weist *Vc569* mit einer Länge von 894 Aminosäuren, einem Signalpeptid, sechs potentiellen EGF-Domänen, einer *Zona pellucida*-Domäne und einer Transmembrandomäne die größte Übereinstimmung mit HrVC120 auf (Abb. 2.5). Zusätzlich zu dieser Domänenstruktur konnte eine Reihe von repetitiven Elementen zwischen den ersten und letzten drei EGF-Domänen von *Vc569* gefunden werden (Abb. 2.10).

Vc182 wird nur durch eine Sequenz in den SSH-Daten repräsentiert (Tab. 2.4). Die ermittelte vollständige Sequenz von *Vc182* aus der EST-Datenbank (*Vc182-H*) kodiert mit einer Länge von 1,7 kb für ein Protein mit 532 Aminosäuren. Das vorhergesagte Protein besitzt ein Signalpeptid, eine *Zona pellucida*-Domäne und eine

Transmembrandomäne. Allerdings beinhaltet Vc182 keine vorhergesagten EGF-Domänen (Abb. 2.5).

In allen SSH-cDNA-Banken konnten insgesamt acht Sequenzen identifiziert werden (Tab. 2.4), die sich dem Gen *Vc16* zuordnen lassen. Die aus den ESTs ermittelte vollständige Sequenz von *Vc16* (Vc16-H) ist 1,5 kb lang, und kodiert für ein Protein, das mit 486 Aminosäuren das kürzeste Protein der drei identifizierten Gene ist. Vc16 besitzt allerdings mit einem Signalpeptid, einer EGF-Domäne, einer *Zona pellucida*-Domäne, und einer Transmembrandomäne größere strukturelle Gemeinsamkeiten mit HrVC120 als Vc182 (Abb. 2.5).

Trotz der offensichtlich größeren strukturellen Übereinstimmungen zeigt Vc569 im Blastp gegen die NCBI Proteindatenbank mit einem E-Wert von $4e^{-57}$ nur eine geringfügig bessere Übereinstimmung mit HrVC120 als Vc182 mit $6e^{-56}$ und Vc16 mit $2e^{-51}$.

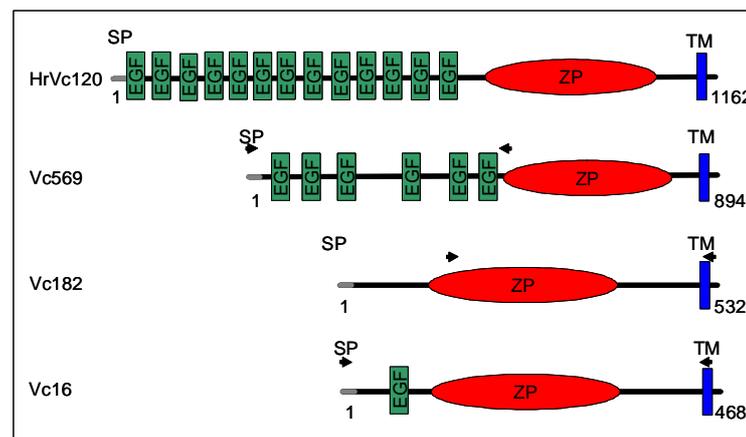


Abb. 2.5 Vergleich der Proteinstrukturen von HrVC120, Vc569, Vc182 und Vc16

ZP: *Zona pellucida*-Domäne; EGF: Epidermal Growth Factor-Domäne; grau: Signalpeptid; blau: Transmembrandomäne; Pfeile: Primer für Sequenzvergleich

2.2.1.1 Variabilität der *Ciona Vc*- Gene

Alle drei Vc-Gene wurden auf Grund ihrer Anwesenheit in einer der drei SSH-cDNA-Banken und der folgenden Datenbankanalyse als möglicherweise variabel identifiziert. Um zu überprüfen, ob die Anreicherung der Gene während der SSH spezifisch war und ob die während der Datenbankanalyse beobachtete Varianz bestätigt werden konnte, wurden verschiedene Bereiche der unterschiedlichen Gene aus mehreren Tieren von Helgoland kloniert.

2.2.1.1.1 Variabilität von Vc16

Der analysierte Bereich von Vc16 umfasst das Startcodon und reicht bis zur Aminosäure 455, die kurz vor der Transmembranregion liegt (Abb. 2.6). Insgesamt wurde Vc16 aus acht Tieren von Helgoland sequenziert und mit der EST-Sequenz aus Japan (Vc16-H) verglichen. Wie der Aminosäurevergleich zeigt (Abb. 2.6), lassen sich vor allem innerhalb der ersten und letzten 80 Aminosäuren und besonders kurz vor der vorhergesagten EGF-Domäne stärkere Unterschiede in den Aminosäuresequenzen beobachten.

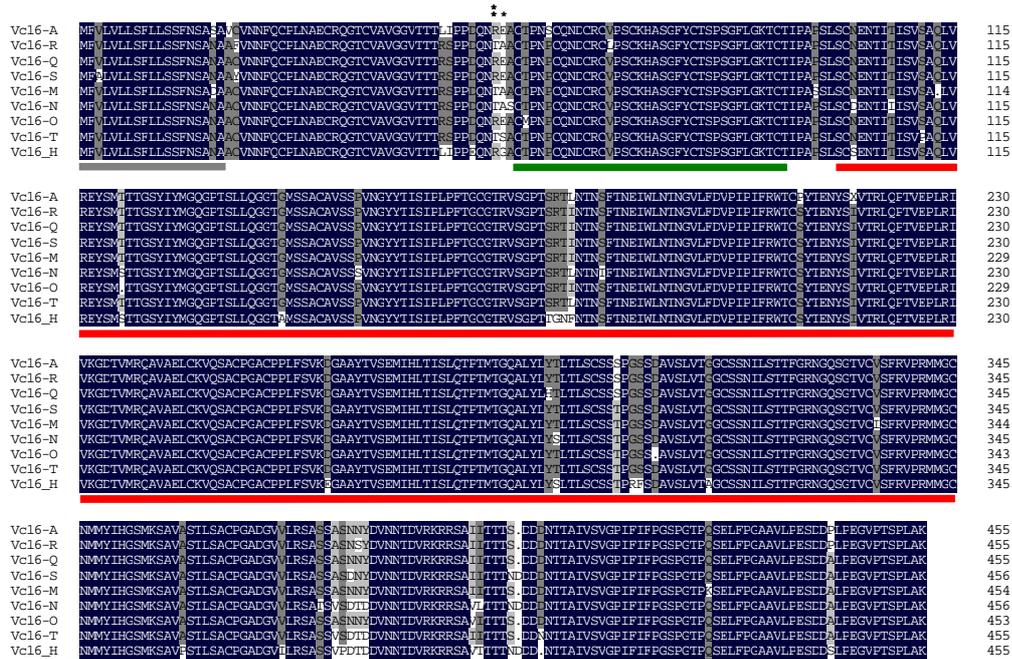


Abb. 2.6 Vc16 Aminosäurevergleich von neun *Ciona intestinalis* Individuen. grauer Balken: Signalpeptid; grüner Balken: EGF-Domäne; roter Balken: *Zona pellucida*-Domäne, *: Aminosäurepositionen unter positiver Selektion mit einer Wahrscheinlichkeit zwischen 95 und 99%, **: Aminosäurepositionen unter positiver Selektion mit einer Wahrscheinlichkeit über 99% (siehe 2.2.5); Vc16-H: Sequenz aus der EST-Datenbank (Japan)

Innerhalb der ersten 80 Aminosäuren lassen sich daher alle Varianten der verschiedenen Individuen durch wenigstens einen Aminosäureaustausch unterscheiden (Abb. 2.6). Allerdings zeigt sich, dass der aus dem Aminosäurevergleich ermittelte maximale Identitätsunterschied (siehe 6.12.1) von 4% innerhalb der Individuen von Helgoland relativ gering ist. Zwischen dem EST aus Japan und den Tieren von Helgoland bestehen mit einem maximalen Identitätsunterschied von 6% größere Sequenzunterschiede als innerhalb der Population von Helgoland. Die phylogenetische Analyse der neun Individuen aus dem Aminosäurevergleich (Abb. 2.6) bestätigt dies und zeigt, dass die

phylogenetische Distanz zwischen Vc16-H aus Japan und den Sequenzen aus Helgoland am größten ist (Abb. 2.7 A).

Um die Variabilität der genomischen Region von Vc16 zu überprüfen, wurde mit Hilfe eines Southern Blots eine „Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus“-Analyse (RFLP) durchgeführt. Für den Southern Blot wurde durch *Hind*III verdaute gDNA aus acht Individuen verwendet. Die Sonde für den Southern Blot wurde aus der gDNA von Tier G mit den Primern VC16(s)_F35 und VC16(s)_R290 amplifiziert und entspricht dem Exon 2 von Vc16 (Abb. 2.9).

Die RFLP-Analyse von Vc16 zeigt eine Varianz der genomischen Region an, da sich das Bandenmuster zwischen allen Tieren unterscheidet (Abb. 2.7 B). Für Tier 15 könnte kein Signal beobachtet werden, dies liegt vermutlich an einer Degradation der verwendeten DNA aus Tier 15.

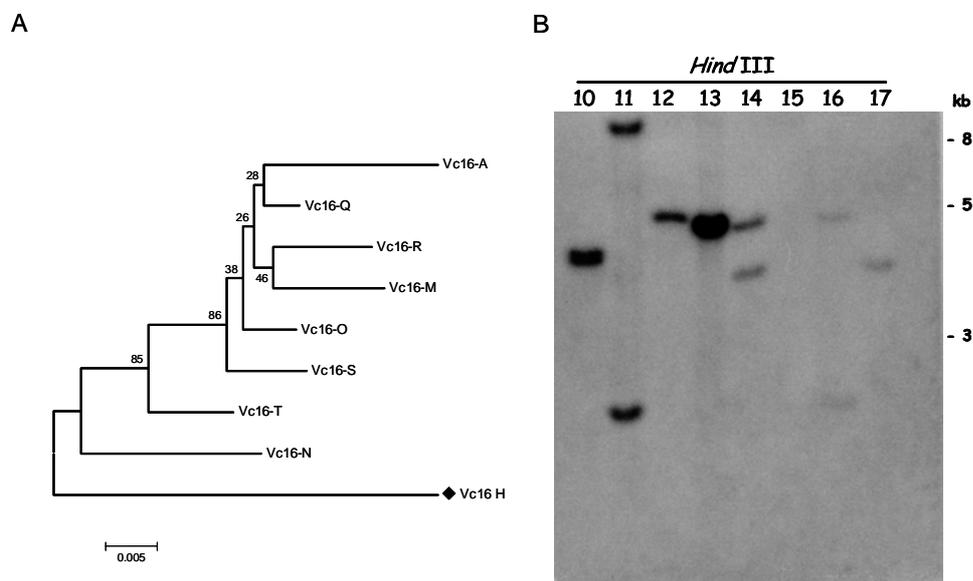


Abb. 2.7 Analyse der Variabilität von Vc16. A) Phylogenetischer Baum von Vc16 mit acht Individuen; Sequenz aus Japan markiert mit Viereck; Balken markiert 0,005 Aminosäureaustausche pro Aminosäureposition; B) Southern Blot Analyse von Vc16 mit gDNA von acht Individuen (10-17) von Helgoland mit *Hind*III verdaut.

2.2.1.1.2 Variabilität von Vc182

Für die Analyse der Variabilität von Vc182 wurde der Bereich von Aminosäure 163 am Anfang der *Zona pellucida*-Domäne bis zur Aminosäure 525 kurz vor Ende des Leserahmens ausgewählt (Abb. 2.5). Dieser Bereich wurde aus sieben Tieren amplifiziert, sequenziert und mit der aus der EST-Datenbank gewonnenen Sequenz (Vc182-H) verglichen. Wie der Vergleich der Proteine (Abb. 2.8) zeigt, ist die Variabilität im verglichenen Bereich mit nur wenigen zwischen den Individuen variierenden Aminosäuren relativ gering. Der geringste Polymorphismus tritt innerhalb

der ersten 140 Aminosäuren auf. In diesem Bereich befinden sich nur fünf variable Aminosäurepositionen, die hauptsächlich nur in einem der Individuen abweichen. In der gesamten Sequenz lassen sich keine Bereiche erkennen, in denen gehäuft Aminosäureaustausche auftreten (Abb. 2.8). Zusätzlich sind die Sequenzen von Vc182 in Tier M und N identisch (Abb. 2.8 und Abb. 2.9 A).

Eine Analyse des Aminosäurevergleichs zeigt, dass die geringste Übereinstimmung der Proteine mit einer maximalen Identität von 95% zwischen der EST-Sequenz aus Japan (Vc182-H) und den analysierten Individuen von Helgoland auftritt (Abb. 2.8). Die Individuen von Helgoland unterscheiden sich dagegen mit einer Identität zwischen 97%-100% unter einander nur gering.

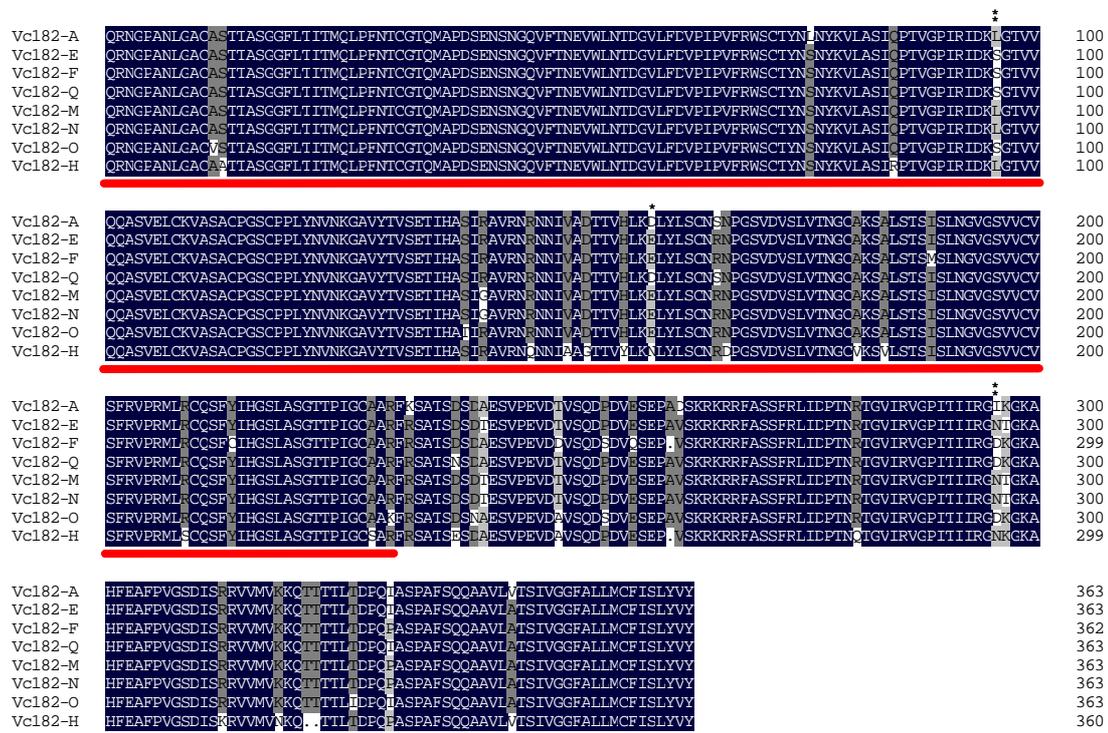


Abb. 2.8 Vc182 Aminosäurevergleich von acht *Ciona* Individuen. roter Balken: *Zona pellucida*-Domäne; blauer Balken: Transmembrandomäne; Vc182-H: Sequenz aus Japan; * : Aminosäureposition unter positiver Selektion mit einer Wahrscheinlichkeit zwischen 95 und 99%; **: Aminosäureposition unter positiver Selektion mit einer Wahrscheinlichkeit über 99% (siehe 2.2.5)

Die phylogenetische Analyse der Sequenzen der acht Individuen aus dem Aminosäurevergleich zeigt ebenfalls, dass sich die Sequenz von Vc182 aus Japan (Vc182-H) eindeutig von den aus Helgoland stammenden Sequenzen unterscheidet (Abb. 2.9 A).

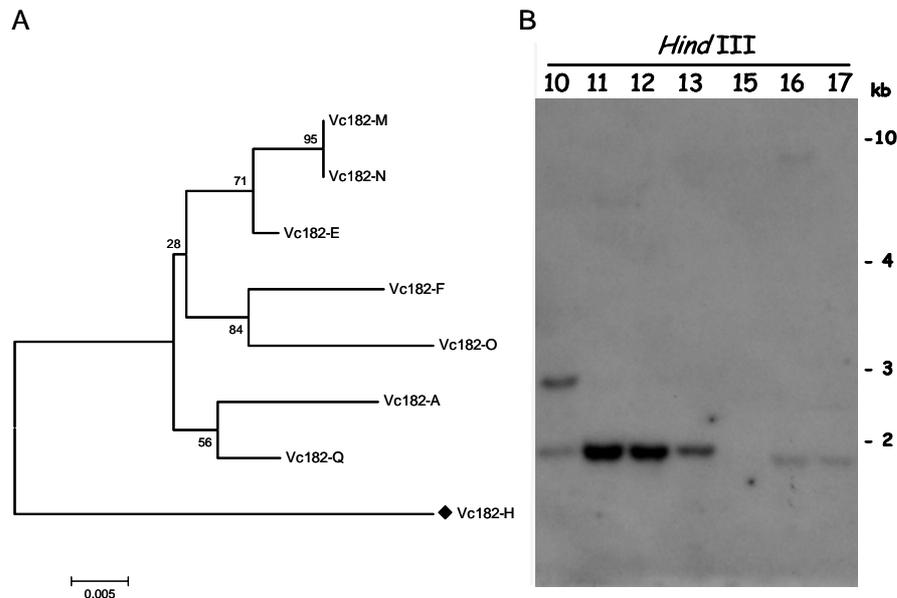


Abb. 2.9 Analyse der Variabilität von Vc182. A) Phylogenetischer Baum von Vc182, Sequenz aus Japan markiert mit Viereck; Balken markiert 0,005 Aminosäureaustausche pro Aminosäureposition; B) Southern Blot Analyse von Vc182 mit sieben Individuen (10-17 ohne 14) aus Helgoland; *HindIII*: für den Verdau verwendetes Restriktionsenzym; Probe wurde mit den Primern VC182(s)_F410 und VC182(s)_R762) aus Tier G amplifiziert.

Die geringe Variabilität auf Aminosäureebene zwischen den Vc182 Genen der Individuen von Helgoland lässt sich auch im genomischen Locus von Vc182 beobachten. Im Southern Blot mit gDNA aus sieben Individuen und einer Probe aus Tier G, die einen Teil des fünften und das gesamte sechste Exon umfasst, tritt nur ein gering unterschiedliches Restriktionsmuster auf (Abb. 2.9B). Die geringen Unterschiede deuten darauf hin, dass der analysierte genomische Bereich nicht sehr variabel ist. Wie für Vc16 konnte auch für Vc182 kein Signal in der Spur mit der gDNA von Tier 15 entdeckt werden.

2.2.1.1.3 Variabilität von Vc569

Um die Variabilität von Vc569 zu analysieren, wurde ein Sequenzbereich aus der cDNA von vier Tieren amplifiziert. Die Region reicht vom Startcodon bis zur Aminosäure 528 der Sequenz aus Japan (Vc569-H) und umfasst alle sechs EGF-Domänen (Abb. 2.10). Die vier Sequenzen aus den Tieren von Helgoland wurden ebenfalls mit der Sequenz aus Japan verglichen. Ein Vergleich auf Aminosäureebene zeigt, dass sich alle fünf Aminosäuresequenzen von einander unterscheiden. Die gefundenen Aminosäureaustausche treten in keiner bestimmten Region gehäuft auf, sondern scheinen relativ gleichmäßig über den gesamten Sequenzbereich verteilt zu sein (Abb. 2.10).

Die Ergebnisse des Sequenzvergleichs zeigen, dass die Sequenzunterschiede zwischen den Individuen von Helgoland und aus Japan ausgeprägter sind als innerhalb der Gruppe von Helgoland. So liegt die aus dem Vergleich bestimmte Sequenzidentität innerhalb der Individuen von Helgoland zwischen 96-97%, während die Sequenz aus Japan eine Identität zu den Helgoländer Tieren von maximal 92% aufweist.

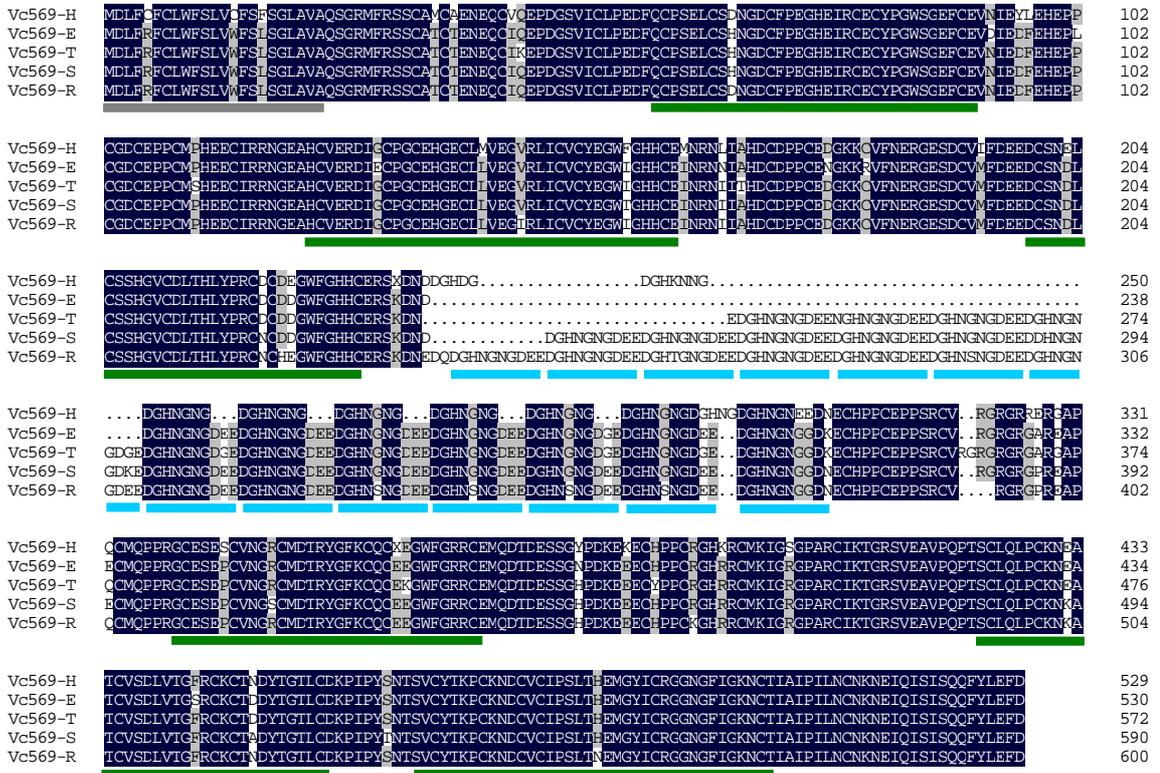


Abb. 2.10 Aminosäurevergleich für Vc569 von fünf Individuen. Grauer Balken: Signalpeptid; grüner Balken: EGF-Domäne; hellblauer Balken: repetitives Element; Vc569-H: Sequenz aus der EST-Datenbank (Japan)

Zusätzlich zu den Aminosäureaustauschen konnten in allen untersuchten Tieren Unterschiede in der Länge der amplifizierten Sequenzen beobachtet werden. Diese Längendifferenzen lassen sich auf eine unterschiedliche Anzahl sich wiederholender Sequenzmotive mit der Aminosäuresequenz DGHNGNGDEE zurückführen (Abb. 2.10). Auffällig ist, dass sich das repetitive Sequenzmotiv zwischen Japan und Helgoland durch das Fehlen des Aminosäuremotivs DEE in der Sequenz aus Japan unterscheidet (Abb. 2.10).

Auf Grund einzelner klarer Banden innerhalb der RT-PCR von einzelnen Tieren (Daten nicht gezeigt), scheint dieser Unterschied nicht auf verschiedenen Splicevarianten innerhalb einzelner Tiere zu beruhen. Dies lässt sich allerdings auf Grund der geringen Anzahl sequenzierter Klone aus einem einzelnen Tier nicht eindeutig belegen. Ebenso

wenig lässt sich durch die geringe Anzahl der untersuchten Individuen eine eindeutige Aussage darüber treffen, ob die beobachteten Längenunterschiede Individuen-spezifische Merkmale sind oder eine vergleichbare Anzahl von repetitiven Sequenzabschnitten in verschiedenen Gruppen von Tieren auftritt.

2.2.1.2 Vc16, Vc182 und Vc569 werden in *Ciona intestinalis* in Oozyten exprimiert

Im Folgenden sollte geprüft werden, ob die gefundenen Gene in einem für die Selbststerilität relevanten Gewebe exprimiert werden.

Sowohl das Auffinden von Vc16, Vc182 und Vc569 in unseren SSH-Datenbanken als auch die Analyse der öffentlichen EST Datenbanken deuten an, dass Vc16, Vc182 und Vc569 ausschließlich in Ovarien exprimiert werden. Daher wurde, um das genaue Expressionsprofil innerhalb der Ovarien zu analysieren, eine *in situ* Hybridisierung für Vc16, Vc182 und Vc569 durchgeführt. Diese zeigt, dass alle drei Gene ein nahezu gleiches Expressionsmuster aufweisen (Abb. 2.11). Sowohl Vc16 (Abb. 2.11 A-F) als auch Vc182 (Abb. 2.11 G-L) und Vc569 (Abb. 2.11 M-O) zeigen eine sehr starke Expression in relativ kleinen Zellen. Bei diesen handelte es sich um frühe Entwicklungsstadien von Oozyten, die noch nicht von Follikelzellen umschlossen sind. Ein schwaches Hybridisierungssignal wurde für Vc182 in größeren, weiterentwickelten Oozyten entdeckt. Diese sind bereits von Follikelzellen umgeben, befinden sich allerdings noch in der Reifung (Abb. 2.11 K, L). In reifen Oozyten konnte mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung keine Expression der drei Gene nachgewiesen werden (Abb. 2.11). Alle Gene scheinen daher in frühen Entwicklungsstadien der Oozytenentwicklung sehr stark exprimiert zu sein und während der fortlaufenden Reifung deaktiviert zu werden.

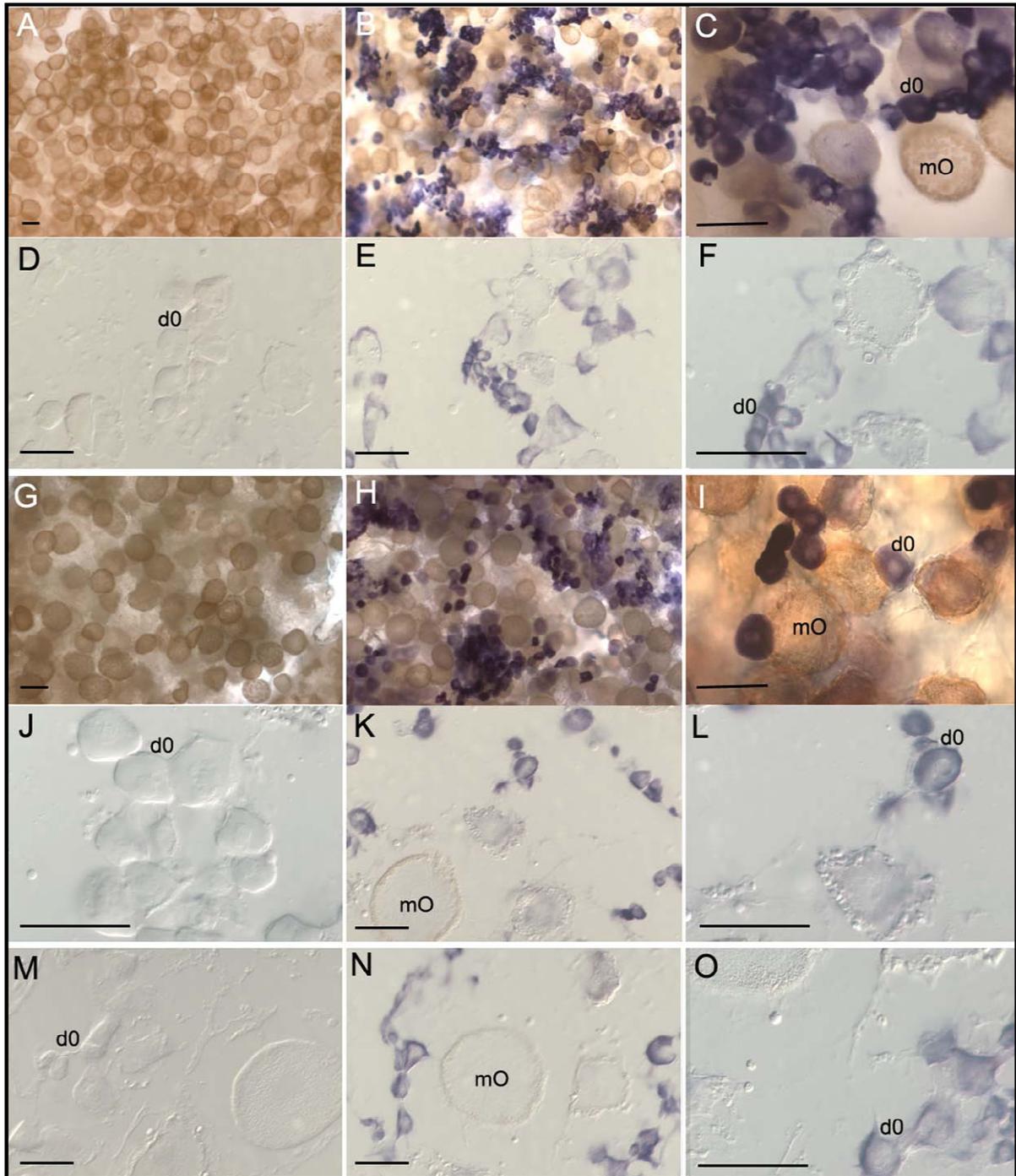


Abb. 2.11 Expression von Vc16, Vc182 und Vc569 in *Ciona intestinalis* Ovarien. A-F) *in situ* Hybridisierung Vc16 ; A-C) mit ganzen Ovarien; A) Sense-Kontrolle; B,C) Antisense-Probe; D-F) 9 µm Parafinschnitte, D) Sense-Kontrolle; E-F) Antisense-Probe; G-L) *in situ* Hybridisierung V182; G-I) mit ganzen Ovarian; G) Sense-Kontrolle; H,I) Antisense-Probe; J-M) 9 µm Parafinschnitte; J) Sense-Kontrolle; K-L) Antisense-Probe; M-O) *in situ* Hybridisierung V569 mit 9 µm Parafinschnitten; M) Sense-Kontrolle; N-O) Antisense-Probe; mO: reife Oozyte; d0: sich entwickelnde Oozyte; Balken: 100µm

2.2.1.3 Genstrukturen von Vc16, Vc182 und Vc569

Die ähnliche Proteinstruktur und das vergleichbare Expressionsmuster legen nahe, dass Vc16, Vc182 und Vc569 durch Genduplikation und durch Duplikation einzelner Domänen aus einem Ursprungsgen hervorgegangen sind. Ist dies zutreffend, könnten sie innerhalb der gleichen Region des Genoms vorliegen. Um dies zu überprüfen, wurden die Lage der drei Gene und ihr Aufbau im Genom mit Hilfe der öffentlich zugänglichen *Ciona* Genomdatenbank bei JGI v.2.0 überprüft.

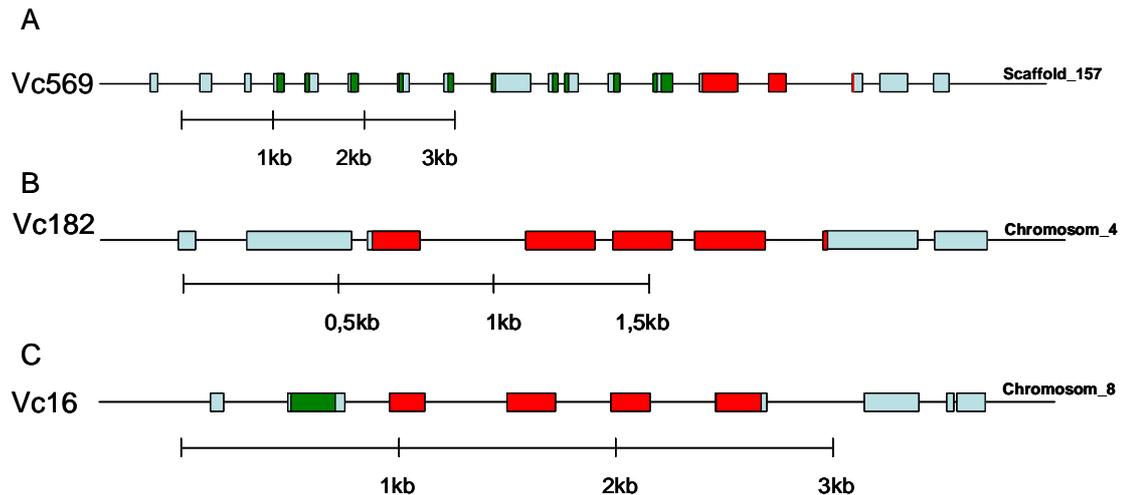


Abb. 2.12 Genomische Struktur von Vc569, Vc182 und Vc16. A) Genstruktur; Vc569 B) Genstruktur Vc182; C) Genstruktur Vc16; blau: Exon; grün: Exons die für EGF-Domäne kodieren; rot: Exons die für *Zona pellucida*-Domäne kodieren

Vc569 lässt sich eindeutig im Scaffold 157 lokalisieren, in dem es über eine Distanz von ca. 8,3kb verteilt ist und aus 19 Exons besteht (Abb. 2.12A). Dabei ist zu erkennen, dass fünf der sechs EGF-Domänen von zwei Exons kodiert werden (Abb. 2.12A). *Vc182* liegt auf Chromosom 4 und umfasst mit acht Exons einen 2,3 kb großen Bereich des Chromosoms (Abb. 2.12B). Sowohl die Genomdatenbank als auch der Southern Blot, der in allen Spuren eine oder maximal zwei Banden aufweist (Abb. 2.9 B), zeigen, dass es sich bei *Vc182* um ein Gen und nicht um eine Genfamilie handelt. *Vc16* liegt auf Chromosom 8 und überspannt mit neun Exons einen Bereich von 3,6 kb (Abb. 2.12C). Wie bei *Vc182* weist der Southern Blot nur ein oder maximal zwei Banden auf (Abb. 2.7 B). Daher handelt es sich bei *Vc16* wahrscheinlich ebenfalls um ein Gen, das nur in einer Kopie im haploiden Genom vorliegt.

Die Ergebnisse zeigen, dass trotz des ähnlichen Expressionsmusters und der Gemeinsamkeiten im Aufbau der Proteinstruktur keine Co-Lokalisation von *Vc16*, *Vc182* und *Vc569* im *Ciona* Genom vorliegt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit *Vc16*, *Vc182* und *Vc569* drei Gene identifiziert werden konnten, die strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen und in den gleichen Zelltypen exprimiert werden. In Bezug auf ihre Variabilität weisen alle drei Gene Polymorphismus auf, der allerdings relativ gering ist.

2.2.2 Identifikation des hochvariablen Transmembranrezeptors vCRL1 in *Ciona intestinalis*

Innerhalb der SSH-cDNA-Bank[2-3] wurden zwei Klone gefunden, die sowohl kodierende als auch nicht kodierende Bereiche der in der EST-Datenbank von Unigene identifizierten Sequenz Ak173924 umfassen. Dabei zeigen sich, besonders im kodierenden Bereich größere Unterschiede in der Nukleotidsequenz (Anhang Abb. 8.1). Zusätzlich kann aus dem Alignment von Ak173924 und den Klonen aus der SSH entnommen werden, dass die übereinstimmenden Bereiche durch lange Sequenzregionen unterbrochen werden, die in den beiden SSH Klonen nicht vorhanden sind (Anhang Abb. 8.1). Auf Grund der beobachteten hohen Variabilität und seiner interessanten Proteinstruktur (siehe 2.2.2.1) wurde daher Ak173924 zur weiteren Analyse ausgesucht und vCRL1-H (variable complement receptor like1) genannt.

2.2.2.1 Proteinstruktur und genomische Organisation von vCRL1 aus *Ciona intestinalis*

vCRL1-H umfasst den gesamten Leserahmen und kodiert für einen potentiellen Transmembranrezeptor, der nach einer SMART-Analyse ein Signalpeptid, eine CCP-Domäne (Complement Control Protein), eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Region umfasst. Bei unserer Analyse wurde aus einem Tier eine nahe verwandte Sequenz kloniert, für die drei potentielle CCP-Domänen durch eine SMART-Analyse vorausgesagt werden (Abb. 2.13). So kann die allgemeine Struktur des gefundenen Gens als die eines Transmembranrezeptors mit ein bis drei CCP-Domänen angesehen werden. Dadurch weist es strukturelle Ähnlichkeiten zu verschiedenen bekannten Komplementrezeptoren wie z.B. dem CD46 des Menschen auf (Abb. 2.13 A, B). Allerdings handelt es sich bei vCRL1 um kein Homolog von CD46, da es mit einem E-Wert von 0,09 im Blastp gegen die NR Proteindatenbank von NCBI nur geringe Ähnlichkeit mit CD46 zeigt.

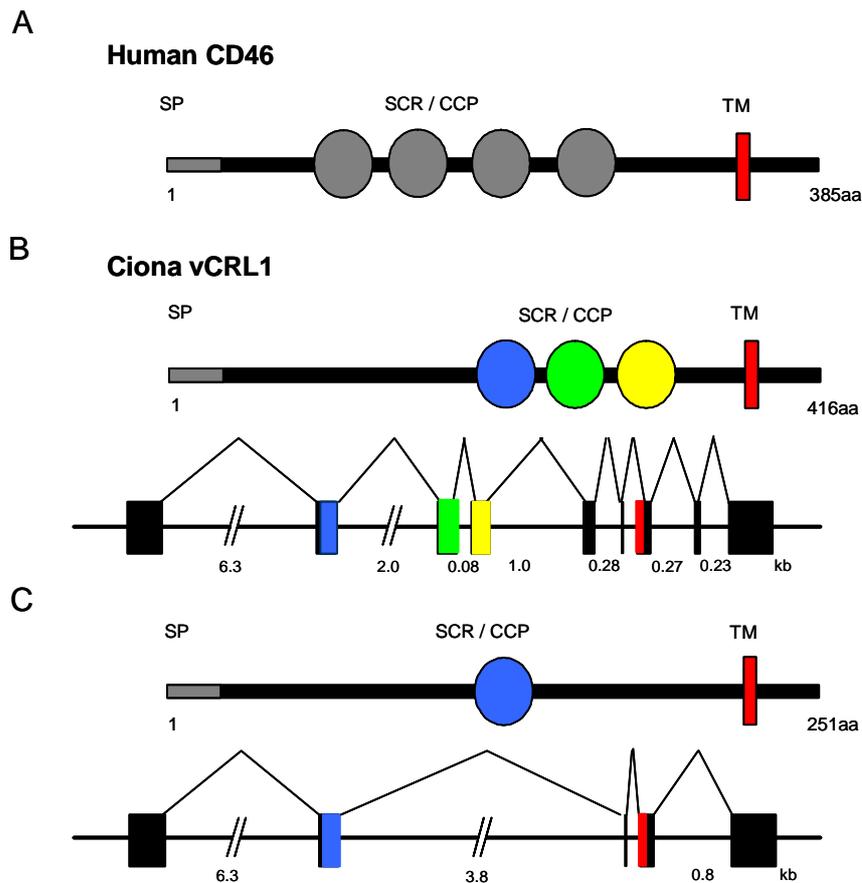


Abb. 2.13 Proteinstruktur des humanen CD46 und Protein und Genomstruktur von *Ciona* vCRL1.

