

**Reinigung und Charakterisierung zweier
Matrix-Metalloproteinasen
(VMP3 und VMP4)
aus
*Volvox carteri f. nagariensis***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
– Biologie und vorklinische Medizin –
der
Universität Regensburg

vorgelegt von
Markus Heitzer
aus Regensburg
2002

Promotionsgesuch eingereicht am: 17.04.02

Die Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. A. Hallmann

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. S. Schneuwly (Vorsitzender)

PD Dr. A. Hallmann (1. Gutachter)

Prof. Dr. G. Hauska (2. Gutachter)

Prof. Dr. W. Tanner (3. Prüfer)

Meinen Eltern

„ Der Geringe wie der Hohe
kann manches Werk nur einmal vollbringen,
und an diesem Werk hängt sein Herz.“

(J.R.R. Tolkien)

Die Untersuchungen zu vorliegender Arbeit wurden unter Anleitung von PD Dr. A. Hallmann in der Zeit von April 1998 bis März 2002 am Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie der Universität Regensburg durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. M. Sumper möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die großzügige Überlassung aller benötigten Materialien und Gerätschaften sowie für seine hilfreichen Ratschläge zum Fortgang dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. A. Hallmann für die Themenstellung, die Einweisung in viele alltägliche und spezielle Arbeitsmethoden, sein Vertrauen auch eigenen Ideen nachgehen zu können und sein reges Interesse an dieser Arbeit. Seine Kooperativität und ständige Diskussionsbereitschaft waren bei der Erstellung dieser Arbeit überaus hilfreich.

Herrn Prof. R. Deutzmann und Herrn Edi Hochmut danke ich für die Durchführung und die Unterstützung bei der Auswertung der Peptidsequenzierungen.

Frau Corinna Friedrich und Herrn Norbert Eichner sei für die technische Assistenz und für viele hilfreiche Ratschläge im Labor gedankt.

Sehr herzlich möchte ich auch Herrn Oliver Hantschel, Herrn Stefan Barthe und Frau Lisa Borkner danken, die im Rahmen ihrer Forschungspraktika für diese Arbeit wichtige und verlässliche experimentelle Ergebnisse lieferten.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen ehemaligen bzw. jetzigen Laborkollegen – Peter A., Christian, Alke, Markus, Sabine, und Peter B. – für ihre moralische und technische Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung größerer und kleinerer Probleme im Labor und für das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Ferner danke ich allen nicht näher genannten Mitgliedern des Lehrstuhls Biochemie I für ihre Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie, allen meinen Freunden außerhalb des Instituts und v.a. Dir, Asli, für uneingeschränktes Verständnis, manch aufmunternde Worte und die Fähigkeit danken, mich auf dezente Art und Weise auf die wichtigen Dinge des Lebens hinzuweisen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs).....	1
1.2. Der Versuchsorganismus <i>Volvox carteri</i>	4
1.3. <i>Volvox</i> -Metalloproteinasen (VMPs).....	7

2. Ergebnisse

2.1. <i>Volvox</i> -Metalloproteinase 3 (<i>VMP3</i>).....	9
2.1.1. Heterologe Expression des N-Terminus in <i>E. coli</i>	9
2.1.2. Produktion und Spezifität der Antikörper.....	12
2.1.3. Lokalisierung von <i>VMP3</i>	14
2.1.4. Analyse der <i>VMP3</i> -Expression.....	15
2.1.5. Präparative Reinigung von <i>VMP3</i>	17
2.1.6. Biochemische Charakterisierung von gereinigten <i>VMP3</i>	20
2.1.6.1. Bestimmung der apparenten molekularen Masse von <i>VMP3</i>	20
2.1.6.2. Deglykosylierung von <i>VMP3</i> mit Fluorwasserstoff.....	22
2.1.6.3. Bestimmung der N-terminalen Sequenz von <i>VMP3</i>	23
2.1.7. Nachweis einer enzymatischen Aktivität von <i>VMP3</i> in einem In-Gel-Assay.....	24
2.1.8. Expression und Analyse von <i>VMP3</i> -Varianten mit verändertem Molekulargewicht in <i>Volvox carteri</i>	26
2.1.9. Analyse der enzymatischen Aktivität von <i>VMP3</i> γ	31
2.1.10. Expression und Analyse von <i>VMP3</i> γ -Punktmutanten in <i>Volvox carteri</i>	36
2.1.11. Suche nach einer physiologischen Funktion von <i>VMP3</i>	40
2.1.11.1. Test der <i>VMP3</i> -Transformanden auf Sensitivität gegenüber dem Sexualpheromon.....	40
2.1.11.2. Analyse der Pherophorin II-Kinetik von <i>VMP3</i> -Transformanden.....	40
2.1.11.3. Verdau von radioaktiv markierten Ellmann`s-Extrakten.....	41
2.2. <i>Volvox</i> -Metalloproteinase 4 (<i>VMP4</i>).....	42
2.2.1. Heterologe Expression des C-Terminus in <i>E. coli</i>	43
2.2.2. Produktion und Spezifität der Antikörper gegen den <i>VMP4</i> -C-Terminus.....	44
2.2.3. Lokalisierung von <i>VMP4</i>	45
2.2.4. Analyse der <i>VMP4</i> -Expression.....	46

2.2.5. Präparative Reinigung von VMP4.....	48
2.2.6. Biochemische Charakterisierung von gereinigten VMP4.....	51
2.2.6.1. Bestimmung der N-terminalen Sequenz von VMP4.....	51
2.2.6.2. Deglykosylierung von VMP4 mit Fluorwasserstoff.....	53
2.2.7. Heterologe Expression des N-Terminus in <i>E. coli</i>	54
2.2.8. Produktion und Spezifität der Antikörper gegen den VMP4-N-Terminus.....	56
2.2.9. Analyse von VMP4 mit dem Antikörper gegen den N-Terminus.....	57

3. Diskussion

3.1. Die Proteaseaktivität von VMP3.....	59
3.2. Die Lokalisierung und der modulare Aufbau von VMP3 und VMP4.....	62
3.3. Die Expression und die Regulation von VMP3 und VMP4.....	63
3.4. Die Funktion der VMPs.....	65

4. Material und Methoden

4.1. Kultivierung von <i>Volvox carteri</i>	68
4.1.1. Stammkulturhaltung.....	68
4.1.2. Anzucht im analytischen Maßstab.....	68
4.1.3. Anzucht im Großmaßstab.....	68
4.1.4. Anzucht von sexuell induzierten Algen.....	68
4.1.5. Herstellung mechanisch verletzter Algen.....	69
4.1.6. Test auf Sensitivität gegenüber dem Sexualpheromon.....	69
4.2. Ernte und Aufschluss von <i>Volvox</i> -Sphäroiden.....	70
4.2.1. Isolierung von innerer Matrix, Gonidien und Sphäroidhüllen.....	70
4.2.2. Präparation der inneren Matrix ("deep zone"-Extrakt, „Schlitzextrakt“) im Großmaßstab... 70	
4.2.3. Präparation des EDTA-Extraktes.....	71
4.2.4. Herstellung von Ultraschalllysaten.....	71
4.3. Molekularbiologische Methoden.....	72
4.3.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	72
4.3.1.1. Bakterienkultur.....	72
4.3.1.2. Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA.....	72
4.3.1.3. Gelelektrophorese von DNA.....	72

4.3.1.4. Reinigung von DNA aus Lösung und Agarosegelen.....	73
4.3.2. Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	73
4.3.3. Klonierung von DNA.....	73
4.3.3.1. Präparation von Plasmidvektoren.....	73
4.3.3.2. Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme.....	74
4.3.3.3. Ligation von DNA.....	74
4.3.3.4. Transformation von <i>E. coli</i>	74
4.3.3.5. Klonierung von PCR-Produkten.....	75
4.3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	76
4.3.5.1. Amplifikation von DNA.....	76
4.3.5.2. Kolonie-PCR mit <i>E. coli</i>	76
4.3.5.3. Genomische PCR mit <i>Volvox carteri</i>	76
4.3.5.4. RT-PCR mit <i>Volvox carteri</i>	77
4.3.6. Synthese und Bezug von Oligonukleotiden.....	77
4.3.7. Sequenzierung von DNA.....	78
4.3.8. Transformation von <i>Volvox carteri</i>	78
4.3.9. Klonierschemata der angefertigten Genkonstrukte.....	79
4.4. Proteinbiochemische Methoden.....	89
4.4.1. Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	89
4.4.1.1. Kultivierung und Induktion.....	89
4.4.1.2. Proteinreinigung und -rückfaltung.....	90
4.4.2. Reinigung von VMP 3 und VMP 4 aus <i>Volvox carteri</i>	91
4.4.2.1. Ionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex A25.....	91
4.4.2.2. HPLC mit einer Uno Q 1R-Säule.....	92
4.4.2.3. Proteinelution aus SDS-Polyacrylamidgelen.....	92
4.4.3. Proteintransfer auf eine PVDF-Membran zur Ansequenzierung des N-Terminus.....	93
4.4.4. Deglykosylierung mit Fluorwasserstoff.....	93
4.4.5. Radioaktive Markierungen.....	93
4.4.5.1. [³⁵ S]-Sulfat- und [³³ P]-Phosphat-Puls-Markierung von <i>Volvox</i> -Embryonen unter Anwesenheit von Ellmann`s Reagenz.....	93
4.4.5.2. [³⁵ S]-Sulfat-Puls-Chase-Markierung.....	94
4.4.6. In-Gel-Aktivitätstest (Zymographie).....	94
4.4.7. SDS-PAGE nach Davies und Stark.....	95
4.4.8. Biochemische Standardmethoden.....	96
4.4.8.1. SDS-PAGE nach Laemmli.....	96

4.4.8.2. Coomassie-Färbung von SDS-PAGs.....	96
4.4.8.3. Silberfärbung von SDS-PAGs.....	96
4.4.8.4. Fluorographie.....	96
4.4.8.5. TCA-Fällung von Proteinen.....	96
4.4.8.6. Proteinmengenbestimmung mit BCA.....	97
4.5. Immunologische Methoden.....	97
4.5.1. Produktion polyklonaler Antikörper.....	97
4.5.2. Aufreinigung der Antikörper.....	97
4.5.3. Western Blotting und Immunodetektion.....	98
4.5.4. Immunopräzipitation.....	99
4.6. Puffer, Lösungen, Medien und Organismen.....	100
4.6.1. Puffer und Lösungen.....	100
4.6.2. Medien.....	103
4.6.3. Organismen.....	104
4.6.3.1. <i>Volvox carteri</i> -Stämme.....	104
4.6.3.2. <i>E. coli</i> -Stämme.....	105
4.7. Chemikalien, Enzyme und Materialien.....	105
4.8. Geräte.....	107
5. Zusammenfassung.....	109
6. Anhang	
6.1. Verwendete Oligonukleotide.....	111
6.2. Aminosäure- und cDNA-Sequenz von <i>VMP3</i>	112
6.3. Genomische Sequenz von <i>VMP3</i>	114
6.4. Aminosäure- und cDNA-Sequenz von <i>VMP4</i>	118
7. Literaturverzeichnis.....	122

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Bettvolumen
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
del.	deletiert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N',-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N',-Tetraessigsäure
Fa.	Firma
FBK	Fernbachkolben
GLE	gametic lytic enzyme
h	Stunde
Hrsg.	Herausgeber
HPLC	high pressure liquid chromatography
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
kDa	kilo Dalton
MEZ	mitteleuropäische Zeit
min	Minute
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MMP	Matrix-Metalloproteinase

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NBT	4-Nitrobluetetrazolium-Chlorid
Ni	Nickel
NTA	Nitrilotriessigsäure
Nukl.	Nukleotid(position)
O.D. _x	optische Dichte gemessen bei Wellenlänge x
ON	Oligonukleotid
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pos.	Position
PPO	2,5-Diphenyl-Oxazol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SVM	steriles <i>Volvox</i> -Medium
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit
UK	United Kingdom
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VMP	<i>Volvox</i> -Metalloproteinase
VT	Volumenteil
v/v	volume per volume
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid

1. Einleitung

1.1. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)

Für alle Organismen ist der kontrollierte Abbau von Proteinen genauso wichtig wie deren Biosynthese. Der Proteinabbau liefert dabei nicht nur Moleküle für die Energiegewinnung der Zelle und wichtige Metabolite für diverse Stoffwechselwege, sondern ist auch essentiell für eine effektive Regulation aller Zellfunktionen. Durch den spezifischen Abbau von Enzymen ist die Zelle in der Lage, Einfluss auf alle ablaufenden Stoffwechselwege zu nehmen, und so schnell auf Veränderungen ihrer Bedürfnisse oder Lebensbedingungen zu reagieren. Proteasen greifen aber auch direkt in die Regulation von Enzymen ein, indem sie inaktive Vorstufen (Zymogene) durch Abspaltung eines sogenannten Propeptids in ihre katalytisch aktive Form überführen. Zudem müssen fehlerhaft translatierte, missgefaltete und chemisch geschädigte Proteine aus der Zelle entfernt werden, damit es durch falsche Katalyseleistungen oder Ablagerungen von Proteinen nicht zu einer Störung des sensiblen intrazellulären Milieus kommt. In vielzelligen Organismen kommt den Proteasen noch eine zusätzliche Aufgabe beim Auf- und Umbau einer komplexen extrazellulären Matrix (ECM) zu, die einerseits als bloßes Gerüst für den Zusammenhalt der einzelnen Zellen verantwortlich ist, andererseits alle für den Gesamtorganismus wichtigen Entwicklungen an die Einzelzelle weitergibt und umgekehrt (Stryer, 1994).

Alle diese Leistungen werden von proteolytischen Enzymen realisiert, die in vier große Gruppen eingeteilt werden: In Serin/Threoninproteasen, Cysteinproteasen, Aspartatproteasen und Metalloproteasen. Die Mitglieder der beiden ersten Gruppen sind nach ihrem katalytisch aktiven Rest benannt, der bei der Spaltung die Polypeptidkette direkt angreift, und so eine kovalente Bindung mit dem Substrat eingeht. Bei den Aspartatproteasen dienen ein oder zwei Aspartatreste zur Koordinierung und Aktivierung eines Wassermoleküls im aktiven Zentrum des Enzyms, das im deprotonierten Zustand die Peptidbindung spalten kann; eine kovalente Bindung zum Substrat tritt dabei nicht auf. In der Gruppe der Metalloproteasen wird derselbe Katalysemechanismus durch ein enzymgebundenes, zweifach positiv geladenes Metallion verwirklicht, das an der Aktivierung des Wassermoleküls beteiligt ist. Dabei handelt es sich in der Regel um ein Zinkion (Zn^{2+}), bei manchen Enzymen tritt Cobalt (Co^{2+}) oder Mangan (Mn^{2+}) auf. Die weitere Unterteilung der Vertreter dieser Enzymgruppe beruht auf den - üblicherweise drei - Aminosäureresten, die an der Bindung des Metallions beteiligt sind. Dabei konnte den Aminosäuren Histidin, Glutamat, Aspartat und Lysin eine Funktion als Metallligand zugeschrieben werden (Barrett et al., 1998).

Ein wichtiger Vertreter aus der Gruppe der Metalloproteasen ist die Familie der extrazellulären Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) oder Matrixine (Nagase & Woessner, 1999). Die drei an der Metallbindung beteiligten Histidinreste dieser Enzyme sind in einem charakteristischen

Sequenzmotiv (HExxHxxGxxH) eingebunden. Die Funktion der anderen konservierten Aminosäuren dieser Konsensussequenz konnte durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden (Lovejoy et al., 1994): Der Glutamatrest ist für die enzymatische Katalyse essentiell und wirkt vermutlich als Base, die bei der Aktivierung des Wassermoleküls ein Proton bindet; das Glycin verursacht in der Tertiärstruktur des Enzyms eine β -Schleife, die die drei Histidine in räumliche Nähe zueinander bringt und so eine Koordinierung des Metallions ermöglicht. Darüber hinaus ist im Abstand von etwa 20 Aminosäureresten vom Metallbindemotiv ein Methionin von zentraler Bedeutung, das in der räumlichen Struktur des Proteins ebenfalls eine Krümmung bewirkt (sogenannter "Met-turn") und die Polypeptidkette zurück zum aktiven Zentrum führt (Bode et al., 1993). Dadurch bilden die C-terminal vom Methionin liegenden Aminosäurereste die „Unterseite“ der Substratbindetasche aus, und sind für die Spezifität des Enzyms von entscheidender Bedeutung. Die meisten Matrix-Metalloproteinasen werden von der Zelle als inaktive Zymogene synthetisiert und erst extrazellulär durch Abspaltung eines Propeptids aktiv. Eine Sequenz innerhalb dieses Propeptids (PRCGVPD) ist ebenfalls konserviert; das Cystein bindet dabei im Zymogen als vierter Ligand an das Metallion und verschließt dadurch das aktive Zentrum (sogenannter "cysteine-switch"; Van Wart & Birkedal-Hansen, 1990). Alle Matrix-Metalloproteinasen zeigen einen modularen Aufbau, d.h. zusätzlich zur Proteasedomäne besitzen die Enzyme noch andere distinkte Proteinbereiche, die z.T. Homologie zu anderen extrazellulären Proteinen, z.B. Hemopexin oder Fibronectin, aufweisen. Diese Domänen sind von der N-terminalen Domäne durch einen prolinreichen Bereich (sogenannter "hinge") getrennt, ihnen wird eine Rolle bei der Substraterkennung und der Verankerung der Enzyme in der ECM zugeschrieben (Nagase & Woessner, 1999).

Der wohl bekannteste Vertreter der MMP-Familie ist die Kollagenase1 (heute als MMP-1 bezeichnet), die schon 1962 entdeckt wurde (Gross & Lapière, 1962). Heute umfasst diese Gruppe von Endopeptidasen in den Vertebraten etwa 25 Mitglieder (Barrett et al., 1998). Ihre Hauptaufgabe ist der kontrollierte Umbau der ECM, d.h. sie sind an so wichtigen Prozessen wie z.B. Wundheilung, Angiogenese, Nervenwachstum, Knochenbildung und der Embryonalentwicklung beteiligt, indem sie direkt Proteine der ECM umsetzen oder in der ECM gebundene Moleküle freisetzen. Die Enzyme der MMP-Familie sind damit von großer klinischer Bedeutung, zumal fehlerhafte Aktivitäten mit Arthritis, Multipler Sklerose, Leberfibrose und manchen Krebsarten in Verbindung stehen (Parks & Mecham, 1998). Die Kontrolle der Aktivität dieser Proteasen ist für den Organismus also von entscheidender Bedeutung und findet deshalb auf fast allen bekannten Ebenen der Enzymregulation statt. Zum einen wird die Transkription vieler *MMP*-Gene erst als Antwort auf externe Signale, wie z.B. die Anwesenheit von Wachstumshormonen oder Cytokinen oder aufgrund von Veränderungen im Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakt induziert und ist zudem gewebsspezifisch (Fini et al., 1998). Zum anderen werden – wie bereits

oben beschrieben – die meisten MMPs erst durch proteolytische Spaltung durch andere Proteasen an ihrem eigentlichen Wirkungsort aktiv. Die enzymatische Aktivität vieler MMPs ist darüber hinaus calciumabhängig und wird im Organismus zusätzlich durch sogenannte TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) reguliert (Gomez et al., 1997). Dabei handelt es sich um 21-30 kDa schwere Proteine, deren N-terminaler Cysteinrest genau wie der "cysteine-switch" des Propeptids an das Metallion im aktiven Zentrum bindet, ohne dabei selbst verdaut zu werden. Die Expression der vier bislang bekannten TIMPs ist selbst wieder stark reguliert, so dass hier ein sehr effizientes und sensibles Instrument zur Kontrolle der Matrix-Metalloproteinasen vorliegt.

Das Auftreten von MMPs ist aber nicht auf Vertebraten beschränkt. Homologe Proteine konnten z.B. in *Caenorhabditis elegans* und im Seeigel nachgewiesen werden: In der *C. elegans* Datenbank fanden sich drei cDNAs mit Ähnlichkeit zu MMP-11, die codierten Proteine sind noch unbekannt (Wada et al., 1998). Bei einem wichtigen Schritt der Embryonalentwicklung von Seeigeln verdaut die Metalloprotease Envelysin den Embryonalsack und entläßt dadurch die schwimmfähige Blastula (Nomura et al., 1997). Aus höheren Pflanzen sind acht Gene mit Homologie zur MMP-Familie bekannt: *SEMP1* (Soybean metalloproteinase 1) und *GmMMP2* (*Glycine max* matrix metalloproteinase 2) aus Sojabohne (*Glycine max*), wobei ersteres ausschließlich in Blättern transkribiert wird und am Blattwachstum beteiligt zu sein scheint (Pak et al., 1997), und letzteres nur auf die Infektion mit Pflanzenpathogenen hin exprimiert wird (Yongqing et al., 2001); die *Cs1-MMP* (*Cucumis sativus* 1 matrix metalloproteinase) aus Gurke (*Cucumis sativus*) wird mit Blattseneszenz und programmiertem Zelltod in Verbindung gebracht (Delorme et al., 2000); in *Arabidopsis thaliana* erfolgt die Transkription von fünf homologen Genen (*At1-MMP-At5-MMP*; Maidment et al., 1999) gewebsspezifisch, eine Funktion ist aber nur für *At2-MMP* bekannt, das eine wichtige Rolle bei der Morphogenese und der Seneszenz der Pflanze spielt (Golldack et al., 2002). Bislang konnte aber nur das *SEMP1*-Protein isoliert und als aktive Protease identifiziert werden (Graham et al., 1991). Heterologe Expressionsprodukte von *GmMMP2*, *Cs1-MMP* und *At1-MMP* in *Escherichia coli* zeigen zwar ebenfalls Proteaseaktivität, die entsprechenden Proteine wurden aber noch nicht aus den jeweiligen Ursprungsorganismen der Gene gereinigt. Für keine der pflanzlichen Proteasen ist das natürliche Substrat und damit seine genaue Aufgabe bekannt.

Erstaunlicherweise wurden auch in der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* zwei Gene (*mmp1* und *mmp2*) entdeckt, die alle charakteristischen Eigenschaften der MMP-Familie aufweisen (Kinoshita et al., 1992 und Kubo et al., 2001). Eines dieser Gene (*mmp1*) codiert für das sogenannte GLE (gametic lytic enzyme), das schon vor mehr als 30 Jahren beschrieben wurde (Claes, 1971). Das GLE löst die extrazelluläre Matrix sexuell differenzierter *Chlamydomonas*-Gameten auf, um das Verschmelzen der Zellen und damit die sexuelle Fortpflanzung zu ermöglichen (Schlösser, 1976). Das Enzym liegt dabei als inaktive Vorstufe in der ECM der Gameten vor und wird erst beim Kontakt der Flagellen eines Individuums mit den Flagellen eines

gegengeschlechtlichen Gameten aktiviert (sogenannte Agglutination), um eine vorzeitige Lyse der Zellwand zu verhindern (Snell et al., 1989). Es finden sich also dieselben Regulationsmechanismen wieder, wie sie auch bei den MMPs der Vertebraten auftreten.

Vor kurzem wurden auch in der mehrzelligen Grünalge *Volvox carteri* vier Gene (*VMP1-4*) identifiziert, die zur *MMP*-Genfamilie homolog sind (Hallmann, et al., 2001).