A) Proteinstruktur des humanen CD46 (NM_172360); B) Proteinstruktur von *Ciona* vCRL1 (Variante vCRL1-D1) und die entsprechende Exon-/Intronstruktur des Gens; C) Proteinstruktur und Genstruktur von vCRL1 (Variante vCRL1-D2); SP: Signalpeptid; SCR: short consensus repeats; CCP: Complement control protein domain; TM: Transmembrandomäne; CCP1, CCP2 und CCP3 von vCRL1 sind blau, grün und gelb gekennzeichnet. Die entsprechenden Exons sind dementsprechend gekennzeichnet. Die Introngröße ist in Kilobasen angegeben.

Die genomische Struktur wurde mit Hilfe des Genomprojekts (JGI v1.0) evaluiert. Alle untersuchten Versionen von vCRL1 identifizierten Scaffold 948 als genomischen Locus. Allerdings wurden für die ersten 120 Basenpaare von vCRL1-H weder in Scaffold 948 noch in anderen Teilen der Genomdatenbank entsprechende Sequenzen gefunden. Wie in Abbildung 2.13 B am Beispiel von vCRL1-D1 gezeigt, überspannt der restliche Teil von vCRL1-1 ungefähr 11 kb und besteht aus neun Exons, von denen Exon 2 für die erste, Exon 3 für die zweite, und Exon 4 für die dritte CCP-Domäne kodiert. Die Transmembrandomäne wird von Exon 7 kodiert. Exon 8 und 9 kodieren für die intrazelluläre Domäne, das Stopcodon und die 3' UTR.

2.2.2.2 Untersuchung zur Variabilität von vCRL1 zwischen verschiedenen *Ciona* Individuen

Da es sich bei vCRL1 um einen variablen Individuen-spezifischen Rezeptor handeln könnte, wurde im Folgenden der Grad der Variabilität durch den Vergleich verschiedener Tiere aus Helgoland untersucht. Dazu wurde ein Teil des Gens, der vom 3'Ende des Signalpeptids bis zum Beginn der 3'UTR reichte, aus acht Tieren von Helgoland (A-G und P Abb. 2.14) sequenziert und mit der EST-Sequenz vCRL1-H aus Japan (Ak173924) verglichen. Wie in Abbildung 2.14 gezeigt, konnten 20 verschiedene Sequenzen aus den neun Tieren identifiziert werden. Die vorhergesagten Aminosäuresequenzen der 20 Proteine weisen starke Unterschiede untereinander auf. Diese entstehen innerhalb eines Individuums durch das Fehlen bzw. den Einbau einzelner Aminosäuren oder Aminosäuresequenzen und nicht durch den Austausch von Aminosäuren (Abb. 2.14). Die Unterschiede zwischen einzelnen Individuen werden, neben dem Fehlen bestimmter Aminosäurebereiche, vor allem durch den Austausch einzelner Aminosäuren erzeugt. Die Aminosäureaustausche führen dazu, dass keines der Individuen eine mit einem anderen Tier identische Aminosäuresequenz von vCRL1 aufweist (Abb. 2.14). Dabei sind die Unterschiede zwischen den Sequenzen unterschiedlicher Individuen mit einer aus dem Aminosäurevergleich bestimmten Identität von 75-98% sehr groß.

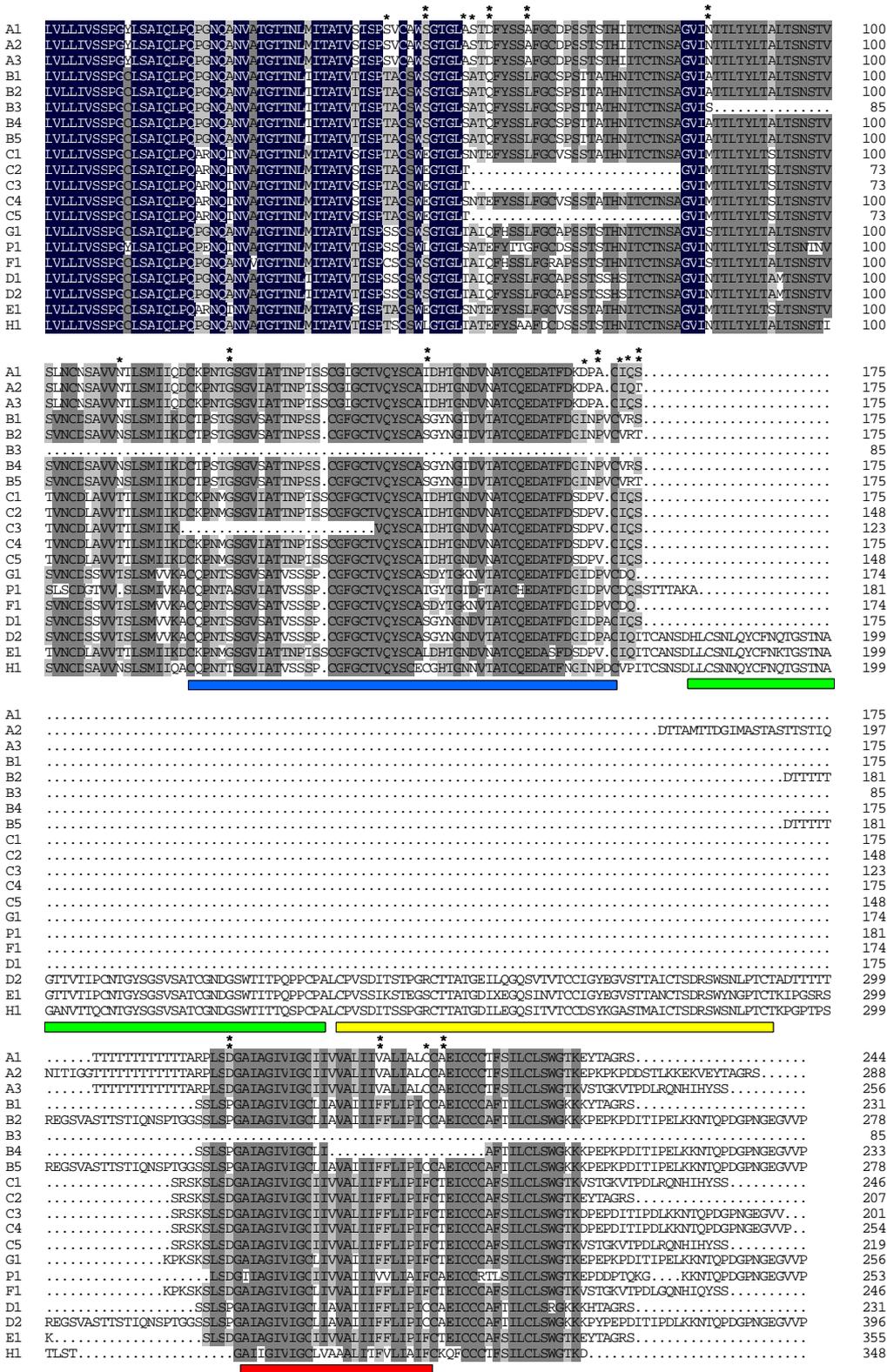


Abb. 2.14 vCRL1 Aminosäurealignment von 20 Aminosäuresequenzen aus neun Individuen. Sequenzen aus gleichen Individuen werden mit gleichen Buchstaben bezeichnet; blauer Balken: Erste CCP-Domäne; grüner Balken: Zweite CCP-Domäne; gelber Balken: Dritte CCP-Domäne; roter Balken: Transmembrandomäne; H1: AK173924; *: Aminosäureposition unter positiver Selektion mit einer Wahrscheinlichkeit zwischen 95 und 99%; **: Aminosäureposition unter positiver Selektion mit einer Wahrscheinlichkeit über 99% (siehe 2.2.5)

Die phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenz zeigt, dass fast alle Varianten von einem einzelnen Tier, mit Ausnahme von C1-5 und E1, Gruppen bilden, die sich klar von denen anderer Tiere unterscheiden (Abb. 2.15). Dabei fällt auf, dass vCRL1-H (Ak173924), die Sequenz aus Japan, in der phylogenetischen Analyse der Aminosäuresequenz keine abgetrennte Außengruppe darstellt, wie es für Vc16, Vc182 (Abb. 2.7; Abb. 2.9) und Vc569 (Daten nicht gezeigt) beobachtet werden konnte.

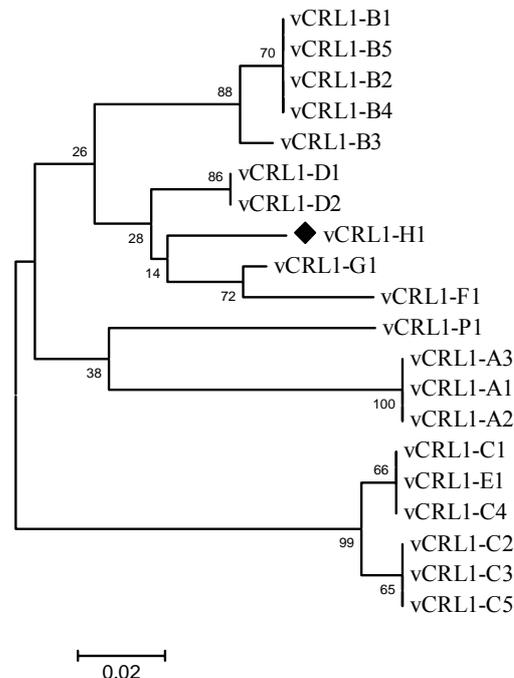


Abb. 2.15 Analyse der Variabilität von vCRL1. Phylogenetischer Baum von vCRL1; Sequenz aus Japan markiert mit Viereck; Balken markiert 0,02 Aminosäureaustausche pro Aminosäureposition.

Interessanterweise zeigt der Vergleich der 3'UTR von fünf verschiedenen Tieren (Abb. 8.2 Anhang), dass dieser Bereich mit einer berechneten Identität zwischen 94% und 99% zwischen den verschiedenen Tieren keinen starken Nukleotidpolymorphismus aufweist. Vergleicht man den kodierenden Bereich derselben Tiere (Abb. 8.3 Anhang), zeigt sich, dass innerhalb dieses Bereiches die Sequenzunterschiede mit 7-15% deutlich größer sind. Dies wird auch durch die phylogenetische Analyse der kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen der fünf Tiere bestätigt, die größere Unterschiede im kodierenden Bereich als im nicht kodierenden Bereich anzeigt (Abb. 2.16). Zusätzlich scheint sich nach der phylogenetischen Analyse die Sequenz von vCRL1 aus Japan in ihrer 3'UTR phylogenetisch klarer von den Sequenzen aus Helgoland abzugrenzen, als in ihrem kodierenden Bereich, der innerhalb der Sequenzen der Tiere von Helgoland clustert (Abb. 2.16). Daher deutet sich an, dass die Variabilität von vCRL1 im kodierenden Bereich ausgeprägter ist als innerhalb des nicht translatierten Bereiches.

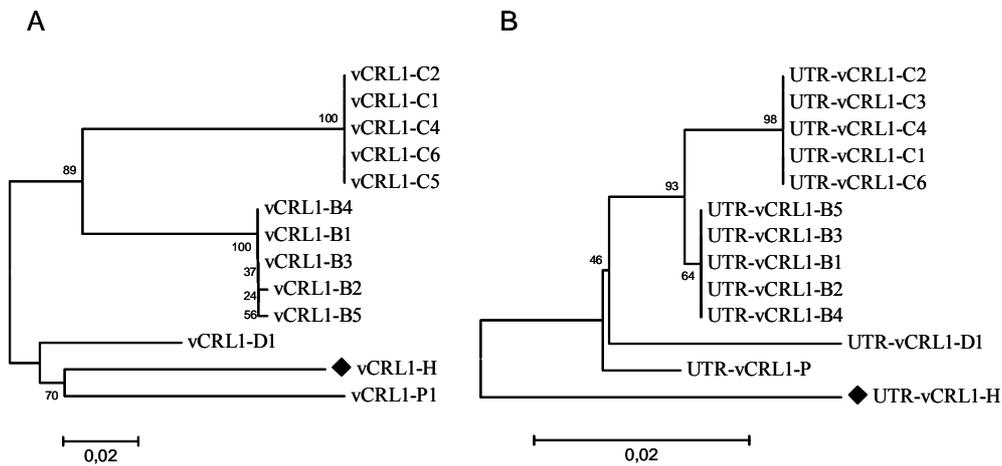


Abb. 2.16 Phylogenetische Analyse der DNA-Sequenz von vCRL1 aus fünf Tieren. A) Phylogenetischer Baum der kodierenden Region; B) Phylogenetischer Baum der 3'UTR; Sequenz aus Japan markiert mit Viereck; Balken markiert 0,02 Austausche pro Position.

Einen weiteren Hinweis auf die Variabilität von vCRL1 ergibt die RFLP-Analyse der genomischen DNA von vier *Ciona intestinalis* Individuen. Dazu wurde die genomische DNA der vier Individuen (A, J, K, L) mit den zwei Restriktionsenzymen *HindIII* und *BglI* verdaut. Als Probe wurde ein genomisches DNA-Fragment aus Tier C (Abb. 2.18) verwendet, welches Teile der Exons 7-9 (Abb. 2.13 B) umfasst.

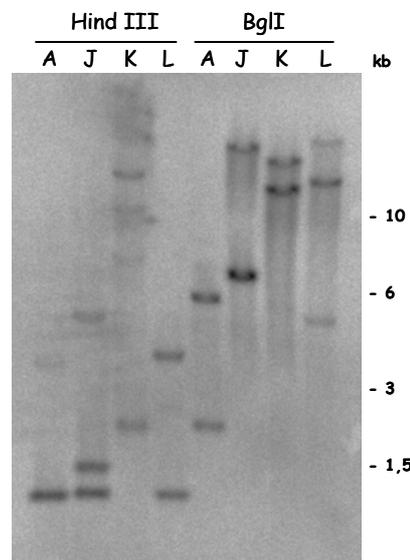


Abb. 2.17 Southern Blot Analyse von vCRL1 mit gDNA von vier Individuen aus Helgoland. gDNA wurde mit *HindIII* und *BglI* verdaut. Probe: gDNA Fragment aus Tier C (siehe Abb. 2.18)

Der Southern Blot zeigt sowohl in den Spuren mit *HindIII* als auch mit *BglI* verdauter DNA Unterschiede im RFLP-Bandenmuster zwischen den vier Individuen (Abb. 2.17). Dies zeigt, dass der genomische Locus von vCRL1 ebenfalls variabel ist.

2.2.2.3 Variabilität von vCRL1 innerhalb eines Individuums

Zusätzlich zu der Variabilität zwischen verschiedenen Individuen von *Ciona intestinalis* konnte ebenfalls ein überraschend hoher Grad an Variabilität zwischen den Transkripten des vCRL1-Gens innerhalb eines Tieres entdeckt werden. In vier der acht Individuen wurden mehrere Versionen von vCRL1 durch RT-PCR amplifiziert (Abb. 2.14). Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Versionen innerhalb eines Tieres nur in der Länge des Transkripts und nicht durch Aminosäureaustausche. Dies führt zum Fehlen verschiedener Aminosäurebereiche innerhalb eines Individuums und kann zum Verlust von einer oder mehreren CCP-Domänen in verschiedenen vCRL1-Versionen führen (Abb. 2.13 B, C, Abb. 2.14). In einem der *Ciona* Individuen wurde zusätzlich eine sekretierte Version von vCRL1 identifiziert, welcher alle CCP-Domänen, die Transmembranregion und die intrazelluläre Domäne fehlen (Abb. 2.14, Individuum B3). Diese Variabilität innerhalb eines Individuums ist nicht nur auf den extrazellulären Teil von vCRL1 begrenzt, sondern führt auch zu verschiedenen intrazellulären Domänen. In den 20 Proteinen konnten insgesamt fünf eindeutig verschiedene intrazelluläre Domänen von vCRL1 identifiziert werden. Innerhalb eines einzelnen Tieres kamen bis zu drei verschiedenen Versionen vor (Abb. 2.14 Tier C).

Mögliche Faktoren, die für eine Variabilität innerhalb eines Tieres verantwortlich sein können, sind die Existenz einer Genfamilie und (oder) differentielles Splicing. Um festzustellen, ob es sich bei den verschiedenen vCRL1 Varianten um Mitglieder einer Genfamilie handelt, wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. In allen Spuren, die mit *Bgl*I verdaut wurden, konnten nur zwei Banden bzw. drei Banden in Tier L entdeckt werden (Abb. 2.17). Zusätzlich kann in der mit *Hind*III verdauten Spur von Tier A nur eine starke Bande gesehen werden (Abb. 2.17). Dies deutet darauf hin, dass maximal nur zwei Kopien von vCRL1 im Genom von *Ciona intestinalis* existieren, welche höchstwahrscheinlich die zwei Allele eines einzelnen vCRL1 Locus darstellen. Daher scheint die beobachtete intraindividuelle Variation nicht durch die Existenz einer Genfamilie verursacht zu werden.

Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Varianten von vCRL1 durch differentielles Splicing entstehen, wurde der 3' Bereich des offenen Leserahmens von vCRL1, der die Exons 7-9 (Abb. 2.13 B) und damit die intrazelluläre Domäne umfasst, aus der gDNA von einem Individuum amplifiziert und mit den entsprechenden cDNA Sequenzen verglichen (Abb. 2.18). Der Vergleich zeigt, dass die cDNA Abschnitte, die für verschiedene intrazelluläre Versionen von vCRL1 kodieren (Abb. 2.14), mit verschiedenen Abschnitten der genomischen DNA übereinstimmen (Abb. 2.18). Daraus

lässt sich ableiten, dass differentielles Splicing für das Entstehen der verschiedenen Varianten von vCRL1 verantwortlich ist.

cDNA_C	CATTGTTATGGATGCAATAATGTGTGCACTCCTCATATCTTCCCTGATTCCTATCTTTGTACGGGATTTGCCGTGTGGCTTTTTCAACTTTCCTTGGC	105
cDNA_C1	CATTGTTATGGATGCAATAATGTGTGCACTCCTCATATCTTCCCTGATTCCTATCTTTGTACGGGATTTGCCGTGTGGCTTTTTCAACTTTCCTTGGC	105
cDNA_C5	CATTGTTATGGATGCAATAATGTGTGCACTCCTCATATCTTCCCTGATTCCTATCTTTGTACGGGATTTGCCGTGTGGCTTTTTCAACTTTCCTTGGC	105
cDNA_C3	CATTGTTATGGATGCAATAATGTGTGCACTCCTCATATCTTCCCTGATTCCTATCTTTGTACGGGATTTGCCGTGTGGCTTTTTCAACTTTCCTTGGC	105
cDNA_C4	CATTGTTATGGATGCAATAATGTGTGCACTCCTCATATCTTCCCTGATTCCTATCTTTGTACGGGATTTGCCGTGTGGCTTTTTCAACTTTCCTTGGC	105
cDNA_C2	CATTGTTATGGATGCAATAATGTGTGCACTCCTCATATCTTCCCTGATTCCTATCTTTGTACGGGATTTGCCGTGTGGCTTTTTCAACTTTCCTTGGC	105
cDNA_C6	CATTGTTATGGATGCAATAATGTGTGCACTCCTCATATCTTCCCTGATTCCTATCTTTGTACGGGATTTGCCGTGTGGCTTTTTCAACTTTCCTTGGC	105
cDNA_C	TTGGGGAACAAAAGGTGAGTAGTGTATTATCAAAATATGCCATATTTGTATTAAATAATTAACATACACAGACTAAGATCGAAAGTGGATATGGCAGTCTTC	210
cDNA_C1	TTGGGGAACAAAAGGTGAGTAGTGTATTATCAAAATATGCCATATTTGTATTAAATAATTAACATACACAGACTAAGATCGAAAGTGGATATGGCAGTCTTC	117
cDNA_C5	TTGGGGAACAAAAGGTGAGTAGTGTATTATCAAAATATGCCATATTTGTATTAAATAATTAACATACACAGACTAAGATCGAAAGTGGATATGGCAGTCTTC	117
cDNA_C3	TTGGGGAACAAAAGGTGAGTAGTGTATTATCAAAATATGCCATATTTGTATTAAATAATTAACATACACAGACTAAGATCGAAAGTGGATATGGCAGTCTTC	117
cDNA_C4	TTGGGGAACAAAAGGTGAGTAGTGTATTATCAAAATATGCCATATTTGTATTAAATAATTAACATACACAGACTAAGATCGAAAGTGGATATGGCAGTCTTC	117
cDNA_C2	TTGGGGAACAAAAGGTGAGTAGTGTATTATCAAAATATGCCATATTTGTATTAAATAATTAACATACACAGACTAAGATCGAAAGTGGATATGGCAGTCTTC	117
cDNA_C6	TTGGGGAACAAAAGGTGAGTAGTGTATTATCAAAATATGCCATATTTGTATTAAATAATTAACATACACAGACTAAGATCGAAAGTGGATATGGCAGTCTTC	117
cDNA_C	AGCTTGTATTACTAAACATTTTCACTTTTACTTTGTGATATATATGATATACCTTTTAGCTTTTGTAAATTTTCCCTGAAGCTCGAAACTGTGTATGTTTCATTT	315
cDNA_C1	AGCTTGTATTACTAAACATTTTCACTTTTACTTTGTGATATATATGATATACCTTTTAGCTTTTGTAAATTTTCCCTGAAGCTCGAAACTGTGTATGTTTCATTT	117
cDNA_C5	AGCTTGTATTACTAAACATTTTCACTTTTACTTTGTGATATATATGATATACCTTTTAGCTTTTGTAAATTTTCCCTGAAGCTCGAAACTGTGTATGTTTCATTT	117
cDNA_C3	AGCTTGTATTACTAAACATTTTCACTTTTACTTTGTGATATATATGATATACCTTTTAGCTTTTGTAAATTTTCCCTGAAGCTCGAAACTGTGTATGTTTCATTT	117
cDNA_C4	AGCTTGTATTACTAAACATTTTCACTTTTACTTTGTGATATATATGATATACCTTTTAGCTTTTGTAAATTTTCCCTGAAGCTCGAAACTGTGTATGTTTCATTT	117
cDNA_C2	AGCTTGTATTACTAAACATTTTCACTTTTACTTTGTGATATATATGATATACCTTTTAGCTTTTGTAAATTTTCCCTGAAGCTCGAAACTGTGTATGTTTCATTT	117
cDNA_C6	AGCTTGTATTACTAAACATTTTCACTTTTACTTTGTGATATATATGATATACCTTTTAGCTTTTGTAAATTTTCCCTGAAGCTCGAAACTGTGTATGTTTCATTT	117
cDNA_C	TCGCACCAATATCGATTTTGAACATGCAATGAAAGCATGCAATGCCAATTAATAGCATGCAACATGAACAATTTAAATGTTTCCAAATGCACATACAGTGTCCACGG	420
cDNA_C1	TCGCACCAATATCGATTTTGAACATGCAATGAAAGCATGCAATGCCAATTAATAGCATGCAACATGAACAATTTAAATGTTTCCAAATGCACATACAGTGTCCACGG	128
cDNA_C5	TCGCACCAATATCGATTTTGAACATGCAATGAAAGCATGCAATGCCAATTAATAGCATGCAACATGAACAATTTAAATGTTTCCAAATGCACATACAGTGTCCACGG	128
cDNA_C3	TCGCACCAATATCGATTTTGAACATGCAATGAAAGCATGCAATGCCAATTAATAGCATGCAACATGAACAATTTAAATGTTTCCAAATGCACATACAGTGTCCACGG	117
cDNA_C4	TCGCACCAATATCGATTTTGAACATGCAATGAAAGCATGCAATGCCAATTAATAGCATGCAACATGAACAATTTAAATGTTTCCAAATGCACATACAGTGTCCACGG	117
cDNA_C2	TCGCACCAATATCGATTTTGAACATGCAATGAAAGCATGCAATGCCAATTAATAGCATGCAACATGAACAATTTAAATGTTTCCAAATGCACATACAGTGTCCACGG	117
cDNA_C6	TCGCACCAATATCGATTTTGAACATGCAATGAAAGCATGCAATGCCAATTAATAGCATGCAACATGAACAATTTAAATGTTTCCAAATGCACATACAGTGTCCACGG	117
cDNA_C	GAAAAGTCAAGCCTGATTTGAGACAAAATCATATCCATTATAGCTCTTAGCAAGGTGTGTATGTAAACACATGAGCTCGTAAATATTAATATATAACCAATAGTTG	525
cDNA_C1	GAAAAGTCAAGCCTGATTTGAGACAAAATCATATCCATTATAGCTCTTAGCAAGGTGTGTATGTAAACACATGAGCTCGTAAATATTAATATATAACCAATAGTTG	180
cDNA_C5	GAAAAGTCAAGCCTGATTTGAGACAAAATCATATCCATTATAGCTCTTAGCAAGGTGTGTATGTAAACACATGAGCTCGTAAATATTAATATATAACCAATAGTTG	180
cDNA_C3	GAAAAGTCAAGCCTGATTTGAGACAAAATCATATCCATTATAGCTCTTAGCAAGGTGTGTATGTAAACACATGAGCTCGTAAATATTAATATATAACCAATAGTTG	117
cDNA_C4	GAAAAGTCAAGCCTGATTTGAGACAAAATCATATCCATTATAGCTCTTAGCAAGGTGTGTATGTAAACACATGAGCTCGTAAATATTAATATATAACCAATAGTTG	117
cDNA_C2	GAAAAGTCAAGCCTGATTTGAGACAAAATCATATCCATTATAGCTCTTAGCAAGGTGTGTATGTAAACACATGAGCTCGTAAATATTAATATATAACCAATAGTTG	117
cDNA_C6	GAAAAGTCAAGCCTGATTTGAGACAAAATCATATCCATTATAGCTCTTAGCAAGGTGTGTATGTAAACACATGAGCTCGTAAATATTAATATATAACCAATAGTTG	117
cDNA_C	TTGTTTGCCTGTAAGCTTGCTATGGTCTTGCAATTGAATGGCAGCTTTTACTTTAAATAGATCCAGAGCCAGATATAACCAATCCAGACTTGAAAAGGTGGTAGG	630
cDNA_C1	TTGTTTGCCTGTAAGCTTGCTATGGTCTTGCAATTGAATGGCAGCTTTTACTTTAAATAGATCCAGAGCCAGATATAACCAATCCAGACTTGAAAAGGTGGTAGG	180
cDNA_C5	TTGTTTGCCTGTAAGCTTGCTATGGTCTTGCAATTGAATGGCAGCTTTTACTTTAAATAGATCCAGAGCCAGATATAACCAATCCAGACTTGAAAAGGTGGTAGG	180
cDNA_C3	TTGTTTGCCTGTAAGCTTGCTATGGTCTTGCAATTGAATGGCAGCTTTTACTTTAAATAGATCCAGAGCCAGATATAACCAATCCAGACTTGAAAAGGTGGTAGG	155
cDNA_C4	TTGTTTGCCTGTAAGCTTGCTATGGTCTTGCAATTGAATGGCAGCTTTTACTTTAAATAGATCCAGAGCCAGATATAACCAATCCAGACTTGAAAAGGTGGTAGG	155
cDNA_C2	TTGTTTGCCTGTAAGCTTGCTATGGTCTTGCAATTGAATGGCAGCTTTTACTTTAAATAGATCCAGAGCCAGATATAACCAATCCAGACTTGAAAAGGTGGTAGG	117
cDNA_C6	TTGTTTGCCTGTAAGCTTGCTATGGTCTTGCAATTGAATGGCAGCTTTTACTTTAAATAGATCCAGAGCCAGATATAACCAATCCAGACTTGAAAAGGTGGTAGG	117
cDNA_C	GGATGATAAAATTAATCAAACTAATAAATTTTAAACAGAGATGAGATAGTAATTAACAGATCAGTGTTCATGTAAGTGTGGGTAATCTTTCGTGTTCAATGT	735
cDNA_C1	GGATGATAAAATTAATCAAACTAATAAATTTTAAACAGAGATGAGATAGTAATTAACAGATCAGTGTTCATGTAAGTGTGGGTAATCTTTCGTGTTCAATGT	180
cDNA_C5	GGATGATAAAATTAATCAAACTAATAAATTTTAAACAGAGATGAGATAGTAATTAACAGATCAGTGTTCATGTAAGTGTGGGTAATCTTTCGTGTTCAATGT	180
cDNA_C3	GGATGATAAAATTAATCAAACTAATAAATTTTAAACAGAGATGAGATAGTAATTAACAGATCAGTGTTCATGTAAGTGTGGGTAATCTTTCGTGTTCAATGT	155
cDNA_C4	GGATGATAAAATTAATCAAACTAATAAATTTTAAACAGAGATGAGATAGTAATTAACAGATCAGTGTTCATGTAAGTGTGGGTAATCTTTCGTGTTCAATGT	155
cDNA_C2	GGATGATAAAATTAATCAAACTAATAAATTTTAAACAGAGATGAGATAGTAATTAACAGATCAGTGTTCATGTAAGTGTGGGTAATCTTTCGTGTTCAATGT	117
cDNA_C6	GGATGATAAAATTAATCAAACTAATAAATTTTAAACAGAGATGAGATAGTAATTAACAGATCAGTGTTCATGTAAGTGTGGGTAATCTTTCGTGTTCAATGT	117
cDNA_C	TGIGATCAAGATTAAGTTACAACCTAACACAGTGTGTTTAAACAAATGTTGATAGCTGTGTCATTTCAAATGATGCTATGTAATGAATGTGGTCAATTTTAAAC	840
cDNA_C1	TGIGATCAAGATTAAGTTACAACCTAACACAGTGTGTTTAAACAAATGTTGATAGCTGTGTCATTTCAAATGATGCTATGTAATGAATGTGGTCAATTTTAAAC	182
cDNA_C5	TGIGATCAAGATTAAGTTACAACCTAACACAGTGTGTTTAAACAAATGTTGATAGCTGTGTCATTTCAAATGATGCTATGTAATGAATGTGGTCAATTTTAAAC	182
cDNA_C3	TGIGATCAAGATTAAGTTACAACCTAACACAGTGTGTTTAAACAAATGTTGATAGCTGTGTCATTTCAAATGATGCTATGTAATGAATGTGGTCAATTTTAAAC	157
cDNA_C4	TGIGATCAAGATTAAGTTACAACCTAACACAGTGTGTTTAAACAAATGTTGATAGCTGTGTCATTTCAAATGATGCTATGTAATGAATGTGGTCAATTTTAAAC	157
cDNA_C2	TGIGATCAAGATTAAGTTACAACCTAACACAGTGTGTTTAAACAAATGTTGATAGCTGTGTCATTTCAAATGATGCTATGTAATGAATGTGGTCAATTTTAAAC	119
cDNA_C6	TGIGATCAAGATTAAGTTACAACCTAACACAGTGTGTTTAAACAAATGTTGATAGCTGTGTCATTTCAAATGATGCTATGTAATGAATGTGGTCAATTTTAAAC	119
cDNA_C	AATACAGACCCGGACGGTCTAA	863
cDNA_C1	AATACAGACCCGGACGGTCTAA	205
cDNA_C5	AATACAGACCCGGACGGTCTAA	205
cDNA_C3	AATACAGACCCGGACGGTCTAA	180
cDNA_C4	AATACAGACCCGGACGGTCTAA	180
cDNA_C2	AATACAGACCCGGACGGTCTAA	142
cDNA_C6	AATACAGACCCGGACGGTCTAA	142

Abb. 2.18 Intraindividuelle Variation der intrazellulären Domäne von vCRL1 durch Splicing. Alignment eines Teils der genomischen DNA aus Tier C mit fünf cDNAs desselben Tieres. Dieses genomische Fragment wurde als Probe für den Southern Blot von vCRL1 (Abb. 2.17) verwendet.

2.2.2.4 Expression von vCRL1 in Follikelzellen und Hämocyten von *Ciona intestinalis*

Untersuchungen der öffentlichen EST-Datenbanken und die Isolierung von vCRL-1 aus den SSH-cDNA-Datenbanken weisen darauf hin, dass vCRL-1 hauptsächlich in Ovarien und Hämocyten exprimiert wird. Um die Expression in den Ovarien genau zu lokalisieren, wurde eine *in situ* Hybridisierung mit Schnitten von weiblichen Gonaden durchgeführt.

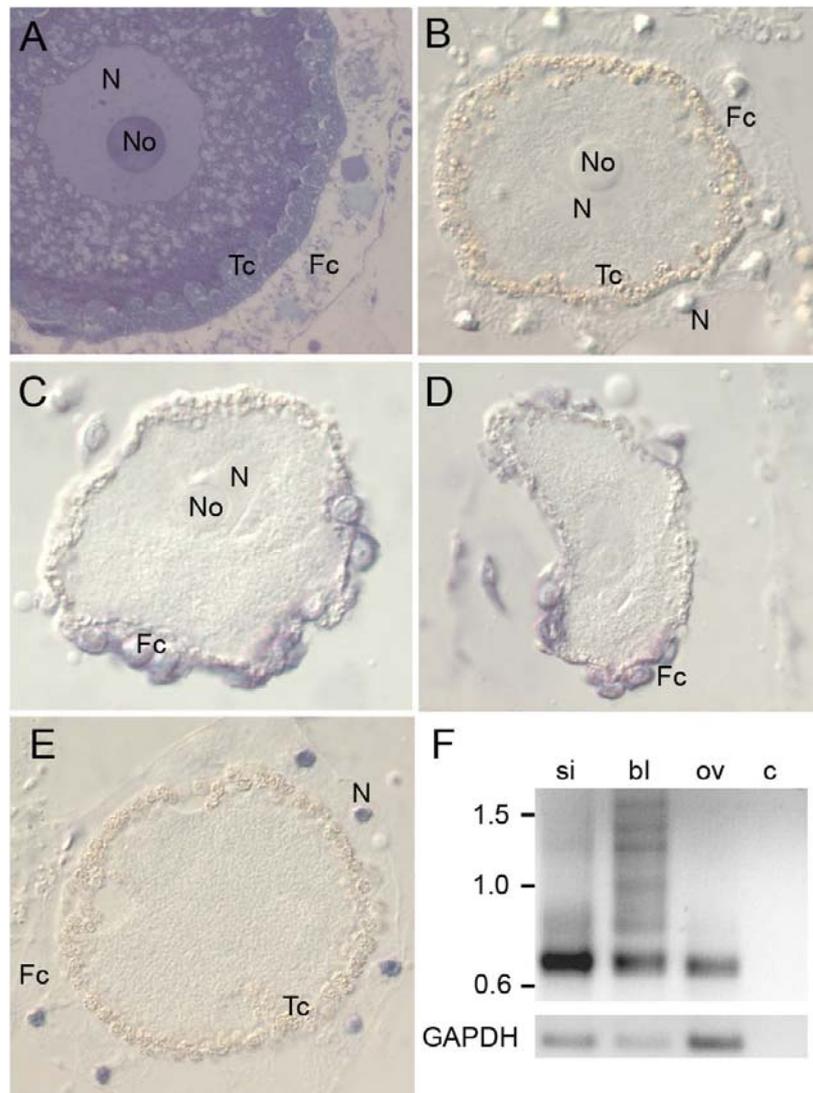


Abb. 2.19 Expressionsprofil von vCRL1. A) Semidünnschnitt (2 µm) einer vitellogenen Oozyte gefärbt mit Methylenblau; B-E) in situ Hybridisierung mit Schnitten (9 µm); B) Sense-Kontrolle vitellogene Oozyte; C,D) Antisense-Probe mit previtellogenen Oozyten; E) Antisense-Probe mit vitellogener Oozyte; F) semiquantitative RT-PCR-Analyse der Expression von vCRL1 mit GAPDH als Ladekontrolle; si: Siphon; bl: Hämocyten; ov: Ovar; c: Wasserkontrolle; Fc: Follikelzelle; Tc: Testzellen; N: Nukleus; No: Nukleolus

Wie in Abbildung 2.19 gezeigt, wird *vCRL1* in Zellen exprimiert, die die einzelnen Oozyten umgeben und als Follikelzellen bezeichnet werden (Marino et al., 1998). Dabei konnte beobachtet werden, dass sich während der Oozytenreifung die Lokalisation des Transkripts verändert. In Follikelzellen, die previtellogene Oozyten umgeben, wurde das Transkript im Zytoplasma detektiert (Abb. 2.19 C, D), während in Follikelzellen von reiferen vitellogenen Oozyten eine Lokalisation im Zellkern vorliegt (Abb. 2.19 E). Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die Expression von *vCRL1* innerhalb der Ovarien auf die Follikelzellen beschränkt ist.

Um die Expression in verschiedenen Geweben von *Ciona intestinalis* zu überprüfen, wurde eine RT-PCR mit Siphongewebe, Ovarien und Hämocyten von einem Individuum durchgeführt. Dabei konnte in jedem der untersuchten Gewebe eine PCR-Bande mit einer Größe von ca. 650 bp amplifiziert werden (Abb. 2.19 F). Interessanterweise konnten mehrere zusätzliche Banden mit einer Größe zwischen 750 bp und 1600 bp nur aus der cDNA von Hämocyten amplifiziert werden (Abb. 2.19 F). Daher scheint es so, als würde in Ovarien nur eine Variante der *vCRL1* Transkripte exprimiert, während in Hämocyten mehrere Transkripte mit verschiedenen Längen exprimiert werden, die wahrscheinlich mit den verschiedenen entdeckten Splicevarianten übereinstimmen (Abb. 2.14).

2.2.3 Identifikation eines zweiten Rezeptors mit CCP-Domänen

Anhand einer Analyse der *Ciona* EST-Datenbank konnte eine Klasse von ESTs entdeckt werden, die eine große Ähnlichkeit mit *vCRL1* aufweist, sich allerdings klar von den verschiedenen Varianten von *vCRL1* unterscheidet. Auf Grund des ähnlichen Aufbaus (siehe 2.2.3.1) wurde dieser Rezeptor *vCRL2* genannt. Aus den Sequenzinformationen wurde die längstmögliche Sequenz identifiziert und weiter analysiert. Zur weiteren Analyse wurde versucht, *vCRL2* aus den gleichen Tieren wie *vCRL1* zu amplifizieren.

2.2.3.1 Vergleich von *vCRL1* und *vCRL2*

Wie der Vergleich verschiedener Transkripte aus Tier G zeigt, lässt sich innerhalb der ersten ca. 300 bzw. 450 Nukleotide keine Übereinstimmung zwischen *vCRL1* und *vCRL2* feststellen. Im Gegensatz dazu zeigt der restliche Bereich der Sequenzen eine hohe Übereinstimmung und unterscheidet sich zwischen *vCRL1* und *vCRL2* vorrangig durch einzelne Nukleotidaustausche oder das Fehlen von bestimmten, kleineren Nukleotidbereichen (Abb. 2.20).

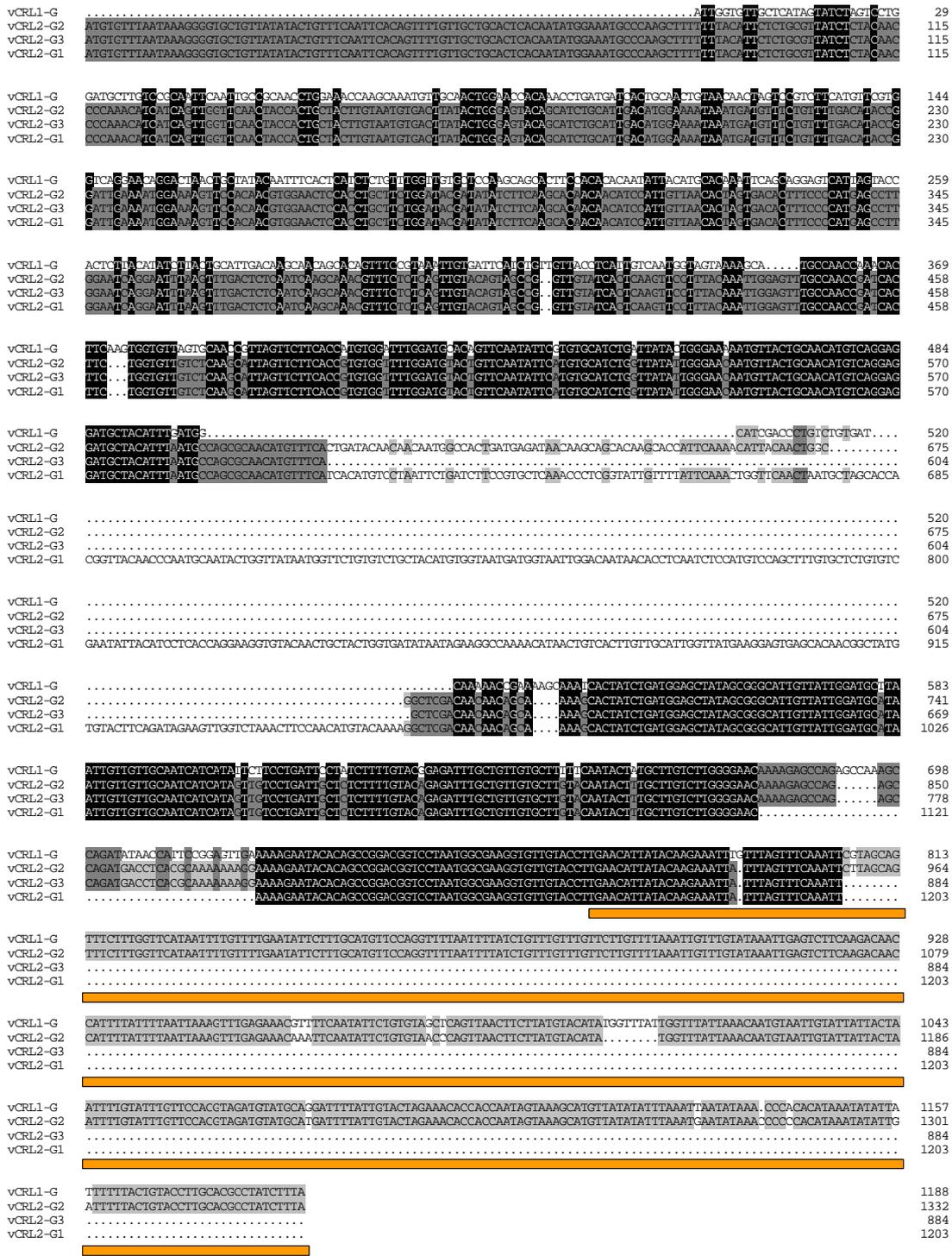


Abb. 2.20 Nukleotidalignment der vCRL1- und vCRL2- Varianten aus Tier G. Oranger Balken: 3'UTR

Ein Vergleich von vCRL1 und vCRL2 aus drei Individuen auf Aminosäureebene zeigt ebenfalls, dass sich vCRL1 und vCRL2 vor allem in der N-terminalen Region unterscheiden. So weisen vCRL2 und vCRL1 über die ersten 140 bzw. 110 Aminosäuren keinerlei Übereinstimmung auf. Dies ändert sich im weiteren Verlauf der Proteine, und es lassen sich größere Bereiche, die die erste CCP-Domäne und die

Transmembrandomäne umfassen, mit nahezu identischer Aminosäuresequenz erkennen. Die Sequenzunterschiede in diesen Bereichen scheinen nicht vCRL1- oder vCRL2-spezifisch zu sein, sondern treten auch zwischen den Versionen von vCRL1 bzw. vCRL2 aus verschiedenen Individuen auf (Abb. 2.21).

vCRL2-A	MCSIRGCCYILFQFTVLLLSHQYVNAQAPFFTSVLSLQSPISVVGSTATATCNVYFTGSAALTWKINIVSVLTYLIESGKVPQ	85
vCRL2-G1	MCLIKGCCYILFQFTVLLLSHQYVNAQAPFFTSVLSLQSPISVVGSTTTATCNVYFTGSAALTWKINIVSVLTYRIENKGVQ	85
vCRL2-G2	MCLIKGCCYILFQFTVLLLSHQYVNAQAPFFTSVLSLQSPISVVGSTTTATCNVYFTGSAALTWKINIVSVLTYRIENKGVQ	85
vCRL2-F	MCLIKGCCYILFQFTVLLLSHQYVNAQAPFFTSVLSLQSPISVVGSTATATCNVYFTGSAALTWKINIVSVLTYRIENKGVQ	58
vCRL1-A1LVLLIVSSPGYLSAIQLPQPGNQANVATGTINLMITATVSTSPSVCAWSGTGLAS	55
vCRL1-A2LVLLIVSSPGYLSAIQLPQPGNQANVATGTINLMITATVSTSPSVCAWSGTGLAS	55
vCRL1-A3LVLLIVSSPGYLSAIQLPQPGNQANVATGTINLMITATVSTSPSVCAWSGTGLAS	55
vCRL1-GLVLLIVSSPGYLSAIQLPQPGNQANVATGTINLMITATVSTSPSVCAWSGTGLAS	55
vCRL1-FLVLLIVSSPGYLSAIQLPQPGNQANVATGTINLMITATVSTSPSVCAWSGTGLAS	55
vCRL2-A	RGNPPASGYNTSSSTITTSIVNTDDTFPMSLEIRNVYFTLQNSTVLSLSCGAGCITQANLHKVCCPITLGVESIVSSSPCCGF	167
vCRL2-G1	RGTPPASGYDSSSTITTSIVNTSDTFPMSLGIRNLSLTLNQANVLSLCTVAGCITQVPLQIGVCCPITLGVWS.SISS.SPCCGF	167
vCRL2-G2	RGTPPASGYDSSSTITTSIVNTSDTFPMSLGIRNLSLTLNQANVLSLCTVAGCITQVPLQIGVCCPITLGVWS.SISS.SPCCGF	167
vCRL2-FDITFMNLEIRNVSLTLNQSTVLSLSCSEPGCIAPVQLQIGVCCPITLGVWS.SISS.SPCCGF	118
vCRL1-A1	TDFYSAFGCDFSSSTSTHITCTNSAGVINTLTYLTAITSNSTVSLNCNSAVVNTLSMIIQDCKENTSGVLA.TINPTSSCGI	139
vCRL1-A2	TDFYSAFGCDFSSSTSTHITCTNSAGVINTLTYLTAITSNSTVSLNCNSAVVNTLSMIIQDCKENTSGVLA.TINPTSSCGI	139
vCRL1-A3	TDFYSAFGCDFSSSTSTHITCTNSAGVINTLTYLTAITSNSTVSLNCNSAVVNTLSMIIQDCKENTSGVLA.TINPTSSCGI	139
vCRL1-G	IQFHSSLFGCAFSSSTSTHITCTNSAGVINTLTYLTAITSNSTVSLNCNSAVVNTLSMIIQDCKENTSGVLA.TVSS.SPCCGF	138
vCRL1-F	IQFHSSLFGCAFSSSTSTHITCTNSAGVINTLTYLTAITSNSTVSLNCNSAVVNTLSMIIQDCKENTSGVLA.TVSS.SPCCGF	138
vCRL2-A	GCTVQYSCESGYIGENVVATCCEDATFNASATCFSDTITMADEITSSSTSTIQNIITGG.....A	207
vCRL2-G1	GCTVQYSCASGYIGENVVATCCEDATFNASATCFSDTITMADEITSSSTSTIQNIITGG.....SITTAKA	209
vCRL2-G2	GCTVQYSCASGYIGENVVATCCEDATFNASATCFSDTITMADEITSSSTSTIQNIITGG.....SITTAKA	233
vCRL2-F	GCTVQYSCESGYIGSDVAVATCCANATFDNPMCTLSSRSK.....P	159
vCRL1-A1	GCTVQYSCAIDHTGNDVAVATCCEDATFDKDPACIQS.....TTTTTTTTTTTTTARP	190
vCRL1-A2	GCTVQYSCAIDHTGNDVAVATCCEDATFDKDPACIQS.....IDTTAMITDGIIMASTASTSTIQNIITGGTTTTTTTTTTTTTARP	218
vCRL1-A3	GCTVQYSCAIDHTGNDVAVATCCEDATFDKDPACIQS.....TTTTTTTTTTTTTARP	190
vCRL1-G	GCTVQYSCASDYTGKENVVATCCEDATFDGIDPVCDDQPKPKSKS.....	180
vCRL1-F	GCTVQYSCASDYTGKENVVATCCEDATFDGIDPVCDDQPKPKSKS.....	180
vCRL2-A	LSDGATAGIVIGCLIVVAIIIFFLPIFCIEICCCAFSILCLSWGTKKEYTAGRS.....	261
vCRL2-G1	LSDGATAGIVIGCLIVVAIIIVVLTALFCIEICCCACTILCLSWGTKPEPPDDLTKKKEKNTQPDGPNGEVWP..	283
vCRL2-G2	LSDGATAGIVIGCLIVVAIIIVVLTALFCIEICCCACTILCLSWGTKPEPPDDLTKKKEKNTQPDGPNGEVWP..	307
vCRL2-F	LSDGATAGIVIGCLIVVAIIIFFLPIFCIEICCCAFSILCLSWGTKKEYTAGRS.....	213
vCRL1-A1	LSDGATAGIVIGCLIVVAIIIVVLTALFCIEICCCAFSILCLSWGTKKEYTAGRS.....	244
vCRL1-A2	LSDGATAGIVIGCLIVVAIIIVVLTALFCIEICCCAFSILCLSWGTKPEPKPDDSLKKEKVEYTAGRS.....	288
vCRL1-A3	LSDGATAGIVIGCLIVVAIIIVVLTALFCIEICCCAFSILCLSWGTKVSTGKVTPLDRQNHIHYSS.....	256
vCRL1-G	LSDGATAGIVIGCLIVVAIIIFFLPIFCIEICCCAFSILCLSWGTKPEPKPDDSLKKEKNTQPDGPNGEVWP	256
vCRL1-F	LSDGATAGIVIGCLIVVAIIIFFLPIFCIEICCCAFSILCLSWGTKVSTGKVTPLDRQNHIHYSS.....	246

Abb. 2.21 Vergleich von vCRL1 und vCRL2 aus drei Individuen. Sequenzen aus gleichen Individuen werden mit gleichen Buchstaben bezeichnet; blauer Balken: erste CCP-Domäne; roter Balken: Transmembrandomäne

Vergleicht man die längsten Varianten von vCRL1 und vCRL2 (Abb. 2.22) aus verschiedenen Individuen, zeigt sich, dass für vCRL2 ebenfalls eine lange Variante existiert, die innerhalb der drei vorhergesagten CCP-Domänen große Übereinstimmung mit der längsten Variante von vCRL1 aufweist. Somit haben vCRL1 und vCRL2 nach einer HMM-Analyse (SMART) die gleiche Proteinstruktur. Allerdings konnten bisher keine Varianten von vCRL1 und vCRL2 kloniert werden, die innerhalb der ersten 110 bzw. 140 Aminosäuren eine Übereinstimmung aufweisen.

vcRL2-G1	MCLIKGCCYILFQFTVLLLSQYGNQAFFTFSSALS LQPQIS SVGSTTTATCNVTITGSDASALIMKINDVSVLTYRIENGKVPQRTPPASGYDIISSST	100
vcRL1-D2LVLIVSSPGCLSAIQLPQGNQANVATGTTNLTITATVITSPSSCSWSGTLTAIQFYSSLFCAPSSIS	71
vcRL2-G1	TTSTVNTSDTFPMSLGRNLSLTLNQNANVSLSCIVAGCITQVPLQIGVCQPIITSGVYSSISSSPCGFGCTVQYSCASGYHNNVTATCOEDATFNASATC	200
vcRL1-D2	SESLITCINSAGVINITLTYLTAMTSNSTVSNCDSSVVTSLSMVVKACQPNIS SGVSAIVSSSPCGFGCTVQYSCASGYHNNVTATCOEDATFDGIDPA	171
vcRL2-G1	F..ITCNSDLECSNIPRYCHIQTGSTNASTVTITCCNTIGYNGSVSATCGNDGNWITIPQSPCPALCSVSNITSSPGRCTITATGTLLEGONITVTCIGYE	298
vcRL1-D2	CIQITCNSDHLCSNLYCFNQTGSTNASTVTITIPCNIGYSGSVSATCGNDGNSWITIPQSPCPALCFVSDITSSPGRCTITATGTLLEGONITVTCIGYE	271
vcRL2-G1	GVSTTAVCTSDRSWSKLPCTCKGSTITTAKA.....LSLGAAGIVIGCIIVAVAILIIVVLTALFCEIECCCACTILCLSWGCKREYTT	379
vcRL1-D2	GVSTTAVCTSDRSWSNLPCTADITTTIREGSVASTTSTIQNSPTGGSSLSLGAAGIVIGCIIVAVAILIIFFLIPICCEIECCCACTILCLSWGCKKPYTP	371
vcRL2-G1	GRT.....	382
vcRL1-D2	EPDITIPDLKKNITQPDGPNEGGVVP	396

Abb. 2.22 Vergleich der längsten Versionen von vcRL1 und vcRL2. Blauer Balken: erste CCP-Domäne; grüner Balken: zweite CCP-Domäne; gelber Balken: dritte CCP-Domäne; roter Balken: Transmembrandomäne

Die phylogenetische Analyse des Aminosäurevergleichs aus Abbildung 2.21 zeigt, dass vcRL1 und vcRL2 trotz der hohen Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz und der Proteinstruktur zwei von einander separierte Gruppen bilden (Abb. 2.23).

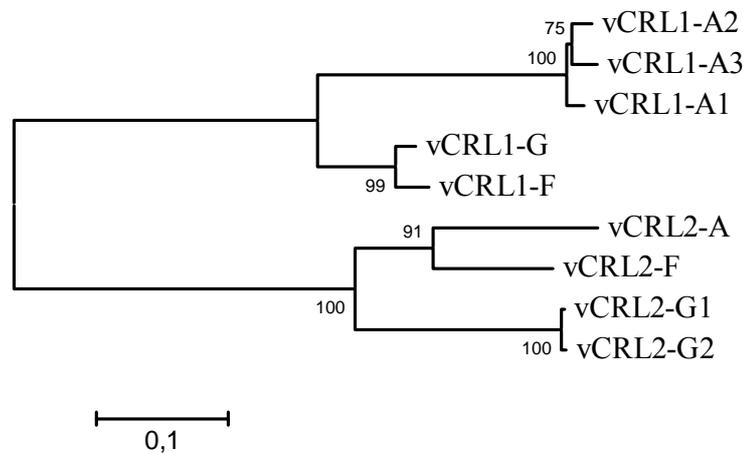


Abb. 2.23. Phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenz von vcRL1 und vcRL2 aus drei identischen Tieren. Balken: 0,1 Aminosäureaustausch pro Position

Allerdings ist die hohe Übereinstimmung zwischen *vcRL1* und *vcRL2* innerhalb des 3' Bereichs beider Gene nicht nur auf den kodierenden Bereich beschränkt, sondern setzt sich auch in der 3'UTR fort (Abb. 2.20). Dieses hohe Maß an Übereinstimmung einzelner, nicht hundertprozentig identischer Bereiche, lässt sich durch zwei mögliche Szenarien erklären: (i) *vcRL1* und *vcRL2* werden vom gleichen genomischen Bereich von unterschiedlichen Chromosomen transkribiert; oder (ii) die Ursachen für dieses Phänomen liegen in einem Duplikationsereignis der Genomregion. Um dies zu

überprüfen wurde ein Southern Blot mit einer für den 3'UTR-Bereich von *vCRL1* und *vCRL2* spezifischen Probe durchgeführt (Abb. 2.24).

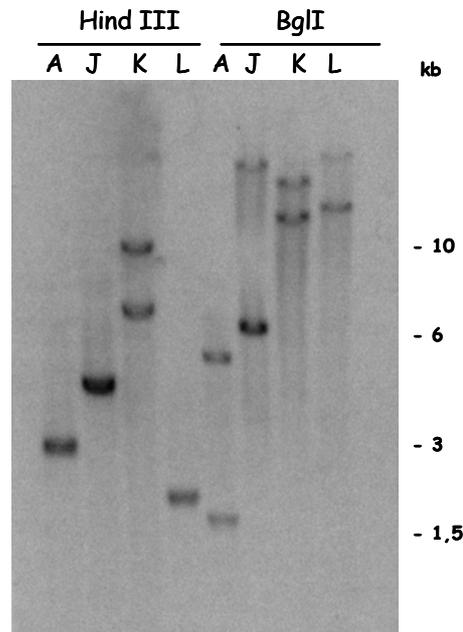


Abb. 2.24 Southern Blot Analyse der 3'UTR von *vCRL1* und *vCRL2* mit gDNA aus vier Individuen aus Helgoland. gDNA wurde mit *HindIII* und *BglI* verdaut. Probe: UTR aus Tier C, amplifiziert mit den Primern AK17utr18_F und AK17utr18_R

Dabei zeigt die Abbildung 2.24, dass nur eine oder maximal zwei Banden auf dem Southern Blot erkennbar sind. Weiterhin ist zu beobachten, dass in den Spuren mit *BglI* verdauter gDNA das gleiche Bandenmuster auftritt (Abb. 2.24) wie im Southern Blot mit einer für den kodierenden Bereich von *vCRL1* und *vCRL2* spezifischen Probe (Abb. 2.17). Dies deutet darauf hin, dass die 3'UTRs von *vCRL1* und *vCRL2* aus derselben genomischen Region stammen, aber auf Grund der Sequenzunterschiede innerhalb eines Tieres (Abb. 2.20) höchstwahrscheinlich von zwei unterschiedlichen Chromosomen stammen.

Durch die Analyse der JGI Datenbank (JGI v1.0) lässt sich *vCRL2* in Scaffold 948 lokalisieren. Dies ist der gleiche Scaffold, in dem auch *vCRL1* liegt. Somit erhärtet die Analyse der Genomdatenbank die Annahme, dass *vCRL1* und *vCRL2* aus der gleichen genomischen Region stammen. Allerdings lässt sich auf Grund von unklaren Daten im Genomprojekt keine genaue Lokalisation der ersten nicht übereinstimmenden Nukleotide von *vCRL1* und *vCRL2* erreichen.

2.2.3.2 Die Variabilität von vCRL2 zwischen und innerhalb einzelner *Ciona* Individuen ist mit der von vCRL1 vergleichbar

Da vCRL1 eine hohe Variabilität sowohl zwischen einzelnen als auch innerhalb einzelner Individuen aufweist, wurde der gesamte kodierende Bereich von vCRL2 aus fünf verschiedenen Tieren amplifiziert und mit der Sequenz aus den öffentlichen Datenbanken verglichen. Wie im Fall von vCRL1 zeigen auch hier die Sequenzen von vCRL2 aus unterschiedlichen Tiere große Unterschiede innerhalb ihrer Aminosäuresequenz, die auf dem Austausch von einzelnen Aminosäuren basieren (Abb. 2.25).

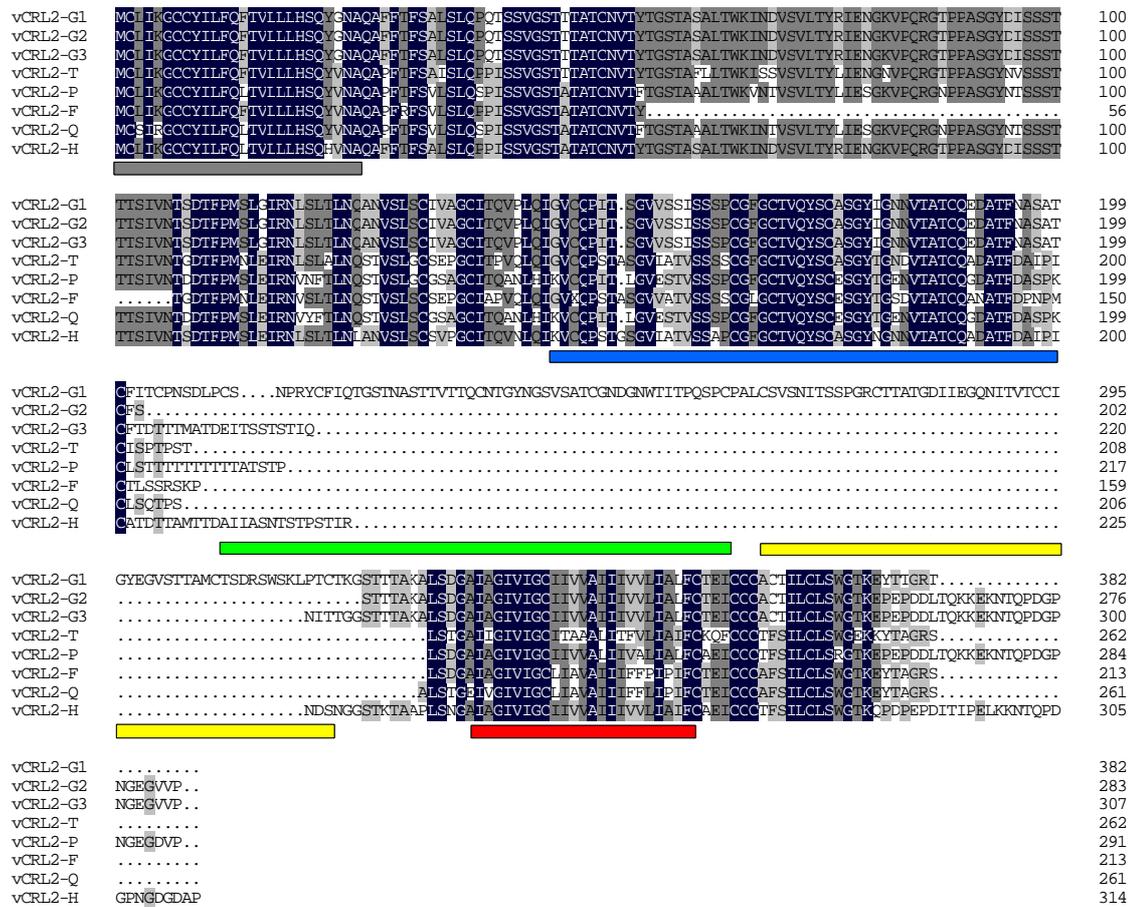


Abb. 2.25 vCRL2 Aminosäurealignment von acht Aminosäuresequenzen aus sechs Individuen. Sequenzen aus gleichen Individuen werden mit gleichen Buchstaben bezeichnet; vCRL2-H: EST-Sequenz aus Japan; grauer Balken: Signalpeptid; blauer Balken: erste CCP-Domäne; grüner Balken: zweite CCP-Domäne; gelber Balken: dritte CCP-Domäne; roter Balken: Transmembrandomäne

Dies führt dazu, dass einzelne Sequenzen von unterschiedlichen Tieren eine Identität zwischen 75-90% über die gesamte Länge des Proteins aufweisen, was mit den Werten für vCRL1 vergleichbar ist. Die phylogenetische Analyse von vCRL2 zeigt, dass auch

für vCRL2 die Sequenz (H) aus Japan keine speziell abgegrenzte Position im phylogenetischen Baum einnimmt (Abb. 2.26).

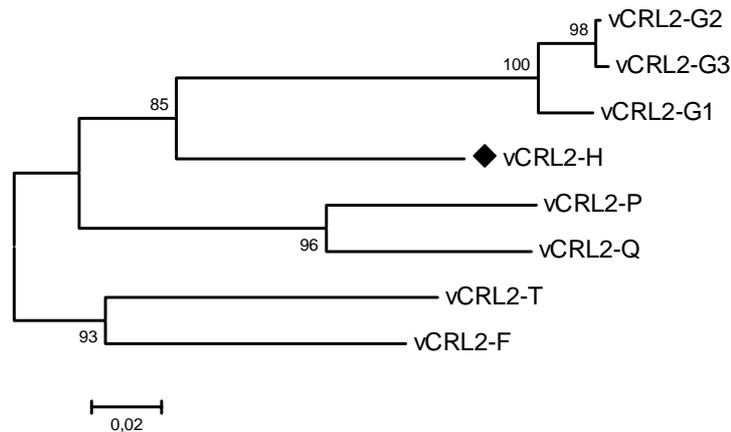


Abb. 2.26 Phylogenetische Analyse von vCRL2 aus sechs Tieren. Sequenz aus Japan mit Viereck markiert, Balken markiert 0,02 Aminosäureaustausche pro Position

Ebenfalls vergleichbar mit der Situation für vCRL1 ist die Tatsache, dass verschiedene Varianten von vCRL2 innerhalb eines Individuums identifiziert werden konnten. Diese weisen unterschiedliche Längen auf, die auf das Vorhandensein bzw. Fehlen einzelner Sequenzabschnitte zurückzuführen sind. vCRL2 zeigt ebenfalls, wie vCRL1, Unterschiede innerhalb der intrazellulären Domäne und besitzt Varianten aus zwei Tieren (vCRL2-F, -Q), die eine zu der zytoplasmatischen Region von vCRL1 (Abb. 2.14 vCRL1-E1,-C2) identische intrazelluläre Sequenz besitzen.

Mit vCRL2 konnte daher neben vCRL1 ein zweiter hoch variabler Rezeptor entdeckt werden, der hohe Ähnlichkeiten mit vCRL1 aufweist und wahrscheinlich in der gleichen genomischen Region liegt.

2.2.4 Die Variabilität ist in *Ciona* auf eine bestimmte Gruppe von Proteinen beschränkt

Die Daten der Analyse zeigen, dass mit den VC-Genen und vCRL1 alle aus der SSH-cDNA-Datenbank ausgewählten und untersuchten Gene Polymorphismus aufweisen. Allerdings ist bekannt, dass *Ciona intestinalis* mit 1,2 % unterschiedlichen Nukleotiden zwischen Allelen eines einzelnen Individuums im Vergleich zum Menschen ein 15-fach höheres Maß an allelischem Polymorphismus aufweist (Dehal et al., 2002).

Daher wurde zur Prüfung, wie stark ausgeprägt die Unterschiede zwischen Sequenzen verschiedener Individuen sind, und ob die in den untersuchten Genen gefundene Variabilität innerhalb der natürlich auftretenden interindividuellen Variabilität liegt, die Sequenzvariabilität von zwei Kontrollgenen untersucht. Als eines der beiden

Kontrollgene wurde *GAPDH*, ein Stoffwechsellenzym, ausgesucht, welches auch zur Kalibrierung von RT-PCRs und Northern Blots genutzt wird. Um den genomischen Bereich von *GAPDH* auf Unterschiede im Restriktionsverdau zu untersuchen, wurde ein Southern Blot mit gDNA von vier verschiedenen Tieren durchgeführt. Als Probe wurde das *GAPDH*-Fragment (AY89057) verwendet.

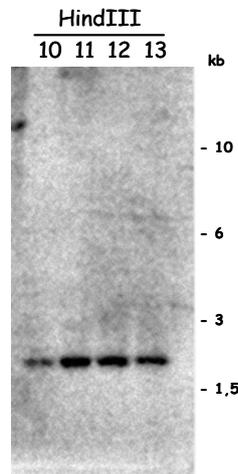


Abb. 2.27 Southern Blot mit *GAPDH* von vier Tieren mit *HindIII* verdaut

Der Southern Blot weist keine Unterschiede im RFLP-Muster innerhalb der vier Tiere auf (Abb. 2.27).

Als zweite Kontrolle wurde *ciFLRT* ausgesucht, ein Transmembranrezeptor, der in Hämocyten exprimiert wird und ein Signalpeptid, neun LRRs (leucine rich repeats), eine Fibronectin Typ III Domäne und eine Transmembrandomäne besitzt (Abb. 2.28) (Khalturin et al., 2005).



Abb. 2.28 Proteinstruktur von *ciFLRT*. SP: Signalpeptid (grau); LRR: Leucine Rich Repeat; orange: N-Terminaler LRR; gelb: C-Terminaler LRR; blau: Transmembrandomäne (TM); Fn3 : Fibronectin Typ III Domäne

In Agnathen wurde ein ähnliches Protein kürzlich als somatisch diversifiziert und als hoch variabel zwischen Individuen identifiziert (Pancer et al., 2005; Adler et al., 2005). *ciFLRT* ist auf Grund seiner Expression in Hämocyten und der strukturellen Ähnlichkeit zu VLR aus dem Neunauge ein geeignetes Kontrollgen, um zu überprüfen ob die Variabilität in den hier untersuchten Genen größer ist als in anderen Transmembranrezeptoren in *Ciona intestinalis*.

Zur Bestimmung der Variabilität von ciFLRT wurde ein 987 bp langes Fragment, das die neun vorhergesagten LRRs umfasst (Khalturin et al., 2005), aus vier verschiedenen Individuen kloniert und sequenziert. Auf Ebene der DNA liegt der Unterschied der vier Sequenzen mit einer Identität von jeweils nur 96% (Daten nicht gezeigt) höher als der von Dehal beobachtete Polymorphismus zwischen Allelen (Dehal et al., 2002). Allerdings wurden innerhalb der 329 Aminosäuren nur sieben Aminosäurepositionen identifiziert, die zwischen den vier Individuen variieren (Abb. 2.29).

FLRT_B	ACVNRRCDSRNIVYCIENSWIFVYPIVETRSINMYRNNITNGPITNANLERLNLKLEMDHNDLKSPFIGLPNSLELTYFCKNDIKYIGRNSLHGLSNLNLHLDENNTIN	115
FLRT_D	ACVNRRCDSRNIVYCIENSWIFVYPIVETRSINMYRNNITNGPITNANLERLNLKLEMDHNDLKSPFIGLPNSLELTYFCKNDIKYIGRNSLHGLSNLNLHLDENNTIN	115
FLRT_J	ACVNRRCDSRNIVYCIENSWIFVYPIVETRSINMYRNNITNGPITNANLERLNLKLEMDHNDLKSPFIGLPNSLELTYFCKNDIKYIGRNSLHGLSNLNLHLDENNTIN	115
FLRT_A	ACVNRRCDSRNIVYCIENSWIFVYPIVETRSINMYRNNITNGPITNANLERLNLKLEMDHNDLKSPFIGLPNSLELTYFCKNDIKYIGRNSLHGLSNLNLHLDENNTIN	115
FLRT_B	KGLSSVAFKDATRLMELVLTNNLLTAVPEGLFVSLRVLRLDNNLVQRVTHSALQPLTRLRLDL SGNSIMCKFVEEAFGLHRLRLTLDISANRIQTIPKGLPDNLDELLSKNS	230
FLRT_D	KGLSSVAFKDATRLMELVLTNNLLTAVPEGLFVSLRVLRLDNNLVQRVTHSALQPLTRLRLDL SGNSIMCKFVEEAFGLHRLRLTLDISANRIQTIPKGLPDNLDELLSKNS	230
FLRT_J	KGLSSVAFKDATRLMELVLTNNLLTAVPEGLFVSLRVLRLDNNLVQRVTHSALQPLTRLRLDL SGNSIMCKFVEEAFGLHRLRLTLDISANRIQTIPKGLPDNLDELLSKNS	230
FLRT_A	KGLSSVAFKDATRLMELVLTNNLLTAVPEGLFVSLRVLRLDNNLVQRVTHSALQPLTRLRLDL SGNSIMCKFVEEAFGLHRLRLTLDISANRIQTIPKGLPDNLDELLSKNS	230
FLRT_B	TEFVYSTSSENESPTAFGSLSGLTMLTKLDI SSNGLKSVEGAFDSQCRLRTICELQNNWQDCVLYLKHWSSTTTTTLSSERNTRCSSPQAFSGVTL	329
FLRT_D	TEFVYSTSSENESPTAFGSLSGLTMLTKLDI SSNGLKSVEGAFDSQCRLRTICELQNNWQDCVLYLKHWSSTTTTTLSSERNTRCSSPQAFSGVTL	329
FLRT_J	TEFVYSTSSENESPTAFGSLSGLTMLTKLDI SSNGLKSVEGAFDSQCRLRTICELQNNWQDCVLYLKHWSSTTTTTLSSERNTRCSSPQAFSGVTL	329
FLRT_A	TEFVYSTSSENESPTAFGSLSGLTMLTKLDI SSNGLKSVEGAFDSQCRLRTICELQNNWQDCVLYLKHWSSTTTTTLSSERNTRCSSPQAFSGVTL	329

Abb. 2.29 ciFLRT Aminosäurealignment von vier Individuen. oranger Balken: N-Terminale LRR; blaugrüner Balken: LRR; gelber Balken: C-Terminale LRR

Insgesamt zeigen zwei Sequenzen mit nur einem Aminosäureaustausch eine nahezu 100%-ige und die anderen Sequenzen eine 99%-ige Übereinstimmung auf Aminosäureebene.

Dies zeigt, dass der beobachtete Unterschied auf Aminosäureebene in allen untersuchten Genen größer ist als innerhalb der Kontrollgene, und dass trotz der hohen Variabilität über das gesamte Genom von *Ciona* eine erhöhte Variabilität auf bestimmte Proteine beschränkt ist.

2.2.5 „Maximum likelihood“ Analyse der Sequenzen mit Hilfe des Programms Codeml

Untersuchungen haben gezeigt, dass Proteine die an der Interaktion von Spermium und Oozyte beteiligt sind, sich auf Grund von positiver (darwinistischer) Selektion in unterschiedlichen Spezies schnell auseinander entwickeln (Swanson and Vanquier, 1998), und dass sich mehrere MHC-Allele nur durch wenige unter positiver Selektion befindlichen Aminosäurepositionen innerhalb der Antigen-bindenden Region unterscheiden (Hughes and Nei, 1988). Daher scheint positive Selektion ein möglicher Mechanismus zu sein, Variabilität innerhalb bestimmter Gruppen von Erkennungsmolekülen zu erzeugen.

Um zu untersuchen, ob die festgestellten Unterschiede in Vc16, Vc182 und vCRL1 auf positive (darwinistische) Selektion zurück zu führen sind, wurde mit Hilfe der „maximum likelihood“ Methode das Verhältnis (ω) zwischen d_N/d_S (nicht-synonymen/synonymen Nukleotidaustausche) bestimmt. Dabei deutet ein Wert von $\omega > 1$ darauf hin, dass nicht-synonyme Nukleotidaustausche einen Fitness- bzw. Selektionsvorteil darstellen und damit eine höhere Wahrscheinlichkeit haben, als synonyme Nukleotidaustausche fixiert zu werden (Yang et al., 2000). Dafür wurden alle amplifizierten Sequenzen von Vc16 und Vc182 und jeweils eine Sequenz der Tiere A-H von vCRL1 mit Hilfe des Programms PAML untersucht (Yang, 1997; Yang et al., 2000). Auf Grund einer geringen Individuenzahl wurde auf eine Analyse der Sequenzen VC569 und vCRL2 verzichtet. Für die Analyse wurden die Modelle M3 und M8 verwendet, die aus den 13 verfügbaren Modellen empfohlen und am häufigsten verwendet werden (Suzuki und Nei, 2002; Yang, 2000; Yang et al., 2000). Diese Modelle erlauben die Identifikation positiver Selektion und können über einen LRT-Test (likelihood ratio test) mit dem Modell M0 für M3 und Modell M7 für M8 verglichen werden. Die Modelle M0 und M3 lassen keine positive Selektion zu, so dass der Vergleich der Modelle als Test auf positive Selektion gewertet werden kann. Dazu wird der zweifache Logarithmus des „likelihood“-Wertes $2\Delta l = 2x [(\ln l_x) - (\ln l_y)]$ mit $x = M8$ bzw. $M3$ und $y = M7$ bzw. $M0$ berechnet und mit dem $\chi^2_{1\%}$ -Wert mit einem Freiheitsgrad von 1 für M8 und 4 für M3 verglichen. Der Grad der Freiheit entspricht dabei der Differenz der freien Parameter zwischen den verglichenen Modellen. Zeigt der LRT-Test für M3 und M8 darwinistische Selektion an und der Vergleich mit Modell M0 bzw. Modell M7, dass Modell M3 und M8 besser für die Auswertung der Daten geeignet sind als M0 und M8, kann daraus geschlossen werden, dass positive Selektion vorliegt. In einem zweiten Schritt können dann über eine „empirical Bayes“ Analyse potentielle Aminosäurepositionen unter positiver Selektion identifiziert werden.

Analyse von Vc182

Die Maximum-Likelihood Analyse von VC182 zeigt sowohl für M3 als auch für M8 positive Selektion. Die LRT-Statistik für den Vergleich von M0 und M3 ist für $2\Delta l = 2x [(-2122,9) - (-2138,7)] = 31,6$. Da $\chi^2_{1\%}$ mit 13,27 bei einem Freiheitsgrad von 4. deutlich kleiner ist, kann M3 für die weitere Analyse benutzt werden. Für M7 und M8 ist $2\Delta l$ mit 6,2 kleiner bzw. nahezu identisch mit dem $\chi^2_{1\%}$ -Wert von 6,6, so dass M8 nicht für eine weitere Analyse geeignet ist. Das Modell M3 sagt voraus, dass sich 5,1% aller Aminosäuren mit einem $\omega = 4,1$ unter diversifizierender Selektion befinden. Um

diese Stellen im Protein zu lokalisieren, wurde eine „empirical Bayes“ Analyse durchgeführt. Diese sagt drei Stellen im Protein voraus, die sich mit hoher Wahrscheinlichkeit unter positiver oder diversifizierender Selektion befinden. Darunter befinden sich eine Stelle mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit zwischen 95 und 99% und 2 Stellen mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit über 99% (Tab. 2.5, Abb. 2.8 gekennzeichnet mit *). Die drei vorhergesagten Positionen zeigen kein gehäuftes Auftreten innerhalb einer bestimmten Region, sondern sind über das gesamte Protein verteilt (Abb. 2.8).

Tab. 2.5 Aminosäuren unter positiver Selektion in Vc182 nach M3. Die in der ersten Spalte angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf Vc182 aus Tier A. Die Sterne wurden in dem Aminosäurevergleich (Abb. 2.8) zur Kennzeichnung der Aminosäurepositionen unter positiver Selektion verwendet

Aminosäure in Vc182-A	posteriore Wahrscheinlichkeit	ω
96 L	0.994**	4.031
159 D	0.990*	4.014
296 I	0.999**	4.050

Analyse von VC16

Die Analyse der Sequenzen von Vc16 die mit Hilfe der „Maximum likelihood“ Analyse und LRT-Statistik durchgeführt wurde zeigt, dass sowohl M3 mit $2\Delta l = 73,6$ verglichen mit einem $\chi^2_{1\%}$ von 13,27, als auch M8 mit $2\Delta l = 22,8$ signifikant besser zu unseren Daten passen als M0 und M3. Beide Modelle schlagen vor, dass sich 0,6% aller Aminosäurepositionen mit einem ω -Wert von 8,5 unter positiver Selektion befinden. Darunter befindet sich eine Position mit einer Wahrscheinlichkeit zwischen 95 und 99% und eine mit einer Wahrscheinlichkeit über 99% (Tab. 2.6 und Abb. 2.6 gekennzeichnet mit *). Die zwei Aminosäurepositionen mit Wahrscheinlichkeiten über 95% befinden sich nebeneinander in einer Region, die mit die größten Sequenzunterschiede aufweist, und direkt vor der EGF-Domäne liegt (Abb. 2.6).