1.2. Der Versuchsorganismus *Volvox carteri*

Seit der Erfindung des Mikroskops ist *Volvox* ein beliebtes Versuchsobjekt (Van Leeuwenhoek, 1700). Frühe Studien beschränkten sich zunächst nur auf Anatomie und Morphologie der Alge, wichtige entwicklungsbiologische Schritte im Lebenszyklus wurden später beschrieben (Overton, 1889 und Mainx, 1929). Doch erst Mitte des 20. Jahrhunderts wurden geeignete Kulturmedien gefunden, in denen ein synchrones Wachstum unter Laborbedingungen und damit eine genauere Beobachtung der Alge möglich war (Provasoli & Pintner, 1959 und Darden, 1966). Zunächst fanden nur die in Europa auftretenden Arten *Volvox aureus*, *Volvox globator* und *Volvox tertius* Beachtung (Pringsheim, 1970), später isolierten und kultivierten v.a. Richard Starr und Mitarbeiter ab Mitte der 60er Jahre *Volvox*-Arten aus allen Erdteilen (Starr, 1970). Unter der Vielzahl dieser Isolate setzte sich schließlich der in Japan isolierte weibliche Stamm *Volvox carteri* f. *nagariensis* Iyengar HK 10 als Gegenstand nachfolgender biochemischer und molekularbiologischer Untersuchungen durch (Starr, 1969).

Die mehrzellige, diözische Grünalge *Volvox carteri* besteht nur aus zwei Arten von Zellen (Kirk, 1998): 2000-4000 somatischen Zellen, die als Einzelschicht die Oberfläche der Kugelalge bilden, und aus bis zu 16, etwa 1.000 mal größeren, reproduktiven Zellen, sogenannte Gonidien, die knapp unter der Oberfläche im Inneren des Sphäroids am posterioren Pol der Alge eingebettet sind (s. Abb. 1.1.). Die somatischen Zellen ähneln in ihrem Aussehen ihren nächsten einzelligen Verwandten *Chlamydomonas reinhardtii*, besitzen also im Gegensatz zu den Gonidien zwei Flagellen und einen Augenfleck, und ermöglichen der Alge eine koordinierte Bewegung. Befinden sich die Algen im asexuellen Lebenszyklus, so bildet sich aus jeder reproduktiven Zelle ein neuer Organismus, der genetisch identisch zur Mutterkolonie ist und denselben haploiden Chromosomensatz trägt (s. Abb. 1.2.). Die Gonidien vollziehen zu Beginn der Embryogenese zunächst fünf symmetrische Teilungen zum 32-Zellembryo, gefolgt von einer asymmetrischen Teilung (Starr, 1970). Die dabei entstehenden, größeren Zellen am anterioren Pol des Embryos bilden die Vorläufer der reproduktiven Zellen der nächsten Generation. Nach weiteren fünf oder sechs Zellteilungen ist die Embryogenese abgeschlossen, jedoch weisen die Flagellenanlagen der somatischen Zellen ins Innere des Sphäroids, und die Gonidienvorläufer kommen an der Außenseite zu liegen.

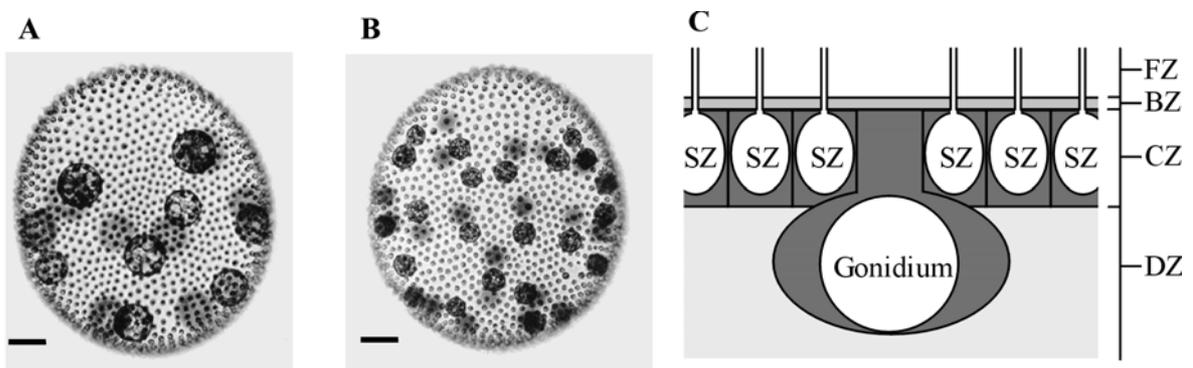


Abb. 1.1.: Die Grünalge *Volvox carteri*: **A:** Weiblicher Stamm HK 10 im asexuellen Stadium. **B:** Weiblicher Stamm HK 10 im sexuellen Stadium. **C:** Schematische Darstellung der Hauptbereiche der ECM (nach Kirk et al., 1986). FZ: "flagellar zone", BZ: "boundary zone", CZ: "cellular zone", DZ: "deep zone", SZ: somatische Zellen. Der schwarze Balken in **A** und **B** entspricht 50 μm .

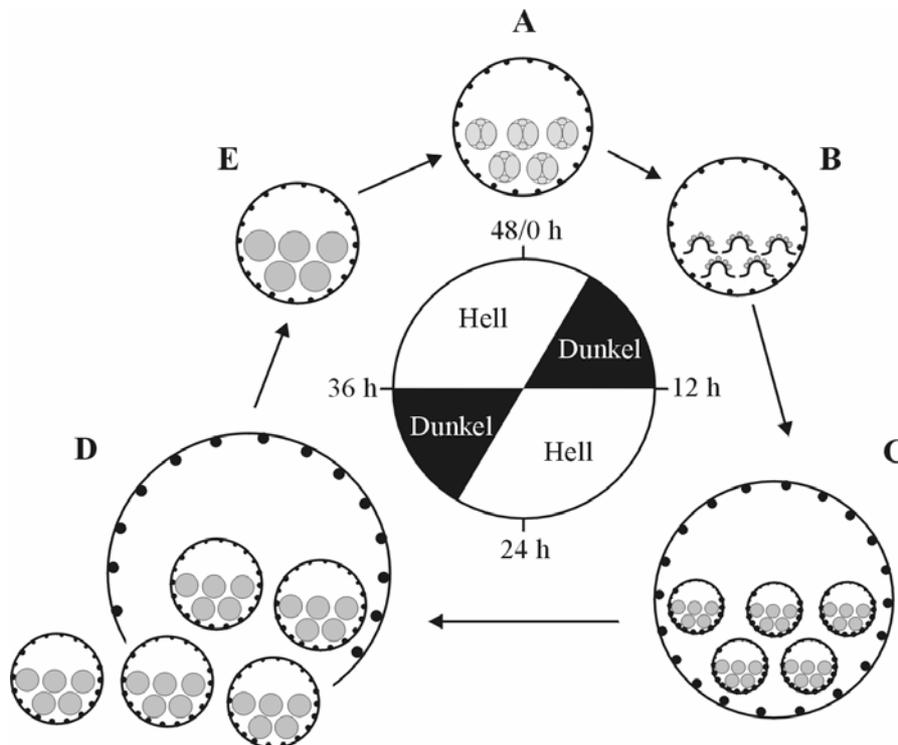


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung des asexuellen Lebenszyklus von *Volvox carteri* unter Laborbedingungen: **A:** Start der Embryogenese, **B:** Inversion, **C:** Wachstum der Embryonen und Zelldifferenzierung, **D:** Release, **E:** Reifung der reproduktiven Zellen (Gonidien). Die Generationszeit der Alge beträgt 48 h.

Durch einen gastrulationsähnlichen Prozess, der sogenannten Inversion, stülpt sich der Organismus komplett um und erlangt so die richtige Orientierung (Kelland, 1964). Mit dem Ende der Inversion beginnt die eigentliche Wachstumsphase der Alge, die fast ausschließlich durch die Ausbildung einer komplexen extrazellulären Matrix an Größe zunimmt (s. Abb. 1.1.). Diese besteht aus einer Vielzahl von stark glykosylierten, hydroxyprolinreichen Proteinen wie sie auch in höheren Pflanzen vorkommen (sogenannte Extensine; Kielizewski & Lamport, 1994) und macht im adulten Organismus bis zu 95% des Gesamtvolumens aus (zusammengefasst in Sumper & Hallmann, 1998). Das anhaltende Größenwachstum führt letztendlich dazu, dass das Innere der Mutterkolonie fast gänzlich von den Sphäroiden der nächsten Generation ausgefüllt ist, die schließlich durch einen lokalen Abbau der mütterlichen Zellwand ins Medium entlassen werden, ein Vorgang der als „Release“ bezeichnet wird. Nach der Reifung ihrer Gonidien können diese Individuen einen neuen Fortpflanzungszyklus initiieren, die somatischen Zellen der zurückbleibenden mütterlichen Hülle sind jedoch einem programmierten Zelltod unterworfen (Pommerville & Kochert, 1981).

Neben diesem vegetativen Lebenszyklus kann *Volvox carteri* aber auch einen sexuellen Lebensweg einschlagen (Starr, 1970). Männliche Algen, die sich im asexuellen Stadium morphologisch nicht von den weiblichen Organismen unterscheiden, entwickeln sich spontan zu sexuellen Individuen und sezernieren ein Sexualpheromon, den sogenannten (Sexual)Induktor (Starr & Jaenicke, 1974). Die Produktion dieses Induktors kann auch nach Hitzeschock (43°C-45°C) in den männlichen und den weiblichen Algen erfolgen (Kirk & Kirk, 1986). Dabei handelt es sich um ein 32 kDa schweres Glykoprotein, welches eine enorme biologische Aktivität besitzt und noch in einer Konzentration von 10^{-16} M wirksam ist (Tschochner et al., 1987 und Sumper et al., 1993). Um eine sexuelle Entwicklung der männlichen und weiblichen Algen in der folgenden Generation zu initiieren muss das Pheromon jedoch für mindestens 6 h vor Beginn der nächsten Embryogenese im Kulturmedium anwesend sein (Gilles et al., 1984). Sexuelle Algen unterscheiden sich in ihrer Morphologie von den asexuellen Organismen: sexuelle weibliche Algen besitzen anstatt der 16 Gonidien bis zu 48 Eier (s. Abb. 1.1.), sexuelle männliche Algen sind kleiner und weisen 64-128 sogenannte Androgonidien auf, die sich zu Spermienpaketen aus 64-128 Spermien weiterentwickeln. Grundlage für die veränderte Anzahl an reproduktiven Zellen ist dabei die Verschiebung der asymmetrischen Teilung in der Embryogenese auf einen späteren Teilungsschritt (Starr, 1970). Nach der vollständigen Reifung der Spermienpakete lösen sich diese aus den männlichen Algen heraus, und suchen freischwimmend nach sexuellen Weibchen. Beim Kontakt mit einer Eizelle dissoziiert das Spermienpaket, und ein einzelnes Spermium befruchtet das Ei. Die dadurch entstandene diploide Zygote bildet die Überdauerungsform von *Volvox carteri*. Diese vollzieht noch vor der Keimung die Meiose, so dass dann wieder ein asexueller, haploider Organismus entsteht.

Obwohl die reproduktive Zelle das eigentliche Ziel des Sexualinduktors ist, führt die Wirkung des Pheromons zunächst entweder zu biochemischen Modifikationen in der extrazellulären Matrix der Alge (Wenzl & Sumper, 1982 und Gilles et al., 1986) oder zu einer Veränderung in der Genexpression der somatischen Zellen (Haas, 1994 und Amon, 1995). Eine wichtige Gruppe dieser sexuell induzierbaren Gene stellen die sogenannten Pherophorine dar, die eine zum Pheromon homologe Domäne besitzen und eventuell an dessen Signaltransduktion beteiligt sind (Godl et al., 1995). Eine zweite Gruppe bilden die sogenannten *Volvox*-Metalloproteinasen (*VMPs*).

1.3. *Volvox*-Metalloproteinasen (VMPs)

Die vier bekannten Mitglieder der *VMP*-Familie wurden in verschiedenen genetischen Ansätzen zur Identifikation sexuell induzierbarer Gene in *Volvox carteri* gefunden (beschrieben in Amon et al., 1998). Die aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Proteine VMP1-4 weisen zueinander eine enge Verwandtschaft auf und zeigen eine modulare Domänenstruktur (Hallmann, et al., 2001; s. Abb. 1.3.):

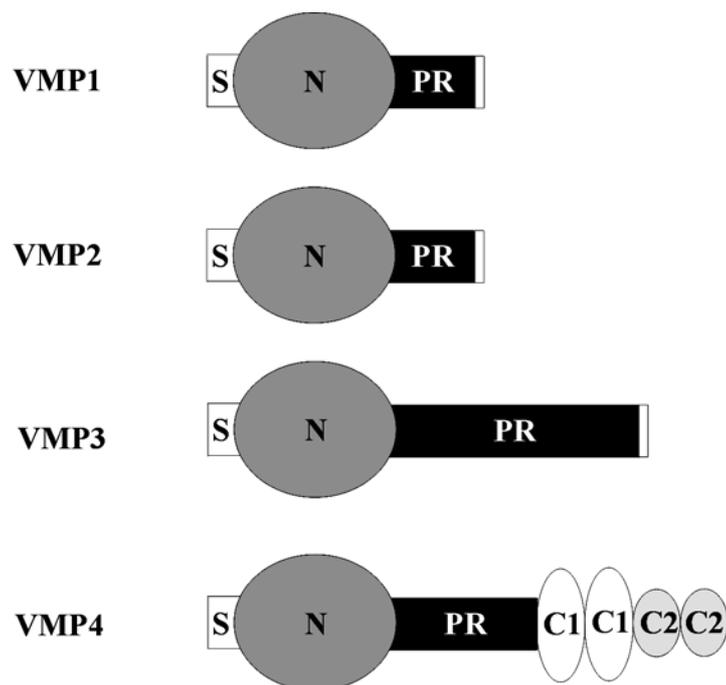


Abb. 1.3.: Schematische Darstellung der von den Genen *VMP1-4* abgeleiteten Domänenstruktur der Proteine VMP1-4: S: Signalpeptid, N: N-terminale Domäne, PR: prolinreicher Bereich, C1/2: C-terminale Domäne 1 bzw. 2., weißes Rechteck: C-terminale Aminosäuren ohne Zuteilung. Proteingrößen: VMP1: 573 AS, VMP2: 588 AS, VMP3: 687 AS, VMP4: 1143 AS (Hallmann et al., 2001).

Alle Proteine besitzen eine potentielle Signalsequenz zur extrazellulären Lokalisation (McGeoch, 1985), eine stark konservierte N-terminale Domäne (VMP1: 484 AS, VMP2: 482 AS, VMP3: 454

AS, VMP4: 479 AS; mit 50-70% Identität zueinander), und einen prolinreichen Bereich variabler Länge (VMP1 und VMP2: 69 AS, VMP3: 207 AS, VMP4: 118 AS). Nur *VMP4* codiert für vier weitere C-terminale Domänen (C1: 178 und 184 AS, C2: 94 und 74 AS), von denen je zwei zueinander homolog sind (C1: 46% Identität über 172 AS, C2: 35% Identität über 49 AS). Beide C2-Domänen zeigen zudem Homologie zur sogenannten "apple"-Domäne von Kallikrein (Seidah et al., 1990). Der prolinreiche Bereich, in dem wiederholt charakteristische Ser-(Pro)_{2,4}-Motive auftreten, ist für extrazelluläre Proteine aus *Volvox carteri* typisch und liegt im vollständig prozessierten Protein wahrscheinlich als stark O-glykosylierter Polyhydroxyprolinstab vor (Ertl et al., 1992). Ein Sequenzvergleich der N-terminalen Domäne in der Proteindatenbank (Altschul et al., 1997) identifizierte das GLE aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Kinoshita et al., 1992) als das am nächsten verwandte Protein (28% Identität über 195 AS). Der Bereich der größten Identität erstreckt sich dabei über das katalytische Zentrum des GLE, d.h. über das Metallbindemotiv und den Methionin-Turn (s. 1.1.). Allerdings tritt im mutmaßlichen Metallbindemotiv der vier VMP-Proteine (QExxHxxGxxH) ein wesentlicher Unterschied zur entsprechenden Konsensussequenz des GLE und der aller anderen bekannten MMPs (HExxHxxGxxH) auf: Ein Glutaminrest ersetzt einen der drei für die Metallbindung essentiellen Histidinreste. Darüber hinaus fehlt in der VMP-Familie auch die auf die Abspaltung eines Propeptids hinweisende konservierte Signalsequenz der MMPs. Alle anderen für die Katalyse wichtigen Elemente sind zwar identisch, der Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum könnte aber nichtsdestotrotz Auswirkungen auf eine enzymatische Aktivität der VMP-Proteine haben.

Die vier Mitglieder der *VMP*-Familie bilden zusammen mit dem GLE die Familie M11 des Clans MA der Metalloproteasen in der MEROPS Proteasen Datenbank (Rawlings & Barrett, 2000). Die cDNA-Sequenzen sind in der EMBL Sequenz Datenbank unter den Accession-Nummern AJ311547 (*VMP1*), AJ311548 (*VMP2*), AJ311549 (*VMP3*) und AJ311550 (*VMP4*) aufgeführt (Hallmann et al., 2001). Dabei handelt es sich um die früher als *23/1* (*VMP1*), *Sph3I-4/22-6* (*VMP2*), *Sph22/3* (*VMP3*) bzw. *A-Klon* (*VMP4*) bezeichneten Differenzklone (Haas, 1994 und Amon, 1995).

2. Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit war die DNA-Sequenz von vier zueinander homologen Genen bekannt, deren N-terminaler Bereich starke Ähnlichkeit zu bekannten Zn^{2+} -abhängigen Metalloproteinasen zeigt, und die deswegen als *Volvox*-Metalloproteinasegene 1-4 (*VMP1-4*) bezeichnet werden (Hallmann et al., 2001). Alle Vertreter dieser Genfamilie codieren außerdem für ein Signalpeptid zur extrazellulären Lokalisation des Proteins und einen für *Volvox*-ECM-Proteine typischen prolinreichen Bereich. Ursprünglich wurden diese Gene durch verschiedene differentielle "screenings" von cDNA aus vegetativ wachsenden bzw. sexuell induzierten *Volvox*-Kulturen entdeckt, wobei es sich in diesem Fall um Gene handelt, deren Transkription bei Zugabe des Sexualpheromons („Induktor“) stimuliert wird (Amon, 1995 und Haas, 1994). Mit den Primärklonen dieser "screenings" als Basis, konnten dann aus cDNA- und genomischen Genbanken die fehlenden Genbereiche isoliert werden, bis für alle vier Gene die vollständige codierende Gensequenz vorlag.

Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend von den bekannten DNA-Sequenzen und mit Hilfe der bereits klonierten Fragmente der Gene *VMP3* und *4* die codierten Proteine zu identifizieren, zu reinigen und zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf eine eventuelle proteolytische Aktivität dieser Proteine gelegt werden.

2.1. *Volvox*-Metalloproteinase 3 (*VMP3*)

Das *VMP3*-Gen (frühere Bezeichnung: *Sph22/3*) war für genauere molekularbiologische und biochemische Untersuchungen der *VMP*-Genfamilie am besten geeignet, weil nur für dieses Mitglied sowohl die gesamte cDNA-Sequenz, als auch die vollständige genomische Sequenz vom „Promotor“ bis zum Polyadenylierungssignal inklusive aller Introns bekannt war. Alle vorliegenden Sequenzen wurden zunächst durch eigene Sequenzierungen bestätigt bzw. vervollständigt.

Mit den existierenden cDNA-Klonen als Ausgangspunkt wurde ein Teil des *VMP3*-Gens heterolog exprimiert, um das Expressionsprodukt zur Herstellung polyklonaler Antikörper zu verwenden, die dann in *Volvox*-Lysaten das *VMP3*-Protein erkennen sollten.

2.1.1. Heterologe Expression des N-Terminus in *E. coli*

Zur Produktion von polyklonalen Antikörpern wurde der N-terminale, proteinasehomologe Teil von *VMP3* (Aminosäure 22-476, s. 6.2.) gewählt. Zwar beruht die Homologie der Mitglieder der *VMP*-Genfamilie auf genau diesem Genabschnitt, so dass mit eventuellen Kreuzreaktionen der

Antikörper gerechnet werden musste, der restliche, für den Polyprolinbereich codierende Genabschnitt ist dafür aber aufgrund seiner Gensequenz und seinem Auftreten in fast allen extrazellulären Proteinen von *Volvox* völlig ungeeignet (Sumper & Hallmann, 1998), ebenso wie die übrigen fünf Aminosäuren am C-Terminus.

Zur Expression in *E. coli* wurde das T7-RNA-Polymerase-System nach Studier et al. (1990) verwendet, bei dem die Bakterien unter Verwendung eines viralen Promotors für die T7-RNA-Polymerase nach Induktion mit IPTG fast ausschließlich das gewünschte Protein translatieren.

Da anfänglich noch kein Bakterienklon mit der cDNA des gesamten N-terminalen Bereichs des *VMP3*-Gens vorlag, musste zunächst ein solcher hergestellt werden. Dazu wurden die Inserts verschiedener cDNA- und genomischer Klone über geeignete Restriktionsschnittstellen oder durch rekombinante PCR nach Horton et al. (1989) zusammengesetzt (s. Abb. 4.1. und Abb. 4.2.). Das resultierende Plasmid pUC18/22/3-c.2.3./1/"6" (Nukl. 0-1492, s. 6.2.) diente dann als Matrize für eine rekombinante PCR mit den Oligonukleotiden ON 14480 und 14481, die sowohl die für die weitere Klonierung in den Expressionsvektor pET11a (Fa. Novagen) nötigen Restriktionsschnittstellen, als auch einen C-terminalen (His)₆-"tag" anfügten (s. Abb. 2.1), der bereits im Ausgangsplasmid vorhanden war und für die spätere Reinigung des Proteins durch Metall-Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose benutzt werden konnte (Hochuli & Piesecki, 1992):

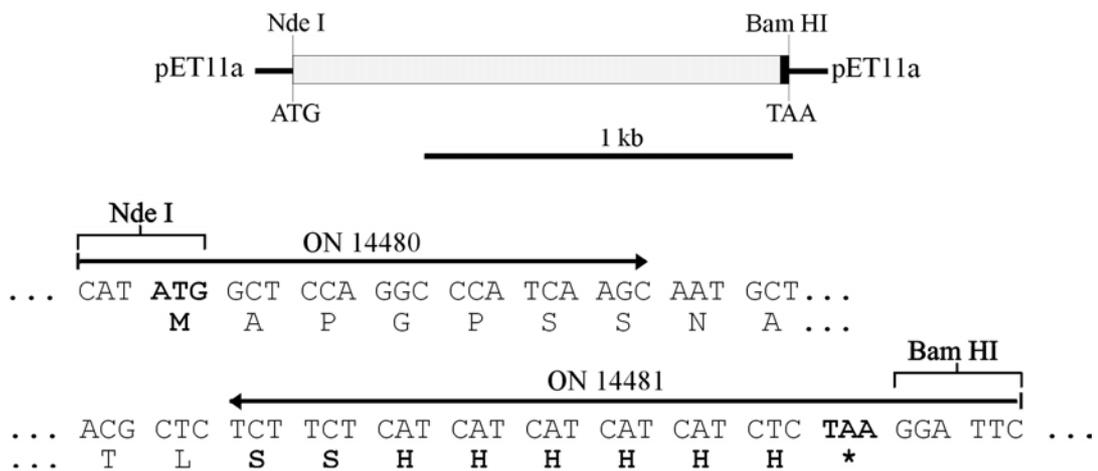


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung des Plasmids pET11a/22/3/1/"6": Das durch PCR hergestellte DNA-Stück wurde über die rekombinanten Restriktionsschnittstellen Nde I und Bam HI in den Expressionsvektor pET11a kloniert. Durch die beiden Oligonukleotide ON 14480 bzw. ON 14481 wurden zusätzliche Nukleotide angefügt, die für das Startmethionin (**M**), einen C-terminalen (**S**)₂-(**H**)₆-"tag" und das Stopcodon (*****) codieren.

Das resultierende N-terminale Genfragment von *VMP3* in pET11a/22/3/1/"6" codiert für die Aminosäuren 22 bis 476 (Nukleotid 131-1492, s. 6.2.), d.h. genau bis zur letzten Aminosäure vor Beginn des prolinreichen Bereichs. Die ersten 21 Aminosäuren des Proteins wurden zur Expression

nicht miteinbezogen, da sie eventuell ein Signalpeptid zur extrazellulären Lokalisation darstellen (McGeoch, 1985), und so zu einer fehlerhaften Prozessierung des Proteins führen könnten. Vor dem C-terminalen (His)₆-tag wurden noch zwei Serinreste als Abstandshalter eingefügt, um während der anschließenden Proteinreinigung eine effiziente Wechselwirkung des "tags" mit der Affinitätsmatrix zu gewährleisten. Bei der Expression sollte also ein Protein (hVMP3-N-Terminus) von etwa 51 kDa (464 AS) gebildet werden.

Die abschließende Sequenzierung des Konstrukts wies im Vergleich zum Wildtypgen zwei Punktmutationen auf, die zu Aminosäureaustauschen im Expressionsprodukt führten (Position 385: Gly statt Asp und Position 439: Arg statt Leu). Da aber das Expressionsprodukt v.a. für die Produktion polyklonaler Antikörper verwendet werden sollte, konnten diese Mutationen vernachlässigt werden.

Bei der nachfolgenden Expression im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) war schon 30 min nach Start der Expression mit 1 mM IPTG im Hitzelysate der Bakterien ein Protein der erwarteten Größe (51 kDa) zu detektieren, der Zeitpunkt der maximalen Expression war aber erst nach zwei bis drei Stunden erreicht (s. Abb. 2.2.). Wie erwartet verfügt dieses Protein über einen (His)₆-tag (s. Abb. 2.2.).

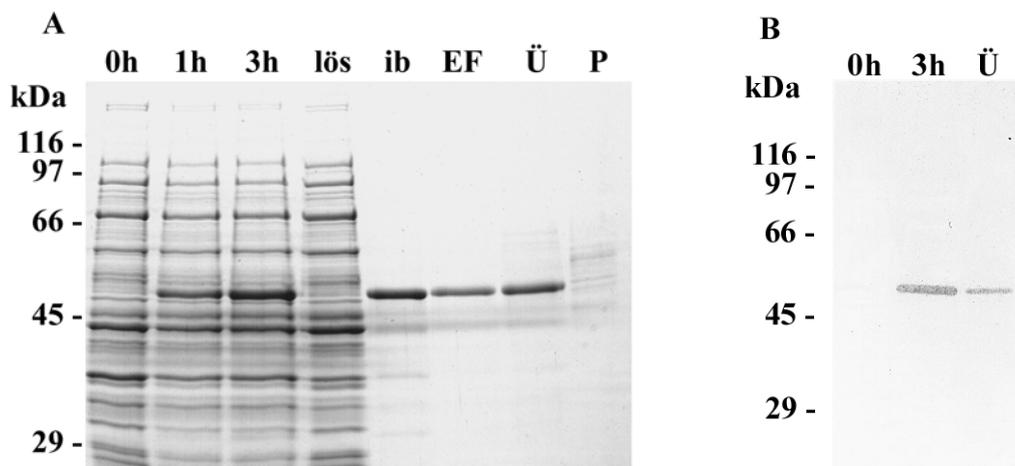


Abb. 2.2.: Expressionskinetik und Reinigung von hVMP3-N-Terminus, **A:** 10% SDS-PAG, Coomassiefärbung, Spur 1, 2 und 3: Bakterienhitzelysate 0 h, 1 h und 3 h nach Start der Expression, Spur 4 und 5: lösliche (lös) bzw. unlösliche (ib) Proteinfraction nach Zellaufschluss, Spur 6: Elutionsfraktion (EF) "2" der Metall-Affinitätschromatographie, Spur 7 und 8: Überstand (Ü) bzw. Pellet (P) nach Dialyse gegen Glycinpuffer. **B:** 10% SDS-PAG, Immunodetektion mit anti-(His)₅-AK (1:1.000, Fa. Qiagen), Spur 1 und 2: Bakterienhitzelysate 0 h und 3 h nach Start der Expression, Spur 3: gereinigter hVMP3-N-Terminus (Ü).

Nach dem Aufschluss der Zellen stellte sich heraus, dass sich das Protein im unlöslichen Anteil der Bakterien, den sogenannten "inclusion bodies" befand, und schon relativ sauber vorlag (s. Abb. 2.2.). Die Reinigung des Proteins mit Hilfe des (His)₆-tags über Metall-Affinitätschromatographie musste somit aber unter denaturierenden Bedingungen stattfinden, weil die "inclusion bodies" nur durch Zugabe von 6 M Harnstoff in Lösung gebracht werden konnten.

Nach Elution von der Säule, auf der noch einige wenige Verunreinigungen abgetrennt werden konnten, war eine Renaturierung des Proteins durch Dialyse gegen 50 mM Glycin pH 9,0 möglich (s. Abb. 2.2.). Bei dem im Gel sichtbaren, niedermolekularen „Schmier“ handelt es sich vermutlich um Abbauprodukte des Proteins. Aus einer 100 ml *E. coli*-Expressionskultur konnten so etwa 3 mg gereinigter hVMP3-N-Terminus gewonnen werden.

Um zu überprüfen ob es sich bei dem gereinigten Protein tatsächlich um hVMP3-N-Terminus handelt, wurden 5 µg des Proteins nach Auftrennung auf einem 10% SDS-PAG und Transfer auf eine PVDF-Membran N-terminal ansequenziert. Die Sequenzierung ergab dabei über 11 Zyklen die erwartete Aminosäuresequenz : MAPGPSSNAPG.

Aufgrund seiner Homologie zu Metalloproteinasen wurde hVMP3-N-Terminus auch auf eine eventuelle Enzymaktivität hin untersucht, zeigte jedoch weder bei Verdauen in Lösung (Azokoll, BSA, Casein, Casein-Yellow, Gelatine und RNase A als Substrat), noch in In-Gel-Aktivitätstests (Casein und Gelatine) proteolytische Eigenschaften. Da aber das Expressionsprodukt zuerst als intrazellulärer, unlöslicher "inclusion body" vorlag und zudem zehn Cysteinreste besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass die spätere Rückfaltung des Proteins während der Dialyse und die Knüpfung eventueller Disulfidbrücken nicht im vollem Umfang dem des nativen VMP3-Proteins entspricht und deswegen keine enzymatische Aktivität zu detektieren war. Darüber hinaus ist *E. coli* nicht in der Lage für Eukaryonten übliche Proteinmodifikationen durchzuführen, die für die Enzymaktivität essentiell sein könnten.

Da das *VMP3*-Gen für eine Signalsequenz zur extrazellulären Lokalisation des resultierenden Proteins codiert, sollte ursprünglich auch der N-Terminus von VMP3 so in *E. coli* exprimiert werden, dass das Expressionsprodukt extrazellulär, d.h. im Periplasma der Bakterien, vorliegt, um die „richtige“ Faltung und somit eine mögliche enzymatische Aktivität des Proteins zu gewährleisten. Nach Klonierung des Genfragments in einen entsprechenden Expressionsvektor, konnte aber kein Produkt im Periplasma nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Es fand zwar in geringem Maße Expression statt, aber nur in Form intrazellulärer, unlöslicher und damit vermutlich falsch gefalteter "inclusion bodies". Verschiedene Versuche die Genexpression, z.B. durch Temperaturniedrigung, zu verlangsamen, um so einen Proteintransport zum Periplasma zu ermöglichen, brachten keine qualitative oder quantitative Verbesserung, so dass dieser Versuchsansatz verworfen werden musste.

2.1.2. Produktion und Spezifität der Antikörper

Die Herstellung der Antikörper in Kaninchen wurde nicht selbst durchgeführt, sondern es wurden zweimal 1 mg des gereinigten Expressionsprodukts hVMP3-N-Terminus (s. 2.1.1.) zur Gewinnung polyklonaler Antikörper in zwei Tieren an Dr. Pineda Antikörper-Service, Berlin geschickt.

Beim Test der verschiedenen Antikörperseren erwies sich die Probe des Tieres 1 vom Tag 85 in einer Verdünnung von 1:2.500 als am geeignetsten (nicht gezeigt). Deswegen wurden etwa 7 ml dieses Serums über Protein-A-Sepharose gereinigt und gegen PBS dialysiert (Harlow & Lane, 1988). Alle folgenden Immunodetektionen wurden mit Aliquots des gereinigten Antikörpers durchgeführt. Bei der Analyse der Expressionskinetik und Reinigung von hVMP3-N-Terminus detektiert der Antikörper nur im Lysat induzierter Bakterien ein Protein in der richtigen Größe von 51 kDa und einige, schon im Bakterium vorliegende niedermolekulare Abbauprodukte dieses Expressionsprodukts (s. Abb. 2.3.). Auch der gereinigte hVMP3-N-Terminus wird mit großer Spezifität erkannt. Mit Präimmenserum konnte dagegen in keinem der Ansätze ein Antigen detektiert werden.

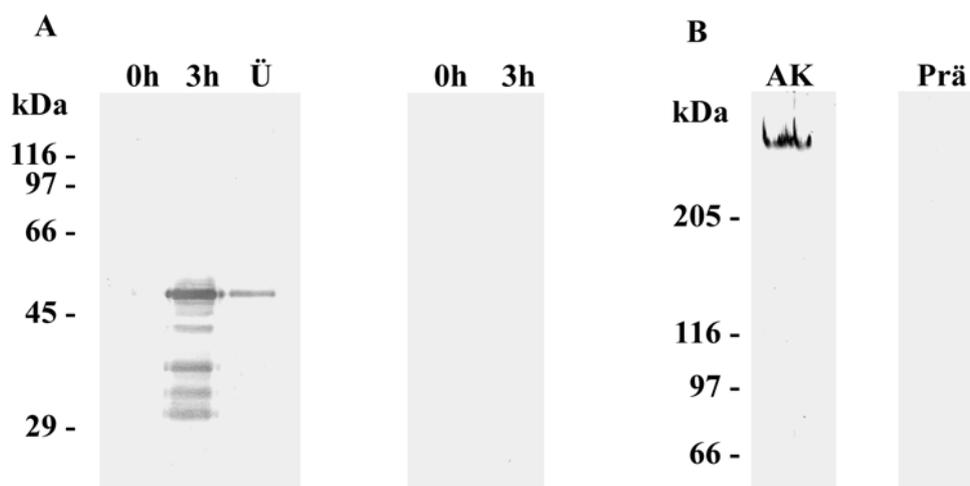


Abb. 2.3.: Test des anti-hVMP3-N-Terminus-Antikörpers, **A:** 10% SDS-PAG, Immunodetektion, Spur 1, 2, 4 und 5: Bakterienhitzelysate 0 h (Spur 1 und 4) bzw. 3 h (Spur 2 und 4) nach Start der Expression, Spur 3: gereinigter hVMP3-N-Terminus (Ü). Spur 1-3 detektiert mit anti-hVMP3-N-Terminus (1:2.500, Tier 1/Tag 85), Spur 4-5 mit Präimmenserum (1:2.500, Tier 1/Tag 1). **B:** 6% SDS-PAG, Immunodetektion, Spur 1 und 2: *Volvox*-Ultraschalllysat gesamt, 6 h nach Pheromonzugabe. Spur 1 detektiert mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (AK, 1:2.500, Tier 1/Tag 85), Spur 2 mit Präimmenserum (Prä, 1:2.500, Tier 1/Tag 1).

Wie bereits erwähnt, wird die Transkription der *VMP*-Genfamilie in *Volvox carteri* durch Zugabe des Sexualpheromons stimuliert. In früheren Untersuchungen konnte *VMP3*-mRNA in Northern-Blots 3-4 h nach der sexuellen Induktion nachgewiesen werden (PD Dr. A. Hallmann, pers. Mitteilung), das *VMP3*-Protein sollte demnach nach etwa 5 h in den Algen vorliegen. Tatsächlich erkennt der Antikörper gegen hVMP3-N-Terminus im Gegensatz zum Präimmenserum im Ultraschalllysat von Algen, die 6 h nach Pheromonzugabe geerntet wurden (s. Abb. 2.3.), ein Protein. Dabei handelt es sich um ein sehr hochmolekulares Signal, das verantwortliche Molekül läuft selbst im weitporigen SDS-PAG kaum ins Trenngel ein. Die cDNA von *VMP3* codiert dagegen für ein Protein mit nur etwa 70 kDa (666 AS), das *VMP3*-Protein ist also posttranslational

stark modifiziert. Die Immunodetektion zeigte darüber hinaus keine weiteren Banden, die Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen der *VMP*-Familie blieben aus.

2.1.3. Lokalisierung von VMP3

Das *VMP3*-Gen enthält zwei Hinweise auf eine möglicherweise extrazelluläre Lokalisation des VMP3-Proteins: erstens können die Aminosäuren 1-21 als Signalpeptid zum Transport ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums dienen (McGeoch, 1985), und zweitens weist das Gen einen Bereich auf, der v.a. für Proline codiert. Dieser sogenannte Polyprolinbereich ist ein typisches Merkmal für Proteine aus der extrazellulären Matrix von *Volvox carteri* (Sumper & Hallmann, 1998). Durch Passage durch eine Spritzenkanüle und einige nachfolgende Reinigungsschritte lässt sich die extrazelluläre Matrix (ECM) sexuell induzierter *Volvox*-Sphäroide in drei Elemente zerteilen, nämlich in die innere Matrix ("deep zone", „Schlitzextrakt“), die äußere Zellhülle mit den somatischen Zellen ("somatic sheet") und die reproduktiven Zellen (Gonidien, s. 4.2.1.). Wie Abb. 2.4. zeigt, ist das VMP3-Protein wie erwartet extrazellulär lokalisiert. und zwar in der "deep zone" der Algen (s. Abb. 1.1.).

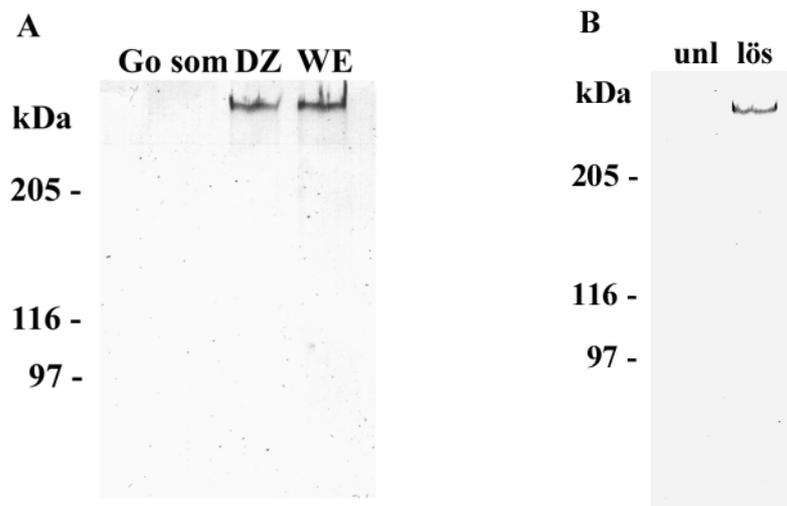


Abb. 2.4.: Lokalisierung von VMP3: **A:** 6% SDS-PAGE, Immunodetektion mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (1:2.500), Spuren 1-4: Fraktionierte *Volvox*-Sphäroide, 6 h nach Pheromonzugabe, Spur 1: Gonidien (Go), Spur 2: "somatic sheet" (som), Spur 3: "deep zone"-Extrakt (DZ), Spur 4: „Waschextrakt“ (WE). **B:** 6% SDS-PAGE, Detektion wie in **A**, unlöslicher (unl) und löslicher (lös) Anteil eines Ultraschalllysats ganzer Sphäroide, 6 h nach Pheromonzugabe.

Ein Teil der "deep zone"-Proteine haftet aber in der Regel noch an der äußeren Zellhülle an, kann aber durch mehrmaliges Waschen mit *Volvox*-Medium vollständig abgewaschen werden, ohne dabei die somatischen Zellen zu lysieren („Waschextrakte“, s. Abb. 2.4.). Bei "deep-zone"-Extrakten ist im Western-Blot ein vom VMP3-Signal ausgehendes „Schmier“ hin zu

niedermolekularen Proteingrößen zu beobachten. Dabei handelt es sich vermutlich um weniger stark glykosylierte Varianten von VMP3.

Wird das Ultraschalllysate sexuell induzierter, ganzer Algen durch Zentrifugation in seine löslichen und unlöslichen Bestandteile aufgeteilt, kann VMP3 nur in der löslichen Fraktion detektiert werden (s. Abb. 2.4.). Bei VMP3 handelt es sich also um ein lösliches Protein aus der "deep zone" von *Volvox carteri*.

Eine genauere Untersuchung der Lokalisation von VMP3 innerhalb der "deep zone" durch Immunogoldmarkierung des Proteins und anschließender Analyse mittels Transmissions-elektronenmikroskopie wurde freundlicherweise von PD Dr. A. Hallmann durchgeführt (nach Hallmann & Kirk, 2000). Das Protein konnte aber keiner distinkten Zone der ECM zugeordnet werden. Dies legt den Schluss nahe, dass VMP3 in der "deep zone" nicht an bestimmten Stellen konzentriert vorliegt, sondern gleichmäßig über die gesamte innere Matrix verteilt ist.

2.1.4. Analyse der VMP3-Expression

Bei den Mitgliedern der *VMP*-Familie handelt es sich um Gene, deren Transkription durch den Sexualinduktor kontrolliert wird, d.h. die Genexpression findet erst nach Zugabe des Pheromons statt oder wird zumindest erheblich gesteigert. Eine genaue Analyse der *VMP3*-Expression durch RT-PCR über Intron 1 und 2 (ON 14372, im Promotorbereich und ON 14369, s. 6.3.) und Immunodetektion im Western-Blot mit dem anti-hVMP3-N-Terminus-Antikörper zeigte, dass in vegetativ wachsenden Algen - wenn auch nur in geringem Maße - eine Transkription und Translation des Gens stattfindet (s. Abb. 2.5.). In manchen Fällen war aber in vegetativen Algen mit der RT-PCR-Technik gar kein Transkript nachzuweisen. Nach sexueller Induktion wird die Transkriptionsrate schon nach 90 min deutlich gesteigert und die mRNA-Menge bleibt über den beobachteten Zeitraum (18 h) konstant auf diesem hohem Niveau; die mRNA-Menge des *actin*-Gens als Kontrolle änderte sich dagegen nicht (Cresnar et al., 1990). Parallel dazu wird eine immer größere Menge von VMP3-Protein in die ECM eingebaut, die Menge in vegetativ wachsenden Algen bleibt dagegen nahezu konstant. Eine Steigerung der Proteinmenge ist im Vergleich zur Transkription aber erst relativ spät, d.h. nach 6 h deutlich zu erkennen. Ursache dafür ist die Tatsache, dass die Pheromonzugabe während der Dunkelphase des Lichtzyklus (um 17⁰⁰ Uhr) erfolgte, und *Volvox carteri* zu diesem Zeitpunkt zwar mRNA bildet, die Translation aber stark verlangsamt ist (Kirk & Kirk, 1983). Erst mit dem Einsetzen der Lichtphase (um 20⁰⁰ Uhr) kann eine effiziente Umsetzung der gebildeten mRNA erfolgen. Unabhängig vom Entwicklungsstadium der Algen zum Zeitpunkt der Pheromonzugabe ergab sich ansonsten aber immer die gleiche Expressionskinetik, ebenso konnte kein Unterschied bei der Verwendung von in *Saccharomyces cerevisiae* heterolog exprimierten und aus *Volvox carteri* gereinigten Induktor festgestellt werden.

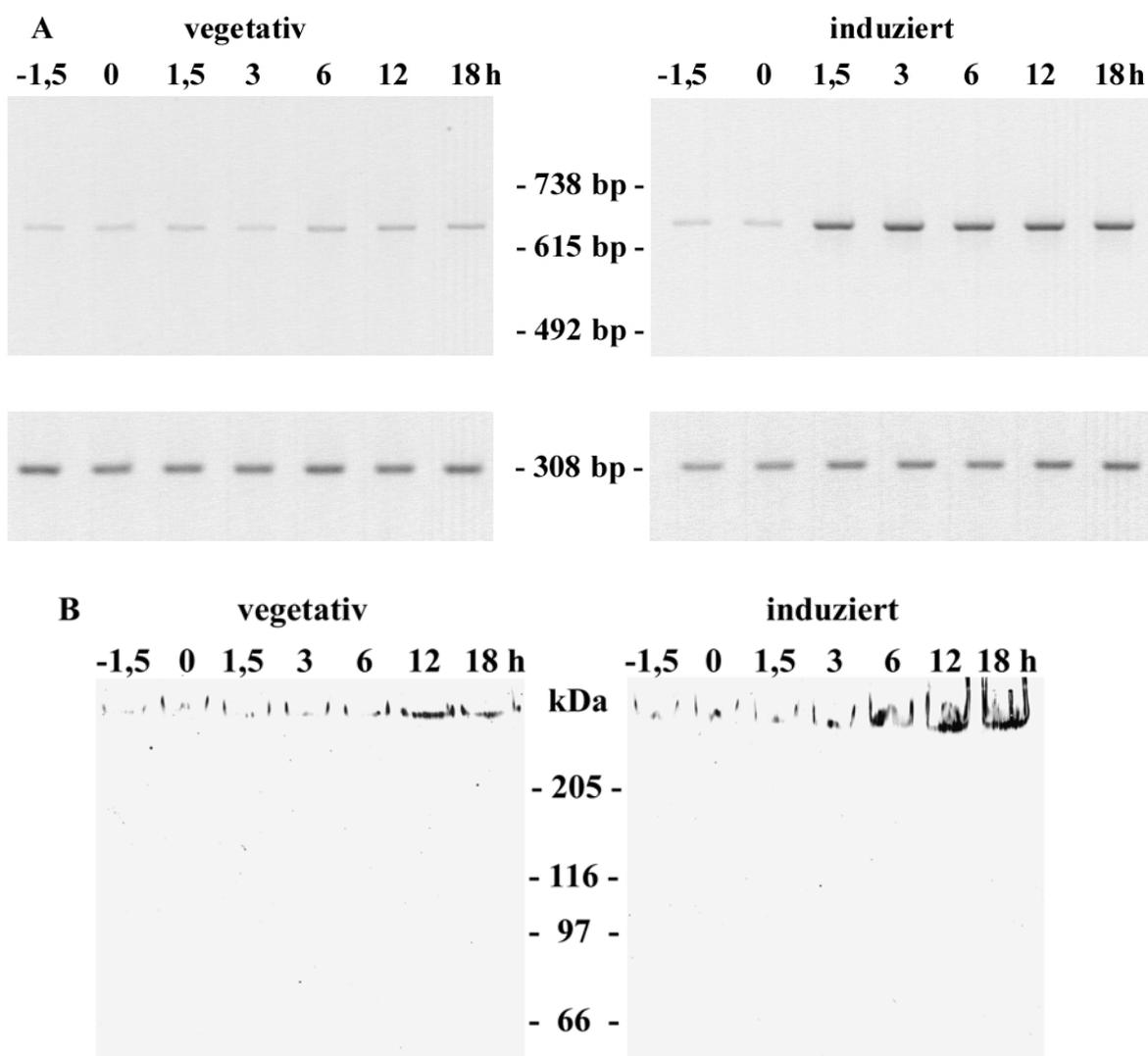


Abb. 2.5.: Expressionskinetik von *VMP3* nach Zugabe des Sexualpheromons: **A:** 1% Agarosegel, inverse Darstellung. Nachweis von *VMP3*-mRNA durch RT-PCR mit ON 14372 und ON 14369 (641 bp, über Intron 1 und 2, obere Bildhälfte) in vegetativ wachsenden (linke Bildhälfte) und sexuell induzierten Algen (rechte Bildhälfte), und von *actin*-mRNA als Kontrolle (308 bp, untere Bildhälfte). **B:** 6% SDS-PAG, Immunodetektion mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (1:2.500). Löslicher Anteil von Ultraschalllysaten ganzer, vegetativ wachsender (linke Bildhälfte) und sexuell induzierter Algen (rechte Bildhälfte). In die RT-PCR und den Western-Blot wurden jeweils Lysate aus derselben Anzahl Algen eingesetzt. Die angegebenen Zahlen der Bildüberschriften repräsentieren die Zeit in Stunden seit Pheromonzugabe.