Tab. 2.6 Aminosäuren unter positiver Selektion nach M3. Die in der ersten Spalte angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf Vc16 aus Tier A. Die Sterne wurden in dem Aminosäurevergleich (Abb. 2.6) zur Kennzeichnung der Aminosäurepositionen unter positiver Selektion verwendet. grün: Aminosäure unter positiver Selektion mit einer Wahrscheinlichkeit zwischen 95 und 99% nach M8; rot: Aminosäure unter positiver Selektion mit einer Wahrscheinlichkeit über 99% nach M8

Aminosäureposition in Vc16-A	posteriore Wahrscheinlichkeit	ω
55 R	1.000**	8.487
56 E	0.985*	8.366

Analyse von vCRL1

Für vCRL1 wurden die gleichen Analysen wie für Vc16 und Vc182 durchgeführt. Dabei zeigt der LRT, dass sowohl M3 mit $2\Delta l = 66.2$ verglichen mit einem $\chi^2_{1\%}$ von 13,27 bei einem Grad der Freiheit von 4, als auch M8 mit einem $2\Delta l = 17,4$ verglichen mit einem $\chi^2_{1\%}$ von 6,6, besser zu unseren Daten passen als M0 und M7. Das Modell M3 sagt voraus, dass sich 31,9% aller Aminosäuren mit $\omega = 2,1$ unter diversifizierender Selektion und 1% der Aminosäuren mit $\omega = 31,2$ unter starker positiver Selektion befinden. Um die Aminosäurepositionen im Protein zu lokalisieren, wurde ebenfalls eine „empirical Bayes“ Analyse durchgeführt. Diese Analyse identifizierte 21 Stellen im Protein (Tab. 2.7, Abb. 2.14 gekennzeichnet mit*), die sich wahrscheinlich unter positiver oder diversifizierender Selektion befinden, 9 Stellen mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit zwischen 95 und 98% und 12 Stellen mit einer posterioren Wahrscheinlichkeit über 98% (Tab. 2.7; Abb. 2.14). M8 sagt voraus, dass sich 7,7% aller Aminosäuren unter positiver Selektion mit $\omega = 4,9$ befinden. Allerdings können nur 4 der mit M3 identifizierten Aminosäuren mit einer Wahrscheinlichkeit von $> 95\%$ durch die anschließende „empirical Bayes“ Analyse bestätigt werden. Vergleicht man die Aminosäurepositionen, die nach M8 mit einer Wahrscheinlichkeit von größer als 80% unter positiver Selektion stehen, konnten insgesamt 11 der 21 in M3 gefundenen Aminosäurepositionen bestätigt werden (Tab. 2.7).

Tab. 2.7 Aminosäuren unter positiver Selektion in vCRL1 nach M3. Die in der ersten Spalte angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf vCRL1 aus Tier F1. Die Sterne wurden in dem Aminosäurevergleich (Abb. 2.14) zur Kennzeichnung der Aminosäurepositionen unter positiver Selektion verwendet. gelb: Aminosäure unter positiver Selektion mit Wahrscheinlichkeit >80% nach M8; grün: Aminosäure unter positiver Selektion mit Wahrscheinlichkeit zwischen 95 und 99% nach M8; rot: Aminosäure unter positiver Selektion mit Wahrscheinlichkeit über 99% nach M8

Aminosäureposition in vCRL1-F1	posteriore Wahrscheinlichkeit	ω
44 C	0.989*	2.158
49 S	0.994**	2.416
54 T	0.984*	2.071
55 A	0.985*	2.072
57 Q	0.994**	2.066
62 L	1.000**	28.754
66 A	0.999**	2.218
71 S	0.955*	2.006
85 S	1.000**	3.032
110 T	0.952*	2.013
124 S	0.993**	2.088
148 S	0.999**	2.661
168 I	0.983*	2.056
171 V	0.996**	2.175
173 D	0.986*	2.076
174 Q	0.988*	2.067
175 K	0.995**	4.304
183 D	1.000**	30.711
202 F	0.995**	2.087
208 F	0.989*	2.054
210 T	1.000**	8.440

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Analyse für alle Sequenzen ergab, dass sie unter positiver Selektion stehen. Allerdings scheint die positive Selektion für Vc16 und Vc182 geringer zu sein, als die für vCRL1 identifizierte.

Dieses Ergebnis stimmt mit dem erhöhten Grad an Polymorphismus in vCRL1 überein.

3 Diskussion

3.1 Systematische Analyse zur Identifikation von immunologisch relevanten Genen

Das Suchen nach homologen Genen vieler Schlüsselmoleküle des Immunsystems hat sich speziell in Nichtmodellorganismen als sehr zeitaufwendig herausgestellt. Vorallem für Moleküle, die an der Erkennung oder Markierung von Selbst beteiligt sind hat sich dieses Vorgehen als nicht sehr erfolgreich erwiesen (Khalturin et al., 2004). Dies kann entweder daran liegen, dass viele der Moleküle sich zu einem so hohen Grad auseinander entwickelt haben, dass eine Homologie nicht mehr zu entdecken ist oder daran, dass verschiedene Tiergruppen unterschiedliche Strategien entwickelt haben, mit diesem Problem umzugehen (Khalturin et al., 2004; Klein, 1998; Klein, 2006). Vielversprechender scheint die Nutzung unvoreingenommener Suchmethoden zu sein (Khalturin et al., 2004). Bei der Suche nach unterschiedlich regulierten Genen während der Fusion bzw. Abstoßung von Kolonien von *Botryllus schlosseri* konnte beispielsweise mit Hilfe einer DD-PCR-Technik mit bsCD94-1 ein potentiell Homolog von CD94 bzw. NKRP-1 gefunden werden (Khalturin et al., 2003). Darüber hinaus führte eine genetische Methode, bei der durch Kreuzungs- und Segregationsexperimente mit Inzuchtlinien versucht wurde, den für die Gewebeunverträglichkeit verantwortlichen Locus zu identifizieren, ebenfalls in *Botryllus schlosseri* zu der Charakterisierung eines potentiell für die Gewebeunverträglichkeit wichtigen Gens (*cFu/HC*) (De Tomaso et al., 2005). Allerdings ist diese Methode sehr zeitaufwendig (De Tomaso et al., 1998; De Tomaso et al., 2005) und kann sich auf Grund von Inzuchtsuppression als sehr schwierig erweisen (De Tomaso und Weissman, 2003).

3.2 Identifikation von ciCD94-1 und die Suche nach möglichen Interaktionspartnern mit dem „Yeast Two-Hybrid“ System

Die Identifikation von bsCD94-1 auf Blutzellen von *Botryllus schlosseri* (Khalturin, 2002; Khalturin et al., 2003) und die Identifikation von ciCD94-1 in *Ciona intestinalis* (Khalturin et al., 2004) hat einige nicht unerhebliche Implikationen und wirft viele interessante Fragen auf.

So scheinen die Identifikation eines möglichen CD94 Homologs und die Entdeckung verschiedener potentieller NK-Zellrezeptoren, Proteine der Signaltransduktionskaskade (Azumi et al. 2003; Khalturin, 2002) sowie der Nachweis zytotoxischer Zellreaktionen (Parinello et al., 1996) starke Hinweise darauf zu geben, dass NK-Zellen schon in ancestralen Chordaten existieren. Auf Grund des Fehlens aller MHC-Klasse Liganden in den bereits sequenzierten Genomen der Urochordaten *Ciona intestinalis* und *Ciona savignyi* stellt sich die Frage nach der Rolle der potentiellen NK-Zellrezeptoren, nach möglichen Liganden und danach ob diese Aufschlüsse über die Evolution der NK-Zellen und ihrer Regulation geben können.

Bei dem von uns gewählten „Yeast Two-Hybrid“ System handelt es sich um eine Hochdurchsatz-Methode, die es ermöglicht, das gesamte Transkriptom eines Organismus auf mögliche Interaktionspartner zu untersuchen. Wie auch die meisten anderen Hochdurchsatz-Methoden ist das „Yeast Two-Hybrid“ System anfällig, sowohl falsch-negative als auch falsch-positive Ergebnisse zu produzieren. Allerdings kann die Zahl von falsch-positiven Ergebnissen durch Kontrollexperimente oft reduziert werden (Vidalain et al., 2004). Während der Suche nach möglichen Interaktionspartnern von ciCD94-1 konnten durch die gewählten Kontrollexperimente fünf der 12 möglichen Interaktionspartner mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, während für die sieben verbliebenen, potentiellen Interaktionspartner keine eindeutige Verifizierung oder Falsifizierung möglich war.

Allerdings erscheint eine weitere Eingrenzung der potentiell biologisch relevanten Interaktionspartner auf Grund der Ergebnisse der Datenbankanalyse möglich. So müssen neben der physikalischen Interaktion, die durch das „Yeast Two-Hybrid“ System nachgewiesen werden kann, auch andere Bedingungen erfüllt werden. Wenn die Interaktion eine biologische Rolle spielen soll, müssen die Proteine *in vivo* in Kontakt kommen. Daher lassen sich mit großer Wahrscheinlichkeit Proteine, die keine Co-Lokalisation innerhalb des lebenden Organismus aufweisen, aus dem Kandidatenkreis ausschließen.

Es besteht daher nur eine geringe Wahrscheinlichkeit, dass die im „Yeast Two-Hybrid“ System beobachtete Interaktion von pL10 und ciCD94-1 relevant für die mögliche Funktion von ciCD94-1 als NK-Zellrezeptor ist. Sowohl die hohe Homologie zu Tektin als auch die überwiegende Expression in den Hoden impliziert vielmehr eine mögliche Rolle von pL10 bei der Bildung der Mikrotubuli von Spermien.

Auch das Auftreten einer *in vivo* Interaktion von ciCD94-1 und pL4 als Rezeptor-Liganden-Paar erscheint relativ unwahrscheinlich, da pL4 eine hohe Homologie zu dem

Protein GABA-Rap aufweist, das in den Transport des GABA-Rezeptors involviert ist (Nymann-Andersen et al., 2002). Allerdings ist interessant, dass pL4 als einziger potentieller Interaktionspartner zusammen mit ciCD94-1 auf Chromosom 1 liegt und dass auch im menschlichen Genom das Protein GABA-RAPL1 (GeneID: 23710, HGNC:4068) auf Chromosom 12 im Bereich (12p13.2) des Natural killer cell cluster (NKC) lokalisiert ist. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist jedoch fraglich, da sowohl die hier vorliegenden als auch andere Untersuchungen bisher kein ursprüngliches NKC in *Ciona intestinalis* nachweisen konnten (Khalturin et al., 2004; Azumi et al., 2003). Daraus ergibt sich die Frage, ob das geclusterte Auftreten von NK-Zellrezeptoren erst in Wirbeltieren auftritt und damit ein mögliches Ergebnis der vermuteten zwei aufeinander folgenden Genomduplikationen ist (Azumi et al., 2003).

Die anderen potentiellen Kandidaten lassen sich anhand der Homologie zu bekannten Proteinen und anhand der Expressionsanalyse nicht eindeutig aus dem Kandidatenkreis ausschließen.

Allerdings zeigt pL2 alle Eigenschaften, die eine *in vivo* Interaktion mit ciCD94 wahrscheinlich machen: In den Kontrollversuchen zeigt pL2 eine spezifische Interaktion mit dem ciCD94-Konstrukt in Hefe und ist ein Transmembranprotein mit einer extrazellulären SCP-Domäne, die Protein-Protein Interaktionen ermöglichen kann (Udby et al., 2005). Zusätzlich zeigen die Ergebnisse der RT-PCR eine gewebespezifische Expression, die einen Kontakt zwischen beiden Proteinen ermöglicht. Zusammenfassend konnten mit Hilfe des „Yeast Two-Hybrid“ Systems daher mehrere potentielle Interaktionspartner identifiziert werden, darunter ein Gen (pL2), das auf Grund seiner Proteinstruktur und Expression als wahrscheinlichster Kandidat für eine *in vivo* Interaktion gilt. Allerdings kann eine Bestätigung der potentiellen Interaktion nur über eine zweite unabhängige Methode zur Identifikation von Protein-Protein Interaktionen erfolgen.

3.3 Selbst-/Nichtselbsterkennung in Invertebraten: Ein Prinzip und viele Mechanismen

Die Fähigkeit, Selbst von Nichtselbst zu unterscheiden, ist ein allgemeines Merkmal aller multizellulären Organismen (Klein, 1998) und ist nicht nur auf die Erkennung von möglichen Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder auch Parasiten beschränkt, sondern zeigt sich vielmehr auch in der Unterscheidung von Selbst und anderen Individuen der gleichen Art. In Wirbeltieren scheint die Fähigkeit allogenenes Gewebe zu

erkennen, vor allem ein Nebeneffekt der Fähigkeit des adaptiven Immunsystems zu sein, alles Fremde zu erkennen (Khalturin, 2002).

In vielen wirbellosen Tieren dagegen spielt die Erkennung von allogenen Gewebe eine weit wichtigere Rolle zum Schutz ihrer Individualität (Buss, 1997). Viele marine Invertebraten leben sessil und kolonial und konkurrieren um den beschränkten Lebensraum Hartsubstrat. Dies führt dazu, dass viele kolonial lebende Spezies in engen Kontakt mit anderen Individuen kommen. Zusätzlich besitzen viele dieser Spezies multipotente Stammzellen, die im gesamten Gewebe verteilt sind. Bei allogenen Kontakt könnten daher Stammzellen von einer in eine andere Kolonie übertragen werden und den Wirtsorganismus ganz oder teilweise von der Reproduktion ausschließen. Daher scheint der „Keimbahnparasitismus“ (Buss, 1987; Stoner und Weissman, 1996; Pancer et al., 1995) den evolutiven Druck darzustellen, unter dem sich die Gewebeunverträglichkeit in Wirbellosen entwickelt hat. Als zwei der wichtigsten Modelorganismen für die Erforschung der Gewebeunverträglichkeit haben sich *Hydractinia echinata* (Frank et al., 2001), ein kolonial lebender Cnidarier, und der koloniale Urochordat *Botryllus schlosseri* (De Tomasso et al. 2005; Khalturin et al., 2003) etabliert.

Selbststerilität als spezielle Art der Selbst-/Nichtselbsterkennung spielt ebenfalls in vielen marin lebenden, hermaphroditen Invertebraten eine wichtige Rolle, kann aber auch in Pflanzen beobachtet werden. In diesen Organismen verhindert sie bei der gleichzeitigen Ausbildung weiblicher und männlicher Geschlechtsorgane, dass es zur Selbstbefruchtung kommt und unterbindet innerhalb einer Population somit durch Selbstbefruchtung auftretende genetische Degeneration.

Bis jetzt sind sowohl für die Gewebeunverträglichkeit als auch für die Selbststerilität in Invertebraten nur wenige Effektormoleküle bekannt (De Tomaso et al., 2005; Sawada et al., 2004; Khalturin et al., 2004). Allerdings zeigen die neuesten Untersuchungen, und immer größer werdende Datenbanken, dass keine Homologe der für die Selbst-/Nichtselbsterkennung in Wirbeltieren entscheidenden Moleküle in wirbellosen Tieren gefunden werden können (Klein, 2006, Khalturin et al., 2005). Zusätzlich konnten bisher, bis auf eine Ausnahme (Ban et al., 2005), in unterschiedlichen Arten von Invertebraten und sogar innerhalb der Urochordaten keine zueinander homologen Selbst-/Nichtselbsterkennungsmoleküle gefunden werden. So ließen sich bisher sowohl für das potentiell in die Gewebeunverträglichkeit in *Botryllus schlosseri* involvierte cFU/HC als auch für HrVC70 aus *Halocynthia roretzi* keine Homologe in *Ciona intestinalis* beschreiben (De Tomaso et al., 2005; Sawada, 2002). Zusätzlich lässt sich

auch keine dem cFU/HC Lokus entsprechende Region in den Genomen von *Ciona intestinalis* und *Ciona savignyi* identifizieren (De Tomaso et al., 2003). Auch auf Zellebene lassen sich Unterschiede erkennen. So kann die in *Halocynthia roretzi* beobachtete schnelle, gegenseitige Lyse von allogenen Hämocyten (ACR) (Arai et al., 2002) in dieser Form in *Ciona intestinalis* nicht gefunden werden (Khalturin et al., 2004). Diese sich andeutende Vielfalt an Mechanismen erinnert an die Situation im Pflanzenreich. Dort sind in unterschiedlichen Gruppen verschiedene Moleküle und Effektor-Mechanismen für die Selbststerilität zuständig (Nasarallah, 2005).

So scheint zwar das Grundprinzip der Selbst-/Nichtselbsterkennung, das auf dem Erkennen von Selbst basiert, in allen Invertebraten das Gleiche zu sein. Ob aber die molekularen Effektoren in verschiedenen Invertebraten homolog sind, steht selbst innerhalb der Gruppe der Urochordaten in Frage.

3.4 Identifikation von variablen Proteinen in den Ovarien von *Ciona intestinalis*

Eine der Grundvoraussetzungen für das Erkennen von Selbst ist die Expression von variablen Selbstmarkern (Khalturin et al., 2005). Um variable Proteine und damit potentielle Selbstmarker in den Ovarien von *Ciona intestinalis* zu identifizieren, haben wir einen neuen Ansatz benutzt, der auf dem Grundprinzip der SSH beruht. Dazu wurde das Ovarien-Transkriptom von drei *Ciona intestinalis* Individuen voneinander subtrahiert und damit auf Individuen-spezifische Gene untersucht. Dabei konnten bei der vorläufigen Analyse zwei Klassen von Proteinen entdeckt werden, die auf Grund ihrer Homologie und Struktur interessant sind.

3.4.1 Funktionelle und evolutive Bedeutung der *Zona pellucida*-Domänen enthaltenden Vc-Gene in *Ciona intestinalis*

In Deuterostomiern ist die Fortpflanzung als Interaktion zwischen den weiblichen und männlichen Gameten ein präzise kontrollierter und spezifischer Prozess. Dabei spielt das Binden des Spermiums an die Vitellinhülle bzw. die *Zona pellucida* und die darauf folgende Akrosomenreaktion eine wichtige Rolle für die Kontrolle der Spezifität der Befruchtung. Proteine, die *Zona pellucida*-Domänen besitzen spielen oft beim Aufbau der Matrix der Vitellinhülle und bei der Interaktion mit den Spermien eine Rolle (Jovine et al., 2005; Wassarman, 2005).

Die drei identifizierten und charakterisierten Vc16, Vc182 und Vc569 (Vc-Gene) besitzen alle eine *Zona pellucida*-Domäne. Die Expressionsanalyse aller Gene zeigt, dass sie in frühen Oozyten, die noch keine Vitellinhülle besitzen, exprimiert werden. Somit könnten sie auf Grund ihrer Proteinstruktur und Expression potentiell an der Bildung der Vitellinhülle beteiligt sein.

Da die Vitellinhülle in *Ciona intestinalis* und *Halocynthia roretzi* der Ort der Selbsterkennung ist (Morgan, 1923; Fuke et al., 1996) und die Vc-Gene Ähnlichkeit zu HrVC120 aufweisen, stellt sich die Frage, ob sie in die Selbststerilität von *Ciona intestinalis* involviert sind. Die Analyse der Variabilität konnte aufdecken (Abb. 2.6; Abb. 2.8; Abb. 2.10), dass alle Vc-Gene einen höheren Grad an Polymorphismus aufweisen als der innerhalb des Genomprojekts ermittelte Durchschnittswert von 1,2%. Diese Beobachtung wird ebenfalls durch die Analyse der Kontrollgene (Abb. 2.27; Abb. 2.29) gestärkt, die eine weit geringere Variabilität aufweisen. Dies zeigt, dass die beobachtete Variabilität nur auf eine kleine Gruppe von Genen beschränkt ist und somit eine biologische Rolle spielen kann.

Allerdings stellt sich die Frage, ob dieser Grad an Polymorphismus ausreicht, um als Selbstmarker zu dienen. Vergleicht man die beobachtete Variabilität der drei Vc-Gene mit dem für HrVC70 (HrVC120) in *Halocynthia roretzi* entdeckten Grad an Polymorphismus, sieht man, dass der für HrVC70 gemessene Polymorphismus mit dem hier für die Vc-Gene gemessenen vergleichbar ist. Innerhalb des analysierten Bereichs, der 12 EGF-Domänen von HrVC70, ist die Variabilität mit drei bis sechs ausgetauschten Aminosäuren in einer Gruppe von neun Tieren relativ gering (Sawada et al., 2004). Die funktionell beobachteten Unterschiede in der Effizienz der Bindung von analogen und autologen Spermien an HrVC70 erklärt Sawada dadurch, dass EGF-Domänen besonders sensibel auf Aminosäureaustausche reagieren können (Sawada et al., 2004). Der Austausch einer einzelnen Aminosäure in der EGF-Region von Notch kann zu einer drastischen Änderung der Zell-Zellerkennung führen (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). So scheinen die einzelnen Aminosäureaustausche innerhalb und in der Nähe der EGF-Domänen von Vc182, Vc569 und im Besonderen die variable Anzahl von repetitiven Elementen in Vc569 zwischen den ersten und letzten drei EGF-Domänen dazu geeignet zu sein, strukturelle Veränderungen herbeizuführen, die in der Lage sind, die Bindeaffinität von analogen und autologen Spermien zu beeinflussen.

Allerdings gibt es vor allem ein Argument, das gegen die Annahme spricht, dass Vc16, Vc182 und Vc569 allein eine wichtige Rolle in der Verhinderung des Bindens von autologen Spermien an die Vitellinhülle spielen. Für *Ciona intestinalis* konnte gezeigt

werden, dass von den Follikelzellen abgegebene Proteine (Selbstmarker) eine entscheidende Rolle bei der Reifung von selbstfertilen zu selbststerilen Oozyten spielen. (De Santis et al., 1991; Marino et al., 1999). Daher scheint zumindest ein für die Selbststerilität entscheidender Faktor in den Follikelzellen exprimiert zu werden. Da die Vc-Gene in Oozyten und nicht in Follikelzellen exprimiert werden, müsste zumindest ein weiteres Protein aus den Follikelzellen als Selbstmarker eine Rolle spielen.

Allerdings scheint das Binden der von den Follikelzellen abgegebenen Proteine Individuen-spezifisch zu sein (Marino et al., 1999). Daher könnte eine mögliche Funktion der variablen Vc-Gene darin bestehen, die von den Follikelzellen abgegebenen Selbstmarker zu binden und zu präsentieren.

Eine letztendliche Antwort auf die Funktion der variablen Vc-Gene kann nur eine funktionelle Analyse über das Ausschalten einzelner Vc-Gene oder das Blockieren mit Antikörpern und die Lokalisation des Proteins in oder auf den Oozyten geben.

Eine andere interessante Frage, die die Entdeckung der Vc-Gene aufwirft, ist die nach der Verwandtschaft mit HrVc120 aus *Halocynthia roretzi* und HaVC130, dem HrVC130 Homolog aus *Halocynthia aurantium* (Ban et al., 2005). Für HrVC120 und HaVC130 konnte gezeigt werden, dass sie mit einer Identität von 83,4% auf Aminosäureebene eine sehr große Homologie aufweisen und sich vor allem dadurch unterscheiden, dass HaVC130 eine zusätzliche EGF-Domäne besitzt. Die Ähnlichkeit zeigt sich auch auf genomischer Ebene innerhalb der Exon-Intron-Struktur, die für beide Organismen vergleichbar ist. Die zusätzliche EGF-Domäne ist vermutlich durch die Duplikation derjenigen EGF-Domäne, die der achten EGF-Domäne von HrVC130 entspricht, in einem Vorläufer von HaVC130 entstanden (Ban et al., 2005). Aus einem Vergleich der einzelnen EGF-Domänen von HaVC130 und HrVC120 wurde gefolgert, dass HrVC120 und HaVC130 durch mehrere Duplikationsereignisse aus einem prototypischen Vc-Protein mit sechs EGF-Domänen hervorgegangen sind (Ban et al., 2005). Dies entspricht der für Vc569 ermittelten Proteinstruktur und scheint besonders interessant, da Vc569 laut unserer Analyse das Gen im Genom von *Ciona intestinalis* ist, welches auf Proteinebene die größte strukturelle Ähnlichkeit zu HrVC120 bzw. HaVC130 aufweist.

Eine Analyse der Aminosäuresequenz zeigt, dass ein Alignment zwischen Vc569 und HrVC120 bzw. HaVC130 nur bruchstückhaft erfolgt und die Identität zwischen einzelnen vergleichbaren Bereichen zwischen 23 - 34% liegt. Daher lässt sich auf Proteinebene keine Aussage darüber machen, ob Vc569 den prototypischen, aber stark

divergierten Zustand von HrVC120 bzw. HaVC130, darstellt. Auf genomischer Ebene lässt sich keine Verwandtschaft der Gene feststellen, da die Exon-Intron-Struktur zwischen Vc569 und HrVC120 bzw. HaVC130 sehr stark abweicht. Dies zeigt sich vor allem darin, dass in *Halocynthia* jede EGF-Domäne von einem einzelnen Exon kodiert wird (Ban et al., 2005; Sawada et al., 2004), während fünf der sechs EGF-Domänen von Vc569 auf zwei Exons kodiert werden. Die Veränderung der Genstruktur könnte allerdings auch durch eine starke Diversifikation entstanden sein, innerhalb welcher sich die Exon/Intron-Struktur verändert hat.

Allerdings scheint es wahrscheinlich, dass trotz der Ähnlichkeit der Proteinstruktur keine Homologie zwischen HrVC120 bzw. HaVC130 und den Vc-Genen aus dem SSH-Experiment vorliegt.

Eine Frage, die durch diese Ergebnisse aufgeworfen wird, ist die, ob sich vielleicht zwei strukturell ähnliche Proteine unabhängig voneinander entwickelt haben oder ob sich die Proteine auf Grund ihrer Funktion in der Befruchtung und ihrer Variabilität nach der Auftrennung der zwei Spezies so weit auseinander entwickelt haben, dass sich eine direkte Verwandtschaft nicht nachweisen lässt. Für eine unabhängige Entwicklung zweier strukturell ähnlicher Moleküle spricht, dass in *Caenorhabditis elegans* und in *Mus musculus* Proteine mit EGF-ähnlichen-Domänen eine wichtige Rolle in der Befruchtung spielen (Singson et al., 1998; Ensslin und Shur, 2003). Daher scheinen Proteine mit EGF-Domänen in mehreren Organismen an der Befruchtung beteiligt zu sein. Für die zweite Möglichkeit spricht, dass Proteine, die in die Interaktion von Spermium und Oozyte involviert sind, sich in verschiedenen marinen Schneckenarten auf Grund positiver Selektion schnell auseinander entwickelt haben (Galindo et al., 2003; Kresge, et al., 2001).

3.4.2 Identifikation hoch variabler Rezeptoren mit Ähnlichkeit zu Komplementkontrollrezeptoren

Überraschenderweise konnte während der Analyse der erstellten SSH-Datenbanken mit vCRL1 ein Rezeptor identifiziert werden, der sich nicht nur durch ein extrem hohes Maß an Variabilität zwischen und auch innerhalb einzelner Individuen auszeichnet, sondern auch Ähnlichkeit zu verschiedenen Komplementkontrollrezeptoren aufweist. Zusätzlich konnte ein zweiter Rezeptor (vCRL2) identifiziert werden, der eine mit vCRL1 vergleichbare Proteinstruktur und einen ähnlichen Grad an Variabilität aufweist. Dies hat potentiell einige interessante Implikationen, die im Folgenden diskutiert werden sollen.

3.4.2.1 Sind vCRL1 und vCRL2 zwei hochvariable Allele eines Gens?

Allele sind eine Gruppe alternativer Formen eines Gens (Alberts et al., 2002). In einer diploiden Zelle hat jedes Gen zwei Allele, von denen jedes die gleiche Position (Lokus) auf den homologen Chromosomen hat (Alberts et al., 2002).

vCRL1 wurde als variables Gen in der SSH-Datenbank gefunden. Durch *in silico* Analyse konnte eine zweite Klasse von Sequenzen (vCRL2) identifiziert werden, die sowohl stark unterschiedliche als auch nahezu identischen Sequenzabschnitte beinhalten. Zu den unterschiedlichen Sequenz-Abschnitten gehören die in den ESTs von vCRL2 und vCRL1 enthaltene 5'UTR-Sequenz (Daten nicht gezeigt) und die ersten ca. 450 bp des Leserahmens. Über weite Strecken des 3' Bereichs und der 3'UTR-Region sind die Sequenzen aus einem Tier nahezu identisch. Da der Southern Blot nur eine oder zwei Banden für eine 3'UTR spezifische Probe zeigt und im Genomprojekt (JGI v1.0) beide Proteine mit Scaffold 948 die gleiche Lokalisation zeigen, kann daraus geschlossen werden, dass vCRL1 und vCRL2 von dem gleichen Lokus, aber unterschiedlichen Chromosomen transkribiert werden. Daher handelt es sich wahrscheinlich um stark polymorphe Allele. Auf Grund der unterschiedlichen 5'UTR kann davon ausgegangen werden, dass für vCRL1 und vCRL2 wahrscheinlich unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte genutzt werden (Abb. 3.1 A). Allerdings kann der Polymorphismus der 5'UTR auch seinen Ursprung in einer starken Diversifikation der Allele haben (Abb. 3.1 B). Eine eindeutige Beantwortung der Frage nach dem möglichen Grund für die unterschiedlichen 5'Regionen ist auf Grund der bislang unzureichenden Datenlage nicht möglich.

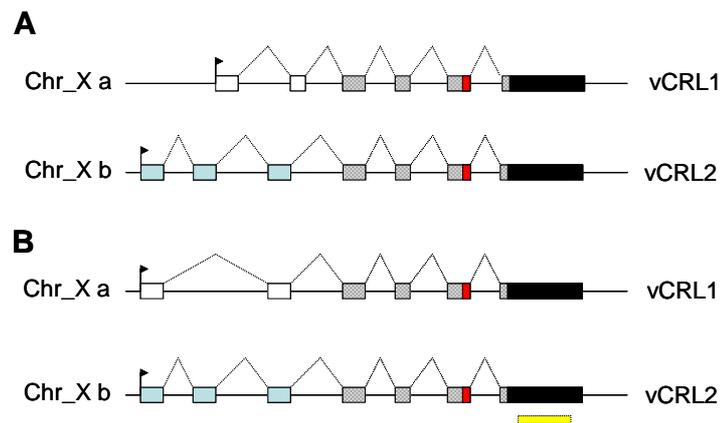


Abb. 3.1 Mögliche Modelle für die genomische Situation von vCRL1 und vCRL2.

A) Die Variabilität des 5' Bereichs von vCRL1 und vCRL2 entsteht durch unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte; B) Die Variabilität der 5' Sequenzbereich ist durch starke Diversifikation der Genombereiche entstanden. weiß: Exons vCRL1, blau: Exons vCRL2; rot: Exon das für die Transmembrandomäne kodiert; schwarz: 3'UTR; gelb: Probe für Southern (Abb. 2.24); grau und schwarz: identische Exons; Pfeil: Transkriptionsstartpunkt

Dabei ist der Grad des Polymorphismus zwischen den Allelen vCRL1 und vCRL2 mit nur ca. 39% Identität auf Aminosäureebene zuerst überraschend. Allerdings konnte ein vergleichbar niedriger Grad an Identität von 56% bzw. 45% für Allele der Selbstinkompatibilitätsgene von Pflanzen, z.B. *Nicotiana alata* und verschiedene Arten von Solanaceen, gefunden werden (Ioerger et al., 1990; Anderson et al., 1989).

3.4.2.2 vCRL 1, ein neuer Selbststerilitätsrezeptor in *Ciona intestinalis*.

Die Voraussetzung für jedes Selbst-/Nichtselbsterkennungssystem ist die Expression von hochvariablen Individuen-spezifischen Molekülen (Khalthurin et al., 2004) in Geweben, in dem die Selbst-/Nichtselbsterkennung stattfindet. Für vCRL1 zeigen die Daten, dass beide Voraussetzungen erfüllt sind und es sich aus den folgenden fünf Gründen bei vCRL1 um einen Selbststerilitätsrezeptor handeln kann:

- (1) vCRL1 zeigt mit einer Identität zwischen 75 und 98% einen weitaus höheren Grad an Variabilität als das als Selbststerilitätsrezeptor bereits identifizierte HrVC70 (Sawada et al., 2004) und übertrifft dabei sogar innerhalb einer Spezies den Identitätsunterschied, der für HrVC70 und HaVC80 zwischen zwei Arten beobachtet wurde (Ban et al., 2005).
- (2) Eine weitere Beobachtung, die auf die Signifikanz der Variabilität von vCRL1 hindeutet, ist die Tatsache, dass der für die drei verschiedenen Vc-Gene gezeigte Zusammenhang zwischen geographischer Isolation der Populationen und

phylogenetischer Distanz der Gensequenzen nicht für vCRL1 gilt, da die Gensequenz aus Japan keine Außengruppe innerhalb des phylogenetischen Baums darstellt. Dies ist auffällig, da getrennte Populationen ohne genetischen Austausch dazu tendieren, sich auseinander zu entwickeln und daher, wie für die VC-Gene beobachtet, phylogenetische Unterschiede mit der geographischen Isolation der Populationen korrelieren (Perdices et al., 2001; Chenoweth et al., 1998). Da dieses nicht auf den kodierenden Bereich, sondern nur auf die 3'UTR von vCRL1 zutrifft, scheint der Mechanismus, der für die Variabilität des kodierenden Bereichs von vCRL1 verantwortlich ist, diesen Effekt zu überlagern. Allerdings ist die verglichene Anzahl an Sequenzen von unterschiedlichen, getrennten Standorten zu klein, um eine signifikante Aussage treffen zu können, so dass die beobachtete Situation nur als Hinweis betrachtet werden kann.

(3) Anhand der statistischen „Maximum Likelihood“ Analysemethode konnte mit Hilfe des Programms Codeml gezeigt werden, dass mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit einer der Mechanismen, der für die Entstehung des hohen Polymorphismus von vCRL1 verantwortlich ist, positive Selektion ist. Positive Selektion konnte ebenfalls in HaVC80 (Ban et al., 2005) nachgewiesen werden und ist eine der treibenden Kräfte bei der Evolution des Spermienlysins verschiedener Abalonearten (Galindo et al., 2003). Auch für andere Selbst-/Nichtselbsterkennungsmoleküle konnte gezeigt werden, dass positive Selektion eine Rolle spielt. So wurden in den VLRs aus Neunauge und Schleimaal verschiedene Aminosäurepositionen entdeckt, die unter positiver Selektion stehen (Alder et al., 2005). Daher scheint positive Selektion ein wichtiger evolutiver Faktor in der Entwicklung von Selbst-/Nichtselbsterkennungsmolekülen sowie von Rezeptoren zu sein, die an der Befruchtung beteiligt sind. So kann die beobachtete positive Selektion als weiterer Hinweis betrachtet werden, dass vCRL1 eine Rolle in der Selbststerilität spielt. Allerdings zeigen die Unterschiede in der Anzahl der vorhergesagten unter positiver Selektion stehenden Codons, vier mit Modell M8 und 21 mit Modell M3, dass eine genaue Aussage über den Grad der positiven Selektion und vor allem über die Anzahl der Codons nicht eindeutig möglich ist. Dies könnte zum einen an der relativ kleinen Zahl der verglichenen Sequenzen liegen, die zu einer erhöhten berechneten Wahrscheinlichkeit führen können (Wong et al., 2004), aber auch daran, dass eine starke Rekombination, wie z.B. in viralen Proben, fälschlicherweise als positive Selektion gewertet wird und so zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann (Anisimova et al., 2003).

(4) Ein weiterer wichtiger Hinweis auf die wahrscheinliche Bedeutung von vCRL1 in der Selbststerilität ist die gezeigte Expression in Follikelzellen, die mit der Beobachtung

korreliert, dass Follikelzellen eine entscheidende Rolle bei der Selbststerilität von *Ciona intestinalis* spielen (De Santis et al., 1991; Marino et al., 1999).

(5) Eine weitere erwähnenswerte Beobachtung ist die Tatsache, dass ein Gen, das für einen Transmembranrezeptoren mit Signalpeptid und CCP-Domänen kodiert, innerhalb des Fu/Hc Locus in *Botryllus schlosseri* in Scaffold subsf-560b6 (AC138583) und subsf-568h21 liegt. Eine solche physikalische Verknüpfung eines mit vCRL1 strukturell vergleichbaren Proteins mit dem cFU/HC-Rezeptor (De Tomaso et al., 2005) ist vor allem daher interessant, da auf der Grundlage genetischer Experimente eine Verknüpfung zwischen dem FU/HC Locus und dem Locus für Selbststerilität vorgeschlagen wurde (Oka and Watanabe, 1967; Oka 1970; Saito et al., 1994). Allerdings wurde noch nicht gezeigt, ob dieses Gen variabel und in Gameten exprimiert ist. Daher kann dies nur als interessanter Aspekt und nicht als Beweis für die Beteiligung an der Selbststerilität gesehen werden.

Auf Grund der hohen Variabilität und des zu früheren Beobachtungen passenden Expressionsprofils in Follikelzellen, lässt sich daher eine Beteiligung von vCRL1 in der Selbst-/Nichtselbsterkennung vermuten. Ein letztendlicher Beweis für die Funktion von vCRL1 in den Follikelzellen und während der Befruchtung, kann allerdings nur über funktionelle Tests durch Knockoutexperimente oder aber auf Proteinebene erbracht werden.

vCRL1 wird weiterhin auch in Hämozyten exprimiert. Auch hier können nur funktionelle Tests Aufschluss über die Rolle von vCRL1 geben. Allerdings scheint auf Grund seiner hohen Variabilität eine Rolle in der Selbst-/Nichtselbsterkennung in Hämozyten ebenfalls wahrscheinlich. Daher stellt sich die Frage, welche Rolle die in Hämozyten exprimierten Splicevarianten (Abb. 2.14; Abb. 2.19) spielen. Diese kann bis dato nicht beantwortet werden, es sollte aber angemerkt werden, dass die Expression von verschiedenen Splicevarianten mit unterschiedlichen intrazellulären Domänen auch für CD46 bekannt ist und eine Rolle in der CD46-Signaltransduktion spielt. (Riley-Vargas et al., 2004). Daher könnten die verschiedenen Splicevarianten von vCRL1 in verschiedenen Signaltransduktionskaskaden eine Rolle spielen.

3.5 Basiert die Selbst-/Nichtselbsterkennung in *Ciona* auf variablen Komplementkomponenten?

Für Urochordaten zeigen viele Daten, dass die Selbst-/Nichtselbsterkennung auf dem Prinzip des „fehlenden Selbst“ basiert (Khalturin et al., 2005; De Tomaso et al., 2005; Murabe et al., 2002).

vCRL1 ist ein Individuen-spezifischer Transmembranrezeptor, der mit mehreren CCP/SCR-Domänen von seiner Proteinstruktur an die Komplementrezeptoren CD46 und CD55 erinnert und nicht nur in Oozyten, sondern auch in Hämazyten exprimiert wird.