Wie frühere Experimente zeigten, werden viele sexuell induzierbare Gene von *Volvox carteri* auch auf mechanischen Stress hin exprimiert, z.B. indem man die Sphäroide durch Passage über eine Spritzenkanüle verletzt (Amon et al., 1998). Dabei entstehen zwar größere Risse in der somatischen Zellhülle, der Organismus als solcher bleibt jedoch erhalten. Auch die Transkription von *VMP3* kann durch Verletzung der Algen induziert werden und erreicht ein Niveau, wie es auch nach Zugabe des Sexualpheromons zu beobachten sind (s. Abb. 2.6.).

Derselbe Effekt tritt auf, wenn man einen kleinen Teil der somatischen Zellhülle der Sphäroide mit einer mikrochirurgischen Schere entfernt, einer Methode, die auch bei höheren Pflanzen typische Verwundungsreaktionen hervorruft (freundlicherweise von PD Dr. A. Hallmann durchgeführt). Alle frühen Antworten auf das Sexualpheromon auf Transkriptionsebene finden in den somatischen Zellen statt (Amon et al., 1998), in den Gonidien, dem eigentlichen Ziel der sexuellen Induktion, konnten noch keine Veränderungen in der Genexpression identifiziert werden (Dr. P. Amon, pers. Mitteilung). Wie erwartet, konnte eine Transkription von *VMP3* ausschließlich in den somatischen Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 2.6.).

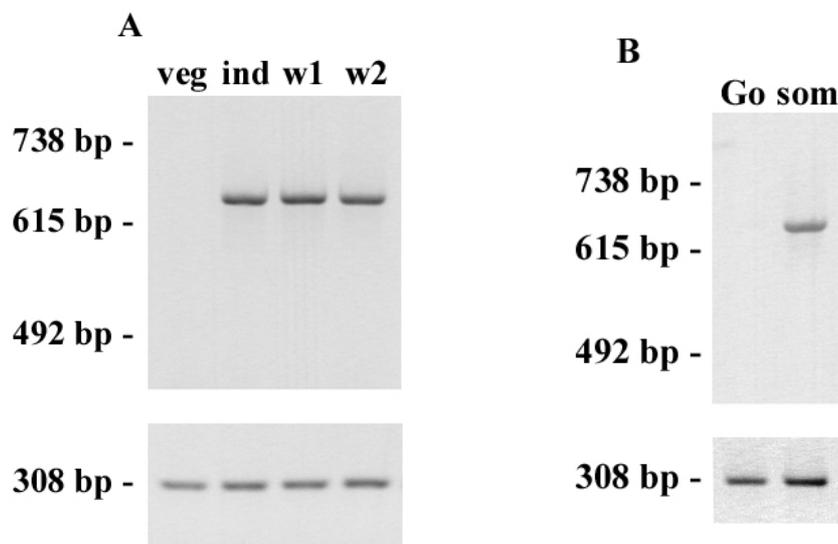


Abb. 2.6.: Nachweis der *VMP3*-Expression nach Verletzung und des Ortes der Transkription mit RT-PCR (s. Abb. 2.6.): **A:** 1% Agarosegel, inverse Darstellung, Spur 1: vegetative Algen (veg), Spur 2: Algen 1 h nach Pheromonzugabe (ind), Spur 3: Algen 1 h nach Verletzung mit einer Spritzenkanüle (w1), Spur 4: Algen 1 h nach Verletzung mit einer mikrochirurgischen Schere (w2). In die RT-PCR wurden jeweils Lysate aus derselben Anzahl Algen eingesetzt. **B:** 1% Agarosegel, inverse Darstellung, Spur 1: Gonidien (Go), Spur 2: somatische Zellen (som).

2.1.5. Präparative Reinigung von *VMP3*

Zur Reinigung von *VMP3* wurde der weibliche Stamm *Volvox carteri* HK 10 im Großmaßstab in 20 l-Kulturgefäßen gezogen, und zum Zeitpunkt des "Release" mit dem Sexualpheromon versetzt (s. Abb. 1.2.). Nach etwa 16 h erfolgte die Ernte der Algen (im Entwicklungsstadium der Embryogenese) über ein engmaschiges Nyllonsieb und das Aufbrechen der Sphäroide mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators. Durch Zentrifugation konnte dann der klare, stark viskose "deep zone"-Extrakt (sogenannter „Schlitzextrakt“) von den Sphäroidresten abgetrennt werden. Diese wurden anschließend noch drei- bis viermal mit *Volvox*-Medium gewaschen, da auch die resultierenden klaren „Waschextrakte“ noch Proteine der "deep zone" enthalten (s. Abb. 2.4.).

Durch Analyse im Western-Blot konnten alle Extrakte mit VMP3 identifiziert werden, und wurden zur weiteren Reinigung vereinigt.

Da bereits bekannt war, dass die meisten Proteine aus der ECM von *Volvox carteri* bei leicht basischen pH-Werten eine negative Ladung tragen (PD Dr. A. Hallmann, pers. Mitteilung), wurden zur weiteren Reinigung zwei Chromatographieschritte an Anionenaustauschern gewählt. Zunächst wurden die vereinigten *Volvox*-Extrakte bei 4°C auf eine QAE-Sephadex A25-Säule aufgetragen und mit 50 mM Tris/HCl pH 9,0 mit 10 mM NaCl gewaschen. Die Elution erfolgte dann mit einem Stufengradienten steigender Salzkonzentration (100-500 mM NaCl) in 50 mM Tris/HCl pH 9,0. Eine nachfolgende Untersuchung von Aliquots der Chromatografiefraktionen im Western-Blot zeigte, dass wie erwartet das gesamte VMP3 der *Volvox*-Extrakte an den Ionenaustauscher binden konnte, und fast vollständig in der 100 mM NaCl-Fraktion wieder eluierte (s. Abb. 2.7.).

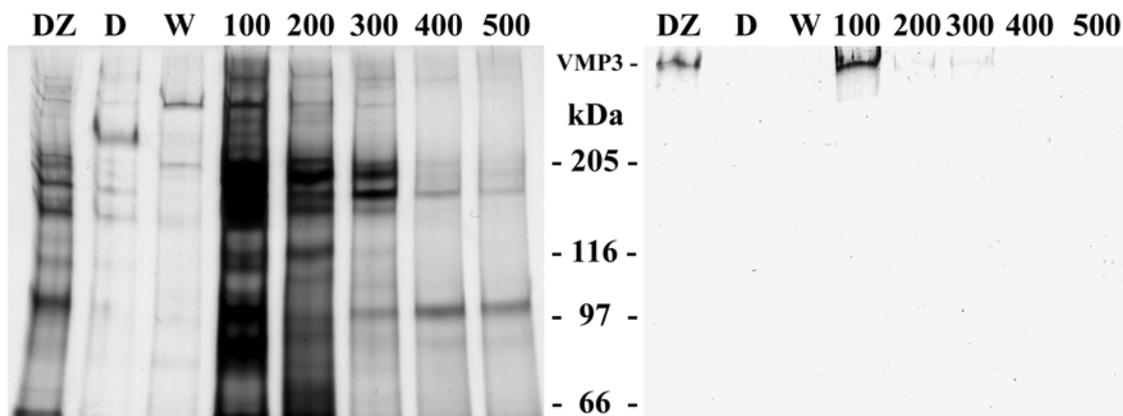


Abb. 2.7.: Reinigung von VMP3 an QAE-Sephadex A25: 6% SDS-PAG, Silberfärbung (linkes Gel) bzw. Immunodetektion mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (1:2.500, rechtes Gel)). Bei allen Proben war eine Aufkonzentrierung der Proteine durch Fällung mit TCA nötig. Spur 1: 200 µl TCA-gefällter "deep zone"-Extrakt (DZ), Spur 2-8: TCA-gefällte 1 ml-Aliquots der Chromatographie: Spur 2: Durchlauf (D), Spur 3: Waschfraktion (W), Spur 4: 100 mM NaCl-Eluat (100), Spur 5: 200 mM NaCl-Eluat (200), Spur 6: 300 mM NaCl-Eluat (300), Spur 7: 400 mM NaCl-Eluat (400), Spur 8: 500 mM NaCl-Eluat (500).

Geringere VMP3-Mengen konnten erst mit 200 bzw. 300 mM NaCl von der Säule gewaschen werden. Auch der Großteil des Gesamtproteins befand sich in der Fraktion mit VMP3 (s. Abb. 2.7.), so dass dem Signal im Western-Blot noch keine Bande im silbergefärbten SDS-PAG zugeordnet werden konnte, und weitere Reinigungsschritte unabdingbar waren.

Deswegen wurde die 100 mM NaCl-Fraktion mit VMP3 nach Dialyse gegen 20 mM Tris/HCl pH 8,2 mit 10 mM NaCl und anschließender Zentrifugation in einer HPLC bei RT auf eine Uno Q1R-Säule der Fa. Bio-Rad aufgetragen. Dabei konnte fast die gesamte Menge an VMP3 vom Anionenaustauscher gebunden werden, nur kleinere Mengen befanden sich im Durchlauf oder eluierten schon durch Waschen mit Startpuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,2 mit 10 mM NaCl, s. Abb. 2.8.).

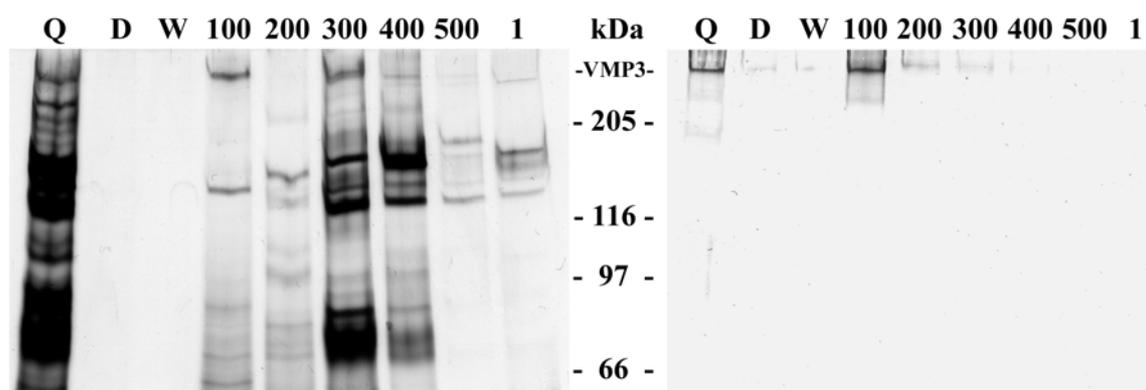


Abb. 2.8.: Reinigung von VMP3 mit der Uno Q1R-Säule: 6% SDS-PAG, Silberfärbung (linkes Gel) bzw. Immunodetektion mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (1:2.500, rechtes Gel). Bei allen Proben war eine Aufkonzentrierung der Proteine durch Fällung mit TCA nötig. Spur 1: 500 μ l, TCA-gefällte 100 mM NaCl-Fraktion der QAE-Sephadex-Chromatographie (Q), Spur 2-9: TCA-gefällte 1 ml-Aliquots der HPLC: Spur 2: Durchlauf (D), Spur 3: Waschfraktion (W), Spur 4: 100 mM NaCl-Eluat (100), Spur 5: 200 mM NaCl-Eluat (200), Spur 6: 300 mM NaCl-Eluat (300), Spur 7: 400 mM NaCl-Eluat (400), Spur 8: 500 mM NaCl-Eluat (500), Spur 9: 1 M NaCl-Eluat (1).

Schon bei einer Erhöhung der Salzkonzentration auf 100 mM eluierte VMP3 nahezu vollständig von der Säule, kleinere Mengen waren in den beiden folgenden Fraktionen des Stufengradienten (200 und 300 mM NaCl) zu detektieren. Im Western-Blot war auch der schon in den "deep zone"-Extrakten vorhandene vom VMP3-Signal ausgehende „Schmier“ zu erkennen. Bei der Analyse der 100 mM NaCl-Fraktion im SDS-PAG mit nachfolgender Silberfärbung erschien auf Höhe des VMP3-Signals im Western-Blot eine relativ separat liegende Bande (s. Abb. 2.8.), die in den anderen Fraktionen nicht auftrat. Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich dabei um das gesuchte, von *VMP3* codierte Protein handelte.

Als nächster Reinigungsschritt empfahl sich die präparative Auftrennung auf einem SDS-PAG mit nachfolgender Gelelektion. Dazu wurde die 100 mM NaCl-Fraktion der HPLC zuerst erschöpfend gegen Reinwasser dialysiert, mittels Gefriertrocknung aufkonzentriert und dann auf ein 5% SDS-PAG aufgetragen. Anschließend wurde der Bereich auf Höhe der oben beschriebenen Bande aus dem Gel ausgeschnitten und dann einer Gelelektion unterzogen. Bei der Analyse des Eluats im Western-Blot und durch Silberfärbung eines SDS-PAG zeigte sich, dass das ausgeschnittene Protein wie erwartet für das Immunsignal verantwortlich war, und bis zur Homogenität gereinigt werden konnte (s. Abb. 2.9.). Der Versuch dieses hochmolekulare Protein durch Ansequenzieren seines N-Terminus eindeutig als VMP3 zu identifizieren war jedoch nicht erfolgreich, möglicherweise interferierten die im Molekül vielfach vorhandenen Zuckerreste mit den Sequenzierreaktionen (s. 2.1.6.2.).

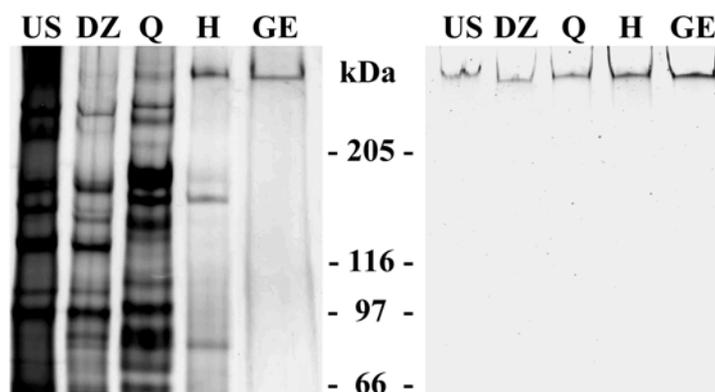


Abb. 2.9.: Reinigung von VMP3: 6% SDS-PAGE, Silberfärbung (linkes Gel) bzw. Immunodetektion mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (1:2.500, rechtes Gel), Spur 1: Ultraschalllysat ganzer Algen als Vergleich (US), Spur 2: "deep zone"-Extrakt (DZ), Spur 3: 100 mM NaCl-Fraktion der QAE-Sephadex-Chromatographie (Q), Spur 4: 100 mM NaCl-Fraktion der Uno Q1R-HPLC (H), Spur 5: Eluat nach präparativer SDS-PAGE (GE). Aufgetragen sind jeweils entsprechende mit TCA gefällte Volumina der einzelnen Reinigungsschritte.

In Abb. 2.10. ist schematisch der Verlauf der gesamten Reinigung des VMP3-Proteins dargestellt. Zu analytischen Zwecken konnte VMP3 auch durch fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (präzipitiert bei 75%, aber nicht bei 30% Sättigung) und nachfolgender Gelfiltration mit einer Superose 12/HR 10/30-Säule (Fa. Pharmacia) angereichert werden (nicht gezeigt). Der Reinigungserfolg entsprach dabei in etwa dem der Anionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex A25, die Gelfiltration war aber aufgrund des geringen maximalen Auftragsvolumens von 200 µl für eine Reinigung im Großmaßstab nicht praktikabel.

2.1.6. Biochemische Charakterisierung von gereinigten VMP3

2.1.6.1. Bestimmung der apparenten molekularen Masse von VMP3

Die Tatsache, dass VMP3 selbst im weitporigen SDS-PAGE mit einer Acrylamidkonzentration von nur 5 % kaum ins Trenngel einläuft, macht eine exakte Bestimmung seiner molekularen Masse mit dieser Methode schwierig. Die Fa. Sigma bietet einen Molekulargewichtsstandard aus chemisch z.T. mehrfach quervernetzten Phosphorylase b-Molekülen (97 - 584 kDa) an, in einer SDS-PAGE nach Laemmli weisen diese Proteine aber kein zur molekularen Masse proportionales Laufverhalten auf. Deshalb wurde zur Ermittlung der molekularen Masse von VMP3 eine SDS-PAGE nach Davies und Stark (1979) verwendet, auf dem für sehr große Proteine die notwendige Proportionalität von Molekulargewicht und Mobilität gegeben ist. Dabei erfolgte die Polymerisation des Gels (4% Acrylamid) und die Elektrophorese in einem Phosphatpuffer mit pH 7,0, auf die Verwendung eines Zweipuffersystems und auf ein Sammelgel wurde verzichtet.

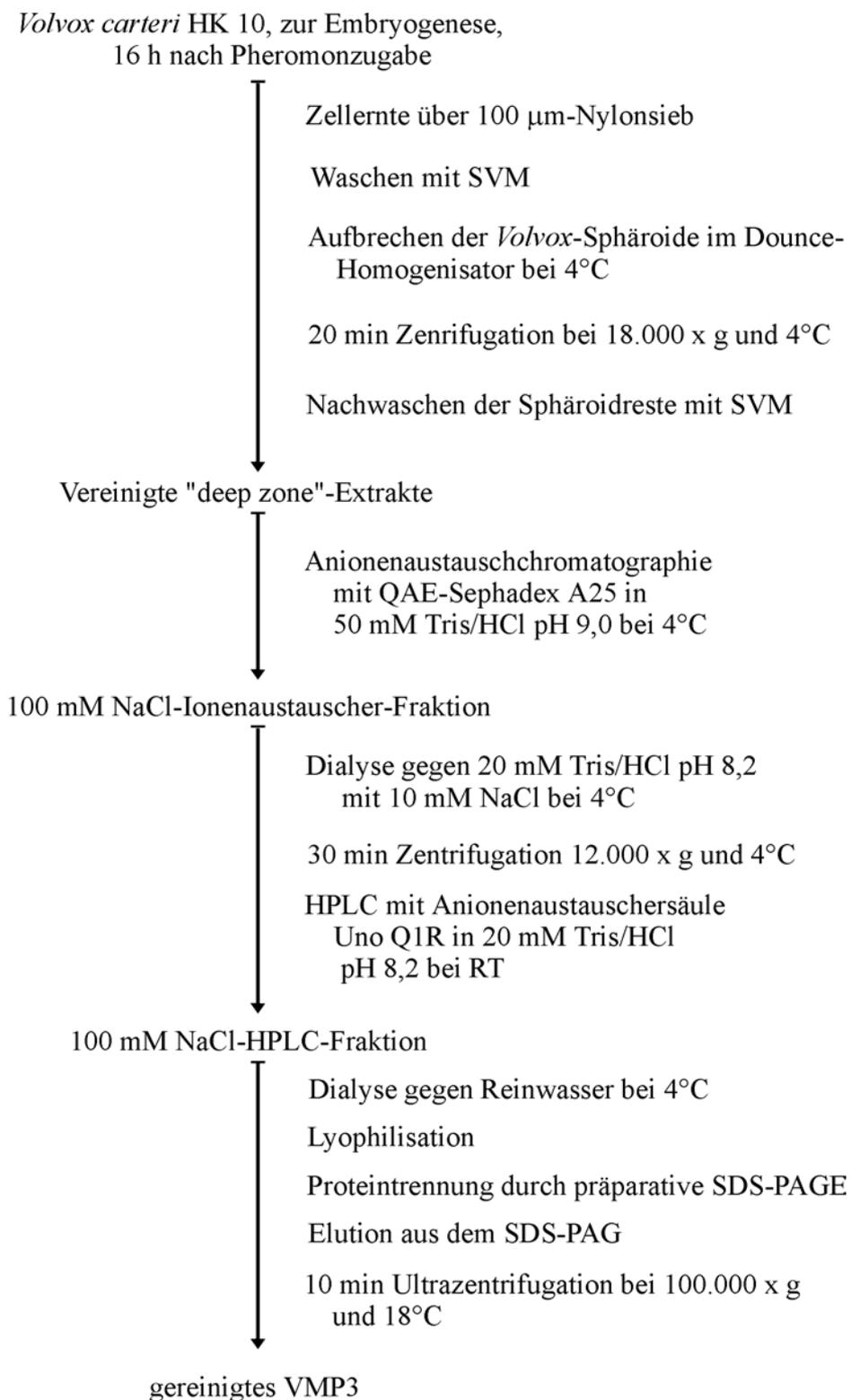


Abb. 2.10.: Reinigungsschema zur präparativen Reinigung von VMP3.

Nach Elektrophorese und anschließendem Western-Blotting konnte für VMP3 eine apparente molekulare Masse von etwa 470 kDa ermittelt werden (s. Abb. 2.11.). Der Wert weicht enorm von der aus der *VMP3*-cDNA ermittelten, erwarteten Masse von 70 kDa ab und ist wahrscheinlich auf eine starke Glykosylierung der hydroxylierten Proline des prolinreichen Bereichs zurückzuführen. Dieser erstreckt sich im VMP3-Protein über 207 Aminosäuren und weist 140 Proline auf.

2.1.6.2. Deglykosylierung von VMP3 mit Fluorwasserstoff

Um zu prüfen, ob das hochmolekulare Laufverhalten von VMP3 tatsächlich auf die vermutete starke Glykosylierung des Proteins zurückzuführen ist, wurde gereinigtes und salzfreies VMP3 bei 4°C mit frisch destilliertem Fluorwasserstoff versetzt. Dadurch wurden sämtliche Zuckerreste im Protein abgespalten, die Polypeptidkette wurde jedoch nicht angegriffen. Nach Aufarbeitung der Probe war bei der Immunodetektion im Western-Blot ein Signal bei etwa 120 kDa zu erkennen (s. Abb. 2.11.). Dieser Wert ist zwar immer noch größer als der aus der cDNA ermittelte Wert (70 kDa), kann aber durch den hohen Prolingehalt der Primärsequenz (26%) erklärt werden. Prolinreiche Proteinbereiche lagern weniger SDS an und zeigen deswegen bei einer elektrophoretischen Wanderung zur Anode eine geringere Mobilität als es aufgrund der berechneten Molekülmasse zu erwarten ist (Andres et al., 1993).