Interessanterweise ist die Regulation des alternativen Komplementaktivierungswegs eines der Systeme in Wirbeltieren, das dem Mechanismus des „fehlenden Selbst“ entspricht. C3 kann sich nach einer spontanen Hydrolyse zusammen mit Faktor B kovalent an die Zelloberfläche von autologen Zellen und Bakterienzellen anlagern (Abb. 1.2). Diese Anlagerung wird von normalen autologen Zellen durch die dauerhafte Expression von Selbstmarkern in Form von z.B. CD46 (MCP, membrane cofactor protein) und CD55 (DAF, decay accelerating factor) auf ihrer Zelloberfläche unterbunden und die Bildung der C3 Konvertase dadurch verhindert (Liszewski et al., 1996; Janeway et al., 2002).

In Wirbeltieren ist das Komplementsystem einer der ersten Verteidigungsmechanismen gegen Pathogene. Diese können durch das Zusammenspiel der drei Komplementaktivationswege lysiert oder für die Phagozytose markiert werden (Janeway et al., 2002). Daher würde die vermutete Funktion von vCRL1 in der Selbststerilität und die beobachtete Expression des potentiellen Komplementrezeptors in den Ovarien nicht mit der klassischen Sichtweise über die Funktion des Komplementsystems übereinstimmen.

Interessanterweise sind Komponenten des Komplementsystems auch in Wirbeltieren in den Gameten exprimiert und an der Spermien/Oozyten-Interaktion beteiligt (Riley-Vargas et al., 2004). CD46-Rezeptoren werden auf der inneren Akrosomenmembran exprimiert (Anderson et al., 1993). Änderungen in der CD46 Expression in Spermien werden mit Unfruchtbarkeit in Zusammenhang gebracht (Kitamura et al., 1997; Nomuar et al., 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen CD46 sowohl das Binden als auch die Penetration der menschliche *Zona pellucida* durch Spermien unterbinden (Riley-Vargas und Atkinson, 2003). Außerdem wird CD46 in Maus, Ratte und Meerschweinchen nur in den Spermien exprimiert, während Crry, ein zu CD46 nah

verwandtes Protein, die Funktion des Komplementregulators übernommen hat (Riley-Vargas und Atkinson, 2003). Dies zeigt, dass CD46 neben seiner Funktion als Komplementregulator eine zusätzliche Aufgabe in der Befruchtung spielt. Daher stellt sich die Frage, ob diese Funktion von CD46 eine ursprüngliche Rolle des Komplementsystems während der Befruchtung oder der Selbst-/Nichtselbsterkennung widerspiegelt.

Viele der Moleküle des Komplementsystems sind zwischen den Wirbeltieren und den Urochordaten konserviert (Azumi et al., 2003). Allerdings ist die Zahl der Gene, die für mögliche Komponenten des Komplementsystems kodieren in *Ciona* viel größer als in Säugetieren. So konnten im Genom von *Ciona* 132 Genmodelle gefunden werden, die SCR bzw. CCP-Domänen enthalten (Azumi et al., 2003). Dies steht im Gegensatz zu der Situation, die für viele anderen Gene in *Ciona* gezeigt werden konnte. So liegen viele Gene in *Ciona* in einer geringeren Anzahl vor als in Wirbeltieren (Corbo et al., 2001). Zusätzlich konnten in *Ciona* zwei C3 Homologe, ciC3-1 und ciC3-2, identifiziert und charakterisiert werden, die interessanterweise nur eine Identität von 40,7% zueinander aufweisen und von denen ciC3-2 ein unterschiedliches RFLP-Muster im Southern Blot zeigt (Marino et al., 2002).

Auf Grund der hohen Variabilität von vCRL1 und der überraschend hohen Anzahl an Proteinen mit Komplementdomänen lässt sich daher eine neue Arbeitshypothese aufstellen.

Auf der Basis des Prinzips des „fehlenden-Selbst“, spielen Komplementrezeptor-ähnliche Proteine eine Rolle in der Selbst-/Nichtselbsterkennung bei *Ciona intestinalis*. Durch Expression von Individuen-spezifischen Rezeptoren und Liganden mit Komplementdomänen werden dabei die Zellen eines Tieres als Selbst markiert, während Zellen eines anderen Individuums durch das Fehlen identischer Rezeptoren als Nichtselbst erkannt werden.

Dies lässt sich am Beispiel der Befruchtung verdeutlichen. Durch Expression des Individuen-spezifischen Rezeptors vCRL1 werden Oozyten als Selbst markiert (Abb. 3.2 B). Beim Binden autologer Spermien an vCRL1 wird somit die Oozyte als Selbst erkannt und die feste Bindung der Spermien an einen weiteren Spezies-spezifischen Rezeptor verhindert (Abb. 3.2 B). Erfolgt keine Bindung an vCRL1 durch analoge Spermien, können diese an den Spezies-spezifischen Rezeptor binden und die Befruchtung kann stattfinden (Abb. 3.2 C)

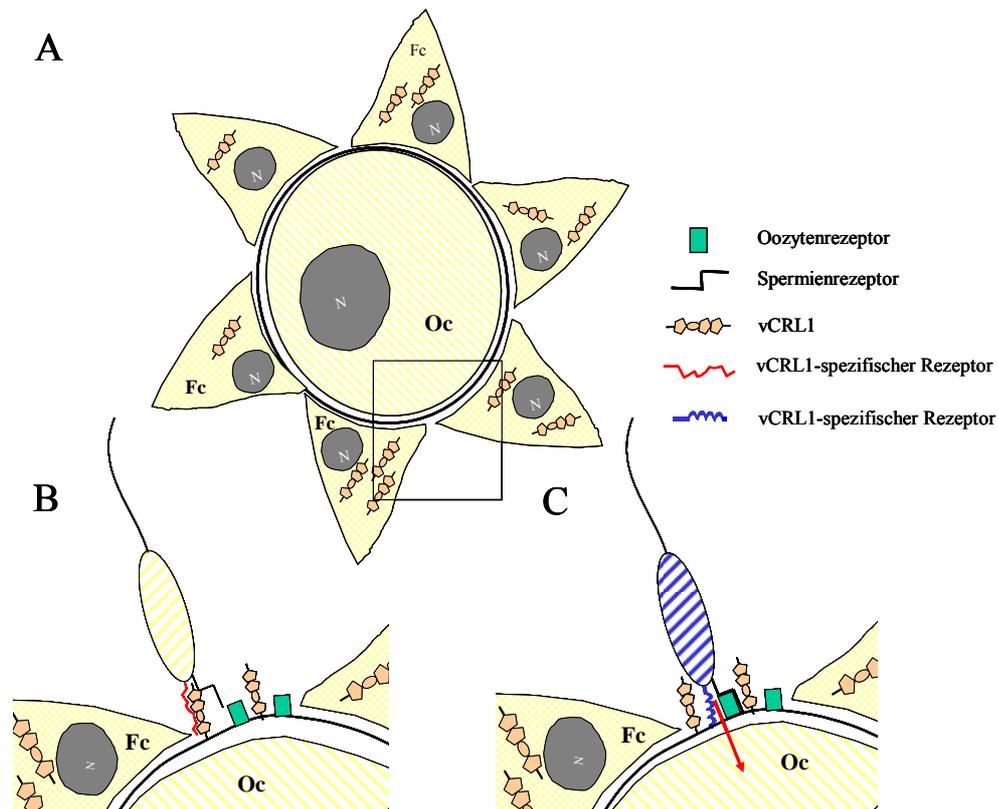


Abb. 3.2 Schematische Darstellung der möglichen Beteiligung von vCRL1 an der Selbststerilität von *Ciona intestinalis*. A) Übersicht: Oozyte mit Follikelzellen; B) Spermien vom selben Individuum binden vCRL1 über einen spezifischen Rezeptor und werden am Binden an die Vittelinhülle gehindert; C) Spermien vom fremden Individuum binden nicht vCRL1 und können somit an einen weiteren Rezeptor binden, der die Befruchtung ermöglicht; N: Nukleus; Fc: Follikelzellen; Oc: Oozyte

Ich schlage daher vor, dass in ancestralen Chordaten einige Komponenten des Komplementsystems neben ihrer Rolle in der Pathogenabwehr auch eine Funktion in der Selbst-/Nichtselbsterkennung haben.

Die Entwicklung des adaptiven Immunsystems könnte daher in der Wirbeltierlinie im Laufe der Evolution mit einem Verlust der Beteiligung des Komplementsystems an der Selbst-/Nichtselbsterkennung einhergegangen sein.

4 Zusammenfassung

Bisher ist sehr wenig über die molekularen Grundlagen der Selbst-/Nichtselbsterkennung in wirbellosen Tieren bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, mit zwei unterschiedlichen Ansätzen neue Einblicke in die molekularen Mechanismen der Selbst-/Nichtselbsterkennung des Urochordaten *Ciona intestinalis* zu erlangen.

Im ersten Ansatz sollte mittels des „Yeast Two-Hybrid“ Systems nach möglichen Liganden des konservierten NK-Zellrezeptors ciCD94-1 in *Ciona intestinalis* gesucht werden. Dies ist von besonderem Interesse, da der aus Säugetieren bekannte Ligand (MHC-Klasse I (HLA-E)) in wirbellosen Tieren nicht gefunden werden konnte. Ziel war es daher, einen vermeintlich neuen Liganden für einen konservierten Rezeptor zu finden. Mit diesem Ansatz konnten fünf Kandidaten isoliert werden. Unter diesen befindet sich ein Protein (pL2), das anhand der Kontrollen und seiner Proteinstruktur ein aussichtsreicher Kandidat für einen CD94-Liganden sein könnte. Allerdings sind weitere Versuche notwendig, um eine mögliche Interaktion zu bestätigen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein neuer, auf einer SSH-Methode beruhender Ansatz etabliert, um variable Gene zu identifizieren, die eine Rolle in der Selbststerilität in *Ciona intestinalis* spielen. Dabei konnten verschiedene potentiell variable Gene identifiziert werden. Zwei Klassen von Genen wurden zur weiteren Analyse ausgesucht. Die erste Klasse zeigt Ähnlichkeiten zu dem aus *Halocynthia roretzi* bekannten Selbststerilitätsrezeptor HrVC70, die andere Klasse zu Komplementrezeptoren in Wirbeltieren. Die *Ciona* Gene mit Ähnlichkeit zu HrVC70 werden in frühen Oozyten exprimiert. Das Gen mit Ähnlichkeit zu Komplementrezeptoren (vCRL1) zeigt eine ungewöhnlich große inter- und intraindividuelle Variabilität. Da vCRL1 in Follikelzellen exprimiert wird, könnte dieser Rezeptor als Selbststerilitätsrezeptor eine wichtige Rolle in der Selbst-/Nichtselbsterkennung in *Ciona* spielen. Daher könnte es sein, dass Komplement-ähnliche Proteine eine Rolle in der Selbst-/Nichtselbsterkennung bei Urochordaten spielen.

Summary

Almost nothing is known about the molecular mechanisms, underlying allorecognition in invertebrates. In this work two different approaches were used to get insights into how the urochordate *Ciona intestinalis* distinguishes self from non-self.

In the first approach a yeast two-hybrid system was used to search for the ligand of the previously identified Nk-cell receptor ciCD94-1. This is of a particular interest, because the conventional ligands of CD94 in jawed vertebrates are MHC-class I proteins (HLA-E), which have not been identified outside the jawed vertebrates so far. Therefore, the goal of this approach was the identification of a presumably novel ligand for the conserved CD94-like receptor in *Ciona*.

Within the five identified possible candidate ligands, according to the results of the controls and its protein structure, one protein seems to be a good potential interaction partner of ciCD94-1. Nevertheless the interaction shown in the yeast two-hybrid system has to be proven by an independent method.

In the second approach a new unbiased screening method based on suppression subtractive hybridization was established to identify variable, proteins which are present in ovaries of *Ciona intestinalis* and which may be responsible for self-incompatibility reactions. Several groups of variable molecules were identified. Two of them were selected for further detailed analysis. One group of proteins shows homology to the self sterility receptor HrVC70 from *Halocynthia roretzi* and the other one shows structural similarity to complement receptors of vertebrates. All candidates proved to be more variable than the control genes, therefore they belong to a class of variable genes in *Ciona intestinalis*. The genes, showing homology to HrVC70, were shown to be expressed in oocytes. The other gene (vCRL1) with structural similarities to complement receptors showed an exceptional high inter- and intraindividual variability. Due to the fact, that vCRL1 is expressed in follicle cells, vCRL1 seems to be a good candidate gene for a self sterility receptor in *Ciona intestinalis*. Therefore, complement-like proteins may play a role in self/non-self recognition in urochordates.

5 Material

5.1 Organismen

Untersuchter Organismus:	<i>Ciona intestinalis</i> von Helgoland
Empfänger-Organismen	<i>Escherichia coli</i> (Stamm DH5 α) <i>Sacharomyces cerevisiae</i> (Stämme Y 187 und AH 109).

5.2 Medien

Freezing - Medium	36 mM K ₂ HPO ₄ , 13,2 mM KH ₂ PO ₄ , 1,7 mM NaCitrat, 0,4 mM MgSO ₄ , 6,8 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 4,4 % (v/v) Glycerol, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l NaCl, autoklavieren mindes. 20 min.
LB-amp – Medium	10 g Trypton, 5 g Hefextrakt, 5 g NaCl, auf 1 l mit Millipore Wasser auffüllen, autoklavieren für 20 min., 0,1 % Ampicillin (50mg/ml) frisch zu gegeben; alternativ: 20 g LB–Broth in 1 l Millipore Wasser aufnehmen.
LB – Agar + Ampicillin	20 g LB Broth Base, 15 g Bactoagar, auf 1 l Millipore H ₂ O auffüllen, autoklavieren mind. 20 min., 1 ml Ampicillin (50 mg/ml) [10–15 ml / Platte]
SD/-Ade/-Trp	0,60 g –Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement, 6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Agar-Agar (für Kulturplatten), 20 g Glukose, 0,02 g Histidin, 0,1 g Leucin auf 1 l Millipore-Wasser, für 15 min autoklavieren
SD/-His/-Leu/-Ade	0,60 g –Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement, 6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Agar-Agar (für Kulturplatten), 20 g

SD/-His/-Trp	Glukose, 20 ml 0,1% Tryptophan auf 1 l Millipore-Wasser, für 15 min autoklavieren 0,60 g -Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement, 6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Agar-Agar (für Kulturplatten), 20 g Glukose, 10 ml 0,2% Adenin, 0,1 g Leucin auf 1 l Millipore-Wasser, für 15 min autoklavieren
SD/-His/-Trp/-Leu	0,60 g -Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement, 6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Agar-Agar (für Kulturplatten), 20 g Glukose, 10 ml 0,2% Adenin, auf 1 l Millipore-Wasser, für 15 min autoklavieren
SD/-His/-Trp/-Leu	0,60 g -Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement, 6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Agar-Agar (für Kulturplatten), 20 g Glukose, 10 ml 0,2% Adenin, auf 1 l Millipore-Wasser, für 15 min autoklavieren
SD/-His/-Trp/-Leu/-Ade	0,60 g -Ade/-His/-Leu/-Trp Dropout Supplement, 6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Agar-Agar (für Kulturplatten), 20 g Glukose, auf 1 l Millipore-Wasser, für 15 min autoklavieren
SD/-Leu	0,69 g -Leu Dropout Supplement, 6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Agar-Agar (für Kulturplatten), 20 g Glukose auf 1 l Millipore-Wasser, für 15 min autoklavieren
SD/-Leu /-Trp	0,64 g -Leu/-Trp Dropout Supplement, 6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Agar-Agar (für Kulturplatten), 20 g Glukose auf 1 l Millipore-Wasser, für 15 min autoklavieren
SD/-Trp	0,64 g -Leu/-Trp Dropout Supplement, 6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Agar-Agar (für Kulturplatten), 20 g Glukose, 0,1 g Leucin

	auf 1 l Millipore-Wasser, für 15 min autoklavieren
SOB - Medium	20 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,58 g NaCl, 0,19 g KCl in 1 l
SOC-Medium	10 ml SOB-Medium, 100 µl 2 M Glucose (steril), 100 µl MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
YPD-Medium	Clontech

5.3 Puffer und Lösungen

5.3.1 Allgemeine Lösungen

Ampicillin – Stammlösung	50 mg/ml, gelagert bei -20°C in 500 µl Einheiten
APS	10 % (m/v) ad Millipore Wasser
Denaturierungs-Lösung	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
Denhardt's (50 x)	1 % Polyvinylpyrrolidon, 1 % Ficoll, 1 % BSA Fraktion V, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern
Depurinierungs-Lösung	0,25 M HCl
DNA-Ladepuffer	50 % Glycerin, 10 mM EDTA pH 8, 0,1 % SDS, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol
Glykogen – Lösung	135 mg/ml in Millipore Wasser
Heparin	10 mg/ml in Millipore H ₂ O, bei -20°C lagern
Hybridisierungslösung (für Blots)	50 % Formamid (v/v), 4,8 x SSC, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1% SDS, 1 x Denhardt's, 10 % Dextransulfat
Hybridisierungslösung (für Southern)	6xSSC, 5x Denhardts reagent, 0,5% SDS, 80 µl Heringssperma-DNA
IPTG – Stammlösung	200 mg/ml ad Millipore Wasser, gelagert bei -20°C in 50µl Einheiten
Kanamycin-Stammlösung	50mg/ml, als 1000µl Aliquots bei -20°C lagern
Lysis-Puffer (für gDNA Isolation)	0,1 M Na ₂ EDTA, 0.2 M Tris pH 8,5, 0,2 % SDS

Lysis-Puffer (Plasmidprep. aus Hefe)	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8) 1 mM EDTA 0.1 % SDS
MOPS (10 x)	92,52 g MOPS, 8,2 g Natriumacetat, 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 in 1 l
Neutralisierungslösung	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,5
NTM	100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 9,5, 50 mM MgCl ₂
PCR Puffer (10 x)	Amersham
RNA-Ladepuffer	25 ml Glycerin, 0,5 M EDTA pH 8,0, 0,2 g Bromphenolblau, 0,2 g Xylencyanol, autoklavieren
RNA-Laufpuffer	116 ml Formaldehyd, 65 ml 10 x MOPS, 469 ml Millipore H ₂ O
RNaseOut	Invitrogen
SDS – Stammlösung	10 % (v/m) ad Millipore Wasser
Sephadex G - 50	5 g Sephadex G-50 in 100 ml 1xTE für 30 min. autoklavieren
SSC (20 x)	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
Strippinglösung (Southern Blot)	1 % SDS (m/v)
TAE (50 x)	2 M Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0
TBE (5 x)	54 g Tris-Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 auf 1 l
TBE Sequenzierpuffer	1,34 M Tris-Base, 450 mM Borsäure, 25 mM
TBE(Long Run)(10x)	1,34 M Tris-Base, 450 mM Borsäure, 25 mM
TE	10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA pH 8.0
Waschlösung 1 (Southern Blot)	2 x SSC, 0,1 % SDS
Waschlösung 2 (Southern Blot)	0,2 x SSC, 0,1 % SDS
X – Gal	20 mg/ml in Dimethylformamid, gelagert bei -20°C in 500 µl Einheiten

5.3.2 Lösungen *in situ* Hybridisierung

Blockierlösung	80 % MAB-B, 20 % Schafserum (hitzeinaktiviert)
CHAPS – Stammlösung	1 % (m/v) CHAPS ad Millipore H ₂ O
Glycin – Stammlösung	40 mg/ml in Millipore H ₂ O
Hybridisierungslösung	50 % Formamid, 5 x SSC, 0,1 % Tween20, 0,1 % CHAPS, 1 x Denhardt's, 100 µg/ml Heparin, immer frisch zubereiten
Levamisol – Stammlösung	1 M Levamisol
Maleinsäurepuffer (MAB)	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5 mit NaOH eingestellt
MAB-B	Maleinsäurepuffer + 1 % BSA Fraktion V, bei 4°C lagern
NTMT	100 mM NaCl, 100 mM Tris pH 9,5, 50 mM MgCl ₂ , 0,1 % Tween20
Paraformaldehyd	4 % mit 75% gefiltertem Meerwasser - auf 55 °C erhitzen, vor Nutzung auf Raumtemperatur abkühlen lassen,
Proteinase K-Stammlösung (100 x)	5 mg Proteinase K in 5 ml Millipore H ₂ O lösen, in 50 µl-Aliquots bei -70°C lagern
PBS	0,15 M NaCl, 0,08 Na ₂ HPO ₄ , 0,021 NaH ₂ PO ₄ , pH 7,3
PBT	PBS + 0,1 % Tween20
Schafserum	Hitzeinaktivierung für 30 min bei 55°C

5.4 Kits

BD Advatange™ 2 PCR Enzyme System	BD Biosciences
Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	BD Biosciences
DIG RNA Labelling Kit (SP6/T7)	Roche
DYEnamic ET Dye Termination Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences
First – Strand cDNA Synthesis Kit	Amersham Biosciences
High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
BD Matchmaker™ Library Construction and BD Biosciences Clontech Screening	Clontech

Kit (#1615-1)	
Megaprime™ DNA labelling Kit	Amersham Biosciences
NucleoSpin® Plasmid	Macherey - Nagel
pGEM®-T Easy Vector System	Promega
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QuickPrep <i>micro</i> mRNA Purification Kit	Amersham Biosciences
SequiTherm EXCEL™ II DNA Sequencing Kit	Epicentre
Superscript™ Double – Strand cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
Superscript™ Plasmid System for cDNA	
Synthesis and Cloning Reagent Assembly	Invitrogen
TRIzol® Reagent	Invitrogen

5.5 Enzyme

SP6 RNA Polymerase	Roche
T7 RNA Polymerase	Roche
T3 RNA Polymerase	Roche
Taq DNA-Polymerase	Fermentas
Platinum Taq Polymerase	Invitrogen
DNase 1	Amersham Pharmacia
RNase A	Sigma
Proteinase K	Sigma

5.6 Chemikalien

Agarose	Sigma
Ammoniumacetat	Roth
Ammoniumsulfat	Sigma
Ampicillin	Merck
APS	Roth
Bactoagar	Roth
BM-Purple	Boehringer Mannheim
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Fluka
BSA Fraktion V (Rinderalbumin)	Merck

CHAPS	Sigma
Chelating Resin	Sigma
Chloroform	Roth
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth
Dextransulfat	Roth/Fluka
Dimethylformamid	Merck
DNA-Größenstandard (50 bp/100 bp/1kb Leiter)	Fermentas
dNTPs (100mM)	Fermentas
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Essigsäureanhydrid (Acetic anhydride)	Sigma
Ethanol (unvergällt)	Roth
Ethanol (vergällt)	Roth
Ethidiumbromid (50 mg/ml)	Merck
Euparal	Roth
Formaldehyd	Merck
Formamid	Roth
Glucose	Merck
Glycerol	Roth
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES	Sigma
Heringssperma 10 mg/ml (Ultraschall behandelt)	Stratagene
IPTG	Sigma
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kalziumchlorid	Merck
Kanamycin	Merck
LB Broth Base	Life Technology
Levamisol	Roth
Lithiumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Maleinsäure	Sigma
Meersalz (Ocean Zac plus)	Zoo Zajac, Duisburg

Methanol	Roth
Mineralöl	Sigma
Mowiol 4-88	Calbiochem
MOPS	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Roth
<i>di</i> -Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natrium- <i>di</i> - hydrogenphosphat	Roth
Natronlauge	Roth
Paraformaldehyd	Merck
Phenol	Roth
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
RapidGel TM -XL-40 % Concentrate	USB
Salzsäure	Roth
Schafsserum	Sigma
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth
SEPHADEX G50	Pharmacia
Substratlösung (NBT/BCIP)	Roche
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Merck
Triethanolamin	Sigma
Tris-base (Trihydroxymethylamonimethan)	Roth
t-RNA (10mg/ml)	Sigma
Tryptic Soy Broth	Sigma
Trypton	Roth
Tween20	Merck
Urethan	Sigma
X-Gal	Sigma
Xylen	Fluka

5.7 Radioaktive Substanzen

α -[³² P]-dCTP	Amersham
-----------------------------------	----------

5.8 Vektor

pGEM [®] -T	Promega
pGADT7-Rec	Clontech
pGBKT7	Clontech

5.9 Antikörper

Anti-DIG-AP Fab Fragment	Roche
--------------------------	-------

5.10 Oligonukleotide

Standard Primer

SP6	5' ATTTAGGTGACACTATAGAATAC 3'
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
T3	5' AATTAACCCTCACTAAAGGG 3'
M13F	5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3'
M13R	5' AGCGGATAACAATTCACACAGG 3'

Sequenzier - Primer

SP6(IRD800)	5' ATTTAGGTGACACTATAGAATAC 3'
T7(IRD800)	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
M13R(IRD800)	5' AGCGGATAACAATTCACACAGG 3'

YTH-Primer

pGBKT7 5'	5' GGATTAGCTTGGCTGCAAGCG3'
3' PCR Primer	5' GTATCGATGCCACCCTCTAGAGGCCG AGGCGGCCGACA 3' (BD-Biosciences Clontech)
5' PCR Primer	5' TTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCA GAGTGG 3' (BD-Biosciences Clontech)
pGADT7-F	5' CTATTCGATGATGAAGATACCCAC 3'
pGADT7-rev.	5' AGATGGTGCACGATGCACAGTTG 3'
BD SMART III Oligo	5' AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTG ATTATGGCCGGG 3' (BD-Biosciences Clontech)
CDS III Primer	5' ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATGd(T)30VN 3' (BD-Biosciences Clontech)

CD94PsTlohneLD	5' GCCGCTGCAGTTGGCAAGTCGGCTGCTTTGTA CA 3'
CD94BamHINurLD	5' CCCGGGGATCCCTCCTAACTTGAACGACGTT ATTGG 3'
FCD94FLBamHI.	5' CGGGGATCCAAATGGCCTTTCTTGCTAAGGCA 3'
RCD94FLPSTI.	5' ACGCTGCAGTTAGGCGAGTATACCCGCAC 3'
FCD94SBamHI.	5' CAAACGGGATCCACGACGTAGGAGA 3'
5?PrimerU1.19	5' TTCGGCCATATACTTCTGGTCCT 3'
3_PrimeU1.19	5' CACAACCTCCATAGACCGTTGTT 3'
5?PrimeU1.8	5' TCTGTTATGAAGGATTCGCCAACT 3'
3?PrimeU1.8	5' GCTTCAACAAATGGAGCGAAGA 3'
ciGAPDH	
ciGAPDH_R	5' GTTCCTGTATCCAAATTCATTGTC 3'
ciGAPDH_F	5' AGC GTG GTC GCG GCC GAG GT3'
ciFLRT	
FLRT_F	5' GGTTAATATCTGTCAGGCTTCTG 3'
FLRT_R	5' GAACTTCTTGGTCGATATTTCTC 3'
vCRL1 und vCRL2	
AK17utr18_F	5' GAATATTCTTTGCATGTTCCAGG 3'
AK17utr18_R	5' TAAAGATAGGCGTGCAAGGTACAG 3'
vCRL2	
AK18_F(40)	5' ATGTGTTTAATAAAGGGGTGCTG 3'
AK18_F(43)	5' TAGCATTGAGTAAGTTTGTATTGCAAATATG 3'
AK18_F(31)	5' ACTTTTGTGTTAGCATTGAGTAAGTTTGTA 3'
AK18_R(1074)	5' CCTGGAACATGCAAAGAATATTC 3'
AK18(s)_F704	5' CAAGCAGCACAAGCACCATTCAAAC 3'
AK18(s)_F514-543	5' TGCCAACCGATCACTTCTGGTGTGTTGT 3'
AK18(s)_R870-900	5' CCAAGACAAGCAAAGTATTGTACAAGCACAA 3'
AK18(s)_R838-865	5' TCTGTACAAAAGAGAGCAATCAGGACAAC 3'

AK18_F_(84) 5` GGGTGCTGTTATATACTATTTCAATTAACA 3`
 AK18_F_(393) 5` ACTTTCCCATGAGCCTTGAATCAGG 3`
 AK18_R_(639) 5` CATGTTGCGCTGGCATTAAAGTAG 3`

vCRL1

AK17_3_ID1. 5` ATAATGTTCAAGGTACAACACCTTCGC 3`
 AK17_3_ID2 5` ATTAGGACCGTCCGGCTGTGT 3`
 AK17_5.3. 5` CATTGGTGTTGCTCATAGTATCTAGT 3`
 AK17_5.7 5` AACCAAGCAAATGTTGCAACTGGAAC 3`
 AK17_3.7 5` GTTGTCTT(AG)AAGACTCAATTTATACAAAC
 3`
 AK17_3.6 5` CATGCTT(GT)ACTATTG(GT)TGGTGTTC 3`
 AK17_3.5. 5` GTAATAATACAATTAC(AG)TTGTTAAT(AG)
 AACCATA 3`
 AK17_5.2 5` TTTCGTCATCCGAGGCTTCAAATAA 3`
 AK17_3.3 5` AACTAAGCATCCAATAACAATGCCAATTATT
 3`
 AK17_3.2 5` GAATTTGAAACTAAACAACTTCTTGCATAA
 3`
 AK17_3.4. 5` CAGTAAGATACGTAAGAGTGGTATTAA 3`

Vc16

VC16(s)_R290 5` GTATGGTGCAAGTTTTCCCAAGGAACCAGG 3`
 VC16(s)_F35. 5` AGTTTCCTGCTTTCGAGCTTCAATTCG 3`
 VC16_3_2 5` TGTTTGCGAGTGGAGACGT
 VC16_5_2 5` TGGCCGAACCTTGCAAGTTCA 3`
 VC16_3_1 5` GGGTCAGGCTGTACAAGTAT 3`
 VC16_5_1 5` TTTGCTGAGTTAAAATGTTTCGTTTC 3`

Vc182

VC182_3_1 5` GTACACATATAACGAAATGAAACACA 3`
 VC182_5_1 5` ATCAGAGAAACGGACCGGCAAA 3`
 VC182(s)_R762 5` GGTTGCTTCAGCGTGTCCGGGCTCAT 3`

Inkubatoren/Schüttler

Thermoshaker Certomat H	B.BraunBiotech
HIS25	Grant BOEKEL
Thermoinkubator	Heraeus Instruments
KS10 (Rotationsschüttler)	Edmund Bühler
Mini 10	Thermo Hybaid
Thermomixer Compact	Eppendorf

UV-Geräte

ImaGo	B+L Systems
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
UV-Kontaktlampe Chroma 43	Vetter GMBH

Elektroporationsgeräte

Gene Pulser II	Biorad
Pulse Controller II	Biorad

Zentrifugen

Biofuge 13	Heraeus
Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Minifuge RF	Heraeus
Labofuge 1	Heraeus
Multifuge 3 S-R	Heraeus

Mikroskopie

AxioCam	Zeiss
Axioskop 2	Zeiss

Sonstige Geräte

BioPhotometer	Eppendorf
Eraser (Löschen der PI's)	Raytest
Gene Quant Photometer	Pharmacia Biotech
LaminAir HB2448 (Modell: Firefly)	Heraeus Instruments
MegaBACE 500	Amersham Biosciences

Milli-Q Academic System	Millipore
NEN Global IR ² DNA Analyzer	LI-COR
Phosphoimager FLA-5000	FUJI
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments
QFill 2	Genetix
QPix	Genetix
VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 400 E	H+P Labortechnik GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wallac WinSpectral	PerkinElmer

5.12 Andere Materialien

96 well Microtiter – Platten	Genetix
384 well Microtiter – Platten	Genetix
Chromatografie Papier	Whatman
Glasperlen	Sartorius
Hybond N Nylon Membran	Amersham Biosciences
Hybond N ⁺ Nylon Membran	Amersham Biosciences
Phosphoimaging Platten	Fuji
QTrays 20 cm x 20 cm	Genetix
Röntgenfilm (BioMax MS)	KODAK
Spirulina	HS-Products

5.13 Computerprogramme

cDNA Macroarray Analyse Software:

AIDA Image Analyzer v3.2 (<http://www.raytest.de>)

AIDA Array Compare v3.2 (<http://www.raytest.de>)

DTP Software für das Erstellen der Arbeit:

MS Word 2000

Software zur Bildbearbeitung und statistischen Analyse:

Adobe Photoshop 7.0

MS Excel 2000

Software für den Scintillationszähler:

Wallac 1414 WinSpectralv1,30 (PerkinElmer) – Protokoll 10 (Cerenkov)

Software zur Sequenzanalyse:

DNAMAN Version 4.15 (Lynnon Biosoft)

ESeq LICOR v2.0

MegaBACE Score Card v3.0 (Molecular Dynamics)

Mega version 3.1 (Kumar et al., 2004)

PAML: Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood Version 3.14 (Ziheng Yang)

(<http://abacus.gene.ucl.ac.uk/software/paml.html>)

Sequenze Analyzer v3.0 (Molecular Dynamics)

SEQtools v8.3 (<http://www.seqtools.dk>)

5.14 Sequenzanalyse im Internet

Ciona intestinalis:

EST-Datenbank

Ghost Database: <http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html>

Genom-Datenbank

JGI *Ciona intestinalis* v 2.0 <http://genome.jgi-psf.org/ciona4/ciona4.home.html>

JGI *Ciona intestinalis* v 1.0 <http://genome.jgi-psf.org/ciona4/ciona4.home.html>

Homo sapiens

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>

Proteinstruktur bzw. -funktion Vorhersage:

Serviceplattformen:

Service am EBI: <http://www.ebi.ac.uk/>

BLAST Datenbanken

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

EBI: <http://www.ebi.ac.uk/blast2/index.html>

Proteindomänen Vergleich und Vorhersage:

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

Signalpeptid Vorhersage:

SignalP V2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>

Transmembrandomänen Vorhersage:

TMHMM server V2.0: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>

Download von Datenbanken:

PFAM-Domänen: Universität in St-Louis (<http://pfam.wustl.edu/>)

Ciona intestinalis Genom: JGI v2.0:

(<http://genome.jgi-psf.org/Cioin2/Cioin2.download.ftp.html>)

UNIGENE full-length EST Datenbank *Ciona Intestinalis*:

ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/UniGene/Ciona_intestinalis

6 Methoden

6.1 Hälterung der Tiere

Die verwendeten *Ciona intestinalis* Individuen wurden aus der vor Helgoland vorkommenden Population durch Forschungstaucher der Biologischen Anstalt Helgoland entnommen und per Post nach Kiel gesandt bzw. persönlich abgeholt. Die Hälterung der Tiere vor Ort erfolgte in Aquarien mit Nordseewasser bei ca. 15°C. Die Aufreinigung des Wassers erfolgte in einem geschlossenen System über Biofilter und Proteinabschäumer. Alle zwei bis drei Tage wurden die Tiere mit Spirulina gefüttert. Nach der Ankunft wurden die Experimente so schnell wie möglich durchgeführt. Grundsätzlich wurden keine Tiere verwendet, die bereits länger als vier bis sechs Wochen gehalten wurden.

6.2 Isolierung von Nukleinsäuren

Um die Nukleinsäuren aus den ganzen Tieren zu isolieren wurde das Gewebe mit Hilfe von flüssigem Stickstoff im Mörser mechanisch zerkleinert. Einzelne Gewebe wurden direkt im Extraktionsmedium zerkleinert.

6.2.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung von genomischer DNA wurden 0,1-0,2 g Gewebe in 450 µl Lyse-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte ein Verdau mit Proteinase K. Dazu wurden 50 µl Proteinase K (1 µg/µl) zu dem Lyse-Puffer hinzugefügt und für zwei Stunden bei 50°C inkubiert. Zur anschließenden Aufreinigung wurde eine Chloroform-Phenol-Extraktion durchgeführt (Sambrock et al., 1989). Um die DNA zu fällen wurde die NaCl-Konzentration auf 0,5 M erhöht und 99,6% Ethanol hinzugefügt. Abgesaugt wurde nur langfädiges Präzipitat, da es sich hierbei um die hochmolekulare genomische DNA handelte. Das Präzipitat wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und in 10mM Tris-HCl pH 8 gelöst. Danach erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C mit RNase (20 µg/ml), um mögliche Verunreinigungen mit RNA zu entfernen. Anschließend wurde eine weitere Proteinase K Inkubation für eine Stunde durchgeführt, um die eingesetzte RNase zu zerstören. Die DNA wurde durch eine weitere Chloroform-Phenol-Extraktion gereinigt (Sambrock et al., 1989) und gefällt. Abschließend wurde die DNA in Tris-HCl gelöst.

6.2.2 Isolierung von mRNA

Zur Isolierung der mRNA wurde das QuickPrep micro mRNA Purification Kit (Amersham-Pharmacia-Biotech) verwendet. In diesem Kit wird das Prinzip der Oligo(dT)-Cellulose Affinitäts-Chromatographie zur selektiven Aufreinigung von polyadenylierter mRNA genutzt. Pro Ansatz wurden ca. 0,1 g Gewebe eingesetzt. Die isolierte mRNA wurde bei -80°C gelagert.

6.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung totaler RNA erfolgte unter Verwendung des Extraktionsmediums TRIzol®-Reagent nach den Angaben des Herstellers. Dieses Verfahren vereint die Vorteile einer Extraktion mit chaotropen Salzen und einer Phenol-Chloroform-Extraktion und ermöglicht die Isolierung in wenigen Schritten. Für die Extraktion wurde ca. 0,1 g Gewebe verwendet. Das erhaltene RNA-Pellet wurde in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Da die so erhaltenen Proben in der Regel noch Kontaminationen durch DNA enthalten, musste ein DNase-Verdau durchgeführt werden. Der Verdau erfolgte für 40 min bei 37°C im Schüttelinkubator bei 1000 rpm. Die RNA wurde anschließend durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook et al., 1989) gereinigt. Die Fällung der RNA erfolgte mit 1/5 Volumen Ammoniumacetatlösung (3 M, pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (99,6%) über Nacht bei -20°C. Nach einem 30 minütigen Zentrifugationsschritt wurde das Pellet zweimal mit 1 ml Ethanol (80%, in DEPC-H₂O) gewaschen, für 10 min zentrifugiert und angetrocknet. Anschließend wurde die RNA in 7 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Verunreinigung mit Protein, Kohlenhydraten und Phenolen wurde über das Verhältnis A_{260 nm}/A_{280 nm} bestimmt und lag bei allen Proben über 1,6.

6.2.4 Plasmid Isolierung aus *E. coli*

Die Propagierung der Vektoren erfolgte in Übernachtskulturen in Flüssigmedium mit dem jeweils geeigneten Antibiotikum. Die Isolierung der Vektoren wurde mittels einer SDS/alkalischen Lyse mit den Kits der Firmen Machery-Nagel und Roche nach Herstellerangaben durchgeführt.

6.2.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA Fragmenten aus PCR-Reaktionsgemischen erfolgte entweder direkt nach der PCR oder nach vorheriger Auftrennung im Agarosegel. Die Isolierung von Banden aus dem Gel erfolgte unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell. Zur Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Reaktionsgemisch wurden das „QIAquick PCR Purification Kit“ und für die Aufreinigung aus dem Agarosegel das „QIAquick Gel Extraction Kit“ verwendet. Beide Kits wurden von der Firma Qiagen hergestellt.

6.3 cDNA-Synthese

Einzelsträngige cDNA (sscDNA) wurde aus Gesamt-RNA oder ggf. mRNA ganzer Tiere oder verschiedener Gewebearten durch Reverse Transkription mit Hilfe des „First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit“ von Amersham Biosciences gewonnen. Die Herstellung erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung des Standard Not I-d(T)18 Primers.

Doppelsträngige cDNA (dscDNA) wurde aus dieser sscDNA oder aus mRNA mit Hilfe des „Superscript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit“ nach Herstellerangaben hergestellt. Dabei wird die nach der Erststrang-Synthese an die sscDNA gebundene RNA durch RNase H in kleine Fragmente zerlegt. Diese können der DNA Polymerase I als Primer für die Zweitstrang-Synthese dienen. Eine DNA-Ligase verbindet die synthetisierten Teilstücke. Abschließend werden Überhänge durch T4 DNA-Polymerase entfernt.