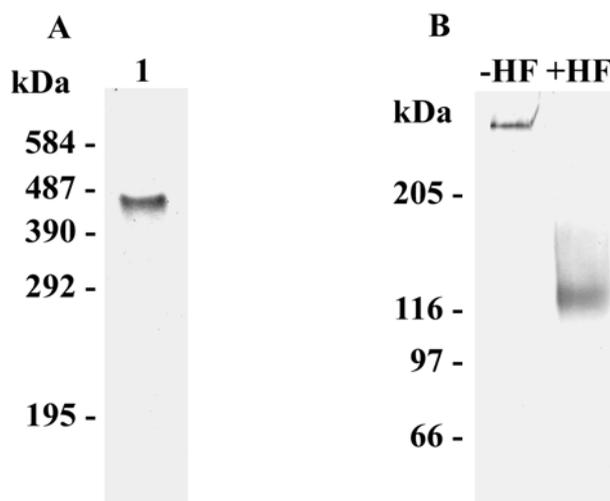


Abb. 2.11.: Molekularmassenbestimmung und Deglykosylierung von VMP3: **A:** 4% SDS-PAG nach Davies und Stark (1979), Immunodetektion mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (1:2.500). Spur 1: gereinigtes VMP3, **B:** 6% SDS-PAG, Immunodetektion mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (1:2.500), Spur 1: VMP3 vor Deglykosylierung mit Fluorwasserstoff (-HF), Spur 2: VMP3 nach Deglykosylierung mit Fluorwasserstoff (+HF).

2.1.6.3. Bestimmung der N-terminalen Sequenz von VMP3

Ein erster Versuch das gereinigte VMP3-Protein N-terminal anzusequenzieren schlug fehl, was durch die starke Glykosylierung des Proteins zu erklären war (s. 2.1.6.2.). Um dieses Problem zu umgehen, wurde eine 100 mM NaCl-Fraktion der HPLC-Anionenaustauschchromatographie (s. 2.1.5.) mit etwa 5 µg VMP3-Protein erschöpfend gegen Reinwasser dialysiert, lyophilisiert und zur Abspaltung der Zuckerreste mit Fluorwasserstoff inkubiert (s. 2.1.6.2.). Nach Auftrennung der Probe auf einem 6% SDS-PAG und Blotten auf eine PVDF-Membran konnte auf Höhe des Immunosignals des deglykosylierten VMP3 bei 120 kDa (s. 2.1.6.2.) mit Coomassie eine Proteinbande angefärbt werden. Diese wurde ausgeschnitten und mit automatisierten Edmannabbau N-terminal ansequenziert. Dabei ergab sich über neun Zyklen hinweg eine Doppelsequenz, die mit freundlicher Unterstützung von Prof. R. Deutzmann der *VMP3*-cDNA folgendermaßen zugeordnet werden konnte (Abb. 2.12.):

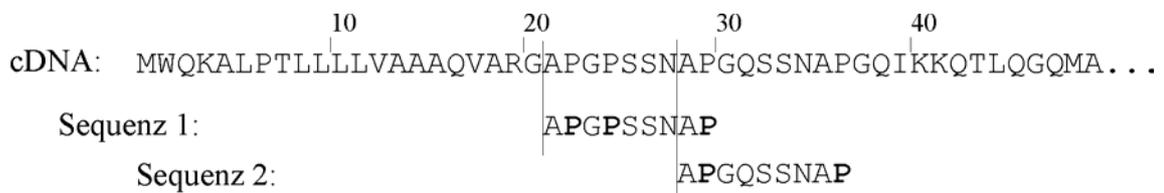


Abb. 2.12.: Ergebnis der N-terminalen Sequenzanalyse von deglykosylierten VMP3: Es konnten zwei nahezu identische N-Termini ansequenziert werden, so dass in *Volvox carteri* vermutlich sowohl AS 1-21 als auch AS 1-28 als Signalpeptid dienen. Sequenz 1 entspricht dem vorhergesagten N-Terminus (McGeoch, 1985). Bei allen in der Sequenzanalyse bestimmten Prolinresten handelt es sich um Hydroxyproline (**P**).

Bei dem gereinigten Protein handelt es sich also eindeutig um das von *VMP3*-Gen codierte Protein. Im VMP3-Protein liegen aber zwei Varianten mit zwei nahezu identischen N-Termini vor, die Signalpeptidase von *Volvox carteri* scheint also in der Primärsequenz zwei Schnittstellen zu erkennen. Da beide N-Termini mit denselben drei Aminosäuren (APG) beginnen und dieses Motiv kurz darauf nochmals auftritt (AS 36-38, s. Abb. 2.12.), kann spekuliert werden, ob es sich hier um eine Art Adressenwiederholung handelt, um eine fehlerlose Translokation der Polypeptidkette ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums zu gewährleisten.

Aufgrund seiner Homologie zu bekannten Metalloproteinasen hätte man erwarten können, dass auch das VMP3-Protein eine sogenannte Prosequenz trägt, nach deren Abspaltung manche Metalloproteinasen erst vollständig prozessiert und enzymatisch aktiv sind (Nagase & Woessner, 1999). Dies ist jedoch bei VMP3 nicht der Fall.

Bei der Sequenzanalyse fiel außerdem auf, dass die vier in der cDNA codierten Proline im gereinigten Protein als Hydroxyproline vorliegen. Dies ist für ECM-Proteine aus *Volvox carteri* nicht ungewöhnlich, Hydroxyproline wurden bisher aber nur in den sogenannten (hydroxy-)

prolinreichen Domänen dieser Proteine gefunden, nicht aber in anderen Proteinbereichen (PD Dr. A. Hallmann, pers. Mitteilung).

2.1.7. Nachweis einer enzymatischen Aktivität von VMP3 in einem In-Gel-Assay

Der N-terminale Bereich aller Mitglieder der *VMP*-Familie weist Homologie zu Zn^{2+} -abhängigen Metalloproteinasen auf. Anstatt aber das für Matrix-Metalloproteinasen typische, konservierte HExxHxxGxxH-Metall-Bindemotiv zu codieren, weisen die Gene aus *Volvox* an der entsprechenden Stelle eine Gensequenz für QExxHxxGxxH auf.

Verschiedene Versuche für den in *E. coli* exprimierten proteasehomologen Bereich von *VMP3* eine enzymatische Aktivität nachzuweisen, führten jedoch zu keinem positiven Ergebnis (s. 2.1.1.). Im Rahmen dieser Untersuchungen fanden auch sogenannte In-Gel-Assays Verwendung. Dabei handelt es sich um SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli, die in Anwesenheit eventueller Enzymsubstrate polymerisiert werden. Dadurch werden die Substrate mit ins Gel eingebaut, und laufen in der folgenden Elektrophorese nicht mehr aus. Nach der elektrophoretischer Auftrennung der Proteinlösung kommt ein Enzym gemäß seiner molekularen Masse im Gel zu liegen, und kann durch Inkubation in geeigneten Puffersystemen, die das proteingebundene SDS auswaschen, an genau dieser Stelle wieder seine native Faltung und Aktivität zurückerlangen, und das eingegossene Substrat umsetzen. So lassen sich auch in komplexen Proteingemischen Enzyme detektieren und, falls ihr Molekulargewicht bekannt ist, auch eindeutig identifizieren.

Zum Nachweis einer Proteaseaktivität für *VMP3* wurden deshalb im folgenden SDS-PAGs mit 8% Acrylamid und 0,2% Gelatine als Substrat verwendet. Im Gegensatz zum Standardprotokoll wurde auf das Aufkochen der Proben vor Auftrag auf das Gel verzichtet, um eine irreversible Denaturierung zu vermeiden. Ebenso fehlten im Probenpuffer reduzierende Reagenzien, damit es im extrazellulären *VMP3*-Protein nicht zum Aufbrechen von möglicherweise vorhandenen Disulfidbrücken kommt. Nach dem Gellauf erfolgte die Inkubation des Gels bei 28°C in *Volvox*-Medium mit 1% Triton X-100, wobei dieses Detergenz das Wegwaschen des SDS erleichtern sollte. Falls aktive Proteasen die eingegossene Gelatine verdauen konnten, wurden die entstandenen niedermolekularen Fragmente ebenfalls aus dem Gel gewaschen. Bei einer nachfolgenden Behandlung des Gels mit Coomassie färbte sich aufgrund der vorhandenen Gelatine das gesamte Gel tiefblau, außer an den Stellen, an denen ein Verdau stattgefunden hat, d.h. an denen nach der Elektrophorese Proteasen zu liegen kamen. In Abb. 2.13. ist die Analyse der einzelnen Reinigungsschritte von *VMP3* in einem In-Gel-Assay dargestellt. (Aufgrund einer besseren Auswertbarkeit der Signale wurde immer das Negativ verwendet):

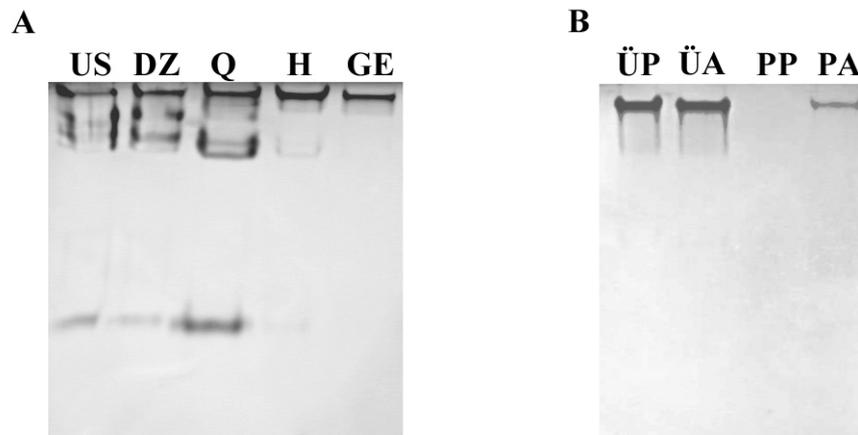


Abb. 2.13.: Analyse der Reinigung und der Immunopräzipitation von VMP3 in einem In-Gel-Assay: **A:** 8% In-Gel-Assay, Coomassiefärbung, inverse Darstellung. Spur 1: Ultraschalllysat ganzer Sphäroide (US), Spur 2-5: entsprechende Volumina der einzelnen Reinigungsschritte von VMP3, Spur 2: "deep zone"-Extrakt (DZ), Spur 3: 100 mM NaCl-Fraktion der Reinigung an QAE-Sepharose (Q), Spur 4: 100 mM NaCl-Fraktion der HPLC (H), Spur 5: geleluertes VMP3 (GE). **B:** 8% In-Gel-Assay, inverse Darstellung. Spur 1 und 2: Überstände der Immunopräzipitation (ÜP bzw. ÜA), Spur 3 und 4: Immunopräzipitat (PP bzw. PA), Spur 1 und 3: mit Präimmenserum (ÜP und PP), Spur 2 und 4: mit Antikörperserum gegen hVMP3-N-Terminus (ÜA und PA). (Die Proteintrennung auf diesem Gel wurde nach Auslaufen der Bromphenolblaubande noch für 4 h fortgesetzt).

Wie deutlich zu erkennen ist, kommen im Ultraschalllysat sexuell induzierter Algen mehrere Proteasen vor, die im In-Gel-Assay Gelatine als Substrat umsetzen können. Polymerisiert man stattdessen Casein mit ins Gel ein, so kann keine dieser Banden beobachtet werden, was auf eine gewisse Substratspezifität dieser Enzyme hindeutet. Alle Proteasen befinden sich darüber hinaus in der "deep zone" der ECM. In allen Schritten der Reinigung von VMP3 tritt auch immer eine sehr hochmolekulare Protease auf, deren Laufverhalten in etwa dem des identifizierten VMP3-Proteins entspricht. Bei den In-Gel-Aktivitätstest kann die Acrylamidkonzentration der Gele nicht unter 8% gesenkt werden, da dann ein effizienter Einschluss des Substrates während der Inkubation nicht mehr möglich ist. Eine eindeutige Zuordnung der proteolytischen Aktivität zum gereinigtem VMP3 war daher nicht möglich, zumal in diesen Tests schon Nanogrammmengen an Protein detektiert werden können, die mit einer einfachen Proteinfärbung nicht nachzuweisen sind.

Deswegen wurde versucht das VMP3-Protein mit Hilfe der anti-hVMP3-N-Terminus-Antikörper in einer Immunopräzipitation spezifisch zu fällen, und im Präzipitat die hochmolekulare Protease nachzuweisen. Die zunächst benutzte Protein-A-Sepharose erwies dabei aber als ungeeignet, da sehr viele *Volvox*-Proteine unspezifisch mitpräzipitiert wurden. Erst durch die Verwendung von mit anti-rabbit-IgG-Antikörper beschichteten, magnetisierbaren Dynabeads der Fa. Dynal ließ sich dieser Effekt vermeiden. Aus der eingesetzten Proteinlösung mit VMP3 (100 mM NaCl-Fraktion der HPLC, s. 2.1.5.) konnte die hochmolekulare Protease nur mit dem Antikörperserum gegen

heterolog exprimiertes VMP3 „gefischt“ werden, nicht aber mit dem Präimmunserum (s. Abb. 2.13.).

VMP3 besitzt also trotz seines atypischen Metall-Bindemotivs proteolytische Aktivität. Eine Aktivität in Lösung (Azokoll, BSA, Casein, Gelatine, Insulin und RNase A als Substrat) konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden.

2.1.8. Expression und Analyse von VMP3-Varianten mit verändertem Molekulargewicht in *Volvox carteri*

Wie unter 2.1.7. gezeigt, ist VMP3 in einem In-Gel-Assay mit Gelatine als Substrat proteolytisch aktiv. Das hochmolekulare Protein läuft bei diesem Aktivitätstest aber kaum ins Gel ein und kommt nahe der Grenze zum Sammelgel zu liegen, was eine genauere Analyse des Enzyms, z.B. durch Densitometrie erschwert. Darüber hinaus kann aber zum einen aus technischen Gründen die Porenweite des Aktivitätsgels nicht weiter erhöht werden, zum anderen konnte für VMP3 bislang in keinem anderen Test eine enzymatische Katalyse gezeigt werden. Eine heterologe Expression des Proteins wurde nicht in Betracht gezogen, weil bereits die Expression der N-terminalen Domäne in *E. coli* kein aktives Protein lieferte (s. 2.1.1.) und möglicherweise die posttranslationalen Modifikationen des Proteins (z.B. Prolinhydroxylierung, Glykosylierung, s. 2.1.6.) für die Katalyse unabdingbar sind, und nur in *Volvox carteri* selbst richtig durchgeführt werden können. Deshalb wurde versucht durch Verkürzen des Polyprolinbereichs des Proteins, der vermutlich nur strukturelle Eigenschaften besitzt und für die Katalyse nicht essentiell sein sollte, das Molekulargewicht des Protein deutlich zu verringern. Die Expression sollte homolog – also in *Volvox carteri* selbst - erfolgen. Das verkürzte aber aktive Protein könnte dann im In-Gel-Assay weiter ins Gel einwandern, und wäre so einer genaueren enzymatischen Analyse zugänglich. Gleichzeitig ließe sich das verkürzte Protein eindeutig vom „schwereren“ Wildtyp-VMP3 unterscheiden.

Ausgehend vom Wildtypgen *VMP3* wurden vier rekombinante Gene – *VMP3 α* , *VMP3 β* , *VMP3 γ* und *VMP3 δ* – hergestellt, die alle für ein im polyprolinreichen Bereich verkürztes VMP3-Protein codieren (s. Abb. 2.14.). Bei der Konstruktion von *VMP3 α* und *VMP3 β* fand eine in der Mitte der für den prolinreichen Bereich codierenden Sequenz liegende Aat II-Schnittstelle Verwendung: In einer PCR (PCR3 α bzw. PCR3 β) mit BlueII/22/3-Pst/1/"3" (s. Abb. 4.3) als Matrize wurde mit Hilfe von rekombinanten Oligonukleotiden (α : ON 14617, β : On 14618) und Vektorprimern (α : SK-Primer, β : universal) direkt vor Beginn (*VMP3 α*) bzw. sofort nach Ende (*VMP3 β*) der Polyprolin-domäne eine neue Aat II-Schnittstellen eingefügt.

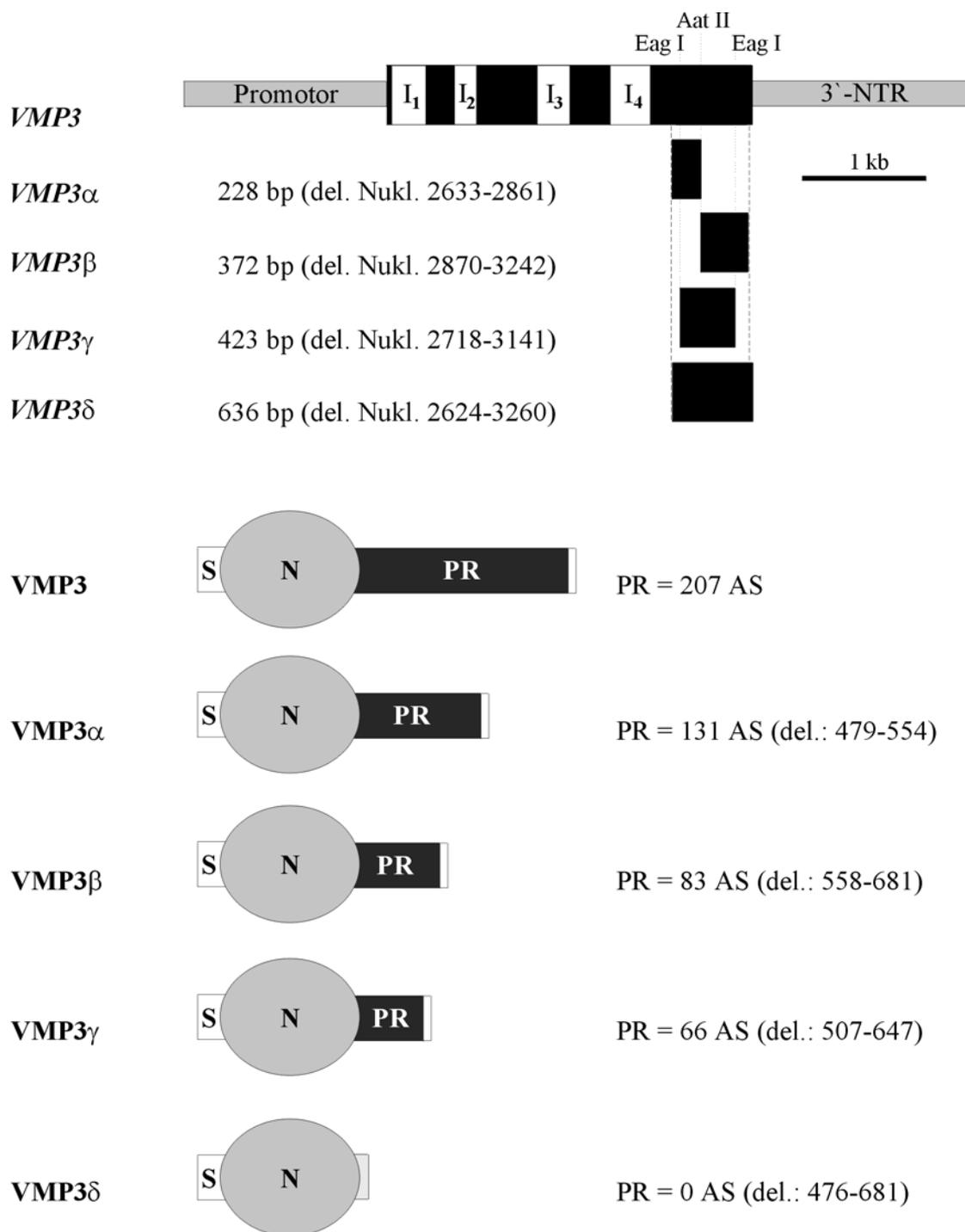


Abb. 2.14.: Schematische Darstellung der verkürzten *VMP3*-Varianten: Im oberen Teil ist das *VMP3*-Wildtypgen aus *Volvox carteri* mit den zur Klonierung wichtigen Restriktionsschnittstellen gezeigt, und der deletierte Genbereich der jeweiligen Variante angegeben (grau: Promotorregion und nicht-translatierte Regionen (NTR), schwarz: Exons, weiß: Introns I_x, Aat II: Nukl. 2868, Eag I: Nukl. 2718 und 3141). Im unteren Teil sind die resultierenden Proteine der *VMP3*-Varianten mit den verkürzten Polyprolinomänen dargestellt (weiß: Signalpeptid (S) und C-terminale AS, grau: N-terminale Proteasedomäne, dunkelgrau: Prolinreicher Bereich (PR), hellgrau: (Gly)₂-(His)₆-"tag"). Daneben sind die verbliebenen AS der Polyprolinomäne und in Klammern die Position der deletierten AS vermerkt. Im unveränderten Protein erstreckt sich der prolinreiche Bereich über 207 AS (476-682), im *VMP3*-Gen entsprechend über 621 bp (Nukl. 2624-3245, s. 6.2.).

Anschließend wurde ein entsprechendes Genstück aus dem Ursprungsplasmid BlueII/22/3-Pst1/"3" herausgeschnitten (α : Bam HI-Aat II, β : Aat II-Eco RI) und durch das PCR-Fragment ersetzt. Der somit verkürzte Genabschnitt wurde dann wieder zu einem vollständigen *VMP3*-Gen zusammengefügt (s. Abb. 4.3.). Zur Herstellung von *VMP3 γ* dienten zwei in der Polyprolindomäne liegende Eag I- Schnittstellen, die nach Herausschneiden eines 423 bp großen DNA-Stücks ohne Rasterverschiebung wieder religiert werden konnten, was zu einer Deletion von 141 Aminosäuren führte (s. Abb. 4.4.). Bei der *VMP3 δ* -Variante wurde durch rekombinante PCR nach Horton et al. (1989) der gesamte C-terminale Bereich von Beginn der prolinreichen Domäne an entfernt und durch einen (Gly)₂-(His)₆-"tag" zur späteren Reinigung des codierten Proteins versehen (s. Abb. 4.5.).

Ansonsten wurde darauf geachtet möglichst wenig Veränderungen im Vergleich zum Wildtypgen vorzunehmen, um eine effiziente Genexpression zu gewährleisten. Deshalb weisen alle *VMP3*-Varianten die Promotorsequenz (etwa 1,8 kb), alle vier Introns und die 3'-nicht-translatierte Region (etwa 2,2 kb) einschließlich des Polyadenylierungssignals (Nukl. 5441) des nativen *VMP3*-Gens auf.

Trotzdem wurden durch die zur Klonierung notwendigen PCRs ungewollt einige Punktmutationen eingeführt, die aber alle bis auf zwei in der 3'-nicht-translatierten Region liegen. Bei *VMP3 α* und *VMP3 β* wirkten sich diese beiden Veränderungen auch auf die Proteinsequenz aus (Position 430: Gly statt Val und Position 566: Pro statt Ala), die Gene wurden aber trotzdem weiterverwendet, da es sich nicht um Reste im aktiven Zentrum handelt.

Nach ihrer Fertigstellung wurden die entsprechenden Plasmide mit *VMP3 α* (pUC18/22/3-G2/1/"9"), *VMP3 β* (pUC18/22/3-G3/1/"3"), *VMP3 γ* (pUC18/22/3-KEag/1/"7") und *VMP3 δ* (pUC18/22/3-Ng/1/"17") zusammen mit dem zur Selektion nötigen Nitratreduktasegen in *Volvox carteri* Stamm 153-48 transformiert, der ohne eine funktionsfähige Nitratreduktase im Standard-*Volvox*-Medium nicht wachsen kann (Details s. 4.3.8.). Danach konnten bei *VMP3 α* (PDS-127) 19, bei *VMP3 β* (PDS-128) 14, bei *VMP3 γ* (PDS-126) 15 und bei *VMP3 δ* (PDS-123) 24 positive *Volvox*-Transformanden isoliert werden, die zumindest das kotransformierte Nitratreduktasegen enthielten. Keine der Transformanden zeigte bei der Untersuchung unter dem Stereomikroskop im Vergleich zur Wildtyp-Alge einen veränderten Phänotyp. Durch Analyse der genomischen DNA mittels PCR wurden anschließend diejenigen Transformanden gesucht, die auch die veränderten Gene durch heterologe Rekombination ins Genom integriert hatten. Für die Gene *VMP3 α* , *VMP3 β* und *VMP3 γ* mussten dafür die Oligonukleotide ON 14333 (in der 3'-nicht-translatierten Region, s. 6.3.) und das Vektoroligonukleotid "reverse" verwendet werden, da die Gene sich abgesehen von der Deletion im prolinreichen Bereich nicht vom Wildtypgen unterscheiden. Über diesen Bereich kann aber wegen des großen GC-Gehalts der DNA keine PCR geführt werden. *VMP3 δ* konnte dagegen mit den Oligonukleotiden ON 14367 (kurz vor dem deletierten Bereich) und ON 14346 (in

der 3'-nicht-translatierten Region) nachgewiesen werden, da der GC-reiche Bereich vollständig fehlt. Dabei erwiesen sich bei *VMP3 α* 11, bei *VMP3 β* 7, bei *VMP3 γ* 10 und bei *VMP3 δ* 14 der ursprünglichen Transformanden als positiv (s. Abb. 2.15.). Für drei Transformanden mit *VMP3 δ* konnte durch RT-PCR mit den Oligonukleotiden ON 14345 (vor Intron 4) und ON 14346 (s.o.) auch eine Transkription des rekombinanten Gens nachgewiesen werden (s. Abb. 2.15.). Eine Analyse der anderen *VMP3*-Varianten mit RT-PCR war aus den bereits erwähnten Gründen nicht möglich.

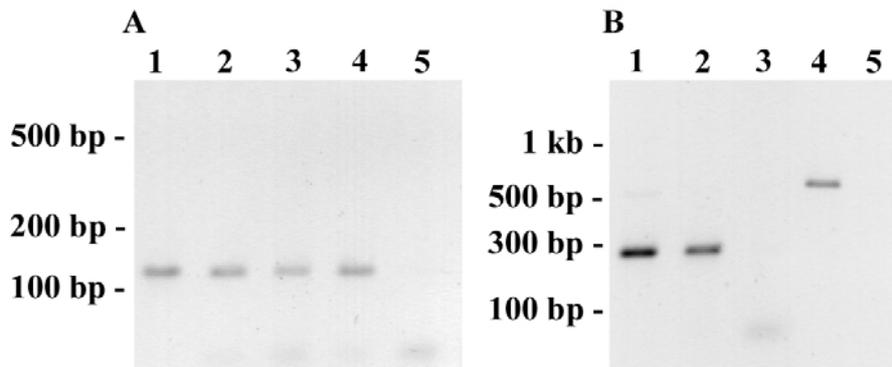


Abb. 2.15.: Genomische PCR und RT-PCR von Transformanden mit *VMP3*-Gen-Varianten: **A:** 3% Agarosegel, inverse Darstellung. Spur 1-5: PCR mit ON 14333 und "reverse", erwartet wurde ein 127 bp-Stück. Spur 1: *VMP3 α* (PDS-127/2/1), Spur 2: *VMP3 β* (PDS-128/5/1), Spur 3: *VMP3 γ* (PDS-126/3/1), Spur 4: Plasmid pUC18/22/3-G3/1/"3" als positive Kontrolle, Spur 5: Stamm 153-48 als negative Kontrolle. **B:** 2% Agarosegel, inverse Darstellung. Spur 1-3: PCR mit ON 14367 und ON 14346, erwartet wurde ein 270 bp-Stück. Spur 1: Plasmid pUC18/22/3-Ng/1/"17" als positive Kontrolle, Spur 2: *VMP3 δ* (PDS-123/18/1), Spur 3: Stamm 153-48 als negative Kontrolle. Spur 4-5: RT-PCR mit ON 14345 und ON 14346, erwartet wurde ein 583 bp-Stück bei vollständig gespleißter mRNA. Spur 4: *VMP3 δ* (PDS-123/18/1), Spur 5: Stamm HK 10 als negative Kontrolle.

Von den verbliebenen Transformanden wurden Ultraschalllysate hergestellt und auf einem SDS-Gel mit anschließendem Western-Blotting untersucht. Mit Hilfe des anti-hVMP3-N-Terminus-Antikörpers gegen die Proteasedomäne von VMP3, die in allen von den Genvarianten codierten Proteinen vorhanden sein sollte, konnten diejenigen identifiziert werden, bei denen tatsächlich eine Genexpression stattfindet. Da der Promotor des *VMP3*-Wildtypgens verwendet wurde, und dieser auch in vegetativ wachsenden Algen schwach abgelesen wird, konnte auf die sexuelle Induktion der Algen verzichtet werden.

Dabei konnten bei *VMP3 α* 11, bei *VMP3 β* 5, bei *VMP3 γ* 9 und bei *VMP3 δ* 3 Transformanden mit einem im Vergleich zum Rezipientenstamm 153-48 neu auftretenden Signal detektiert werden. Dabei handelt es sich um die von den rekombinanten Genen codierten, verkürzten *VMP3*-Varianten, die sich aufgrund des verringerten Molekulargewichts problemlos vom hochmolekularen Wildtyp *VMP3* unterscheiden lassen. Eine genauere Analyse zeigte, dass sich die Proteine *VMP3 α* , *VMP3 β* und *VMP3 γ* genau wie das Wildtyp-Protein in der inneren Matrix ("deep

zone") der *Volvox*-Sphäroide befinden, und folglich trotz eines verkürzten Polyprolinbereichs richtig lokalisiert sind (s. Abb. 2.16.). Bei VMP3 δ war das jedoch nicht der Fall: Das Protein war nicht im "deep zone"-Extrakt der Transformanden zu finden, sondern konnte nur durch Behandlung der Algen mit SDS aus den Sphäroiden gelöst werden (s. Abb. 2.16.). Eine eindeutige Aussage darüber, ob das Protein noch intrazellulär lokalisiert ist, oder nur an der falschen Stelle in der ECM positioniert ist, konnte nicht getroffen werden. Für das Protein VMP3 scheint also das Vorhandensein zumindest eines kleinen Teils der polyprolinreichen Domäne eine notwendige Voraussetzung für die richtige Lokalisierung in der ECM zu sein. Ebenso war es nicht möglich VMP3 δ mit Hilfe des rekombinanten (His)₆-"tag" aus den *Volvox*-Transformanden zu reinigen oder das Protein im Western-Blot mit dem anti-(His)₅-Antikörper zu detektieren. Entweder wurde der "tag" in der Alge wieder abgespalten, oder das Protein wurde nie vollständig prozessiert.

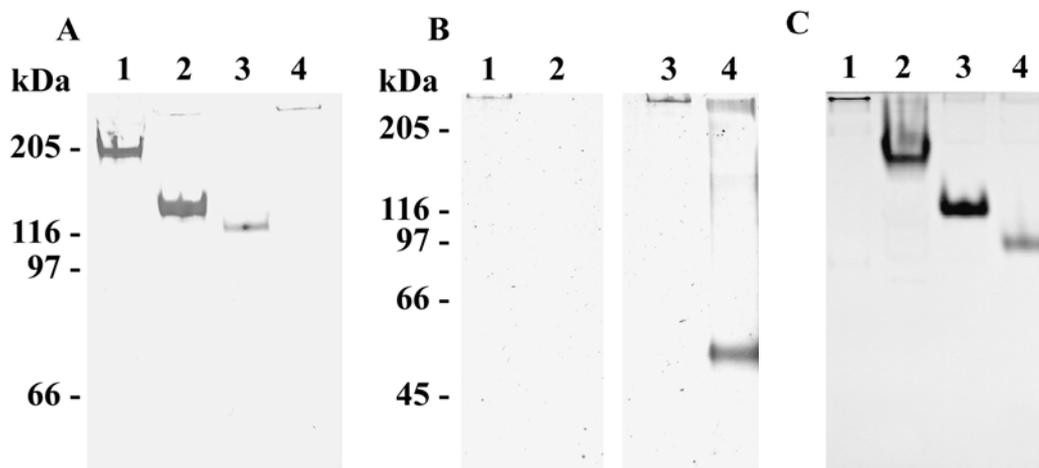


Abb. 2.16.: Analyse der VMP3-Varianten mit Immunodetektion und im In-Gel-Assay: **A:** 8% SDS-Gel, Immunodetektion mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (1:2.500). Spur 1-4: "deep zone"-Extrakte aus derselben Anzahl an Algen. Spur 1: VMP3 α (PDS-127/2/1), Spur 2: VMP3 β (PDS-128/5/1), Spur 3: VMP3 γ (PDS-126/3/1), Spur 4: Stamm 153-48. **B:** 10% SDS-Gel, Immunodetektion mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (1:2.500). Spur 1 und 3: "deep zone"-Extrakte, Spur 2 und 4: SDS-Extrakte aus derselben Anzahl an Algen, Spur 1 und 2: Stamm 153-48, Spur 3 und 4: VMP3 δ (PDS-123/18/1). **C:** 8% In-Gel-Assay, inverse Darstellung. Spur 1-4: "deep zone"-Extrakte aus derselben Anzahl an Algen, Spur 1: Stamm 153-48, Spur 2: VMP3 α (PDS-127/2/1), Spur 3: VMP3 β (PDS-128/5/1), Spur 4: VMP3 γ (PDS-126/3/1). (Das leicht veränderte Laufverhalten der Proteine im In-Gel-Assay im Vergleich zum Western-Blot ist auf die Verwendung von nicht-reduzierenden Laemmli-Probenpuffer zurückzuführen).

Für VMP3 α konnte ein Molekulargewicht von 190 kDa (aus der cDNA ermittelt: 67 kDa) bestimmt werden, für VMP3 β 130 kDa (62 kDa), für VMP3 γ 120 kDa (60 kDa) und für VMP3 δ 52 kDa (53 kDa). Die Abweichungen von der erwarteten Größe lassen sich wie bei VMP3 durch eine ausgeprägte Glykosylierung der Proteine erklären, bei VMP3 δ , das ja keinen prolinreichen Bereich besitzt scheint diese völlig zu fehlen. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch im Wildtyp-Protein der Großteil der Zuckerreste an die Aminosäuren der Polyprolin-domäne angefügt ist.

Untersucht man die "deep zone"-Extrakte der in der Immunodetektion positiven Transformanden in einem In-Gel-Assay, so zeigen sich auf Höhe der Immunsignale der jeweiligen Transformande auch neue Proteasesignale (Die anderen Proteasen aus der "deep zone" (s. Abb. 2.13.) sind hier nicht zu erkennen, da die Algen vor der Ernte nicht sexuell induziert wurden). Alle drei richtig lokalisierten VMP3-Varianten besitzen also trotz der Verkürzung des prolinreichen Bereichs proteolytische Aktivität, die Deletionen haben auf die Katalyse keinen Einfluss. Allein für VMP3 δ , das sich nicht in der "deep zone" befindet und somit wahrscheinlich auch nicht richtig prozessiert ist, konnte keine Aktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Aus der Analyse der Transformanden im Western-Blot und im In-Gel-Assay geht auch hervor, dass die rekombinanten Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Protein überexprimiert sind. Dies ist wahrscheinlich auf eine höhere Kopienzahl der verantwortlichen Gene im Genom aufgrund mehrfach erfolgter Rekombinationsereignisse zurückzuführen.

2.1.9. Analyse der enzymatischen Aktivität von VMP3 γ

Die Tatsache, dass auch VMP3-Varianten mit verkürzten Polyprolinbereich im selben Maße enzymatisch aktiv sind wie das Wildtyp-Protein, erlaubt eine genauere Untersuchung dieser Proteine mit den In-Gel-Assays. Für weitere Analysen wurde VMP3 γ verwendet, da es einerseits die geringste molekulare Masse besitzt und damit am weitesten ins Gel einläuft, zum anderen stimmt seine Proteinsequenz in allen Aminosäuren genau mit VMP3 überein (VMP3 α und VMP3 β weisen je zwei Punktmutationen auf), so dass sich die ermittelten Ergebnisse auch auf das Wildtyp-Protein übertragen lassen sollten.

Bei der Untersuchung verschiedener Mengen an "deep zone"-Extrakt aus vegetativ wachsenden Kulturen der VMP3 γ -Transformande PDS-126/3/1 zeigte sich, dass bei einer densitometrischen Auswertung die Signale des In-Gel-Assays zur eingesetzten Enzymmenge proportional sind (s. Abb. 2.17.). Innerhalb dieses Signalbereichs ist also die Proportionalität zwischen Signalstärke (Bandenvolumen und -intensität) und Menge an proteolytisch aktivem VMP3 γ gegeben, so dass quantitative Aussagen zur Enzymaktivität möglich sind. Im folgendem sind Versuche aufgeführt, bei denen die enzymatische Aktivität des Proteins unter verschiedenen Bedingungen getestet und charakterisiert wurde. Alle quantitativen Aussagen die dabei über die Aktivität von VMP3 γ getroffen wurden, konnten in denselben Tests in qualitativer Hinsicht für VMP3 bestätigt werden (nicht gezeigt).

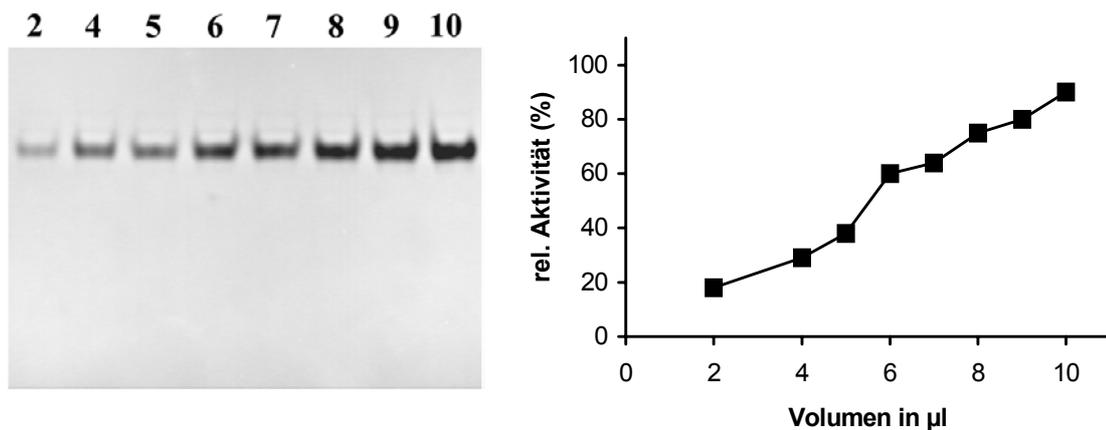


Abb. 2.17.: Proportionalität zwischen VMP3 γ -Menge und proteolytischer Aktivität im In-Gel-Assay (8% In-Gel-Assay, Coomassiefärbung, inverse Darstellung). Links: verschiedene Mengen an "deep zone"-Extrakt (in μl) einer VMP3 γ -Transformante (PDS-126/3/1) im In-Gel-Assay. Rechts: graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung des Gels (dem 10 μl -Wert wurden willkürlich 90% Aktivität zugewiesen).

Um zu prüfen, ob die Katalyse von VMP3 γ tatsächlich den der verwandten Matrix-Metalloproteinasen (MMP) entspricht, wurde der In-Gel-Assay unter Anwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren durchgeführt. Dabei wurde dieselbe Enzymmenge auf unterschiedliche Spuren des Aktivitätsgels aufgetragen, das Gel nach der Elektrophorese in vertikale Streifen geschnitten, und diese im jeweiligen Puffer mit den potentiellen Inhibitor in der für solche Studien üblichen Konzentration inkubiert. Gestestet wurden die Metallchelatoren EDTA (1 mM), EGTA (1 mM) und 1,10-Phenanthrolin (2 mM; Dawson et al., 1987), der Serinproteaseinhibitor PMSF (0,5 mM) und das MMP-Substratanalog GM 6001 (10 μM ; Gobelny et al., 1992). Darüber hinaus wurde in einem Ansatz das Enzym vor dem Gelauftrag mit dem Reduktionsmittel DTT (10 mM) versetzt, um zu untersuchen, ob bei der Katalyse eventuell vorhandenen Disulfidbrücken von Bedeutung sind (s. Abb. 2.18.). Wie deutlich zu erkennen ist wird die VMP3 γ -Aktivität von allen drei Metallchelatoren stark gehemmt, v.a. aber von 1,10-Phenanthrolin, das für zweiwertige Schwermetallionen spezifisch ist. Der Serinproteaseinhibitor PMSF hat dagegen nur geringen Einfluss (Restaktivität 67%), die beobachtete Hemmung ist vermutlich auf die kovalente Modifikation von Resten außerhalb des aktiven Zentrums zurückzuführen. Vollständige Hemmung tritt auch bei der Verwendung geringer Mengen GM 6001 auf, einem Peptidanalogs, das bei vielen Proteasen der MMP-Familie die Substratbindungstasche blockiert (Gobelny et al., 1992). Das aktive Zentrum von VMP3 γ scheint dem einer MMP also strukturell sehr ähnlich zu sein. Auch durch das Aufbrechen von Disulfidbrücken mit DTT kommt die Aktivität des Enzyms zum Erliegen, vermutlich kann sich das extrazellulär lokalisierte Protein ohne dieses kovalente Strukturelement nach der Elektrophorese nicht mehr in seine native Form zurückfalten. Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die Aktivität von VMP3 γ dem Inhibitions muster der

verwandten MMP im starkem Maße ähnelt, also vom Vorhandensein eines zweiwertigen Metallsalzes, vermutlich von Zn^{2+} , abhängig ist.

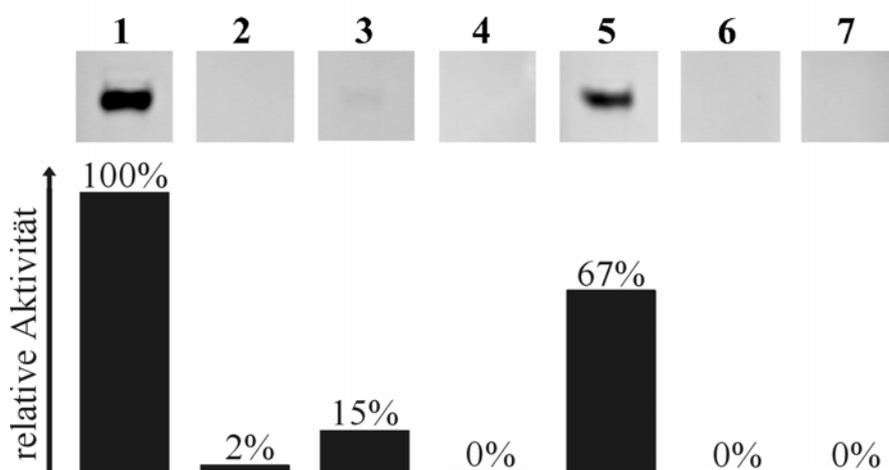


Abb. 2.18.: Test der Sensitivität der VMP3 γ -Aktivität gegenüber Proteaseinhibitoren (8% In-Gel-Assay, Coomassiefärbung, inverse Darstellung): Spur 1-7: 8 μ l "deep zone"-Extrakt der Transformante PDS-126/3/1. Spur 1: ohne Inhibitor (als 100% definiert), Spur 2: 1 mM EDTA, Spur 3: 1 mM EGTA, Spur 4: 2 mM 1,10-Phenanthrolin, Spur 5: 0,5 mM PMSF, Spur 6: 10 μ M GM 6001 und Spur 7: 10 mM DTT.

Im nächsten Experiment sollte geprüft werden, ob nun tatsächlich Zn^{2+} zur Katalyse notwendig ist, oder ob eventuell noch andere Metallsalze diese Aufgabe übernehmen können. Dabei wurden wieder Gelstreifen mit derselben Menge an VMP3 γ in Anwesenheit von verschiedenen Metallsalzen (2 mM) inkubiert, alle Puffer enthielten jedoch auch zusätzlich 1 mM EDTA, um eventuell verschleppte Zn^{2+} -Reste an Gefäßwänden oder als Verunreinigung in den verwendeten Chemikalien zu komplexieren. Wie Abb. 2.19. zeigt, ist auch bei der Verwendung von Co^{2+} und Ni^{2+} noch etwas Aktivität zu detektieren (15% bzw. 11%), eine Tatsache die auch schon für einige Mitglieder der MMP-Familie bekannt ist (Gomis-Rüth et al., 1994). VMP3 γ arbeitet in diesem Test aber mit Cu^{2+} 15mal effektiver als mit Zn^{2+} . Es kann spekuliert werden, ob diese Vorliebe für Cu^{2+} auf das im Vergleich zu der MMP-Familie veränderte Metall-Bindemotiv (QExxHxxGxxH statt HExxHxxGxxH) zurückzuführen ist, zumal ein solcher Effekt für MMPs noch nicht bekannt ist. Um dies zu klären, wurde derselbe In-Gel-Assay mit Gelatinase (MMP-2) durchgeführt. Bei Inkubation mit Cu^{2+} konnte dabei nur ein Viertel der mit Zn^{2+} erreichten Aktivität detektiert werden, es fand also eine deutliche Verringerung der Aktivität statt.

In weiteren Tests wurden der Einfluss der Salzkonzentration (NaCl), des pH-Werts (Tris/HCl-Puffer) und der Temperatur auf die proteolytische Aktivität von VMP3 γ untersucht. Dabei wurde wieder wie oben beschriebenen vorgegangen, den Inkubationspuffern wurde aber aus Gründen der Vergleichbarkeit der Resultate weiterhin Zn^{2+} (100 μ M) als Metallsalz zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 2.20. und Abb. 2.21. dargestellt.

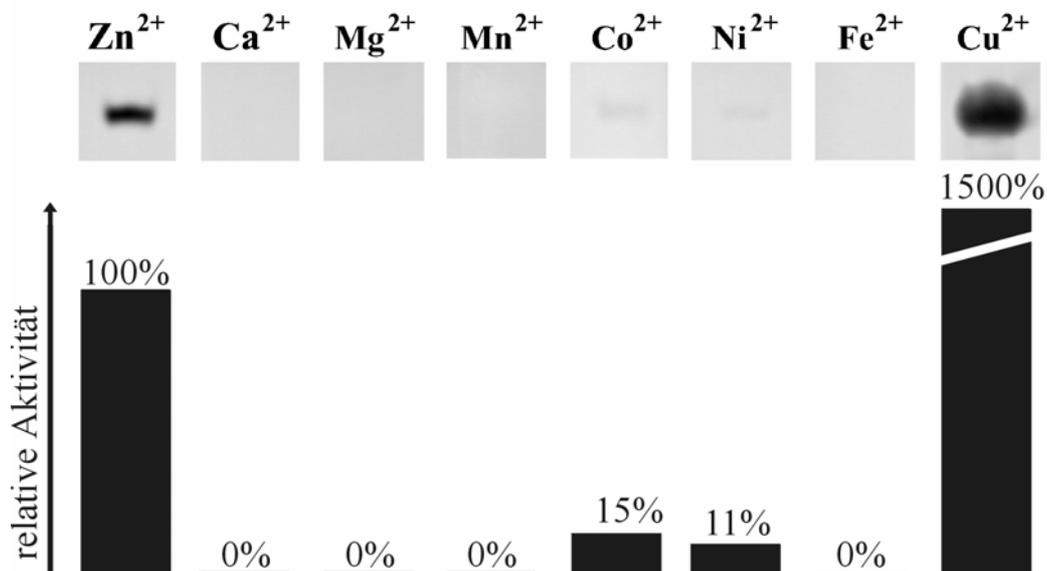


Abb. 2.19.: Metallsalzabhängigkeit der VMP3 γ -Aktivität (8% In-Gel-Assay, Coomassiefärbung, inverse Darstellung): Alle Spuren: 8 μ l "deep zone"-Extrakt der Transformante PDS-126/3/1. Während der Inkubation wurden alle Metallsalze in einer Konzentration von 2 mM zugesetzt, der Wert für Zn²⁺ wurde auf 100% gesetzt. Der angegebene Wert für die relative Aktivität bei Anwesenheit von Cu²⁺ im Vergleich zu Zn²⁺ wurde in einem separaten Test mit weniger Enzym bestimmt, da er hier außerhalb des Proportionalitätsbereichs liegt und nur der Übersicht wegen dargestellt ist.