6.4 Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Bei der PCR handelt es sich um eine Standardmethode der heutigen Molekularbiologie zur Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dabei wird mit Hilfe von zwei Oligonukleotiden (Primern) und einer thermostabilen Polymerase ein Ausgangs-DNA-Fragment (Matrize) exponentiell amplifiziert. Die Methode beruht darauf, dass drei Schritte mehrfach wiederholt werden:

- (1) Denaturierung der Matrize durch starkes Erhitzen
- (2) spezifische Anlagerung der Primer
- (3) Elongation der Primer durch eine thermostabile Polymerase

Zu einem Abbruch der exponentiellen Amplifikation kommt es, wenn die Ressourcen (Primer, Nukleotide) aufgebraucht sind bzw. das Produkt eine bestimmte kritische Menge erreicht hat.

6.4.1 Standard-PCR

Für die Standard-PCR wurde der unten angegebene Reaktionsansatz verwendet. Dabei wurde die verwendete Wassermenge der Menge der eingesetzten Matrize angepasst (Tab. 6.1). Als Programm wurde ein Standard-PCR-Programm (Tab. 6.2) verwendet, in dem je nach Länge des Templates die Elongationsdauer verändert wurde. Die Zyklenzahl wurde der Menge des eingesetzten Templates angepasst. Als Hybridisierungstemperatur wurde eine Temperatur verwendet, die ein Grad unter der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur lag.

Tab. 6.1 Reaktionsansatz einer Standard-PCR. * Menge des Wassers wurde der variablen Menge des Templates angepasst

Komponenten	Volumen [μ l]
10x PCR-Puffer (Amersham)	2,0
dNTPs (10mM) (Fermentas)	0,2
Primer A (10 μ M)	1,0
Primer B (10 μ M)	1,0
Taq-Polymerase (5u/ μ l) (Amersham)	0,2
DNA-Matrize	*
Wasser	*
Summe	20

Tab. 6.2 Standard-PCR-Programm. Annealingtemperatur wurde der Schmelztemperatur des Primers angepasst. Zyklenzahl wurde der Menge des eingesetzten Templates angepasst

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C	30 s	variable
Annealing	$T_m - 1$ °C	30s	Zyklenzahl
Elongation	72 °C	1 min	bis zu 40 Zyklen
Abschließende Elongation	72 °C	5 min	1 Zyklus

In verschiedenen Fällen wurde die Methode durch die Anwendung von „Nested“- ,Hotstart“- und „Touch-Down“-PCR-Techniken optimiert (Müller, 2001).

6.4.2 „Nested“- PCR

Bei der verschachtelten ("nested") PCR werden zwei aufeinanderfolgende Amplifikationen durchgeführt. In der ersten PCR werden Primer eingesetzt, die außerhalb des gewünschten PCR-Fragmentes liegen, so dass ein größeres Amplifikat

entsteht. Anschließend wird das erste PCR-Produkt verdünnt und für eine weitere Amplifikation als Matrize eingesetzt. Bei der zweiten PCR wird ein internes Primerpaar verwendet. Auf diese Weise wird das Auftreten von unspezifischen Nebenprodukten minimiert.

6.4.3 „Hotstart“- PCR

Ein Problem der Standard-PCR ist, dass die eingesetzte Taq-Polymerase auch bei nicht optimalen Temperaturen aktiv ist und es durch die niedrige Temperatur zu einer unspezifischen Bindung der Oligonukleotide ("mispriming") an die Matrize kommt, was zur Amplifikation unspezifischer DNA-Fragmente führen kann. Eine elegante Methode, dies zu verhindern, ist die „Hotstart“-PCR. Diese basiert auf dem Einsatz von modifizierten DNA-Polymerasen, die ihre Elongationsaktivität erst nach einem mehrminütigen Erhitzen auf 95°C ("Hot start") erlangen. Im Fall der von uns verwendeten Platinum-Taq-Polymerase wird dies durch die Bindung eines monoklonalen Antikörpers an die DNA-Bindedomäne des Enzyms erreicht, wodurch eine vorzeitige Elongation der Primer verhindert wird.

6.4.4 „Touch-Down“- PCR

Die "Touch-Down"-PCR wird ebenfalls eingesetzt, um eine unspezifische Bindung der Oligonukleotide bei zu niedrigen Temperaturen zu vermindern. Das Prinzip beruht auf der sukzessiven Herabsetzung der Annealingtemperatur um jeweils 1°C während der jeweils ersten 10 Zyklen. Dieser Vorgang kann bis zu dreimal wiederholt werden. Die anfängliche Hybridisierungstemperatur (T_m) sollte ca. 5°C über dem berechneten optimalen T_m -Wert der benutzten Primer liegen. Auf diese Weise hybridisieren nur die optimal bindenden Primer an die denaturierte Matrize, so dass die Bildung von unspezifischen Fragmenten minimiert wird.

6.4.5 RT-PCR (semiquantitative PCR)

Die Methode der RT-PCR bietet die Möglichkeit, die Expression von Genen innerhalb zweier Proben semiquantitativ zu vergleichen. Dafür wird zuerst mRNA durch eine reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Diese sscDNA dient als Matrize für die folgenden PCR-Reaktionen. Diese werden für alle Proben unter identischen Bedingungen durchgeführt. In einem ersten Schritt erfolgt eine

Äquilibrierung der Probenmenge mit einem Haushaltsgen (ciGAPDH), um den ursprünglichen Gehalt an Transkripten semiquantitativ vergleichen zu können und so die für die eigentliche PCR benötigte Probenmenge für alle Proben zu bestimmen. Diese Äquilibrierung und die eigentliche PCR-Reaktion zur Bestimmung der Genexpression des zu untersuchenden Gens werden zusätzlich mit mehreren unterschiedlichen PCR-Zyklenzahlen durchgeführt, um für das zu untersuchende Gen und den Standard die ideale Zyklenzahl zu ermitteln. Dies geschieht, da eine Vergleichbarkeit der Endprodukte nur während der exponentiellen Phase der PCR gewährleistet ist. Anhand der Bandenstärke der einzelnen Proben kann nun die in der Probe enthaltene Menge an spezifischem Transkript abgeschätzt werden. Für die PCR-Reaktion wurde ein PCR Standardprotokoll verwendet.

Tab. 6.3 Semiquantitative RT-PCR. verwendete Primer, T_m : Hybridisierungstemperatur, n: Anzahl der Zyklen

Gen	T_m	n	5'Primer	3'Primer
ciGAPDH	56°C	38	ciGAPDH_F	ciGAPDH_R
ciCD94-1	56°C	38	FCD94FLBamHI	RCD94FLPSTI.
pL2	56°C	38	5?PrimerU1.19	3_PrimeU1.19
pL6	56°C	38	5?PrimeU1.8	3?PrimeU1.8
vCRL1	56°C	40	AK17_5.3	AK17_3_ID2

6.4.6 5'RACE PCR mit der Splinkerettenmethode

Die Splinkerettenmethode wird verwendet, um unbekannte 5'Enden von DNA- und cDNA-Fragmenten zu bestimmen. Ausgangspunkt für die Isolation 5'-gelegener Gensequenzen ist eine bekannte DNA-Sequenz, die es erlaubt, Sequenz-spezifische und nach 5' gerichtete Primer zu entwerfen. Durch die Ligation von Adapter-DNA-Molekülen bekannter Sequenz an die doppelsträngige cDNA wird eine Amplifikation der DNA-Sequenzen zwischen bekannter, kodierender Sequenz und Adapter durch entsprechende Primer ermöglicht. Bei dem hier verwendeten Adapter handelt es sich um eine Splinkerette.

Die Splinkeretten bestehen aus einem oberen und einem unteren Strang. Diese sind nur am 3' Ende des oberen Stranges komplementär. Der untere Strang weist eine Haarnadel-Struktur auf (Abb. 6.1).

5' CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATTCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCCACGAGCCAAGG
 3' AAAAAACGTTTTTTTTTTGCTCGGTTCC

Abb. 6.1 Nukleotidsequenz der Splinkerette. Rot markiert: im oberen und unterem Strang komplementäre Sequenzen; blau markiert: Sequenz im unteren Strang, die die Haarnadelstruktur ausbildet

Die Ligation der Splinkerette an die doppelsträngige cDNA erfolgt über eine Ligation mit glatten Enden. Die splinkerettenspezifischen Primer sind mit Abschnitten des oberen Stranges identisch, so dass eine Bindung an den noch nicht vorhandenen, komplementären Strang erst nach einer Elongation des für die kodierende Sequenz spezifischen Primer im ersten Zyklus der ersten PCR möglich ist. Diese Tatsache bedingt die hohe Spezifität des gewählten PCR-Ansatzes.

Bei der Ligation der Splinkerette an das 3' Ende der bekannten cDNA kann auf Grund der Primerkombination keine exponentielle Amplifikation stattfinden.

Für die verschachtelte ("nested") PCR wurden Splinkeretten-spezifische Primer mit einer Schmelztemperatur von ca. 57°C, 60°C und 63°C erstellt, um sie mit bereits vorhandenen Sequenz-spezifischen Primern kombinieren zu können.

6.4.6.1 Synthese der Splinkerette und ihre Ligation

Die Oligonukleotide für die Splinkerettensynthese wurden von der Firma MWG geordert. Zur Herstellung der Splinkerette wurden beide Oligonukleotide gemeinsam bei 95°C denaturiert und im Wasserbad langsam abgekühlt.

Die Ligation der Splinkeretten an die dscDNA erfolgte mit einer T4 DNA-Ligase in einem 50 µl Ansatz (Tab. 6.4) für 24 Stunden bei 16°C. Nach der Ligation wurde die T4 DNA-Ligase durch eine 20 minütige Hitzebehandlung bei 70°C inaktiviert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung der Ligationsprodukte mittels des Microcon YM-50 Kits unter Verwendung von 10 mM Tris pH 8, wodurch nicht ligierte Splinkeretten abgetrennt wurden. Die Lagerung der Splinkeretten-cDNA erfolgte bei -20°C.

Tab. 6.4 Pipettierschema für die Splinkerettenligation.

Komponenten	Volumen [μ l]
dscDNA	1
Splinkeretten („blunt end“) (40 pmol)	1,5
Ligase Puffer (mit PEG) (2 x)	25
T4 DNA Ligase (10 U/ μ l)	5
Millipore H ₂ O	17,5
Endvolumen	50

6.4.6.2 Splinkeretten-PCR

Für die Splinkeretten-PCR wurde eine Kombination aus „Hotstart“-, „Touch-Down“- und „Nested“-PCR verwendet. Die erste PCR erfolgte mit einem Touch-Down-PCR-Programm (Tab. 6.6), während die zweite PCR mit einem Standard-PCR-Programm durchgeführt wurde (Tab. 6.2)

Tab. 6.5 Pipettierschema für Splinkeretten-PCR mit Hotstart- (PlatinumTaq) Polymerase. * Für die zweite PCR wurde eine 1 1:100 Verdünnung des PCR-Produkts der ersten PCR eingesetzt.

Komponenten	Volumen [μ l]
10x PCR-Puffer (Gibco)	2,0
dNTPs (10mM)	0,2
Primer A (10 μ M)	1,0
Primer B (10 μ M)	1,0
MgCL ₂ (25 mM)	0,6
Platinum Taq-Polymerase (5u/ μ l)	0,2
Matrize *	1,0
Wasser	14,0
Summe	20

Tab. 6.6 PCR-Programm für Splinkerettenmethode unter Einsatz einer Touchdown-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	3 min
Denaturierung	95°C	30 s
Hybridisierung	$(T_m+5)^\circ\text{C}-1^\circ\text{C}/\text{Zyklus}$	30s 2x 10 Zyklen
Elongation	72°C	1 min/kb
Denaturierung	95°C	30 s
Hybridisierung	$(T_m-1)^\circ\text{C}$	30s 25 Zyklen
Elongation	72°C	1 min/kb
Abschließende Elongation	72°C	5 min

6.4.7 3'RACE

Die 3'RACE Methode wurde verwendet, um unbekannte 3'Regionen eines Gens zu amplifizieren. Dabei wurde ebenfalls eine „Touchdown“-PCR mit den gleichen Parametern wie bei der Splinkerettenmethode verwendet (Tab. 6.6). Allerdings handelte es sich bei der zweiten PCR-Reaktion um eine semi-„nested“-PCR, da nur ein weiterer innerer 5'Primer verwendet werden konnte. Als „unspezifischer“ Primer wurde der Not(dT)18-Primer aus der cDNA-Synthese benutzt. Für den Versuch wurde sscDNA verwendet.

6.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um die PCR-Produkte aufzutrennen wurde je nach Größe der amplifizierten PCR-Produkte Agarosegele mit Konzentrationen zwischen 0,7% und 1,5% verwendet. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit 1 µl Ethidiumbromid pro 20 ml versetzt. Als Elektrophorese-Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Für die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurden 50-100 V an das Gel angelegt. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte mit UV-Licht. Zur Größenbestimmung wurden 100bp- bzw. 1kb-Größenstandards verwendet.

6.6 Klonierung

Bei der von uns verwendeten Methode wurden die PCR-Produkte direkt aus dem PCR-Ansatz oder nach Gelextraktion durch T/A-Klonierung in einen Vektor ligiert und in *E. coli* durch Elektroporation transformiert.

Anschließend wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt und einzelne Klone durch eine Standard PCR mit SP6- und T7-Primern auf die richtige Größe des inserierten PCR-Produktes hin überprüft. Von geeigneten Klonen wurden dann Übernachtskulturen angelegt und Plasmide isoliert.

6.6.1 Ligation in pGEM-T-Vektor (T/A-Klonierung)

Die verwendete Methode der T/A-Klonierung von PCR-Fragmenten basiert auf der Fähigkeit der von uns verwendeten Taq-Polymerase, keine Fragmente mit glatten Enden zu synthetisieren, sondern an jedes 3'-Ende eines synthetisierten PCR-Fragmentes ein einzelnes, überhängendes Nucleotid anzufügen. Bei der Taq-Polymerase wird präferenziell ein Adenosin-Nucleotid eingefügt. PCR-Fragmente mit einem Adenosin-Überhang lassen sich so relativ leicht und ohne vorherige enzymatische Behandlung in einen linearisierten Vektor mit Thyminüberhang (hier: pGEM-T-Vektor) ligieren. Dabei ist es essentiell, dass die PCR-Fragmente unmittelbar nach der PCR eingesetzt werden, da eine Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen eine Degradation des Adenosin-Überhangs verursacht. Außerdem kann auch eine Gelextraktion die Ligationseffizienz dramatisch reduzieren. Deshalb wurden länger gelagerte und aus Agarosegelen extrahierte PCR-Fragmente durch Anhängen eines Adenosins auf die T/A-Klonierung vorbereitet (A-Tailing). Dazu wurden die Fragmente in Anwesenheit von dATP für ca. 5 min bei 72°C mit Taq-Polymerase inkubiert. Im vorliegenden Fall wurde für die Ligation das pGEM-T Vektor System von Promega benutzt. Die Ligation erfolgte bei 4°C über Nacht.

6.6.2 Transfektion von *E. coli* durch Elektroporation

Für die Transfektion wurden kompetente Zellen von *Escherichia coli* (Stamm DH5 α) verwendet, die auf -80°C in 40 μ l-Aliquots unter Zusatz von 10 % (v/v) Glycerin gelagert wurden. Vor der eigentlichen Elektroporation wurden die Elektroporationsküvetten mit einer Spaltbreite von 1 mm (Bio-Rad) mit 70 % Ethanol und Aqua dest. gesäubert und anschließend für 15 Minuten im UV-Cross-Linker bestrahlt, um eventuell darin noch vorhandene DNA zu zerstören. Nach dieser

Behandlung wurden die Küvetten auf Eis gelagert. Danach wurden 40 µl der langsam auf Eis aufgetauten Zellen mit 1 µl des Ligationsansatzes versehen und vorsichtig durchmischt. Dieser Ansatz wurde in die vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Die Elektroporation erfolgte durch einen kurzfristigen Spannungspuls (4-5 ms) von 1,7 kV (bei einer voreingestellten Kapazität von 25 µF und einem Parallelwiderstand von 200 Ω). Danach wurde der Ansatz zum Regenerieren zügig mit 950 µl vorgewärmten SOC-Medium versetzt. Nach kräftigem Durchmischen wurde die Suspension in ein steriles Reagenzglas pipettiert und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Währenddessen wurde pro Elektroporationsansatz eine LB-Ampicillin-Kulturplatte unter sterilen Bedingungen mit einem Gemisch von 40 µl X-Gal und 4 µl IPTG beschichtet. Die beschrifteten Platten wurden zum Trocknen und Vorwärmen für ca. eine Stunde bei 37 °C gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden pro Ansatz zwischen 400-500 µl der Kultur auf die vorbereiteten Platten ausgestrichen. Diese wurden ca. 20 min angetrocknet und dann über Nacht (12-14 h) bei 37°C inkubiert.

6.6.3 Selektion positiver Klone

Da der pGEM-T-Vektor von Promega ein Gen für Ampicillinresistenz enthält, erfolgte eine erste Selektion auf LB-Ampicillin-Medium gefolgt von einer Blau-Weiß-Selektion. Die Blau-Weiß-Selektion beruht auf einer Unterbrechung des *LacZ*-Genes durch die Insertion eines DNA-Fragments und kann daher zur Identifikation von Bakterien, die einen entsprechenden Vektor mit Insert besitzen, genutzt werden.

6.6.3.1 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob die positiven Kolonien auch das gewünschte Insert enthielten, wurde mit der sogenannten Kolonie-PCR die Größe des Inserts getestet. Dabei handelt es sich um eine Standard-PCR mit SP6- und T7-Primern. Als Matrize diente dabei das Plasmid einer positiven Kolonie, die teilweise in den PCR-Ansatz übertragen wurde.

6.6.4 Herstellung von Bakterien Dauerkulturen.

Dauerkulturen wurden durch eine 1:1 Verdünnung der Bakterienkultur in 50% Glycerin erstellt und bei -80°C gelagert.

6.7 „Subtraktive Hybridisierung“

Die SSH (suppression subtractive hybridisation) ist eine Methode, durch die Genexpressionsprofile miteinander verglichen und Unterschiede in Form einer cDNA Bank gespeichert werden können (Diatchenko et al., 1996).

Für die Anreicherung von Individuen-spezifischen Genen wurde eine leicht abgewandelte „Subtraktive Hybridisierung“ durchgeführt (Khalturin et al., 2005). Nach der Theorie soll diese dazu genutzt werden, Gene anzureichern, die sich auf Nukleotidebene durch Nukleotidaustausche bzw. fehlende Nukleotidbereiche unterscheiden oder in dieser Form nur in einem der untersuchten Individuen vorkommen. Die „Subtraktive Hybridisierung“ wurde mit Hilfe des „Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit“ von BD Bioscience durchgeführt. Der Versuch wurde bis auf die Erhöhung der Hybridisierungstemperatur auf 69°C nach Protokoll durchgeführt. Gearbeitet wurde mit cDNA, die aus drei verschiedenen mRNA Populationen aus den Ovarien einzelner *Ciona intestinalis* Individuen hergestellt wurde. Alle drei cDNAs wurden als eine mit „tester“ bezeichnete Probe verwendet. Diese enthielt die zu untersuchenden Individuen-spezifisch exprimierten Gene. Die zweite cDNA-Probe war die hier als „driver“ bezeichnete Referenz-cDNA. Diese sollte alle Gene, die nicht spezifisch für ein einzelnes Individuum sind, in identischer Form besitzen und die Anreicherung dieser dadurch selektiv verhindern (Abb. 6.2). Für den Versuch wurde cDNA aus Tier 2 als „driver“ für die cDNA-Populationen aus Tier 1 und 3 sowie die cDNA aus Tier 3 als „driver“ für die cDNA aus Tier 2 verwendet. Dadurch sollten drei cDNA-Banken entstehen, die Gene enthalten die in Ovarien expremiert werden und für jedes Tier spezifisch sind.

Die folgende Liste fasst den Versuchsablauf zusammen:

1. Präparation der Ovarien aus den Tieren und visuelle Überprüfung des Reifungsgrades
2. mRNA Isolation
3. Erst- und Zweitstrang-cDNA-Synthese
4. Adaptorligation
5. erste und zweite Hybridisierung
6. erste und zweite PCR-Amplifikation
7. Ligation und Klonierung der PCR-Produkte

6.7.1 Erst- und Zweitstrang cDNA Synthese und Adaptorligation

Für die Erstrang-cDNA-Synthese wurden 2 µg mRNA für jeden Ansatz verwendet. Zuerst wurden alle mRNA-Populationen durch eine reverse Transkription in cDNA übersetzt. Anschließend wurde eine Zweitstrang-Synthese durchgeführt. Die entstandene doppelsträngige cDNA wurde dann durch die Endonuklease *Rsa I* verdaut. Dieser Verdau erfolgte, um glatte Enden zu erhalten und so eine Adaptorligation an die in zwei Teile geteilte „tester“ Probe zu ermöglichen. Dadurch erhielt man zwei Populationen von „tester“ cDNA mit unterschiedlichen Adaptoren (Abb. 6.2). Diese Adaptoren wurden später zur PCR-Selektion Individuen-spezifischer Gene benötigt. Anschließend erfolgten zwei Hybridisationsschritte.

Für die erste Hybridisierung wurde ein Überschuss von „driver“ zu den zwei „tester“ Populationen gegeben. Dies hatte zur Folge, dass invariable cDNA aus beiden Populationen Hybride bildeten, die auf Grund des Fehlens des zweiten Adaptors den weiteren Reaktionen nicht mehr zur Verfügung standen (Abb. 6.2 c). Zusätzlich bildete die cDNA von stark exprimierten Genen auf Grund der Hybridisierungskinetik Hybride, die ebenfalls für die weiteren Reaktionen nicht zur Verfügung standen (Abb. 6.2 b), was zu einer Normalisierung der Endprodukte führte. Während der zweiten Hybridisierung wurden die für die PCR zur Verfügung stehenden Matrizen gebildet. Dazu wurden die zwei „tester“ Populationen gemischt und durch Zugabe weiterer denaturierter „driver“ cDNA die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sich Hybride aus den „driver“ und „tester“ Populationen bilden. Dadurch sollte die Stringenz der Subtraktion weiter erhöht werden. Nur Hybride, die in der zweiten Hybridisierung aus den zwei verschiedenen „tester“-Ansätzen entstanden sind, besitzen beide Adaptoren (Abb. 6.2 e).

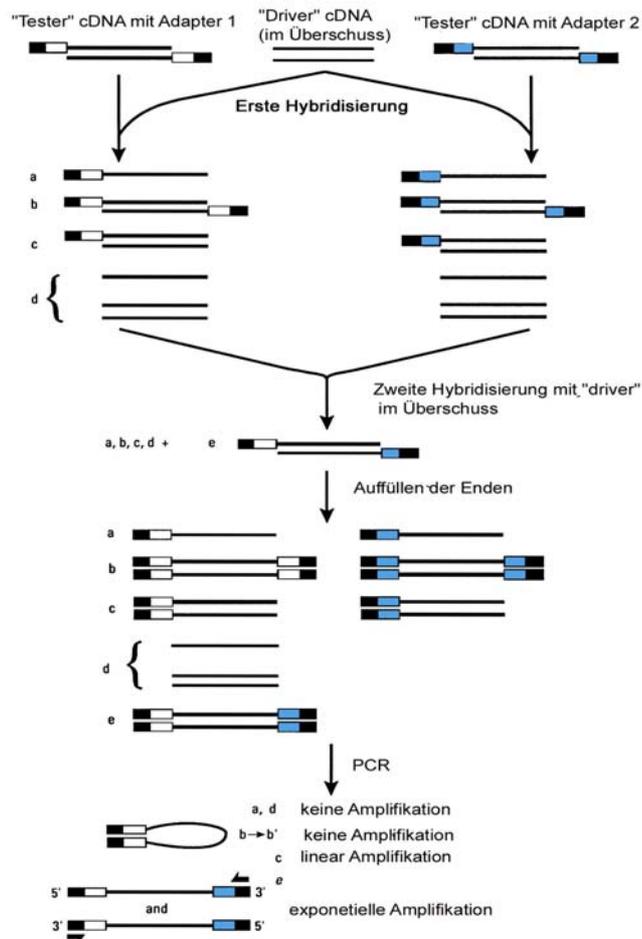


Abb. 6.2 Schematische Darstellung des Reaktionsprinzips der Subtraktiven Hybridisierung. (verändert nach Clontech User Manual)

Nur diese können während der zwei abschließenden PCR-Reaktionen exponentiell amplifiziert werden. Als Kontrolle wurden ebenfalls zwei PCR-Reaktionen mit einem Teil der „tester“ cDNA gemacht, mit dem keine Subtraktion durchgeführt wurde. Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde zu Überprüfung auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Nach einer PCR-Aufreinigung wurden 3 µl des Produkts der zweiten PCR in einen pGEM-T-Vektor ligiert und anschließend kloniert.

6.7.2 Herstellung der cDNA-Bibliotheken mit Hilfe des QPix Robotersystems

Nach der Subtraktiven Hybridisierung wurden cDNA-Banken aus den drei Endprodukten hergestellt. Von diesen wurden jeweils ca. 2000 Klone auf Agarplatten mit 50 ng/ml Ampicillin ausplattiert. Aus diesen wurden jeweils 3x 384 Klone mit Hilfe des Q-Pix Systems (Genetix) gepickt, in 384-Mikrotiterplatten mit Einfriermedium

transferiert und über Nacht bei 37°C angezogen. Nicht angewachsene Klone wurden durch angewachsene Klone aus der dritten 384-Mikrotiterplatte aufgefüllt, so dass zwei vollständig bewachsene Platten hergestellt wurden. Diese wurden mit Hilfe eines „384 Pin“ Stempel zweimal repliziert und eingefroren. Von jeder der drei cDNA-Bibliotheken wurden 768 Klone zur Sequenzierung zum „Genome Sequencing Center“ der Washington Universität nach St Louis gesendet.

6.8 „Yeast Two-Hybrid“ System

Zur Ermittlung möglicher Interaktionspartner von ciCD94-1 wurde das „Yeast Two-Hybrid“ System genutzt. Dieses basiert auf dem modularen Aufbau der meisten eukaryotischen Transkriptionsfaktoren. Diese bestehen aus einer Transkriptionsaktivierenden und einer DNA-bindenden Domäne, die strukturell und funktionell unabhängig sind (Fields and Song, 1989; Fields and Sternglanz, 1994). Für die Untersuchung wurde das BD Matchmaker „Yeast Two-Hybrid“ System von Clontech verwendet, welches den Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 nutzt, dessen Domänen künstlich getrennt wurden. Dazu wird das zu untersuchende Protein als Fusionsprotein mit der DNA-bindenden Domäne (DNA-BD) des GAL4 Transkriptionsfaktors exprimiert. Um alle möglichen Interaktionspartner untersuchen zu können, wird eine cDNA-Bibliothek mit möglichst allen Genen des zu untersuchenden Organismus unter Nutzung des Expressionsvektors pGADT7-Rec („Beute“-Vektor, BV) erstellt. Dadurch werden alle in der cDNA-Bank enthaltenen Transkripte und mögliche darin enthaltene Interaktionspartner als Fusionsproteine mit der transkriptionsaktivierenden Domäne (AD) des GAL4 Transkriptionsfaktors exprimiert.

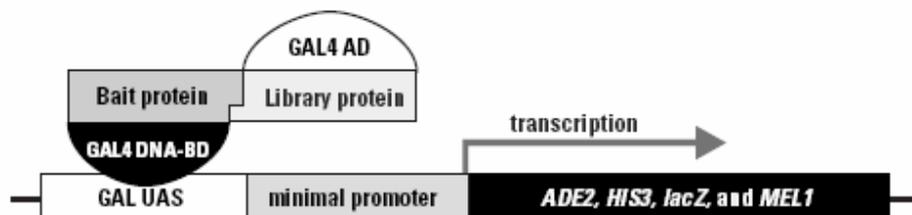


Abb. 6.3 Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des „Yeast Two-Hybrid“ System (aus dem Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits User Manual).

Werden beide Vektoren in Hefezellen eingebracht, und findet eine Interaktion zwischen dem „Köder“ (ciCD94-1) und den Proteinen aus der cDNA-Bibliothek statt, so werden die DNA-bindende Domäne (BD) und die Transkriptions-aktivierende Domäne (AD) in

unmittelbare Nachbarschaft gebracht und die Funktionalität des Transkriptionsfaktors wiederhergestellt (Abb. 6.3). Dieser rekonstituierte Transkriptionsfaktor bindet an definierte Promotorsequenzen (upstream activating sequences) und aktiviert über den minimalen Promotor die assoziierten Reportergene (Abb. 6.3; Abb. 6.4). Im BD Matchmaker „Yeast Two-Hybrid“ System von Clontech werden vier verschiedene Reportergene (HIS3, ADE2, LacZ und Mel1) verwendet. Diese stehen unter der Kontrolle von drei unterschiedlichen, definierten Promotersequenzen (Abb. 6.4).

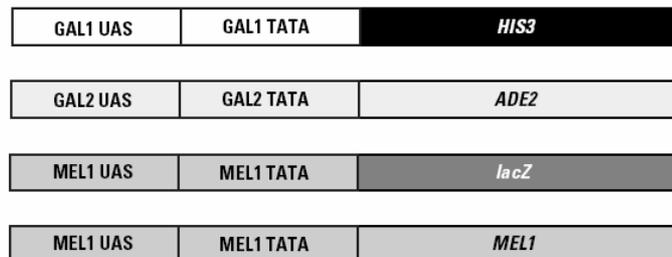


Abb. 6.4 Im YTH-System verwendete Promoter–Reportergen-Konstrukte des Hefestamms AH 109. HIS3, ADE2, lacZ, Mel1: Reportergene (siehe unten); GAL1 UAS, GAL2 UAS, MEL1 UAS: Promotersequenzen (aus Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits User Manual)

Das HIS3-Gen kodiert für ein Protein, das für die Histidin-Synthese essentiell ist, während das ADE2-Gen für ein Protein kodiert, das für die Adenin-Synthese essentiell ist. Durch Nutzung entsprechender selektiver Medien, die kein Histidin und Adenin enthalten, kann die Expression der Reportergene und damit eine positive Interaktion anhand des Wachstums der Hefekolonien detektiert werden. Durch die Expression des *LacZ*-Gens kann ein weiterer Nachweis der Interaktion über einen β -Galaktosidase-Test erfolgen. Dieser kann allerdings nur nach Lyse der Hefezellen erfolgen, da die β -Galaktosidase nicht sekretiert wird. Dies kann durch die Anwesenheit des vierten Reportergens Mel1 umgangen werden, das für eine sekretierte α -Galaktosidase kodiert.

6.8.1 Charakterisierung der verwendeten Hefestämme und Vektoren

Die verwendeten Hefestämme (AH109, Y187) wurden genetisch so verändert, dass sie Phänotypen aufweisen, die zur weiteren Selektion geeignet sind. Den verwendeten Stämmen AH109 und Y187 fehlen funktionelle Enzyme zur Leucin und Tryptophan-Synthese. Die Enzyme zur Adenin- und Histidin-Synthese stehen unter der Kontrolle von durch GAL4 aktivierbaren Promotorsequenzen und werden daher normalerweise nicht exprimiert. Der Transkriptionsfaktor GAL4 fehlt auf Grund einer Deletion.

Der „Köder“-Vektor (pGBKT7) besitzt ein Gen, welches ein für die Tryptophansynthese essentielles Enzym kodiert. Daher können Hefeklone, die den

„Köder“-Vektor enthalten, durch Wachstum auf Medium ohne Tryptophan selektiert werden. Der „Beute“-Vektor besitzt ein für die Leucinsynthese essentielles Gen. Hefeklone, die den „Beute“-Vektor (BV) enthalten, können auf Medium ohne Leucin selektiert werden. Dies ermöglicht eine Kontrolle der Transformationseffizienz.

Insgesamt können Hefeklone, die Plasmide enthalten, deren Fusionsproteine miteinander interagieren, durch Selektion auf Adenin-, Tryptophan- und Leucin-Mangelmedium (SD-3 Medium; für schwache Interaktionen) oder Adenin-, Histidin-, Tryptophan- und Leucin-Mangelmedium (SD-4; für starke Interaktionen) selektiert werden.

Um eine Segregierung der Plasmide in *E. coli* zu ermöglichen, besitzen die beiden verwendeten Vektoren verschiedene Antibiotikaresistenzen. Der „Köder“-Vektor vermittelt eine Kanamycin-Resistenz, der „Beute“-Vektor eine Ampicillin-Resistenz.

6.8.2 Herstellung der „Köder“-Vektoren

Um ein Fusionsprotein im richtigen Leserahmen mit der GAL4 DNA-bindenden Domäne erzeugen zu können, besitzt der Vektor pGBKT7 („Köder“-Vektor) mehrere unterschiedliche Restriktions-Schnittstellen. Für diese wurden zwei Restriktionsenzyme ausgesucht, die keine Schnittstellen innerhalb des amplifizierten *ciCD94-1* aufweisen. Mittels Primer, die Schnittstellen für *Bam*HI oder *Pst*I besitzen, wurden diese über eine PCR an *ciCD94-1* angefügt. Anschließend wurden der Expressionsvektor pGBKT7 und das aufgereinigte PCR-Fragment mit den entsprechenden Enzymen verdaut. Hierdurch wurde eine gerichtete Klonierung durch die komplementären überhängenden Sequenzstücke in den Vektor ermöglicht. Zur Entfernung der Restriktionsenzyme und der abgeschnittenen Primer- bzw. Vektorstücke wurden beide über ein 1%-iges Agarosegel aufgereinigt. Die Ligation wurde über Nacht bei 16°C durchgeführt. Das Ligationsprodukt wurde anschließend transformiert. Positive Kolonien wurden auf LB-Kanamycin-Platten selektiert. Positive Plasmide wurden durch mehrmaliges Sequenzieren mit anschließender manueller Verifizierung auf den Einbau im richtigen Leserahmen und mögliche Nukleotidaustausche untersucht. Anschließend wurde das pGBKT7-*ciCD94-1*-Konstrukt in Y-187 Hefezellen transformiert und auf SD/-Trp-Agarplatten ausplattiert. Eine Überprüfung der Selbstaktivierung aller drei Konstrukte (Abb. 2.1) erfolgte auf SD/-Trp/-Ade- und SD/-Trp/-His-Agarplatten. Um die Konstrukte auf ihre Toxizität für Hefezellen zu überprüfen, wurde jeweils eine Kolonie in SD/-Trp-Medium inokuliert und bei 30°C und 250 rpm für 20 h inkubiert. Anschließend wurde der OD600-Wert bestimmt. In allen Fällen lag der OD600-Wert

deutlich über 0,8. Dies bedeutete, dass die DNA-BD Fusionsproteine nicht toxisch waren. Damit eigneten sich die erstellten Konstrukte für die Durchführung des „Yeast Two-Hybrid“ Screening.

6.8.3 Herstellung der cDNA-Bibliothek

Für die weiteren Experimente wurde cDNA aus *Ciona intestinalis* mRNA hergestellt, die durch eine gerichtete *in vivo*-Klonierung in Hefezellen in den Expressionsvektor pGADT7-Rec eingebaut werden konnte. Dazu wurde mittels „Long-distance-PCR“ dscDNA erzeugt, die an beiden Enden zwei bekannte Adapter-Sequenzen enthielt. Sowohl die Synthese der sscDNA und der dscDNA als auch die Erstellung der cDNA-Bibliothek wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Für die Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde mRNA aus zwei Tieren verwendet. Die mRNA, die zur Herstellung der cDNA-Bibliothek verwendet wurde, stammte zu 80% aus dem Tier, aus dem bereits ciCD94-1 amplifiziert wurde. Die weiteren 20% wurden aus einem zweiten Tier gewonnen.

Die Erststrang-Synthese beruht auf der Verwendung eines Oligo-dT-Primers (CDS III Primer) und einer Reversen Transkriptase, die einige Nukleotide, vorzugsweise Cysteine, an das 5'-Ende der entstandenen cDNA anfügt. Im nächsten Schritt werden BD SMART III Oligonukleotide zugefügt. Diese Oligonukleotide hybridisieren über eine Oligo-G-Sequenz an den entstandenen Oligo-C-Überhang und generieren eine verlängerte Matrize. Diese kann durch die Reverse Transkriptase als Template genutzt werden, wodurch eine cDNA entsteht, die an einem Ende den CDS III Primer und an dem anderen Ende die komplementäre Sequenz des BD SMART III Oligonukleotids besitzt. Diese künstlich inkorporierten Sequenzen dienen als Bindestellen für die Primer der folgenden long-distance PCR (LD-PCR). Als Ergebnis dieser LD-PCR erhält man größere Mengen dscDNA, an deren Enden sich BD SMART und CDS III Adapter befinden, welche die Rekombinations-vermittelte *in vivo* Klonierung in den pGADT7-Rec Vektor ermöglichen. Im nächsten Schritt wurden DNA-Moleküle, die kleiner als 200 bp waren, mit einer BD CHROMA SPINTM Säule aus dem Ansatz entfernt. Dadurch sollte eine Klonierung kleinerer Fragmente vermieden werden. Das erhaltene Eluat wurde durch eine Fällung präzipitiert und in 20 µl Wasser aufgenommen. Die erhaltene dscDNA konnte nun zur Erstellung der Bibliothek genutzt werden.

6.8.4 Herstellung kompetenter Hefezellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Hefezellen wurde eine Lithiumacetat-Methode verwendet. Für jedes der Experimente wurden die kompetenten Hefezellen frisch angesetzt. Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers mit einer Kolonie des für den Versuch benötigten Hefestammes (AH 109 oder Y 187).

6.8.5 Transformation kompetenter Hefezellen

Die kompetenten Hefezellen wurden für die Transformation mit der zu transformierenden DNA, Polyethylenglykol und Träger-DNA versetzt und bei 30°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen durch Zugabe von DMSO und einem Hitzeschock dazu gebracht, die DNA aufzunehmen. Anschließend wurden die Zellen auf selektiven Medien ausgestrichen. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

6.8.6 Screening der cDNA-Bibliothek nach Interaktionspartnern

Innerhalb des „BD Matchmaker Yeast Two-Hybrid Systems“ bestehen zwei Möglichkeiten, die cDNA-Banken nach Interaktionspartnern verschiedener „Köder“-Proteine zu durchsuchen. Erstens kann das Screening der cDNA-Bank durch eine Cotransformation der synthetisierten dscDNA, dem *SmaI*-linearisierten pGADT7-Rec Vektor und dem pGBKT7-Konstrukt erfolgen. Dabei gehen allerdings alle Konstrukte, die keine Interaktion zeigen, verloren, so dass keine weitere Nutzung der cDNA-Bank möglich ist. Die zweite Möglichkeit, die cDNA-Bibliothek zu durchsuchen, beruht auf der Herstellung einer pGADT7-Rec-Bibliothek innerhalb der Hefezellen ohne unmittelbare auf Interaktion zu selektieren. Die so gewonnenen Hefezellen enthalten „Köder“-Plasmide und können anschließend zu einem Screening durch Kreuzung verwendet und durch Ausplattieren beliebig oft repliziert werden. Die Methode der Cotransformation wurde für das Screening mit dem vollständigen ciCD94-1-Konstrukt (Experiment A) verwendet. Das Kreuzungsexperiment wurde mit den beiden weiteren Konstrukten (Experiment B, C) durchgeführt.