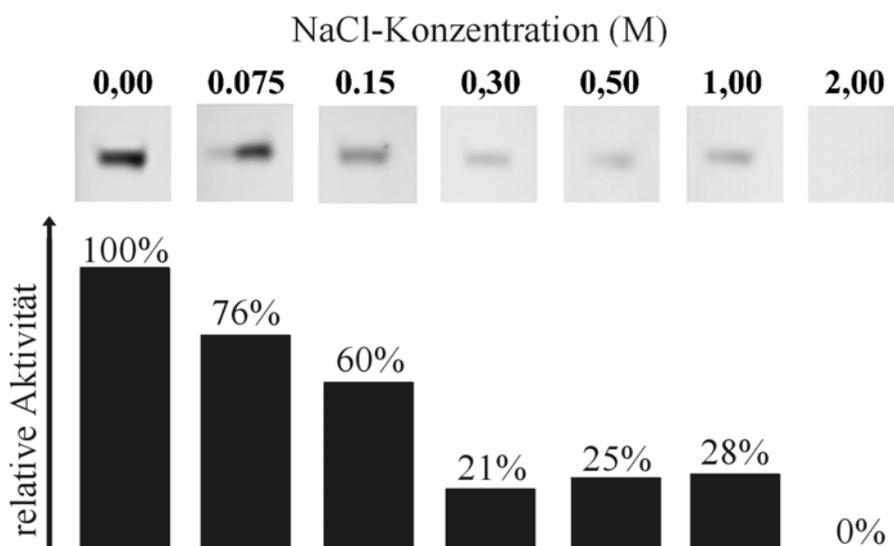


Abb. 2.20.: Einfluss der Salzkonzentration auf die VMP3 γ -Aktivität (8% In-Gel-Assay, Coomassiefärbung, inverse Darstellung): Alle Spuren: 8 μ l "deep zone"-Extrakt der Transformante PDS-126/3/1. Während der Inkubation wurde NaCl in der jeweils angegebenen Konzentration zugesetzt, der Wert ohne Salz wurde auf 100% gesetzt.

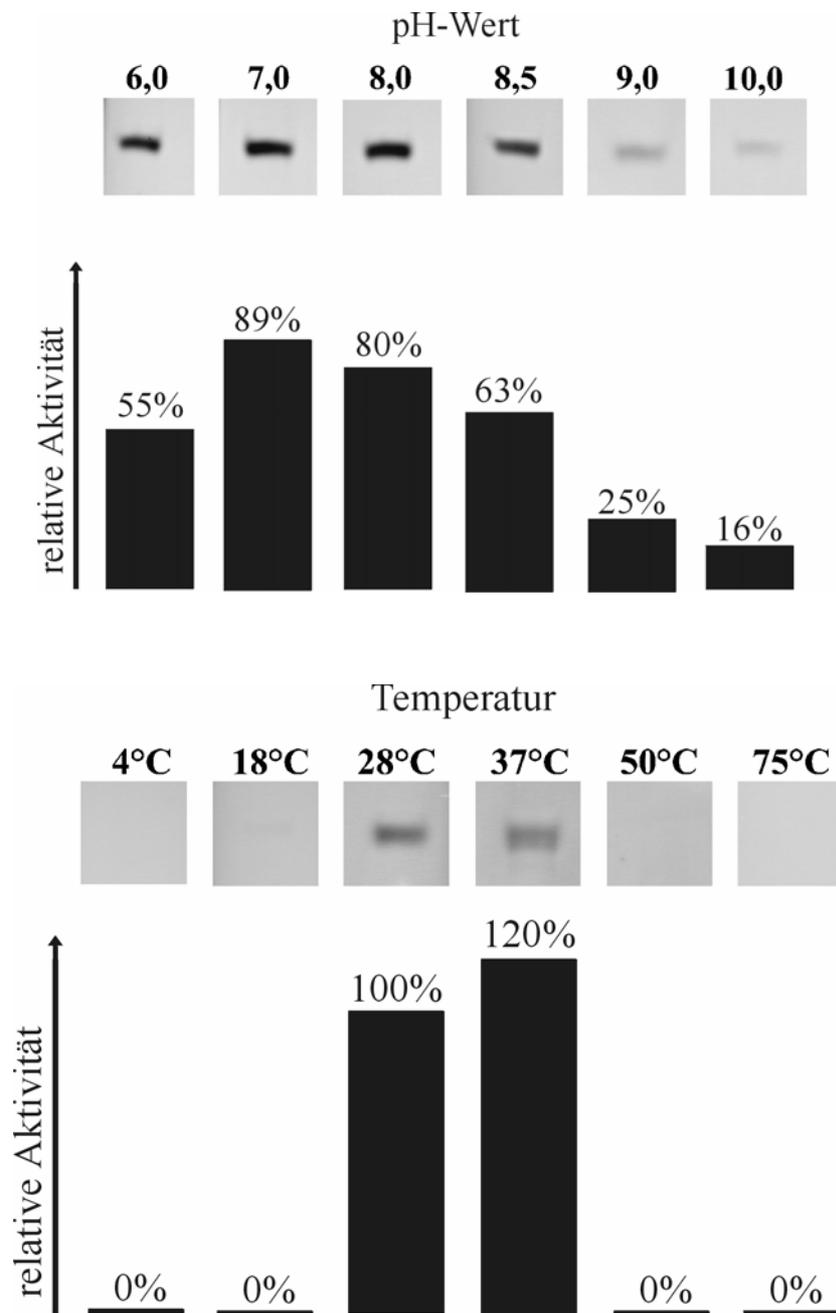


Abb. 2.21.: Einfluss der Temperatur und des pH-Wertes auf die VMP3 γ -Aktivität (8% In-Gel-Assay, Coomassiefärbung, inverse Darstellung): Alle Spuren: 8 μ l "deep zone"-Extrakt von PDS-126/3/1. Oben: Die Inkubation erfolgte jeweils in 25 mM Tris/HCl Puffer des angegebenen pH-Wertes, der Wert für die Inkubation in *Volvox*-Medium (3,8 mM Glycylglycin pH 8,0) wurde auf 100% gesetzt (nicht gezeigt). Unten: Die Inkubation erfolgte bei der jeweils angegebenen Temperatur. Der Wert für 28°C (Temperatur der *Volvox*-Kulturhaltung) wurde als 100% definiert.

Dabei ergaben sich keine weiteren Ungewöhnlichkeiten. Schon eine geringe Erhöhung der Salzkonzentration (0,075 M) führt zu einer Erniedrigung der Aktivität, diese bleibt dann aber über einen relativ breiten Konzentrationsbereich (0,3 M-1,0 M) auf einem niedrigen Niveau (21-28%)

erhalten, bis sie bei 2 M NaCl vollständig verloren geht. Das pH-Optimum des Enzyms liegt zwischen 7,0 und 8,0, nimmt aber zum Basischen hin schneller ab als bei sauren pH-Werten. Die Aktivität in Tris-Puffern lag dabei immer etwas unter denen in Glycylglycin-Puffern deselben pH-Wertes (nicht gezeigt). Das Enzym zeigte maximale Aktivität in einem Temperaturbereich von 28°-37°C, schon etwa 10°C darunter bzw. darüber fand keine Katalyse mehr statt.

Das extrazelluläre VMP3 γ befindet sich in der inneren Matrix der Algen, die für niedermolekulare Substanzen aus dem Kulturmedium durch Diffusion zugänglich ist. Die optimalen Parameter für die VMP3 γ -Aktivitäten stimmen also in etwa mit den optimalen Kulturbedingungen von *Volvox carteri* überein, zeigen also die für eine mesophile Süßwasseralge typischen Werte.

2.1.10. Expression und Analyse von VMP3 γ -Punktmutanten in *Volvox carteri*

Nachdem eine metallsalzabhängige Proteaseaktivität für VMP3 γ (und für VMP3) gezeigt werden konnte, die große Ähnlichkeit zu den charakteristischen Eigenschaften von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) zeigt, sollten nun mit Hilfe des etablierten *Volvox*-Expressionssystems Punktmutationen in das aktive Zentrum des Enzyms eingeführt werden, um die für die Katalyse essentiellen Aminosäurereste zu identifizieren. Wie schon mehrfach erwähnt besitzen die Mitglieder der *VMP*-Genfamilie im Vergleich zu den bislang bekannten Metalloproteinasen ein verändertes Metall-Bindemotiv (s. Abb. 2.22.).

		Metallligand katalytischer Rest		Metallligand		Metallligand												
VMP4	T	I	M	Q	E	A	L	H	D	Y	G	L	W	H	S	W	R	N
VMP3	T	I	M	Q	E	A	I	H	N	Y	G	L	W	H	S	W	Q	N
GLE	V	I	M	H	E	A	M	H	N	Y	G	L	E	H	A	G	R	G
MMP-1	V	A	A	H	E	L	G	H	S	L	G	L	S	H	S	T	D	I

Abb. 2.22.: Aktives Zentrum der VMP- und MMP-Familie: Bei Vertretern der VMP-Familie ist eines der drei für die Koordinierung des Metallions notwendigen Histidinreste (H) durch ein Glutamin (Q) ersetzt (grau hinterlegt). Der eigentlich katalytisch aktive Rest zur Wasserdeprotonierung (Glutamat, E) und andere für die Struktur wichtige Aminosäuren sind dagegen konserviert (schwarz hinterlegt). GLE: gametic lytic enzyme aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Kinoshita et al., 1992), MMP-1: humane Matrix-Metalloproteinase 1 (Templeton et al., 1990).

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde der „ungewöhnliche“ Glutaminrest (AS-Pos. 276, s. 6.2.) zum einen gegen ein Histidin ausgetauscht (*VMP3 γ -H*), und somit das aktive Zentrum dem der MMPs anzugleichen, zum anderen durch einen Leucinrest ersetzt (*VMP3 γ -L*), der zwar im Protein in etwa dasselbe Volumen beansprucht, aber kein freies Elektronenpaar zur Koordination von Kationen besitzt. Darüber hinaus wurde das vermutlich auch in den VMPs katalytisch aktive Glutamat (AS-Pos. 277) zu Alanin mutiert (*VMP3 γ -A*), um dessen Beteiligung am Katalysemechanismus eindeutig zu beweisen.

Dazu wurden im zuvor schon erfolgreich exprimierten *VMP3 γ* -Gen durch rekombinante PCR nach Horton et al. (1989) drei Basenaustausche eingeführt (s. Abb. 2.23.).

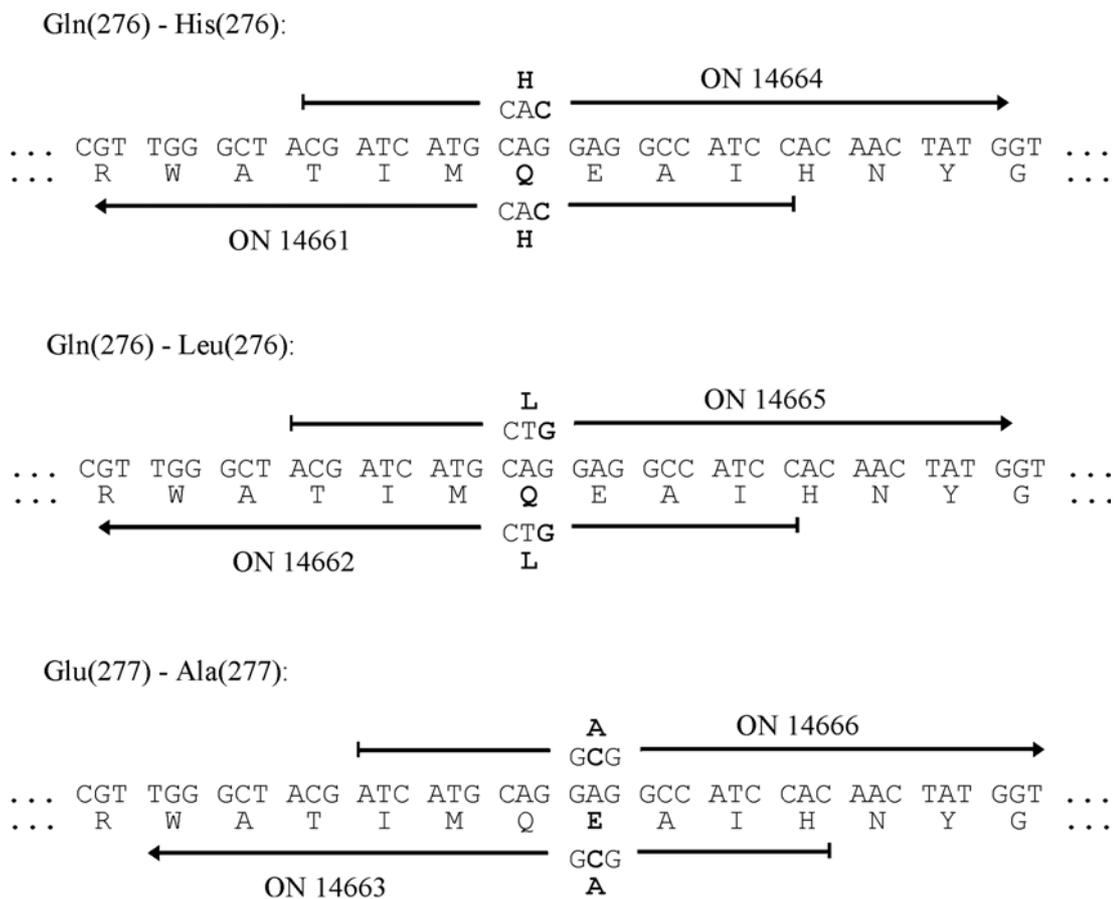


Abb. 2.23.: Rekombinante PCR für *VMP3 γ -H*, *VMP3 γ -L* und *VMP3 γ -A*: Mit Hilfe der rekombinanten PCR-Technik von Horton et al. (1989) wurde in jedem Konstrukt nur eine Base ausgetauscht, was direkt zur gewünschten Aminosäuresubstitution führte. Zunächst erfolgten für jedes Gen zwei PCRs mit je einem der oben angegebenen rekombinanten Oligonukleotiden und den *VMP3*-Oligonukleotiden ON 14559 bzw. ON 14560 (mit zusätzlicher Bam HI- und Hind III-Schnittstelle zur weiteren Klonierung, s. Abb. 4.6.). In einer dritten PCR (PCR_{H3}, PCR_{L3} und PCR_{A3}) mit ON 14559 und ON 14560 und den beiden vorher hergestellten PCR-Stücken (die in den oben dargestellten Bereichen überlappen) als Matrize konnten dann die Punktmutationen ins *VMP3*-Gen eingebracht werden (weiterer Verlauf s. Abb. 4.6.).

Ansonsten blieb das *VMP3 γ* -Gen unverändert (s. auch 2.1.8.). Nach Kotransformation des Selektionsmarkers und der entsprechenden Plasmide (*VMP3 γ -H*: pUC18/22/3-VLH/2/"3", *VMP3 γ -L*: pUC18/22/3-VLL/3/"4" und *VMP3 γ -A*: pUC18/22/3-VLA/3/"3") in den Rezipientenstamm 153-48 (Details, s. 4.3.8.) konnten für *VMP3 γ -H* (PDS-129) 25, für *VMP3 γ -L* (PDS-130) 15 und für *VMP3 γ -A* (PDS-131) 25 im Selektionsmedium wachsende *Volvox*-Transformanden isoliert werden. Unter dem Mikroskop zeigte keiner dieser Transformanden einen zum Wildtyp veränderten Phänotyp. Mittels genomischer PCR (mit ON 14333 (in der 3'-nicht-translatierten Region) und dem Vektoroligonukleotid "reverse", s. 2.1.8.) wurden dann für *VMP3 γ -H* 12, für *VMP3 γ -L* 9 und für *VMP3 γ -A* 17 Transformanden identifiziert, die auch das jeweilige, veränderte *VMP3 γ* -Gen ins Genom integriert hatten (s. Abb. 2.24.).

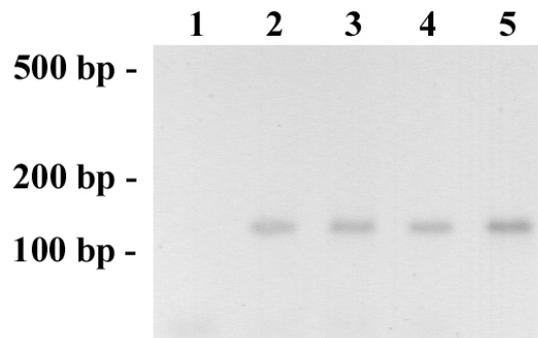


Abb. 2.24.: Genomische PCR der Transformanden der *VMP3 γ* -Punktmutation: 3% Agarosegel, inverse Darstellung. Spur 1-5: PCR mit ON 14333 und "reverse", erwartet wurde ein 127 bp-Stück. Spur 1: Stamm 153-48 als negative Kontrolle, Spur 2: *VMP3 γ -H* (PDS-129/3/2), Spur 3: *VMP3 γ -L* (PDS-130/11/1), Spur 4: *VMP3 γ -A* (PDS-131/6/1), Spur 5: Plasmid pUC18/22/3-VLH/2/"3" als positive Kontrolle.

Bei der Analyse der Ultraschalllysate der Algen im Western-Blot mit dem anti-hVMP3-N-Terminus-Antikörper wiesen 6 der *VMP3 γ -H*-Transformanden, 7 der *VMP3 γ -L*-Transformanden und 12 der *VMP3 γ -A*-Transformanden eine Expression der rekombinanten Gene auf. Eine genauere Analyse der positiven Transformanden zeigte, dass die rekombinanten Proteine VMP3 γ -H, VMP3 γ -L und VMP3 γ -A wie erwartet richtig in der "deep zone" der ECM der Algen lokalisiert sind, und in einem SDS-PAG auch die erwartete Größe von etwa 120 kDa zeigen (s. Abb. 2.25). Bei allen Transformanden konnte auch eine Überexpression der VMP3 γ -Varianten im Vergleich zum Wildtyp-Protein beobachtet werden.

In einem nachfolgendem Test wurden vergleichbare Mengen der jeweiligen VMP3-Proteine in einem In-Gel-Assay untersucht, um quantitative Aussagen über die Veränderungen ihrer enzymatischen Aktivität machen zu können (s. Abb. 2.25.). Dabei zeigte sich, dass der Austausch des atypischen Glutaminrests an Aminosäureposition 276 dramatische Auswirkungen auf die Enzymaktivität hat: Wird das Glutamin gegen Leucin ausgetauscht, kommt es zu einem

vollständigen Verlust der Aktivität; ein freies Elektronenpaar der Säureamidgruppe des Glutamins ist also essentiell für die Bindung des Metallions und damit für die Katalyse. Wird das Glutamin aber durch ein Histidin ersetzt, so kommt es zu einer fünffachen Steigerung der proteolytischen Aktivität. Durch das Angleichen des Metall-Bindemotivs an das der MMP-Familie ist also bei der Verwendung von Zn^{2+} als Kofaktor eine viel effizientere Katalyse möglich.

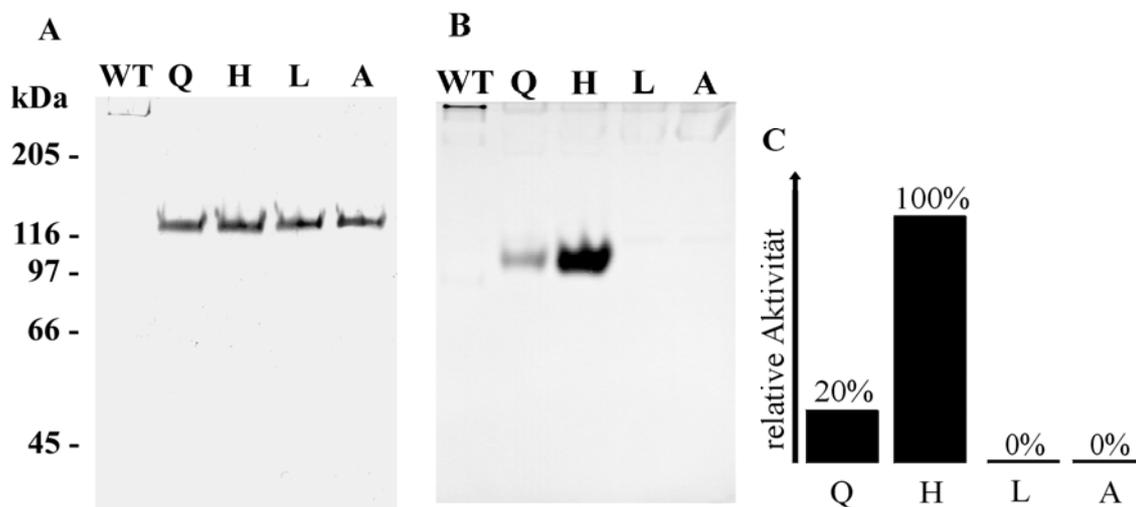


Abb. 2.25.: Analyse der VMP3 γ -Punktmutanten: **A:** 10% SDS-Gel, Immunodetektion mit anti-hVMP3-N-Terminus-AK (1:2.500). Spur 1-5: "deep zone"-Extrakte der jeweiligen Alge, dabei wurde dieselbe Menge an VMP3-Protein auftragen. Spur 1: Stamm 153-48 als negative Kontrolle (WT), Spur 2: VMP3 γ (PDS-126/3/1, Q), Spur 3: VMP3 γ -H (PDS-129/3/2, H), Spur 4: VMP3 γ -L (PDS-130/11/1, L), Spur 5: VMP3 γ -A (PDS-131/6/1, A). **B:** 8% In-Gel-Assay, inverse Darstellung. Spur 1-5: entspricht derselben Menge an "deep zone"-Extrakt der jeweiligen Alge wie in A. Der Assay wurde in Anwesenheit von 0,1 mM Zn^{2+} durchgeführt. **C:** Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung des In-Gel-Assays. Q: VMP3 γ (PDS-126/3/1), H: VMP3 γ -H (PDS-129/3/2), L: VMP3 γ -L (PDS-130/11/1), A: VMP3 γ -A (PDS-131/6/1).

Bietet man dem Enzym dagegen Cu^{2+} an, so zeigt sich zwar eine weitere Erhöhung der Aktivität, jedoch nur um den Faktor 2,5 (nicht gezeigt). Zieht man die bereits oben angeführten Werte für VMP3 γ (15fache Steigerung der Aktivität mit Cu^{2+}) und MMP-2 (4fache Verminderung der Aktivität mit Cu^{2+}) mit in Betracht, so liegt der Schluss nahe, dass das aktive Zentrum von VMP3 nicht nur allein aufgrund des Glutaminrestes für die Bindung von Cu^{2+} optimiert ist.

Der Austausch des Glutamatrestes (AS-Pos. 277) durch ein Alanin führt ebenfalls zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität. Der Aminosäurerest ist also essentiell, und scheint bei der Katalyse dieselbe Funktion zu erfüllen wie bei den Proteinen der MMP-Familie.