6.8.6.1 Screening der cDNA-Bibliothek durch Kreuzung

Um die cDNA-Bank für die Kreuzung herzustellen, wurde die dscDNA zusammen mit dem *SmaI*-linearisierten Vektor pGADT7-Rec („Beute“-Vektor) in Hefezellen cotransformiert. Da die BD SMART III und CDS III Sequenzen an den Enden des

pGADT7-Rec Vektors und der synthetisierten dscDNA zu finden sind, wird die dscDNA durch *in vivo* Rekombination in den Vektor kloniert. Das resultierende Konstrukt exprimiert die cDNA als Fusionsprotein mit der GAL4-Aktivationsdomäne. Da das Screening der Bibliothek durch das Kreuzen von Hefezellen durchgeführt werden sollte, wurde für die Transformation der Hefestamm AH 109 genutzt. Die Cotransformation wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt, auf 18 SD/-Leu Platten (20x20 cm) ausplattiert und für vier Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten für 4 h bei 4°C gelagert. Die gewachsenen Kolonien wurden daraufhin mit einem Glasstab nach Zugabe von ca. 60 ml Freezing Medium abgeschabt. Die einzelnen Aliquots wurden vereinigt und die Zelldichte bestimmt. Die Zelldichte betrug ca. $6,3 \cdot 10^8$ Zellen/ml. Es wurden 1 ml Aliquots der Library angefertigt und bei -70°C gelagert.

Um nach möglichen Interaktionspartnern von ciCD94-1 zu suchen, wurden „Köder“- und „Beute“-Vektoren durch Kreuzen der beiden Hefestämme in eine Hefezelle eingebracht. Der Hefestamm Y187, der den „Köder“-Vektor enthielt, konnte mit dem Stamm AH109 gekreuzt werden, mit dem die Bibliothek konstruiert wurde. Das Resultat waren diploide Hefezellen die sowohl „Köder“- als auch „Beute“-Vektor enthielten. Um die Kreuzung durchzuführen, wurden 5 ml der „Köder“-Kultur, 1ml der „Beute“- Kultur und 45 ml 2x YPDA/Kan (50µg/ml) für 20 h bei 30°C und 40 rpm inkubiert. Anschließend wurden je 2,5 ml der Kultur auf Platten (20x20 cm) mit selektivem Medium ausplattiert. Für die Selektion wurden Platten mit dreifach und vierfach selektivem Medium verwendet. Nach vier Tagen wurden positive Klone mit einem Durchmesser > 2 mm gepickt. Diese wurden viermal nacheinander auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp und SD/-His/-Leu/-Trp Platten ausgestrichen, um die Kolonien unter einem permanenten Selektionsdruck zu halten. Dadurch sollte die Möglichkeit falschpositiver Kandidaten auf Grund mehrerer „Beute“-Plasmide in einer Kolonie stark reduziert werden (Vidalain et al., 2004). Zusätzlich konnte eine erste Verifizierung der Phänotypen erfolgen. Von allen Klonen, deren Phänotyp verifiziert werden konnte, wurden Gefrierkulturen angefertigt und bei -70°C gelagert.

6.8.6.2 Screening der cDNA-Bibliothek durch Cotransformation

Die Cotransformation und das Durchsuchen der cDNA-Bank auf Interaktionspartner erfolgten nach Herstellerangaben. Für den Versuch wurde der „Köder“-Vektor mit dem für ciCD94-1-A (Abb. 2.1) kodierenden Insert verwendet. Für die Cotransformation wurde der Hefestamm AH 109 verwendet. Als Transformationskontrolle wurde ein Teil

der Transformation auf SD/-Leu, SD/-Trp und SD/-Leu/-Trp ausplattiert. Die Transformationseffizienz war mit berechneten ca. $6 \cdot 10^5$ Kolonien im Rahmen der vom Hersteller angegebenen Parameter. Die Selektion der möglichen positiven Kolonien erfolgte nach dem gleichen Schema, nach dem auch das Kreuzungsexperiment durchgeführt worden war (6.8.6.1), mit der Ausnahme, dass nur auf SD-Leu/-Trp/-His/-Platten selektiert wurde.

6.8.7 Identifikation möglicher Interaktionspartner

Um Informationen über die möglichen Interaktionspartner zu erhalten, wurde das Insert der Library-Vektoren mittels Kolonie-PCR amplifiziert und die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese analysiert. Bestand das PCR-Produkt aus mehreren Banden, wurde die Hefe-Kolonie nochmals auf selektivem Medium ausgestrichen, um durch den Selektionsdruck den für das Wachstum verantwortlichen „Beute“-Vektor zu isolieren. Bestand das PCR-Produkt aus einer Bande wurde das Insert direkt sequenziert (MEGABace). Während des ersten Screenings wurden auf Grund des ausschließlichen Auftretens eines einzigen möglichen Liganden (pL1) in der ersten Sequenzierung alle weiteren Kolonien des ersten Screenings vor der Sequenzierung durch eine Southern-Blot Analyse auf ein Insert des möglichen Liganden (pL1) überprüft.

6.8.8 Isolierung der Plasmide aus Hefe

Um die Interaktion zwischen den „Beute“-Proteinen und den ciCD94-1-Konstrukten weiter untersuchen zu können, mussten die verschiedenen Plasmide aus den Hefekolonien isoliert werden. Hierfür wurden die Hefezellen durch Glasperlen (0,45 μM) in Lyse-Puffer mechanisch aufgebrochen, anschließend wurden die Plasmide durch ein Phenol-Chloroform-Gemisch aufgereinigt. Die wässrige Phase konnte direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet werden. Allerdings enthielt die wässrige Phase der Isolation ein Gemisch aus pGBKT7 („Köder“) und pGADT7 („Beute“) -Plasmiden. Auf Grund des im pGADT7 kodierten Resistenzgens für Kanamycin konnte durch den Einsatz von Kanamycin als Selektionsmarker eine Trennung der beiden Plasmide erfolgen. Alle für die Kontrollen verwendeten Plasmide wurden durch eine PCR gegen pGBKT7 auf ihre Reinheit überprüft, um mögliche falsche Ergebnisse durch Kontaminationen während der Kontrollen zu verhindern.

6.8.9 Kontrolle der Spezifität durch Cotransformation

Um die Spezifität der Interaktion im „Yeast Two-Hybrid“ System zu testen, wurde eine Cotransformation der verschiedenen isolierten „Beute“-Plasmide mit verschiedenen „Köder“-Plasmiden durchgeführt. Als „Köder“-Plasmide für die Positivkontrolle wurden die dem jeweiligen Versuch (A, B, C) entsprechenden ciCD94-1-BV-Konstrukte verwendet. HyDKK1/2/4A-BV-Konstrukte und der leere „Köder“-Vektor wurden genutzt, um ein unspezifisches Binden des Interaktionspartners an das Fusionsprotein HyDKK1/2/4A-BV oder an die Aktivationsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors zu ermitteln. Die Transformationen wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt und auf SD/-Leu/-Trp-Medium ausplattiert. Mehrere Kolonien der einzelnen Cotransformationen wurden mit 3 ml SD/-Trp/-Leu- Medium inokkuliert und über Nacht bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurde der OD₆₀₀-Wert bestimmt. Um die Hefezellen in vergleichbarer Konzentration auf die Selektionsplatten auftragen zu können, wurde der Kehrwert des OD₆₀₀-Wertes mit dem Faktor 100 multipliziert. Der erhaltene Wert gab an, wie viele Mikroliter der Übernachtskultur entnommen und mit 0,9 % NaCl-Lsg. auf 1000 µl aufgefüllt werden sollten. Von dieser Ausgangsverdünnung wurden mit 0,9 % NaCl-Lsg. weitere 1:10 und 1.100 Verdünnungen hergestellt. Jeweils 4 µl jeder Verdünnung wurden auf SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp und auf SD/-His/-Leu/-Trp-Platten aufgetragen. Nach drei Tagen wurde das Wachstum der einzelnen Kolonien dokumentiert.

6.8.9.1 β-Galaktosidase-Assay mit Cotransformanten

Mit den erhaltenen Cotransformanten wurde zur weiteren Verifizierung des Phänotyps ein Test auf Galaktosidase-Enzymaktivität durchgeführt. Dazu wurden 6 ml 0,5 M Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7), 200 µl 10% SDS, 200 µl 1 M KCl und 20 µl 1 M MgCl₂ zusammengegeben und gemischt. In einem zweiten Gefäß wurde durch vorsichtiges Erhitzen eine 0,8 % Lösung mit „low melting“ Agarose in Millipore-Wasser erzeugt. Die Natrium-Phosphat-Puffer Mischung wurde zu 10 ml der 0,8 % Lösung hinzugegeben und mit Millipore-Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Zu der handwarmen Lösung wurden 200 µl X-Gal (40 mg/ml in DMF) hinzugefügt. Danach wurden die Hefe-Platten mit dieser Lösung überschichtet und nachdem sich der Agar verfestigt hatte über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Färbung der Kolonien kontrolliert.

6.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide und PCR-Produkte erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Alle Sequenzen, für die eine hohe Sicherheit vorliegen musste (z.B. Sequenzvergleiche und Kontrolle des Leserahmens), wurden mit dem LICOR-System sequenziert. Alle Sequenzen wurden nach dem Lauf nochmals von Hand überprüft, um evtl. Fehler, die bei der *in silico* Sequenzauswertung aufgetreten sein könnten, zu korrigieren. Da auf dem MegaBACE-System diese Möglichkeit nicht besteht, wurde diese nur für eine erste Auswertung der YTH-Interaktionspartner genutzt. Eine abschließende Überprüfung der YTH-Sequenzen erfolgte für jeweils einen Klon aller möglichen Interaktionspartner mit dem LICOR-System.

6.9.1 Sequenzierung mit dem LICOR-Plattensequenzierer

Die Sequenzierung der Inserts erfolgte über einen Cycle-sequencing-Ansatz mit Hilfe des SequiTherm Excel II DNA-Sequencing Kit-LC (Epicentre Technologies) nach Herstellerangaben. Die Methode verwendet das Prinzip der Sequenzierung nach Sanger, das auf einer Kettenabbruchreaktion beruht (Sanger et al., 1977). Dazu wurde jede Probe unter Verwendung IRD800-markierter SP6 oder T7-Primer (MWG Biotech) auf vier Ansätze verteilt, die jeweils eines der vier Nukleotide zu einem gewissen Prozentsatz als Didesoxynukleotid beinhalteten. Die Proben wurden nach den Angaben des Herstellers amplifiziert. Die Auftrennung erfolgte nach Standardbedingungen in 1x TBE auf einem Polyacrylamidgel. Die Sequenzierung erfolgte mit einem automatischen Sequenzierer vom Typ LI-COR Gene ReadIR 4200 mit Internet-Interface Netwinder (MWG Biotech). Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe der Software eSeq V2.0 des Geräteherstellers ausgelesen und analysiert.

6.9.2 Sequenzierung mit dem MEGABace-Kapillarsequenzierer

Die Sequenzierung der Inserts erfolgte ebenfalls über einen Cycle-sequencing-Ansatz. Für jeden Reaktionsansatz wurde das DNA-Template in 5 µl Millipore-Wasser und 1 µl 10 pmol/µl Primer in einer 96-well Platte vorgelegt. Die Matrizenkonzentration für kleine DNA-Fragmente (bis 1 kb) wurde nach der Insert-Größe berechnet: $\text{bp} \times 0,1 = \text{ng DNA}$. Bei größeren Matrizen (>1 kb) wurden maximal 600 ng eingesetzt. Anschließend wurden 4 µl „DYEnamic ET Terminator sequencing reagent premix“ in einer 1:2 Verdünnung mit Dilution-Buffer zugegeben, der Ansatz gründlich

durchmischt und die 96-well Platte mit einer „Sealmat“ verschlossen und die PCR durchgeführt (Tab. 6.7).

Tab. 6.7 Standard PCR-Programm für die Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	5 s
Denaturierung	95°C	30 s
Hybridisierung	T _m -2°C	15 s 30 Zyklen
Elongation	60°C	1 min/kb

Vor dem Sequenzierlauf wurden die Reaktionsprodukte durch eine Präzipitation aufgereinigt. Dazu wurden zu jeder Reaktion 1 µl 7,5 M Ammonium Acetat und anschließend 30 µl 99% Ethanol direkt in die Reaktion gegeben und gründlich durchmischt. Die 96-Well Platte wurde mit einer Sealmat verschlossen und für 40 min bei 4500 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 70% Ethanol, eine erneute Zentrifugation für 40 min bei 4500 rpm und 4°C und das Entfernen des 70% Ethanols. Die Pellets wurden für 2-5 min an der Luft getrocknet, in 20 µl Millipore-Wasser gelöst und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde der Sequenzierlauf mit folgenden Parametern gestartet (Tab. 6.8).

Tab. 6.8 Parameter der Sequenzierung.* Mit der Injektionszeit kann das Ladevolumen bei Überladung herunter gesetzt werden. Die Laufzeit sollte je nach Insert-Größe 120-240 Minuten betragen

Injection Voltage	2 kV
Injection Time	60 seconds*
Run Voltage	8 kV
Run Time	240 minutes*
Run temperature	44°C
PMT1	720 V
PMT2	750 V
Chemistry	ET Terminators
Basecaller	Cimarron 3.12 Aligned

6.10 Southern und Northern Blot Hybridisierung

6.10.1 Southern Blot

Das Southern Blotting ist eine Standardtechnik zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen. Dabei wird durch Gelelektrophorese separierte DNA im Gel denaturiert, auf eine Membran transferiert und fixiert. Anschließend erfolgt die Detektion der Zielsequenz durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter einzelsträngiger DNA. Wird für einen Southern Blot DNA von unterschiedlichen Individuen verwendet, kann der Southern Blot zur Analyse des Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus verwendet werden.

6.10.1.1 Restriktionsverdau der genomischen DNA

Der Verdau der DNA für den Southern Blot erfolgte mit Restriktionsenzymen der Firma Fermentas in 50-100µl Ansätzen nach Herstellerangaben.

6.10.1.2 Auftrennung der DNA

Die geschnittene genomische DNA wurde nach 20 minütiger 65°C Behandlung auf einem 1% Agarosegel bei niedriger Spannung (30-40 V) aufgetrennt. Danach wurde das Gel mit 250 mM HCl solange behandelt, bis sich das Bromphenolblau des Ladepuffers gelb verfärbt hat. Dies geschieht, um die DNA zu depurinieren, wodurch leichtere DNA-Fragmente erzeugt werden und die Diffusion der DNA während des Blottens erleichtert wird. Im Anschluß wurde das Gel kurz mit destilliertem Wasser gespült und für 30 min mit Denaturierungslösung behandelt. Als nächstes wurde das Gel mit destilliertem Wasser gespült und für 25 min mit Neutralisationslösung behandelt.

6.10.1.3 Kapillar-Blot

Beim Kapillar-Blot wird mit Hilfe von Kapillarkräften die DNA aus dem Gel auf eine Membran übertragen. Dafür wurde das Gel auf drei mit 20x SSC gesättigte Whatman Filterpapiere gelegt, die auf einer geeigneten Apparatur platziert wurden. Das Gel wurde dabei mit Parafilm umschlossen, um eine Umgehung des Gels zu vermeiden. Danach wurde die Hybond-N⁺-Nylonmembran auf das Gel gelegt. Dann wurden drei Lagen mit 20xSSC angefeuchteten Whatman Filterpapier, gefolgt von einer 3 bis 5 cm dicken Schicht Papiertücher aufgelegt. Als letztes wurde alles mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert. Bei allen folgenden Vorgängen wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befanden. Der Blot erfolgte

über Nacht. Nach dem Blotten wurde die Membran eine Minute in 6x SSC gespült. Danach wurde die DNA durch UV-Crosslinking auf der Membran fixiert und konnte für die Hybridisierung verwendet werden.

6.10.2 Northern Blot

6.10.2.1 Gelaufftrennung

Um eine Zersetzung der RNA durch RNase zu verhindern, wurde die für die Auftrennung benutzte Gelkammer für 30 min mit 0,5% SDS behandelt, mit 1 N NaOH-Lsg. gespült und abschließend mehrfach mit Millipore Wasser gereinigt. Zur Auftrennung der mRNA wurde eine Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dafür wurde ein 1% Agarosegel mit 1x Formaldehyd-Laufpuffer und 2,2 M Formaldehyd benutzt. Die mRNA-Probe wurde mit einem Volumen von 4,5 µl in 2,0 µl 5x Formaldehyd-Laufpuffer, 3 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid für 15 min auf 65°C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die 20 µl zusammen mit 2 µl Formaldehyd-Ladepuffer auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit ca. 3-4 V/cm laufen gelassen. Die Reihen, welche die Marker in Form von 28S- und 16S-rRNA und einer 1000 Basenpaar Bande beinhalteten, wurden von dem übrigen Gel abgetrennt und für 45 min mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml in 0,1 M Ammoniumacetat) gefärbt und fotografiert. Das Gel wurde danach in RNase freiem Wasser gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen, und für 45 min mit 20x SSC behandelt.

6.10.2.2 Kapillar-Blot

Der Kapillar-Blot erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie der Kapillar-Blot für den Southern-Blot (siehe 6.10.1.3).

6.10.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten durch „Random Primed Labelling“

Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Fragmente erfolgte durch „Random Primed Labelling“. Eine Aufreinigung der markierten DNA erfolgte über 1 ml Sephadex G50-Säulen durch Zentrifugation für 2 min bei 2000 g. Die radioaktive Einbaurate wurde am Szintillationszähler bestimmt (Cerenkov-Protokoll).

Die Reaktion zur radioaktiven Markierung von aufgereinigten und denaturierten (5 min 95°C) PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe von Klenow-Fragment für 3 h bei 37°C.

Tab. 6.9 Pipettierschema zur radioaktiven Markierung der Sonden. Primer A und Primer B sind Sequenz-spezifisch

Komponenten	Volumen [μ l]
100 ng Probe in H ₂ O	70
10x Klenow-Puffer	10
Random Hexamer-Primer [100 μ M]	8
Primer A [10mM]	1
Primer B [10mM]	1
AGT-Mix	4
Klenow-Fragment	3
α - [³² P]-dCTP	3
Gesamt	100

6.10.4 Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung erfolgte eine Prähybridisierung für zwei bis drei Stunden bei der Hybridisierungstemperatur. Für die radioaktive Hybridisierungen von Nylonmembranen wurden ca. 1 Mio cpm/ml Hybridisierungslösung eingesetzt. Die Waschschrte erfolgten in der Regel mit 0,2 x SSC und 0,1% SDS bei 55°C. Je nach Charakter der Probe wurden die Waschschrte durch Änderung der Salzkonzentration bzw. der Temperatur variiert. Die erste Auswertung erfolgte durch Auflegen auf eine „Phosphoimaging“-Platte von Fuji und ein Auslesen derselben am Phosphoimager FLA-5000. Zur weiteren autoradiographischen Auswertung wurden die in Folie eingeschlagenen Membranen auf einen Film gelegt und bei -80 °C exponiert.

Nach Entfernen der radioaktiven Probe („stripen“) durch Inkubation mit kochendem 0,5% SDS konnten die Membranen erneut verwendet werden. Die Vollständigkeit der Probenentfernung wurde durch Autoradiographie überprüft. Die Lagerung der Southern und Northern Blots erfolgte bei -20°C.

6.11 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung beinhaltet das Binden einer Digoxigenin-markierten Ribonukleotid-Sonde an eine im Gewebe befindliche mRNA mit komplementärer Sequenz. Anschließend erfolgt die Bindung eines anti-Digoxigenin-Antikörpers, der mit einer alkalischen Phosphatase konjugiert ist. Dadurch kann bei Einsatz des geeigneten Substrates für dieses Enzym die Expression des zu untersuchenden Gens sichtbar gemacht werden.

6.11.1 Sondensynthese

Als Vorlage für die Sondensynthese wurden Fragmente der entsprechenden Plasmide verwendet. Diese setzten sich aus den Inserts des zu untersuchenden Gens, flankiert von den SP6- und T7-Promotoren des Plasmids, zusammen. Diese Fragmente wurden durch eine PCR-Reaktion mit Primern gegen die viralen Promotoren unter Verwendung von Plasmid als Matrix hergestellt. Zur Synthese der Ribonukleotid-Sonde wurde das „DIG-RNA-Labeling-Kit“ von Roche nach Angaben des Herstellers verwendet (Tab. 6.10).

Tab. 6.10 Pipettierschema eines Transkriptionsansatzes für die DIG-RNA-Sondensynthese.

Komponenten	Volumen [μ l]
10 x Transkriptionspuffer	2,0
DIG-Markierungs-Mix	2,0
RNase-Inhibitor	1,0
SP6- oder T7-Polymerase	2,0
Matrize	1 μ g in variablem Volumen
DEPC-H ₂ O	auf 20 μ l auffüllen
Summe	20,0

6.11.2 Hybridisierung von Gewebe

Alle Schritte, die keine Temperaturangaben enthalten, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Waschschrte wurde ein Schüttler verwendet.

1. Tag

Die Gonaden wurden in frisches 4% Paraformaldehyd, das in 75% Meerwasser gelöst wurde, überführt und bei 4°C über Nacht fixiert.

2. Tag

Die Gonaden wurden 10 min in 100% Ethanol inkubiert und anschließend schrittweise mit Ethanol/PBT im Verhältnis 75% / 25%; 50% / 50%; 25% / 75% für jeweils 5 min rehydriert. Danach erfolgten drei Waschgänge mit PBT für jeweils 10 min. Ein partieller Verdau des fixierten Gewebes mit Proteinase K (10 μ g/ml in PBT) für 20 min ermöglichte eine Penetration des Gewebes durch die RNA-Sonde und entfernte an die mRNA angelagerten Proteine. Die Proteinase K Behandlung wurde danach durch ein kurzes Waschen und anschließende 10-minütige Inkubation mit Glycin (4 mg/ml in PBT) gestoppt. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit PBT wurden die Gonaden in 0,1 M Triethanolaminlösung pH 7,8 überführt und zweimal 5 min gewaschen. Nun folgte eine Behandlung mit Essigsäureanhydrid (1x 5min 2,5 μ l/ml; 1x

5 min 5 µl/ml) in 0,1 M Triethanolamin, um unspezifisches Binden der markierten RNA-Probe zu reduzieren. Nach drei weiteren 10-minütigen Waschvorgängen in PBT wurde das Gewebe zur Refixierung für eine Stunde in 4% Paraformaldehyd in PBT überführt, um die Morphologie der Gonaden bestmöglich zu erhalten. Nach weiterem fünfmaligem Waschen mit PBT wurden die Gonaden einer 30-minütigen Hitzebehandlung bei 80°C unterzogen, um endogene alkalische Phosphatasen zu inaktivieren. Vor der Prähybridisierung wurden die Ovarien für 10 min in Hybridisierungslösung/PBT (50%/50%) und für weitere 10 min in Hybridisierungslösung gewaschen. Die folgenden Schritte der Prähybridisierung wurden bei der gleichen Temperatur wie die eigentliche Hybridisierung (zwischen 56°C und 60°C) durchgeführt und sollte die unspezifische Bindung der Probe reduzieren. Dazu wurden die Ovarien für zwei Stunden in Hybridisierungslösung inkubiert. Für die Hybridisierung wurden die Gonaden 16-60 Stunden in 1,2 ml Hybridisierungslösung unter leichtem Schütteln mit einer Sense bzw. Antisense-Sonde mit der Konzentration von ca. 0,1 µg/ml behandelt.

3. Tag

Um ungebundene Sonden zu entfernen, wurden die Ovarien während der Posthybridisierung zuerst für jeweils 5 min in 100 % Hybridisierungslösung, in 75 % Hybridisierungslösung / 25% 2x SSC, in 50% Hybridisierungslösung / 50% 2x SSC und in 25% Hybridisierungslösung / 75% 2x SSC gewaschen. Danach erfolgten zur weiteren Posthybridisierung zwei 30-minütige Waschschritte in 2x SSC + 0,1 % CHAPS. Die Posthybridisierung wurde bei der gleichen Temperatur wie die Prähybridisierung und die Hybridisierung durchgeführt. Danach wurden die Ovarien zweimal für 10 min in MAB gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für eine Stunde in MAB-B und eine zweistündige Inkubation in Blockierungslösung bei 4°C. Schließlich wurde die Blockierungslösung durch 1:2000 verdünnte Antikörper in Blockierungslösung ersetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei dem eingesetzten Antikörper handelt es sich um einen Anti-Digoxigenin-Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase konjugiert wurde.

4. Tag

Nach der Inkubation wurden die nicht spezifisch gebundenen Antikörper durch achtmaliges Waschen für 40 min mit MAB entfernt. Danach erfolgte eine Erhöhung des pH-Wertes des Gewebes durch 3x 5 min Waschen mit NTMT mit Levamisol (1 µl/ml).

Bei dem verwendeten Substrat handelte es sich um NBT/BCIP-Konzentrat in einer 1:50 Verdünnung in NTMT. Die Reaktion wurde mit destilliertem Wasser abgestoppt und die Gonaden über Nacht in Methanol gelagert. Danach wurden die Ovarien in Euparal eingebettet.

6.11.3 Hybridisierung der Parafinschnitte

Alle Schritte, die keine Temperaturangaben enthalten, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle Waschschritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Die Durchführung der Hybridisierung erfolgte nach Fröbuis et al., 2003.

1. Tag

Die Gonaden wurden in frischen 4 % Paraformaldehyd (gelöst in 75% Meerwasser) bei 4°C über Nacht fixiert und bei -80°C in 100 Methanol gelagert.

2.Tag

Die Ovarien wurden 2x 15 min mit Methylbenzolat und danach 2x 10 min mit Benzol gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 10 min in Benzol/Parafin (50:50, 37°C) und zwei Behandlungen für 30 min in Parafin bei 56°C. Als nächster Schritt wurden die Ovarien in Parafin eingebettet. Aus den Parafinblöcken wurden 9 µm Schnitte hergestellt und auf mit Polylysin überzogene Deckgläser aufgebracht. Die Schnitte und Parafinblöcke wurden bis zur Benutzung bei 4°C gelagert.

3. Tag

Das Parafin wurde von den Schnitten entfernt, indem diese 2x für 10 min in Xylen behandelt wurden. Die Schnitte wurden 2x 3 min in 100% Ethanol inkubiert und anschließend schrittweise mit Ethanol/PBT im Verhältnis 75% / 25%; 50% / 50% und 25%:75% für jeweils 2x 3 min rehydriert. Danach erfolgten drei Waschgänge mit PBT für jeweils 5 min. Ein partieller Verdau des fixierten Gewebes mit Proteinase K (10 µg/ml in PBT) für 5 min ermöglichte eine Penetration des Gewebes durch die RNA-Sonde und entfernte Proteine auf der mRNA. Die Proteinase K Behandlung wurde danach durch zwei 5-minütige Inkubationen mit Glycin (4 mg/ml in PBT) gestoppt. Nach zweimaligem Waschen für jeweils 5 min mit PBT wurden die Schnitte in 0,1 M Triethanolaminlösung pH 7,8 überführt und zweimal 3 min gewaschen. Um unspezifisches Binden der markierten RNA-Probe zu reduzieren, wurden die Schnitte mit Essigsäureanhydrid (2x 5 min 2,5 µl/ml) in 0,1 M Triethanolamin behandelt. Nach

zwei weiteren 5-minütigen Waschvorgängen in PBT wurden die Schnitte zur Refixierung für 15 min in 4 % Paraformaldehyd in PBT überführt. Danach erfolgten weitere fünf Waschschritte für je 5 min mit PBT. Vor der Prähybridisierung wurden die Schnitte für 5 min in Hybridisierungslösung/PBT (50%/50%) gewaschen. Die folgenden Schritte der Prähybridisierung wurden bei der gleichen Temperatur wie die eigentliche Hybridisierung (zwischen 55°C und 58°C) durchgeführt und sollten die unspezifische Bindung der Probe reduzieren. Dazu wurden die Schnitte für 2 Stunden in Hybridisierungslösung inkubiert. Die folgende Hybridisierung erfolgte in 1,2 ml Hybridisierungslösung unter leichtem Schütteln mit einer Sense- und Antisense-Sonde der Konzentration von ca. 0,1 µg/ml für ca. 16 Stunden.

4. Tag

Um ungebundene Sonden zu entfernen, wurden die Schnitte während der Posthybridisierung für jeweils 10 min in 75% Hybridisierungslösung/25% 2x SSC, anschließend in 50% Hybridisierungslösung/50% 2x SSC sowie in 25% Hybridisierungslösung / 75% 2x SSC gewaschen. Danach erfolgten zur weiteren Posthybridisierung zwei 20-minütige Waschschritte in 2x SSC + 0,1 % CHAPS. Die Posthybridisierung wurde bei der gleichen Temperatur wie die Prähybridisierung und die Hybridisierung durchgeführt. Danach wurden die Ovarien zweimal für 5 min in MAB gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 min in MAB-B und ein 20-minütige Inkubation in Blockierungslösung bei 4°C. Schließlich wurde die Blockierungslösung durch 1:2000 verdünnte Antikörper in Blockierungslösung ersetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei dem eingesetzten Antikörper handelt es sich um einen Anti-Digoxigenin-Antikörper, an den eine alkalische Phosphatase konjugiert wurde.

5. Tag

Nach der Inkubation wurden die nicht spezifisch gebundenen Antikörper durch achtmaliges Waschen für 30 min mit MAB entfernt. Danach erfolgte eine Erhöhung des pH-Wertes des Gewebes durch 3x 5 min Waschen mit NTMT. Bei dem verwendeten Substrat handelte es sich um NBT/BCIP-Konzentrat in einer 1:50 Verdünnung in NTMT. Die Reaktion wurde mit destilliertem Wasser abgestoppt und die Schnitte kurz in 99% Ethanol dehydriert.

Danach wurden die Ovarien in Euparal eingebettet.

6.12 Sequenzanalysen

6.12.1 Allgemeine Sequenzanalyse

Die unterschiedlichsten Sequenzanalysen, wie z.B. das Umwandeln von Nukleotidsequenzen in die komplementäre und reverse Sequenz, der Vergleich von Nukleotid- oder Proteinsequenzen, das Auffinden offener Leserahmen sowie die Suche nach Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurden mit dem Programm **DNAMAN Version 4.15** durchgeführt.

Die phylogenetische Analyse erfolgte mit dem Programm **Mega 3.1** (Kumar et al., 2003) und wurde nach der „Neighbor Joining Methode“ mit folgenden Parametern durchgeführt: Als Modell wurde eine „Amino Possion correction“ verwendet, der Test der Phylogenie erfolgte über einen Bootstrap mit 500 Wiederholungen. Lücken und fehlende Daten wurden gelöscht.

Die Identität der einzelnen Sequenzen eines Gens wurde mit **DNAMAN Version 4.15** über eine Analyse der verschiedenen in den Abbildungen gezeigten Alignments bestimmt.

Die Analyse des Expressionsprofils verschiedener Gene anhand der Anzahl der ESTs in verschiedenem Gewebe erfolgte über die EST-Datenbank der „Ghost-Database“ (<http://ghost.zool.kyoto-u.ac.jp/indexr1.html>)

6.12.2 Allgemeine Analyse der SSH-Datenbank

Die SSH-Sequenzen wurde mit dem Programm **TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL)** (Pertea et al., 2003) geclustert. Dazu wurden folgende Parameter verwendet: $p = 95$ (% Identität auf Nukleotidebene), $l = 80$ (minimale Länge der Übereinstimmung) und $v = 40$ (Distanz der Übereinstimmung in Nukleotiden zu den Enden der Sequenzen).

6.12.2.1 Analyse der Sequenzunterschiede zwischen Sequenzen aus den verschiedenen Datenbanken

Zur Analyse der möglichen Sequenzunterschiede zwischen den Sequenzen der drei unterschiedlichen SSH-cDNA-Banken und zur Analyse der genomischen Situation wurden in dem Programm Seqtools 8.3 (<http://www.seqtools.dk>) aus den SSH-cDNA-

Banken und der Genomdatenbank von JGI v2.0 (<http://genome.jgi-psf.org/Cioin2/Cioin2.download.ftp.html>) lokale Datenbanken hergestellt. Gegen diese lokalen Datenbanken wurden BlastN Suchen durchgeführt. Zusätzlich wurde über den Blast Klienten von Seqtools 8.3 ein BlastN gegen die EST-Datenbank bei NCBI durchgeführt. Die Suche nach homologen Proteinen erfolgte ebenfalls mit dem Blast Klienten von Seqtools 8.3 über einen Batch-Blastx der SSH-cDNA-Datenbanken gegen die NR Proteindatenbank bei NCBI. Die Informationen aus diesen Blast-Suchen wurden für jede SSH-cDNA-Bank in einer separaten Exeltabelle gespeichert und dienten als Grundlage für die weiteren Analysen. Zur weiteren Analyse wurden nur Sequenzen verwendet, die eine Identität von $\leq 93\%$ gegen die ESTs aus der öffentlichen Datenbank aufwiesen.

6.12.2.2 Analyse der Proteinstruktur der Sequenzen der SSH-cDNA-Bank

Für die Analyse der Proteinstruktur wurde versucht, für jede Sequenz der SSH-cDNA-Banken eine entsprechende vollständige Sequenz der Unigene-Datenbank (NCBI) zu bestimmen. Dazu wurde in Seqtools eine lokale Datenbank mit allen in Unigen für *Ciona intestinalis* verfügbaren Sequenzen generiert und über eine BlastN-Suche nach passenden Sequenzen gesucht. Wurde keine der SSH-Sequenz entsprechende vollständige Sequenz gefunden, wurde mit der ursprünglichen Sequenz aus der SSH-cDNA-Bank weitergearbeitet. Anschließend wurde für die vollständigen Sequenzen aus der Unigene-Datenbank und den verbliebenen Sequenzen aus den SSH-cDNA-Datenbanken in allen Leserahmen das längstmögliche Protein bestimmt und für die weitere Analyse verwendet. Die Suche nach bereits bekannten Proteindomänen innerhalb der Leserahmen erfolgte mit Hilfe des Programms HMMer (Eddy, 1998) über eine „Hidden Markov Model“-Suche. Die Datensets für die HMM-Suche wurden vom Server der Universität in St-Louis (<http://pfam.wustl.edu/>) heruntergeladen. Die Suche nach **Signalpeptiden** wurde über den Blast-Server des „Center for Biological Sequence Analysis“ der Technischen Universität von Dänemark durchgeführt. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Die Suche nach **Transmembrandomänen** erfolgte ebenfalls über den Server der Technischen Universität von Dänemark mit dem Programm TMHMM server v. 2.0. Die Proteinstruktur interessanter Kandidaten wurde durch eine weitere HMM-Suche mit Smart verifiziert.

6.12.3 Sequenzanalyse mit Codeml

Für die Analyse der positiven Selektion wurden für Vc16 und Vc182 alle erhaltenen Sequenzen verwendet. Für die Analyse von vCRL1 wurde jeweils eine der Sequenzen aus den Tieren A-H verwendet. Da Codons, die in einer der Sequenzen fehlten, nicht in die Analyse einbezogen wurden, wurde, wenn dies möglich war, darauf geachtet einander entsprechende Splicevarianten (A1, B1, C4, D2, E1, F1, G1, H1) zu verwenden. Die für die Analyse verwendeten Alignments wurden in DNAMAN und Mega 3.1 als „Phylip“-Format erstellt. Die phylogenetische Analyse wurde ebenfalls als „Phylip“-Format mit Hilfe der Programme DNAMAN, Mega 3.1 (Kumar et al., 2004) und dem ClustalW-Programm auf dem EMBL-EBI Server erzeugt. Alle weiteren Analysen wurden nach den Angaben der Anleitung mit dem Codeml-Programm des Programmpackets PAML 3.14 durchgeführt (Yang, 1997).

Dieses nutzt einen LRT („likelihood ratio test“), um über verschiedene im Programm enthaltene Modelle zu bestimmen, ob im Gen enthaltenen Codons unter positiver Selektion stehen. Dabei wird angenommen, dass ein Verhältnis (ω) von nichtsynonymen zu synonymen Nukleotidaustauschen, das größer 1 ist ($\omega > 1$), positive Selektion andeutet (Yang et al., 2000). Für die Analyse der Daten wurden die von Yang erzeugten Modelle M0, M3, M7 und M8 verwendet (Yang et al., 2000).

Das Modell M0 (one ratio Model) geht davon aus, dass alle Codonpositionen innerhalb des Gens den gleichen ω -Wert haben, und lässt keine positive Selektion zu. Modell M3 (discrete Model) benutzt eine uneingeschränkte, diskrete Verteilung in unterschiedliche Klassen, um heterogene ω -Verhältnisse auf den unterschiedlichen Codonpositionen zu modellieren. Dabei lässt es Werte von $\omega > 1$ zu und kann dadurch zur Identifikation von positiver Selektion verwendet werden. M7 nutzt zur Modellierung eine beta-Verteilung im Intervall ($\omega = 0-1$) und lässt daher keine positive Selektion zu. Modell M8 ist eine Erweiterung des Modells M7 und fügt eine zusätzliche Gruppe von Positionen mit $\omega > 1$ zu dem beta-Modell hinzu und ist somit zur Identifikation positiver Selektion geeignet (Yang et al., 2000).

Da sowohl Modell 3 eine Erweiterung von Modell M0 als auch M8 eine Erweiterung von Modell 7 ist, können die Modelle M0 und M3 bzw. M7 und M8 über einen LRT miteinander verglichen werden. Sagen die Modelle M3 und M8 positive Selektion voraus und zeigt der LRT an, dass die Modelle M3 und M8 besser zu den Daten passen als M0 und M7, kann dies als Test auf positive Selektion genutzt werden.

Dazu wird die zweifache Differenz des Logarithmus des „likelihoods“ der verglichenen Modelle berechnet (z.B. LRT für Modell M3 ist $2\Delta l = 2 \times (lM3 - lM0)$). Um zu

überprüfen, welches der Modelle besser zu den Daten passt, kann der erhaltene Wert mit einer χ^2 -Verteilung verglichen werden. Dabei wird der Freiheitsgrad der χ^2 -Verteilung aus der Differenz der in den Modellen verwendeten Parameter berechnet (für M3-M0 ist der Freiheitsgrad 4, für M8-M7 ist der Grad der Freiheit 2). Ist $2\Delta l$ signifikant größer als der Wert der χ^2 -Verteilung so zeigt dies an, dass die Modelle M3 bzw. M8 besser zu den Daten passen als M0 bzw. M7.

Zeigen M3 und M8 positive Selektion an, kann anschließend über eine „empirical Bayes“ Analyse die Codonposition bestimmt werden, die mit der höchsten Wahrscheinlichkeit zur Klasse der Positionen mit $\omega > 1$ gehört (Yang et al., 2000). Codonpositionen, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit aus einer Klasse mit $\omega > 1$ kommen, stehen vermutlich unter positiver Selektion.

7 Literatur

7.1 Publikationen

Akira S., Uematsu S., and Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* (2006), 124(4):783-801.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Keith R., Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science (2002) Fourth Edition

Alder M.N., Rogozin I.B., Iyer L.M., Glazko G.V., Cooper M.D., Pancer Z. Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate. *Science* (2005), 310(5756):1970-1973.

Al-Sharif W.Z., Sunyer J.O., Lambris J.D., Smith L.C. Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3. *J Immunol.* (1998), 160(6):2983-2997.

Anderson D.J., Abbot A.F. Jack R.M. The role of complement component C3b and its receptors in sperm-oocyte interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993), 90:10051-10055.

Anderson M.A., McFadden G., Bernatzky R., Atkinson A., Orpin T., Dedman H., Tregear G., Fernley R. and Clarke A. E. Sequence Variability of Three Alleles of the Self-Incompatibility Gene of *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell* (1989), 1:483-491.

Anisimova M., Nielsen R., Yang Z. Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites. *Genetics* (2003), 164(3):1229-1236.

Arai M., Suzuki-Koike M., Ohtake S., Ohba H., Tanaka K., Chiba J. Common cell-surface antigens functioning in self-recognition reactions by both somatic cells and gametes in the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. *Microbiol Immunol.* (2001), 45(12):857-866.

Artavanis-Tsakonas S., Matsuno K., Fortini M.E. Notch signaling. *Science* (1995), 268(5208):225-232.

Augustin R. Molekulare Untersuchungen zur Musterbildung im einfachen Vielzeller *Hydra* (2003) PhD Thesis, University of Kiel, http://e-diss.uni-kiel.de/diss_1027.

Augustin R., Franke A., Khalturin K., Kiko R., Siebert S., Hemmrich G. and Bosch T.C.G. Dickkopf related genes are components of the positional value gradient in *Hydra*. *Dev. Biol.* (2006), in press

Azumi K., De Santis R., De Tomaso A., Rigoutsos I., Yoshizaki F., Pinto M.R., et al. Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: 'waiting for Godot'. *Immunogenetics* (2003), 55(8):570-581.

Ballarin L., Cima F. and Sabbadin A. Morula cells and histocompatibility in the colonial ascidian *Botryllus*. *Zool. Sci.* (1995), 12:757-764.

- Ban S., Harada Y., Yokosawa H., Sawada H. Highly polymorphic vitelline-coat protein HaVC80 from the ascidian, *Halocynthia aurantium*: structural analysis and involvement in self/nonsel self recognition during fertilization. *Dev Biol.* (2005), 286(2):440-451.
- Bancroft F. W. Variation and fusion of colonies in compound ascidians. *Proc Calif Acad Sci* (1903), 3:137–186.
- Berrill N.J. *The Origin of Vertebrates*. Clarendon Press (1955), Oxford.
- Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunology* (2004), 40:845-859.
- Bosch T. C. G., Zill H., Augustin R., Hemmrich G., Kremling S., Röhlk C., Anton-Erxleben F., Leippe M., Stanisak M., Grötzinger J., Jung S., Podschun R., Bartels J., Harder J., Schröder J.-M. Uncovering Ancestral Innate Immunity: the Simple Metazoan Hydra Uses Epithelial Cells for Host Defense. *Nat. Immun.* (2006) eingereicht
- Burnet F.M. Self-recognition in colonial marine forms and flowering plants in relation to the evolution of immunity. *Nature* (1971), 232:230–235.
- Buss L.W. *The Evolution of Individuality*. Princeton University Press, (1987) New Jersey
- Cannon J.P., Haire R.N., Litman G.W. Identification of diversified genes that contain immunoglobulin-like variable regions in a protochordate. *Nat. Immunol.* (2002), 3:1200–1207.
- Chadwick-Furman N. und Rinkevich B. A complex allorecognition system in a reef-building coral: delayed responses, reversal and nontransitive hierarchies. *Coral Reefs* (1994), 13:57-63
- Chenoweth S. F., Hughes J. M., Keenan C. P., Lavery S. Concordance between dispersal and mitochondrial gene flow: isolation by distance in a tropical teleost, *Lates calcarifer* (Australian barramundi). *Heredity* (1998), 80(2):187-197.
- Cooper E.L., Kauschke E., Cossarizza A. Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *Bioessays* (2002), 24(4):319-333.
- Cooper M.D., Alder M.N. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* (2006), 124(4):815-822.
- Corbo J.C., Di Gregorio A., Levine M. The ascidian as a model organism in developmental and evolutionary biology. *Cell* (2001), 106 (5):535-538.
- Dehal P., Satou Y., Campbell R.K., Chapman J., Degnan B., De Tomaso A., et al. The draft genome of *Ciona intestinalis*: insights into chordate and vertebrate origins. *Science* (2002), 298(5601):2157–2167.
- Delsuc F., Brinkmann H., Chourrout D, Philippe H. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* (2006), 439(7079):965-968.

- De Santis R., Pinto M.R. Gamete self-discrimination in ascidians: a role for the follicle cells. *Mol Reprod Dev* (1991), 29(1):47–50.
- De Tomaso A.W., Saito Y., Ishizuka K.J., Palmeri K.J., Weissman I.L. Mapping the genome of a model protochordate. I. A low resolution genetic map encompassing the fusion/histocompatibility (Fu/HC) locus of *Botryllus schlosseri*. *Genetics* (1998), 149(1):277-287.
- De Tomaso A.W. und Weissman I.L. Initial characterization of a protochordate histocompatibility Locus. *Immunogenetics* (2003), 55:480-490.
- De Tomaso A.W. und Weissman I.L. Evolution of a protochordate allorecognition locus. *Science* (2004), 303(5660):977.
- De Tomaso A.W., Nyholm S.V., Palmeri K.J., Ishizuka K.J., Ludington W.B., Mitchell K., Weissman I.L. Isolation and characterization of a protochordate histocompatibility locus. *Nature* (2005), 438(7067):454-459.
- Diatchenko L., Lau Y.F.C., Campbell A.P., Chenchik A., Moquadarn F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D. Siebert P.D. Suppression subtractive hybridisation: A method for generating differentially regulated or tissue – specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1996), 93:6025-6030.
- Di Gregorio A., Spagnuolo A., Ristoratore F., Pischetola M., Aniello F., Branno M., Cariello L., Di Lauro R. Cloning of ascidian homeobox genes provides evidence for a primordial chordate cluster. *Gene* (1995), 156(2):253-257.
- Dodds A.W. Which came first, the lectin/classical pathway or the alternative pathway of complement? *Immunobiology* (2002), 205(4-5):340-354.
- Dutton R.W., McCarthy M.M., Mishell R.I., Raidt D.J. Cell components in the immune response. IV. Relationships and possible interactions. *Cell Immunol.* (1970), 1:196–206.
- Eddy S.P. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* (1998),14:755-763.
- Ensslin M. A., Shur B. D. Identification of mouse sperm SED1, a bimotif EGF repeat and discoidin-domain protein involved in sperm-egg binding. *Cell.* (2003), 114(4):405-417
- Fields S. and Song, O.. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* (1989), 340:245-247.
- Fields S. und Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.* (1994), 10:286-292.
- Forey P. und Janvier P. Agnathans and the origin of jawed vertebrates. *Nature* (1993), 361:129–134.
- Frank U., Leitz T, Muller W.A. The hydroid *Hydractinia*: a versatile, informative cnidarian representative. *Bioessays.* (2001); 23(10):963-971.

- Frobius A.C., Genikhovich G., Kurn U., Anton-Erxleben F., Bosch T.C. Expression of developmental genes during early embryogenesis of Hydra. *Dev Genes Evol.* (2003), 213(9):445-455.
- Fuke M.T. "Contact reactions" between xenogenic or allogeneic coelomic cells of solitary ascidians. *Biol.Bull.* (1980), 158:304-315.
- Fuke M.T. und Nurnakunai, T. Pattern of cellular alloreactivity Of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*, in relation to genetic control. *Biol. Bull.* (1985), 169:631-637.
- Fuke M. Self and nonself recognition in the solitary ascidian, *halocynthia roretzi*. P. 107-117. (1990). In Marchalonis, J., and Reinisch, C. (eds), *Defense molecules*, Alan R. Liss, New York
- Fuke M.A. und Numakunai T.A. Establishment of self-sterility of eggs in the ovary of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Development Genes and Evolution* (1996), 205(7-8):391-400.
- Galindo B.E., Vacquier V.D., Swanson W.J. Positive selection in the egg receptor for abalone sperm lysine. *PNAS* (2003) 100(8):4639-4643.
- Genikhovich G., Kurn U., Hemmrich G., Bosch T.C. Discovery of genes expressed in Hydra embryogenesis. *Dev Biol.* (2006), 289(2):466-481.
- Hoffmann M., Dutton R.W. Immune response restoration with macrophage culture supernatants. *Science* (1971), 172 1047-1048.
- Hughes A.L. und Nei M. Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* (1988), 335(6186):167-170.
- Hughes R.N., Manriquez P.H., Morley S., Craig S.F., Bishop J.D. Kin or self-recognition? Colonial fusibility of the bryozoan *Celleporella hyalina*. *Evol Dev.* (2004), 6(6):431-437.
- Humphreys T. Rapid allogeneic recognition in the marine sponge *Microciona prolifera*. Implications for evolution of immune recognition. *Ann N Y Acad Sci.* (1994), 712:342-345.
- Iizuka K., Naidenko O.V., Plougastel B.F., Fremont D.H., Yokoyama W.M. Genetically linked C-type lectin-related ligands for the NKRP1 family of natural killer cell receptors. *Nat. Immunol.* (2003), 4(8):801-807.
- Ioerger T.R., Clark A.G., Kao T.H. Polymorphism at the self-incompatibility locus predates speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1990), 87:9732-9735.
- Iwanaga S, Lee BL. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *J Biochem Mol Biol.* (2005), 38(2):128-150.
- Janeway C.A., Travers P., Wallport M., Shlomchik M. *Immunobiology*, 5 ed. (2002), Churchill Livingstone, 752 p

- Jovine L., Darie C.C., Litscher E.S., Wassarman P.M. Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem.* (2005), 74:83-114.
- Kapitonov V.V., und Jurka J. RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences were derived from Transib transposons. *PLoS Biol.* (2005) 3(6):e181.
- Kawamura K., Fujita H., Nakauchi M. Cytological characterization of self incompatibility in gametes of the ascidian, *Ciona intestinalis*. *Dev Growth Differ.* (1987), 29:627-642.
- Khalturin K. Molecular analysis of self/nonself recognition in the urochordate *Botryllus schlosseri*. (2002) PhD Thesis, University of Kiel, http://e-diss.uni-kiel.de/diss_688/.
- Khalturin K, Becker M, Rinkevich B, Bosch TCG. Urochordates and the origin of natural killer cells: identification of a CD94/NKR-P1 related receptor in blood cells of *Botryllus*. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003), 100:622–627.
- Khalthurin K, Pancer Z, Cooper M.D, Bosch T.C.G. Recognition strategies in the innate immune system of ancestral chordates. *Mol. Immun.* (2004), 41:1077-1087.
- Khalturin K., Kürn U., Pinnow N., Bosch T.C. Towards a molecular code for individuality in the absence of MHC: screening for individually variable genes in the urochordate *Ciona intestinalis*. *Dev Comp Immunol.* (2005), 29(9):759-773.
- Kimbrell D.A., Beutler B. The evolution and genetics of innate immunity. *Nat. Rev. Genet.* (2001), 2(4):256-267.
- Kitamura M. et al. Possible association of infertility with sperm-specific abnormality of CD46. *J. Reprod. Immunol.* (1997), 33:83–88.
- Klein, J. In an immunological twilight zone. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* (1998), 95:11504-11505.
- Klein J. The grapes of incompatibility. *Dev Cell.* (2006), 10(1):2-4.
- Klein J, O'hUigin C. Composite origin of major histocompatibility complex genes. *Curr Opin Genet Dev.* (1993), 3(6):923-930.
- Kresge N., Vacquier V.D., Stout C.D. Abalone lysin: the dissolving and evolving sperm protein. *Bioessays* (2001), 23(1):95-103.
- Kumar S., Tamura K., and Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* (2004), 5:150-163.
- Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* (1996), 86(6):973-983.
- Liszewski M.K., Farries T.C., Lublin D.M., Rooney I.A., Atkinson J.P. Control of the complement system. *Adv Immunol.* (1996), 61:201-283.

- Marino R., Pinto M.R., Cotelli F., Lamia C.L., De Santis R. The hsp70 protein is involved in the acquisition of gamete self-sterility in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development* (1998), 125(5):899-907.
- Marino R., De Santis R., Giuliano P., Pinto M.R. Follicle cell proteasome activity and acid extract from the egg vitelline coat prompt the onset of self-sterility in *Ciona intestinalis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1999), 96(17):9633-9636.
- Marino R., Kimura Y., De Santis R., Lambris J.D., Pinto, M.R. Complement in urochordates: cloning and characterization of two C3-like genes in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Immunogenetics* (2002), 53(12):1055–1064.
- Matsuyama T., Honda Y., Doiguchi M., Iida H. Molecular cloning of a new member of TEKTIN family, Tektin4, located to the flagella of rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* (2005), 72(1):120-128.
- McQueen K. und Parham P. Variable receptors controlling activation and inhibition of NK cells. *Curr Opin Immunol.* (2002), 14(5):615.
- Meinertzhagen I.A. und Okamura Y. The larval ascidian nervous system: the chordate brain from its small beginnings. *Trends Neurosci.* (2001), 24(7):401-410.
- Morgan T.H. Removal of the Block to Self-Fertilization in the Ascidian *Ciona*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1923), 9(5):170-171.
- Müller H.J. PCR- Polymerase-Kettenreaktion.(2001).
- Murabe N, Hoshi M. Re-examination of sibling cross-sterility in the ascidian *Ciona intestinalis*: genetic background of the self-sterility. *Zoolog Sci* (2002), 19(5):527–538.
- Nasrallah J.B. Recognition and rejection of self in plant self-incompatibility: Comparisons to animal histocompatibility. *Trends in Immunology* (2005), 26(8):412-418.
- Nomura M. et al. Genomic analysis of idiopathic infertile patients with sperm-specific depletion of CD46. *Exp. Clin. Immunogenet.* (2001), 18:42–50.
- Nonaka M. und Azumi K. Opsonic complement system of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi*. *Dev. Comp. Immunol.* (1999), 23(4-5):421-427.
- Nonaka M., Miyazawa S. Evolution of the initiating enzymes of the complement system. *Genome Biol.* (2002), 3(1):Reviews1001.
- Nymann-Andersen J., Wang H., Chen L., Kittler J.T., Moss S.J., Olsen R.W. Subunit specificity and interaction domain between GABA(A) receptor-associated protein (GABARAP) and GABA(A) receptors. *J. Neurochem.* (2002), 80(5):815-823.
- Ohno S. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970–1999. *Semin Cell Dev. Biol.* (1999), 10:517–522.
- Oka H. und Watanabe H. Colony specificity in compound ascidians as tested by fusion experiments (a preliminary report). *Proc. Jpn. Acad.* (1957), 33:657-659.

- Oka H und Watanabe H. On the colony specificity: with particular reference to fusibility of compound ascidians. *Kagaku* (1967), 37:307-313.
- Oka H. Colony specificity in compound ascidians: The genetic control of fusibility. In: H. Yukawa (ed). Profiles of Japan and Japanese scientists. Kodansha, Tokyo (1970), pp 196206
- Pancer Z., Gershon H. & Rinkevich B. Coexistence and Possible Parasitism of Somatic and Germ Cell Lines in Chimeras of the Colonial Urochordate *Botryllus schlosseri* Biol. Bull. (1995), 189:106-112.
- Pancer Z., Amemiya C.T., Ehrhardt G.R., Ceitlin J., Gartland G.L., Cooper M.D. Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* (2004), 430(6996):174-80.
- Parrinello N. Cytotoxic activity of tunicate hemocytes. *Prog Mol Subcell Biol.* (1996), 15:190-217.
- Perdices A., Carmona J.A. , Fernández-Delgado C. Doadrio I. Nuclear and mitochondrial data reveal high genetic divergence among Atlantic and Mediterranean populations of the Iberian killifish *Aphanius iberus* (Teleostei: Cyprinodontidae). *Heredity* (2001), 87(3):314-324.
- Pertea G., Huang X., Liang F., Antonescu V., Sultana R., Karamycheva S., Lee Y., White J., Cheung F., Parvizi B., Tsai J. Quackenbush J. TIGR Gene Indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets. *Bioinformatics* (2003), 19:651-652.
- Pinto M.R., De Santis R., Marino R., Usui N. Specific induction of self-discrimination by follicle cells in *Ciona intestinalis* oocytes. *Develop. Growth Differ.* (1995), 37:287-291.
- Raftos D.A. und Briscoe D.A. Genetic basis of allograft rejection in *Styela plicata* (Urochordata, Ascidiacea). *J Hered* (1990), 81:160–166.
- Raftos D.A., Tait N.N., Briscoe D.A. Allograft rejection and alloimmune memory in the solitary urochordate, *Styela plicata*. *Dev Comp Immunol* (1987);11:343–51.
- Raftos D.A. The morphology of allograft rejection in *Styela plicata* (Urochordata: Ascideacea). *Cell Tissue Res.* (1990), 261:389–396.
- Ravetch J.V. und Lanier L.L. Immune inhibitory receptors. *Science* (2000), 290:84–89.
- Reddy A.L., Bryan B, et al. Integumentary allograft versus autograft reactions in *Ciona intestinalis*: a protochordate species of solitary tunicate. *Immunogenetics* (1975),1:584–590.
- Riley-Vargas R.C. und Atkinson J.P. Expression of membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa: just a complement inhibitor? *MAI* (2003) 3:75–78.

- Riley-Vargas R.C., Gill D.B, Kemper C., Liszewski M.K., Atkinson J.P. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol.* (2004), 25(9):496-503.
- Rinkevich B., Tertakove, S., Gershon H. The contribution of morula cells to allogeneic responses in the colonial urochordate, *Botryllus schlosseri*. *Mar. Biol.* (1998), 131:227-236.
- Saito Y, Hirose E, Watanabe H. Allorecognition in compound ascidians. *Int. J. Dev. Biol.* (1994), 38(2):237–247.
- Sakai N., Sawada H., Yokosawa H. Extracellular ubiquitin system implicated in fertilization of the ascidian, *Halocynthia roretzi*: isolation and characterization. *Dev Biol.* (2003), 264(1):299-307.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis,. *Molecular Cloning*. 2 (1989)
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1977), 74:5463-5467.
- Satoh N. *Developmental Biology of Ascidians* (Cambridge: Cambridge University Press) (1994).
- Sawada H., Tanaka E., Ban S., Yamasaki C., Fujino J., Ooura K., et al. Self/nonsel recognition in ascidian fertilization: Vitelline coat protein HrVC70 is a candidate allorecognition molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004), 101:15615-15620.
- Sawada H. Ascidian sperm lysin system. *Zoolog Sci.* (2002), 19(2):139-151.
- Sawada H., Sakai N., Abe Y., Tanaka E., Takahashi Y., Fujino J., Kodama E., Takizawa S., Yokosawa H. Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*(2002), 99(3):1223-1228.
- Schmucker D., Clemens J., Shu H., Worby C., Xiao J., Muda M., Dixon J., Zipursky S. *Drosophila Dscam* Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell* (2000), 101(6):671-684.
- Scofield V.L., Schlumpberger J.M., West L.A., Weissman I.L. Protochordate allorecognition is controlled by a MHC-like gene system. *Nature* (1982), 295:488-502.
- Singson A, Mercer KB, L'Hernault SW. The *C. elegans* spe-9 gene encodes a sperm transmembrane protein that contains EGF-like repeats and is required for fertilization. *Cell.* (1998); 93(1):71-79
- Smith L.C. The complement system in sea urchins. *Adv. Exp. Med. Biol.* (1999), 484:363-372.
- Smith L.C, Azumi K., Nonaka M. Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways. *Immunopharmacology.* (1999), 42(1-3):107-120.

- Simmen M.W., Leitgeb S., Clark V.H., Jones S.J.M., Bird A. Gene number in an invertebrate chordate, *Ciona intestinalis*. Proc Natl Acad Sci U S A. (1998), 95(8):4437-4440.
- Steinle A., Li P., Morris D.L., Groh V., Lanier L.L., Strong R.K., Spies T. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. Immunogenetics (2001), 53(4):279-287.
- Stoner D.S. und Weissman I.L. Somatic and germ cell parasitism in a colonial ascidian: possible role for a highly polymorphic allorecognition system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1996), 93(26):15254-15259.
- Suzuki Y., Nei M. Simulation study of the reliability and robustness of the statistical methods for detecting positive selection at single amino acid sites. Mol Biol Evol. (2002), 19(11):1865-1869.
- Suzuki M.M., Satoh N., Nonaka M. C6-like and C3-like molecules from the cephalochordate, amphioxus, suggest a cytolytic complement system in invertebrates. J. Mol. Evol. (2002), 54(5):671-679.
- Swanson W.J., Vacquier V.D. Concerted evolution in an egg receptor for a rapidly evolving abalone sperm protein. Science (1998), 281:710-712.
- Swanson W.J., Aquadro C.F. and Vacquier V.D. Polymorphism in Abalone Fertilization Proteins Is Consistent with the Neutral Evolution of the Egg's Receptor for Lysin (VERL) and Positive Darwinian Selection of Sperm Lysin. Molecular Biology and Evolution (2001), 18:376-383.
- Takahashi H., Azumi K., Yokosawa H. A novel membrane glycoprotein involved in ascidian hemocyte aggregation and phagocytosis. Eur. J. Biochem. (1995), 233:778-783.
- Taneda Y., Saito Y. and Watanabe H. Self or non-self discrimination in ascidians. Zool. Sci. (1985), 2: 433-442.
- Taneda Y. und Watanabe H. Studies on colony specificity in the compound ascidian *Botryllus primigenus* II. *In vivo* bioassay for analysing the mechanism of nonfusion reaction. Dev. Comp. Immun. (1982), 6:243-252.
- Udby L., Lundwall A., Johnsen A.H., Fernlund P., Valtonen-Andre C., Blom A.M., Lilja H., Borregaard N., Kjeldsen L., Bjartell A. beta-Microseminoprotein binds CRISP-3 in human seminal plasma. Biochem Biophys Res Commun. (2005), 333(2):555-561.
- Wassarman P.M. Contribution of mouse egg zona pellucida glycoproteins to gamete recognition during fertilization. Journal of Cellular Physiology (2005), 204(2):388.
- Watson F.L., Puttmann-Holgado R., Thomas F., Lamar D.L., Hughes M., Kondo M., Rebel V.I., Schmucker D. Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. Science (2005), 309(5742):1874-1878.

Weissman I.L., Saito Y., Rinkevich B. Allorecognition histocompatibility in a protochordate species: Is the relationship to MHC semantic or structural? *Immun. Rev.* (1990), 113:227-241.

Wong W.S., Yang Z., Goldman N., Nielsen R. Accuracy and power of statistical methods for detecting adaptive evolution in protein coding sequences and for identifying positively selected sites. *Genetics.* (2004), 168(2):1041-1051.

Yang, Z. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood *Computer Applications in BioSciences* (1997), 13:555-556.

Yang Z., Nielsen R., Goldman N., Pedersen A.M.K. Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* (2000), 155:431-449.

8.2 Sequenzen der potentiellen Kandidaten des „Yeast Two-Hybrid“-System

pL1

TACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCCACCCAAGCAGTGGTA
TCAACGCAgAGTGGCCATTATGGCCGGGCATCAGCGAGAAGCTCTTTCGTTACATTTCGCCACCCTCCCAGC
CGCATTCGTGACCCAGCAGTAGATTCTGTCTGCACAGTATCCGGATGGGGTAACACCCAGATTGTTGGA
TCCAAC TACCCGACAAACCATACAGTGTAGATGTACCAGTTATCTCTAACGSTGACTGCAACGTGCGAT
ACGGTGGAGACATCTATGATGGTATGATGTGCCCTTGGTTTGGTGGAACTGGAGGAAAAGACTCTTGCCA
GGGTGATTCCGGCGGCCAGTCCCTTGGCAACGGTGTGTCCACGGTGTGATCATGGGGTATTGGATGT
GCCTACCCAGACTACCCAGGTGTTTACACAGAGTATCTACTACATCAGCTTCATCAACTCCTACGTTTA
AATGTAACCAAACATTTATCGCGGATTTGCAATGAAATAAACGCTGATGA

pL2

GGGTCTCCGAACCAGAATAAAAACAATTCGGCCATATACTTCTGGTCCTAAATGTTCTATGTGTTCTGCCA
ACTACAATAGCCGCGAAAATGGTCTCTGTGTTATTCCAACACCCCAAATTATGATGAATTCTACAAGTAC
CCCTAATTCACCCAAATGGTGTGACCCACATAAGTACAGACGCCCGATTTCCCAACTTTGATGACA
CGACCAAGAAATCTTCGATGCCTCTCACCAAAACAAGTACACCGTCTTCTACCCTAGTTCCACCACAA
TAGCCGCTATACCATCACTGTATTACCCCTTGGCTTTAGCACCGCTTATGCTTCTACCCATTATAAATAC
TTGCATTTAAATCGAAAAGAGACAAGACACCTTTAGCGCATAATATCCAAGTATCCTGATCGG

pL2 vollständige Sequenz aus den ESTs

TTGGTTACAAAAAACAGCGTTTTAACTGTACGGACATATCTGTTATCAGCTAAGAAAATATGTATTTT
AGTGGATTGGCTTTAGTACTTCTACTGTCCGCTGAGGCGTATTCTATAACTCAAGTGTATTTCGCACTGG
ACAAATTACGGATTGTTAGTTCGTTAAACAGAGCTAGAGAAGGGCCAATAAATGCTAGTAATATGCACAA
ACTGGCATGGGACGACGCTCTGGAGAAACGGGCCATTAAATTGGTTGATAATTGCTTTTTATTTCGCACTCT
GATATAAATGGTCTTGGAAAGCGCTTTTCTTACCAATTTCCCTAACAACGCCGGAGGGGGATCTGTAGTGG
CAAAAATGCTGATACAAAGTTTACCATGAATGAGTACAAGTACGTGTACGAAAATAATACGTGTTCTGG
TAATGTTTCTAAATGCAATACCTACAAGCAATTGTTAAAAGGAGAGTCTACAAAAGTTGGGTGCGGAATT
GCTCTGTGTAAGTCTAATTCAAAACGAAGCGCTCTATGTCTCTTGTCTCCGAACCAGAATAAAAACAATTC
GACCATTTACTTCTGGTCCTAAATGCTCTATGTGTACCGGCAACTATTCTGGCTGCGAAAATCGTTTTCTG
TGTTATTCACACCCCAAATTATGATGAATTCTACAAGTACCTCTAACTCTACAACACACAACGTATG
AGGACGACCAATGACCCCTAATTCACCCCAAATGATGATGACCCACATAAGTACCGAACTCGACAA
CCCCAACCATGATCACACGACCAAGAAATTTCTGATGGCTTACACCCAAACAAGTGTACCGTATTCAAC
CACTAGTTCTGCGCTATACCATCGCTGATTTTGGCGTTGCTTTAGCACCTCTTATGCTTCTACCAGTT
ATAAATGCTTGTCTTTTAAACCGGAAATGTACATTTTTCTGCTTTAACATATAGGCTAGTAGGGTGGGAAA
AGATAGGACATTTTTAACACGTAATATCCAAATATCCGATAGTTTTAAACAGTCAACAACGATCTATGGG
GGCCGTGCTGGTACGGTTTTATAATTCTTTAAATGTTCTTTAAAGAATTATAATTTAAAGAATTATTTAC
TGCCGAATGGGACGGGAAAATAGAATAAAAAGGTGTCCCATCTCCCCACCCTACTATATGACTTATTCA
AACTGTATATATGTCAATTTTTGCGTTTTATTTTATTTAATCGCTACTATATATGTGATAAATAAATAAG
TGTCTCAACACTAAGTTAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA

pL3

GGGCAGCCAGGAACAAGGTATCACATCAACTGGCTGCTTGGATTGGTCCTTTGTCTTCTCAGCCAGAAT
ACAAATCTAAGATAACTCCGAAAAGTGTGCCTGATGTAAAACCAAGGGTGAATTGACTGACCAGGGTTT
TCTACTTCAATGGAAGTAAATCGAGATTAGTCGATGGATTTAAATCGTGGTTGAACCTCAAGATGGA
AGTGCAGGGTTTGAACAACCTGTTGACAGATTTACTAAGAGGTATGAACTTGAACCTCTTAAAGCAATA
TTGCATATATAGTGAAAGTATATCCTGTGAGTGGACATATTATAGGAGAACCCTCCATAGTTCATATAACC
GGCTTCTACAACCTCGAATGTGGTGTAAACCATCTACAGTGGAGATTACAAGTTACGTGCTGGGAACG
GATTCATCGATATTTCTTGGAAATAATCCGTGGCCTGATGTGGTTGAATATAGTTTGAATACAAGCAGA
TAGATGAGAGTGTGAAGCTTATCGATCAGTTGTTCCGCAACCACAGATCAGTGACCACCATGCTACAAT
CAGTCATCTTCAACCCGGGAGAATCATAACGATCAAACTTGGGCAGTACGAAGAGGATTCCCCAAAAG
TTGATGGATTCTTGAACACCTTTGGGTTTCTTAAATGGTTGTTTCACTTCCAATTCCAACCAACCATC
CCAATTTTCCAATTGC

pL4

GGGGAGAAAGCAATGAAAGCAAGAATTGGTGATTTGGACAAGAAGAAATATCTAGTTCCTTCAGATTTAA
 CTGTTGGTCAATTTTACTTTTTGATTTCGCAAACGAATCCATCTTCGCCAGAGGAAGCTTTGTTCTTCTT
 TGTAACAATGTTATCCCACCAACCAGCACAACCTATGGGACAACCTGTACCAGGAACATCATGAGGAAGAT
 TTCTTCTTGTACATCGCATACAGTGATGAAAGTGTCTATGGCGCGTGATTTGTTATTAACACTTGTGAT
 GGTGTTGTTCATCAACTGGATTAATGATGATGTGGACAATTATAAACTGCCGTGTCCAATTTATTTGTAC
 TGTGTAAGTGTTTACTCAATGCCGCATATGCGAGAGTCTTTTTCTTGTGTTGTGTATATATTATGTACT
 GATCATGTATGTCGTATTG

pL5

ATGGAGTACCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCCATGGAGGCAGTGAATTCCACCCAAGCAGT
 GGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCGGGTAACGATCGAACGAAAGTTTACAATTTGTTTCAATCAGA
 CGAATACTTGTCAAGCTGGAGACCATGAATTATACTTGTCCgATCCaTTCAACGTGTATAATAACGG
 GCCGGGTATGTTTACGTGCAGCTGTGACAAGGGGTGGGTGGGTATAAGTGTCTACGTCTCACCCACGGT
 TACCCAACTTTACCCATCGTACTCGGGAGCGTCCGGTTCGTCATTGTGCTCAGTGCCTCATGTGGCGGA
 GTCAACGAAGATATTGCAATAACGTTTCGTTATTTCCATGATTTGTTAATTTATTTCGATTACTTCTGACA
 GTGTTGCCAAGTTATTAATATTTTGTGTAATAAAGAAATATGGAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 Ac

pL6

GGGCGCCAAGTCTGTTATGAAGGATTCGCCAACTTTGATCAAGGACCCTTGTTTGGGCTTTCAGTCGTA
 ACTTGCGATCCAGGCTCAGTGTGTGGTACTCTGTATGGTACTGCTAATATTGGTGGACATAATATCAGTG
 GCATACTGACGACTTGCCGACCAGAAAACCAATGCTCGCAATGCCCGGACGCAGCAGAGACTTACATGCT
 CGGTATCAAGTTTAAACGCCACGTTCCAGGCTTGCAATTTCTTAAATGTTGTGACGAATATCTTTGCAAT
 CTTCCTAAACCAAGTTGCCCGTCCAACCAAGTGTATTCTACGTGTGCTGGTTGTGACCGTACATGCGCTG
 ACGTTGGTTCGTAACATTCATGTCTTCTGTGTGTGCGACAAAAATGCACTTGTCCAAGTGGCATGTACCT
 CGATGGTAAACTTGCCTGACAGCGGATAACTGTCCAGGTTTACCCTATAAACTGTCCACCATTGGAAA
 GGGCAAACGTCAAAGAGATACGATCTTTGGTGGATATGCCGATTACATCAAATGGAGATCCACTCACGT
 AAAAGTTGGGCTGCCAAGCTTCCAATAACTTGGAGGCGAAAAACACGGTTAGCAGGATCCGGTCCCGATGC
 CAACTTGGAACTTGAAATGGCAAGATGGTCCAGGTTTACCCTGAACTGGATGGGCTCCCCCAAATGGG
 TTCCCCAACCCATATACTCGGGTGTCCGTTNCGGGAAAGAAATTTNNTTCCCGGGAACCGACAGGGTACA
 ACTTGTGGG

pL7

GGGACATTTGCGTATTGTTGTGGAGTCATGAATGAAACACAGAAAGACAACCTTAAACCCGCTGGTTTCATC
 AGCGAATAACGCCCGTACAAGGATAAAGCAACCTGCAGAACTTGATAACGACGTTCCGGATCCGTTTGA
 TCGCCGAGAAATATTCGATTTAATCCGAGATATTAATGATCCTGAACACCCGTTGACTTTAGAGGACTTA
 AGAGTGGTTAGCGAAAACGACATTGAAGTTGATGATGAAAAAGTTTCATAAAGGTTTTCGTTACACCTA
 CTATTCCTCACTGCAGCCATGGCCACTCTAATCGGTCTTGCTATCCGGGTTTCGATTGTTGAGATCTCTTC
 CACCTCGGTTCAAGGTAGAAGTTGAAATTTCTCCAGGTTCCACCAATCAGAGAAGGCAGTGAACAAACA
 GCTTGGGTGATAAAGGGAAAAGGGTTGCTGCTGCTCTGGGAAAACAATCACTTTGCTTAATGTTGTGAAA
 TCAGTGTCTGACTATCAAAGGAACTC

pL8

AAGACAGCTAAACACAACAAGTCGCTAGAGGCGCTACACTCTCCCTGTTGTTACGTCACAAAGGCCATTA
 TACGTCAATATCTACCCGAAGAATACGCAGAACGCAATTACAAAACAAACAAGAAATCGAAGAATTAAC
 AAAACACAACCAATTTTCGTATCCACGATTGCATATCTTCCGGTACCATGTCCGTTACATATCTTCGAA
 CCCCCTTACATGCTGATGTTACGTGCTGTTTGGACTACAACGACCGGGAATTCGGCATGTGCATGAGGT
 CTCCAGATAAACCGCATCATGACAACGGCACAACCTTACGAGTAAAAACGTCAAATTTTCCCTGACGG
 TCGTTCAAGTTGACAGCGTCCGCAACCGACGTTTTCGTGACAAAACACAGCAAAAACGCGACGGTACAA
 CGTCGCAACGCTAAAGTTTACCGAAGACAAAAAATCCGGGGACGAAGATATAGAAAAAATTTGACACGA
 AATTGTTGATAAGGGTATACGACGAGGCCAAGGGAATGGTTCTTTCAGGTAAACACCCCCGTCAAACG
 GAAATAACGGTTCCATTTTGGGTGAACCTACCCAGCAAAGCAATACATGGGTTCAATAACCGAAAAAGG
 GGCCGAA

pL9

GGGGAAGTGGTTTATGACAACCAACGAATTACCACGATATCTCCCACAAAGTAAATGTTTGTGTAGCGGC
TGCATTGCATCTAGTAATGGTAGAGAACTCTTGTGGGAAATCCATGCCTTTAGTTGCGCAAATCAAAG
TTATGAGAAGAAATAAAACAAACAGTTATTCTGTTGTACAGAAGATGTAACAATAGGCTGCACATGCAT
GCTCAATGTATAAACTGGTACTGTTCATTTTTGTATGAGTTTTATTTTAGTAAGAATATTTTGTAAATAT
CTTGAATACTTATTAATCAAAA

pL10

GGGTCTCCGAACCAGAATAAAACAATTCCGGCCAATATTATCTTCTTGGGTCTCCTATAAAATGTGTCCTA
TGTGTTCTGCCAACTACAATAGCCGCGAAAATGGTCTCTGTGTTATTCCAACACCCCAAATTATGATGAA
TTCTACAAGTACCCCTAATTCTACCCAAATGGTGTATGACCCACATAAGTACAGACGCCCGACTTCCCCA
ACTTTGATGACACGACCAAGAAATCTTCGATGCCTCTCACCCAAACAAGTACACCGTCTTCTACCACTA
GTTTCCACCCTAGCCGCTATACCATCACTGTATTACCCCTTGCTTTAGCACCGCTTATGCTTCTACCC
ATTATAAATACTTGCTTTTAAATCGAAAAAGACAAGACACCTTTACGCATAATATCCAAGGTATCCGTGA
TCGTGTTTTAAACAATTAACACAACGGTCTATGGGAGTTGTGACGATAACCATTTATAATCCTTGAGCAA
ATGTTACCTTGGGGGTTGTACCTTAACTTAAAAAATGGGGATCTGAAGCAAGGAAATTGCAACANACTT
GGTGTCCCNANTTTCCCCAAGACCGTAANCGTATTNGTAAGCCTTTATGCCAAGATTGGGCATACTAT
GGTCTAAATC

pL11

GGGGAAGTAATGGAAGGACTTATGGTTCAGGAACACAAGGACAGTCTTCCAGCCAACCCGGTTCAAATCA
CCAAACCCCACTGAATATTACGACACTGAGGGCGCCACATAACCCTCGACAACCACAGTATCCACGACAA
CCAAACAACGACGTGGACGACAAACAGACAGCTCCGGTTTCCACAAGTGACGATAACGGGCCATCCATCA
CTATCTCCACCCTACCCCTACCCATGCAGTCTATTAGTGGAGGTGTGGCATCGGTGCCACTCGCCCATAT
AAGCTACAACAGTAACAACCTCCGTGTCAATGAGAGCGAGACAAACCCTAATGTGGTTCATCGACACATTT
GGGGCCGGTGGGCACCAATGGCGTGCACGATGTGTCTGCTATTGACAGCGAAGAGACACGAGTAGCACCG
GGGACCACGATGTGTCAACTGTCACCGTCTGTCTTCGGACTCTCGAACATTATGGTTAGAAGAGCCGAAG
AAGGAATGGCATTGTGACATCACAAACCGCAAAGAGAAGGACAA

pL12

CTCATATGGCCATGGAGGCCAGTGAATTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCATTATGGGGG
GACTACAAGTTTTGAATGCGACGAAAAACGCCGTTTCAACGATGGAAGATATGTTATTACATGGTGGCTT
CTTTTCAATGTGTTATCATGTTGGCGACGAAATGGAAGGTGGACCAGCAAGCCAGTTCAGGGACGAAGCA
CTTGATGAACCTTGCAAGCCAGACTATATCGACCCGAACGCAACCATAACCAACTGTTGACTCGGTTATCG
AAAAACAAGAAATGCAACGCAATGGATTGGCTAAAGTTGTTTCGGGGACCGTTGGTTTTCTTTGGAGG
AGTGATCATGGCAGCCACTGCTCTTACCCTCATTCCAACCTGCCCTCATGTTAATAAACGTGGTGAACCT
CAAGCTAGAGGTGGTTTTATTCAACGGACTTACTCTCGGTATAATGTACCTTGTGTTCCGGTGTCTTGCTA
TCGGCTTCATTGTGTTCTACCAGATGAAAATCATCGGGTCTTACCATGAGCAAGATTTGAAAGAAACCA
AACCGTTATTTCATGGACTCTTGCCCTCGTTGGTGGATGCTGTGT

9 Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Thomas Bosch für die Betreuung meiner Arbeit, die sehr guten und motivierenden Arbeitsbedingungen, die finanzielle Unterstützung und seinen fachlichen Rat.

Bei Frau Krüss und den Mitarbeitern der Biologischen Anstalt Helgoland möchte ich mich für die gute und nette Zusammenarbeit bedanken.

Bei meinen Kollegen und Freunden möchte ich mich für ihre Unterstützung, ihre Freundschaft und die schöne gemeinsame Zeit bedanken.

Kiel, den 30.05.2006

10 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Kiel, den

Ulrich Kürn