2.1.11. Suche nach einer physiologischen Funktion von VMP3

Wie in den vorgegangenen Kapiteln beschrieben, besitzt VMP3 proteolytische Aktivität. Diese konnte bislang jedoch nur in einem In-Gel-Assay mit Gelatine als Substrat gezeigt werden. Das natürliche Substrat, wahrscheinlich ein Protein aus der ECM von *Volvox carteri*, und die physiologische Rolle von VMP3 sind noch unbekannt. Im folgendem sind verschiedene Versuche dargestellt diese Punkte zu klären.

2.1.11.1. Test der VMP3-Transformanden auf Sensitivität gegenüber dem Sexualpheromon

Um in *Volvox carteri* die sexuelle Entwicklung vollständig zu induzieren, muss das von den männlichen Algen gebildete Sexualpheromon während der Lichtphase zwar in einer sehr geringen Konzentration (10^{-16} M), aber mindestens für 6 h im Kulturmedium anwesend sein, anderenfalls wachsen die Algen vegetativ weiter (Gilles et al., 1984). Es wird postuliert, dass während dieses Zeitraums eine Art Signalverstärkung in der ECM der Algen abläuft, in dem auch Proteasen involviert sein sollen (Sumper et al., 1993 und Hallmann et al., 1998). Falls nun VMP3 tatsächlich an der Signalweiterleitung beteiligt und seine Menge bei der sexuellen Induktion limitierend ist, sollte eine Überexpression des aktiven Proteins in *Volvox carteri* - wie sie für alle VMP3-Transformanden gezeigt wurde (s. 2.1.8. und 2.1.10.) - zu einer Veränderung der oben beschriebenen Mindestanforderungen der sexuellen Induktion führen.

Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Transformanden mit aktiv (VMP3 α , VMP3 β , VMP3 γ und VMP3 γ -H) bzw. inaktiv (VMP3 δ , VMP3 γ -L und VMP3 γ -A) überexprimiertem VMP3 und der Wildtyp HK 10 in einem Bioassay zu verschiedenen Zeitpunkten (3-12 h vor Start der Embryogenese) mit variablen Pheromonmengen (ad 10^{-12} - 10^{-17} M) versetzt, und die Algen eine Generation später unter dem Mikroskop auf sexuelle Induktion hin überprüft. Dabei konnte weder bei der Verwendung von heterolog exprimierten Sexualinduktor noch bei Gebrauch des aus männlichen Algen angereicherten Pheromons ein Unterschied zwischen Transformanden und Wildtyp erkannt werden (nicht gezeigt). VMP3 scheint also bei der Verstärkung und der Weiterleitung des Pheromonsignals keine limitierende Rolle zu spielen.

2.1.11.2. Analyse der Pherophorin II-Kinetik von VMP3-Transformanden

Bei Pherophorin II handelt es sich um ein sexuell induzierbares, sulfatisiertes Glykoprotein aus der ECM von *Volvox carteri* mit einer molekularen Masse von 70 kDa (Godl et al., 1995). Seine C-terminale Domäne weist große Ähnlichkeit zum Sexualpheromon auf, und wird im Laufe der sexuellen Induktion abgespalten, wodurch ein 42 kDa- (C-terminale Domäne) und ein 30 kDa-Fragment (N-terminale Domäne) entstehen. Dieser proteolytische Prozess beginnt etwa 3 h nach Pheromonzugabe und dauert mindestens für 18 h an (Godl et al., 1997). Da die Kinetik der VMP3-

Expression mit dem zeitlichen Verlauf der Pherophorin II-Spaltung gut übereinstimmt und beide Proteine in der ECM der Alge lokalisiert sind, könnte VMP3 für den Pherophorin II-Abbau verantwortlich sein. Eine Überexpression von aktiven VMP3 sollte somit zu einem beschleunigten oder vermehrten Proteinverdau führen, da zu jeder Zeit auch noch ungespaltenes Pherophorin II in der ECM zu detektieren ist (Godl et al., 1997).

Deshalb wurde je eine *Volvox*-Transformante, die aktives VMP3 γ (PDS-126/3/1) bzw. inaktives VMP3 γ -A (PDS-131/6/1) überexprimiert, in einem Puls-Chase-Experiment mit radioaktivem [35 S]-Sulfat versetzt und sexuell induziert (Details s. 4.4.5.2). Dabei wird radioaktives Sulfat in das Pherophorin II-Molekül (und die beiden beim Verdau entstehenden Fragmente) eingebaut, so dass sich die Kinetik der Pherophorin II-Spaltung ohne großen Reinigungsaufwand durch Autoradiographie verfolgen lässt. Wie in Abb. 2.26. gezeigt, konnte zwischen den beiden Transformanten kein Unterschied im zeitlichen Verlauf der Pherophorin II-Prozessierung detektiert werden. VMP3 ist also wahrscheinlich nicht die dafür verantwortliche Protease.

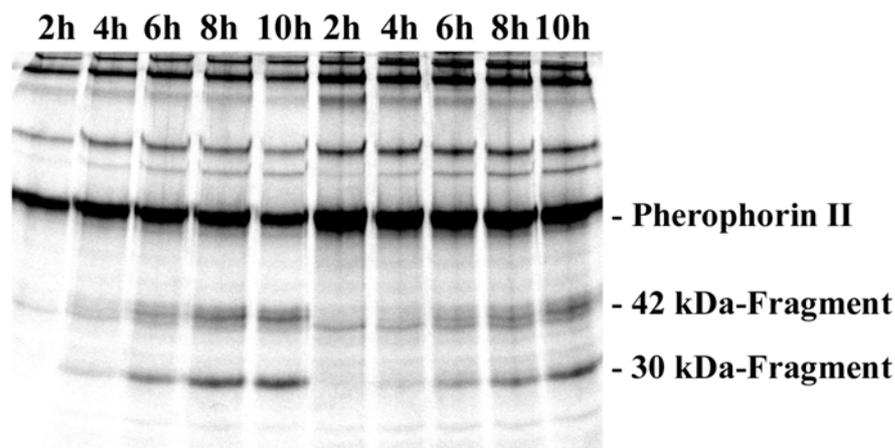


Abb. 2.26.: Pherophorin II-Kinetik einer VMP3 γ (PDS-126/3/1)- und einer VMP3 γ -A (PDS-131/6/1)-Transformante: 10% SDS-PAG mit nachfolgender Fluorographie. Spur 1-10: EDTA-Extrakte der beiden Transformanten, Spur 1-5: VMP3 γ -A (PDS-131/6/1), Spur 6-10: VMP3 γ (PDS-126/3/1). Spur 1 und 6: 2 h, Spur 2 und 7: 4 h, Spur 3 und 8: 6 h, Spur 4 und 9: 8 h, Spur 5 und 10: 10 h nach Pheromonzugabe.

2.1.11.3. Verdau von radioaktiv markierten Ellmann`s-Extrakten

Bei dem natürlichen Substrat von VMP3 handelt es sich wahrscheinlich um ein Protein aus der ECM von *Volvox carteri*. Viele dieser Proteine sind jedoch nur durch Behandlung mit Detergenzien aus der Zellwand herauszulösen, oder bilden in der ECM ein komplexes, unlösliches Netzwerk aus und sind somit einer Untersuchung als mögliches Substrat nur schwer zugänglich. Setzt man aber den Algen zum Entwicklungsstadium der Inversion (s. Abb. 1.2.), d.h. in einer Phase in der noch keine ECM ausgebildet ist, Ellmann`s Reagenz (5,5`-Dithio-bis(2-

Nitrobenzoesäure)) zu, so wird der physiologische Prozess der ECM-Synthese unterbunden und das gesamte neu gebildete Zellwandmaterial in löslicher Form ins Medium abgegeben (sogenannter Ellmann's-Extrakt, Sumper et al., 2000). Erfolgt zugleich eine radioaktive Pulsmarkierung mit [³⁵S]-Sulfat bzw. [³³P]-Phosphat sind nahezu alle bekannten ECM-Proteine im Kulturüberstand detektierbar (Details s. 4.4.5.1.). In einem Experiment wurden radioaktiv markierte Ellmann's Extrakte mit einer konzentrierten Lösung an teilweise gereinigtem VMP3 (100 mM NaCl-Fraktion der HPLC, s. 2.1.5.) versetzt, 15 h bei 28°C inkubiert und nach Auftrennung der Proteine auf einem SDS-PAG autoradiographiert. Es waren aber im Vergleich zum jeweiligen Ansatz ohne VMP3 keine Veränderung im Bandenmuster und somit auch kein Verdau zu erkennen (s. Abb. 2.27.). Bislang konnte für VMP3 jedoch noch keinerlei Aktivität in Lösung gezeigt werden, so dass durch dieses Experiment nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann, dass sich das VMP3-Substrat eventuell doch im Ellmann's Extrakt befindet.

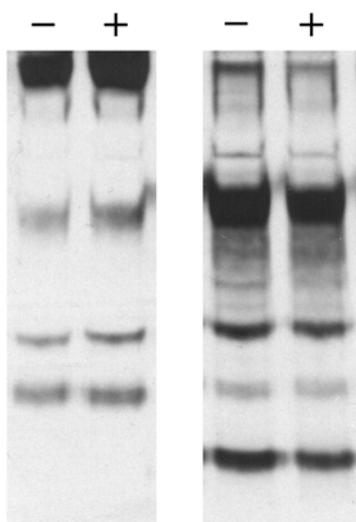


Abb. 2.27.: Verdau radioaktiv markierter Proteine aus dem Ellmann's Extrakt mit VMP3: 6% SDS-PAG mit nachfolgender Fluoro-graphie. Linkes Gel: mit [³³P]-Phosphat markiert, rechtes Gel: mit [³⁵S]-Sulfat markiert. Spur 1 und 3: Inkubation ohne VMP3 (-), Spur 2 und 4: Inkubation mit VMP3 (+).

2.2. *Volvox*-Metalloproteinase 4 (*VMP4*)

Im Gegensatz zu allen anderen Vertretern der *VMP*-Genfamilie codiert das *VMP4*-Gen (frühere Bezeichnung: *A-Klon*) nach dem prolinreichen Bereich für zwei weitere Domänen (C1 bzw. C2), die je einmal direkt nacheinander wiederholt werden (s. Abb. 1.3.). Die C2-Domäne weist dabei Homologie zu der sogenannten "apple"-Domäne aus Kallikrein auf, der eine Funktion als Proteinbindestelle zugeschrieben wird (Seidah et al., 1990).

Ausgehend von der in einem Stück vollständig vorliegenden *VMP4*-cDNA (*A-Klon/VLP*, freundlicherweise von Dr. P. Amon zur Verfügung gestellt) sollte der gesamte C-terminale Teil des Gens vom Ende des prolinreichen Bereichs bis zum Stopcodon in *E. coli* heterolog exprimiert werden. Die weitere Vorgehensweise ist im wesentlichen dieselbe wie beim *VMP3*, weshalb die

Experimente im folgenden kürzer dargestellt sind. Einzelheiten können dem ersten Abschnitt und dem „Material und Methoden“-Teil entnommen werden.

2.2.1. Heterologe Expression des C-Terminus in *E. coli*

Da die vollständige *VMP4*-cDNA bereits als Vollängenklon vorlag (A-Klon/VLP), konnte dieses Plasmid direkt als Ausgangspunkt zur heterologen Expression des gesamten C-terminalen Proteinbereichs (AS 614-1143, s. 6.4.) in *E. coli* eingesetzt werden. Dabei wurde wieder das T7-RNA-Polymerase-System verwendet (Studier et al., 1990). Durch rekombinante PCR mit den Oligonukleotiden ON 14365 und ON 14364 wurden an den *VMP4*-Genbereich zusätzlich ein C-terminaler (His)₆-"tag" zur Proteinreinigung (Hochuli & Piessecki, 1992) und die für die Klonierung in den Expressionsvektor pET11a benötigten Restriktionsschnittstellen (Nhe I) angefügt (s. Abb. 2.28.).

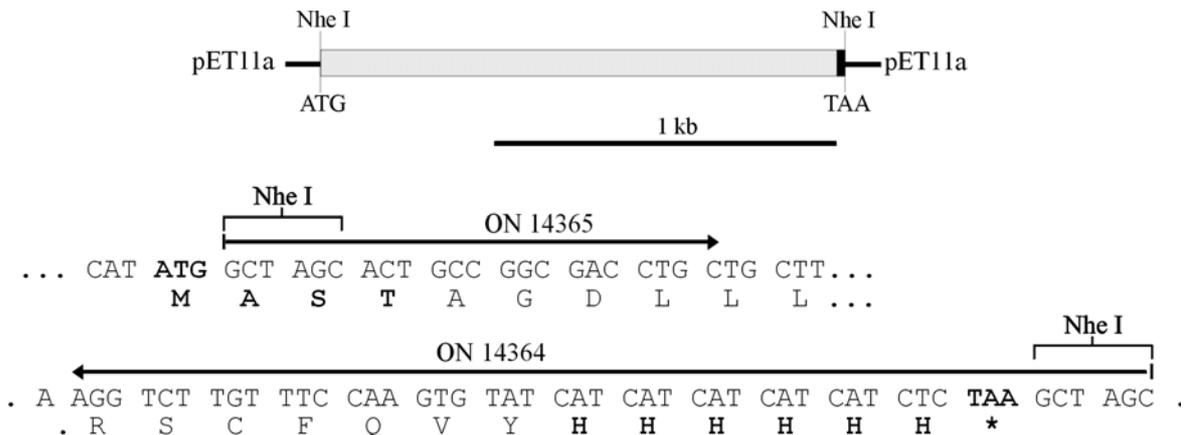


Abb. 2.28.: Schematische Darstellung des Plasmids pET11a/AC-Klon/1/9: Das durch PCR hergestellte DNA-Stück wurde über die rekombinante Restriktionsschnittstelle Nhe I in den Expressionsvektor pET11a kloniert. Durch die beiden Oligonukleotide ON 14365 bzw. ON 14364 wurden zusätzliche Nukleotide angefügt, die für drei zusätzliche N-terminale Aminosäuren (AST), einen C-terminalen (H)₆-"tag" und das Stopcodon (*) codieren.

Ursprünglich sollte der gesamte C-terminale Proteinbereich von der ersten Aminosäure nach dem Polyprolinbereich an, d.h. von Aminosäure 614 bis 1143, heterolog exprimiert werden. Nach Sequenzierung des erzeugten PCR-Fragments und des cDNA-Vollängenklons stellte sich jedoch heraus, dass die bis dahin bekannten Sequenzdaten fehlerhaft waren. Deswegen codiert das letztendlich im Expressionsvektor pET11a/AC-Klon/1/9 enthaltene *VMP4*-Genfragment nur für die Aminosäuren 639-1143, was in einem Expressionsprodukt (hVMP4-C-Terminus) von etwa 57 kDa resultieren sollte. Bei der rekombinanten PCR zur Klonierung des Gens wurden zudem ungewollt drei Basenmutation erzeugt, die zu drei Aminosäureaustauschen in der Primärsequenz führten (Position 690: Glu statt Asp, Position 874: Arg statt Cys, Position 1007: Gly statt Glu).

Nach Start der Expression in BL21(DE3)-Zellen durch IPTG konnte schon kurze Zeit später das gewünschte Protein (57 kDa) im Hitzelysate der Bakterien detektiert werden (s. Abb. 2.29.). Die Ernte der Bakterien erfolgte aber erst 3 h nach IPTG-Zugabe, zum Zeitpunkt der maximalen Expression. Die Anwesenheit des C-terminalen (His)₆-"tag" wurde durch Analyse der Bakterienlysate im Western-Blot mit einem anti-(His)₅-Antikörper (Fa. Qiagen) bestätigt (s. Abb. 2.29.). Das Expressionsprodukt befand sich wieder in den unlöslichen "inclusion bodies", so dass die nachfolgende Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen (in 8 M Harnstoff) durchgeführt werden musste. Nach der Elution (Fraktion "2", Details s. 4.4.1.2.) von der Säule lag der hVMP4-C-Terminus nahezu homogen vor, die Renaturierung bei der Dialyse gegen 50 mM Glycin pH 9,0 verlief vollständig (s. Abb. 2.29.). Aus einer 100 ml Flüssigkultur konnten so etwa 4 mg renaturierter hVMP4-C-Terminus isoliert werden.

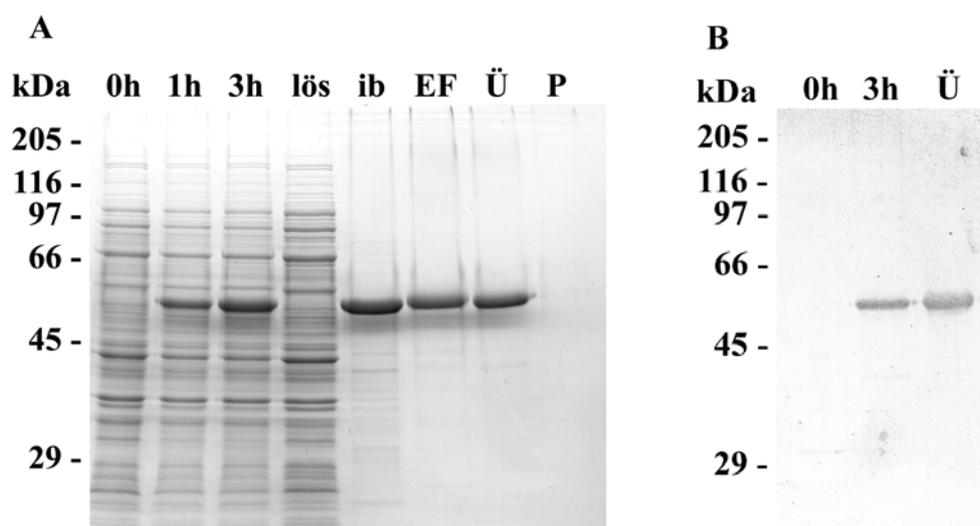


Abb. 2.29.: Expressionskinetik und Reinigung von hVMP4-C-Terminus, **A:** 10% SDS-PAG, Coomassiefärbung, Spur 1, 2 und 3: Bakterienhitzelysate 0 h, 1 h und 3 h nach Start der Expression, Spur 4 und 5: lösliche (lös) bzw. unlösliche (ib) Proteinfraction nach Zellaufschluss, Spur 6: Elutionsfraktion (EF) "2" der Metall-Affinitätschromatographie, Spur 7 und 8: Überstand (Ü) bzw. Pellet (P) nach Dialyse gegen Glycinpuffer. **B:** 10% SDS-PAG, Immunodetektion mit anti-(His)₅-AK (1:1.000, Fa. Qiagen), Spur 1 und 2: Bakterienhitzelysate 0 h und 3 h nach Start der Expression, Spur 3: gereinigter hVMP4-C-Terminus (Ü).

2.2.2. Produktion und Spezifität der Antikörper gegen den VMP4-C-Terminus

Die Produktion polyklonaler Antikörper erfolgte wie unter 4.5.1. beschrieben. Die Probe vom Tag 61 nach Start der Immunisierung des Kaninchen zeigte dabei in einer Verdünnung von 1:2.500 das beste Resultat und erkennt in Bakterienlysaten nur das heterolog exprimierte Antigen bzw. dessen niedermolekulare Abbauprodukte (s. Abb. 2.30.). Mit Präimmenserum konnte dagegen keine

Bande detektiert werden. Bei der Immunodetektion aller folgenden Western-Blots wurde ausschließlich der gereinigte Antikörper (vom Tag 61) verwendet (s. 4.5.2.).

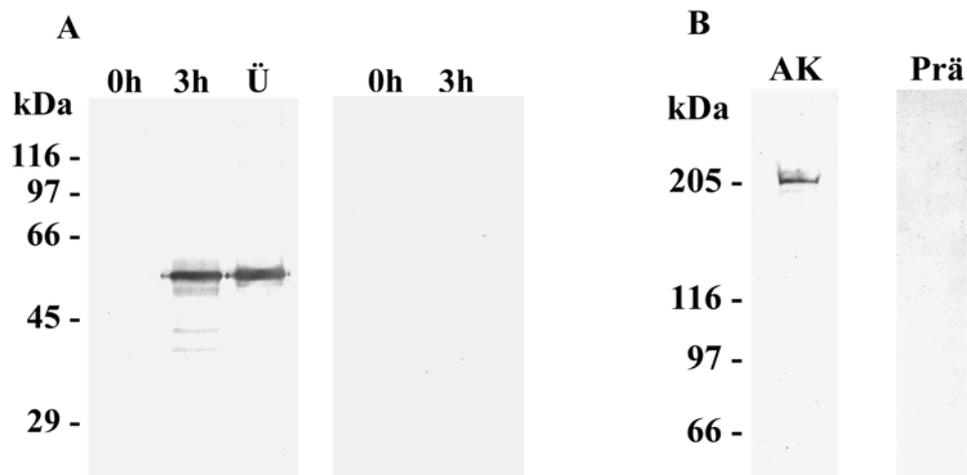


Abb. 2.30.: Test des anti-hVMP4-C-Terminus-Antikörpers, **A:** 10% SDS-PAGE, Immunodetektion, Spur 1, 2, 4 und 5: Bakterienhitze lysate 0 h (Spur 1 und 4) bzw. 3 h (Spur 2 und 4) nach Start der Expression, Spur 3: gereinigter hVMP4-C-Terminus (Ü). Spur 1-3 detektiert mit anti-hVMP4-C-Terminus (1:2.500, Tag 61), Spur 4-5 mit Präimmunsereum (1:2.500, Tag 1). **B:** 6% SDS-PAGE, Immunodetektion, Spur 1 und 2: *Volvox*-Ultrashalllysat gesamt, 3 h nach Pheromonzugabe. Spur 1 detektiert mit anti-hVMP4-C-Terminus-AK (AK, 1:2.500, Tag 61), Spur 2 mit Präimmunsereum (Prä, 1:2.500, Tag 1).

Wie bereits aus Untersuchungen der *VMP4*-mRNA mit der Northern-Blottechnik bekannt war, erfolgt die Transkription des *VMP4*-Gens in *Volvox carteri* ausschließlich nach sexueller Induktion. Das Transkript ist in den Algen schon 1 h nach Zugabe des Pheromons deutlich zu detektieren (Haas, 1991), demzufolge sollte das VMP4-Protein nach spätestens 3 h in den Sphäroiden nachzuweisen sein. Wie Abb. 2.29. zeigt, bindet der anti-hVMP4-C-Terminus-Antikörper in Ultrashalllysatsexuell induzierter Algen an ein Protein mit einer molekularen Masse von etwa 215 kDa, das Präimmunsereum erkennt im selben Lysat dagegen nichts. Abgeleitet von der *VMP4*-cDNA wäre zwar ein 125 kDa-Protein zu erwarten gewesen, das veränderte Laufverhalten lässt sich aber wie beim VMP3-Protein durch eine eventuelle Glykosylierung des wahrscheinlich extrazellulär lokalisierten Proteins erklären.

2.2.3. Lokalisierung von VMP4

Wie alle bekannten Mitglieder der *VMP*-Familie codiert auch das *VMP4*-Gen für ein N-terminales Signalpeptid zur Translokation ins ER-Lumen und für einen für extrazellulär lokalisierte ECM-Proteine aus *Volvox carteri* typischen Polyprolinbereich. Zudem weist das vom anti-hVMP4-C-Terminus-Antikörper detektierte Protein im SDS-PAGE ein sehr viel höheres Molekulargewicht auf als aufgrund der cDNA erwartet, was auf eine starke posttranslationale Modifikation des VMP4-

Proteins hinweist (s. Abb. 2.30.). Vieles deutet also darauf hin, dass das VMP4-Protein in der ECM der Alge lokalisiert ist. Im Western-Blot fraktionierter Algen (s. 4.2.1.) konnte VMP4 nur im "deep zone"-Extrakt bzw. im sogenannten „Waschextrakt“ (s. 2.1.3.) detektiert werden, ist also ein Protein aus der ECM (s. Abb. 2.31.).

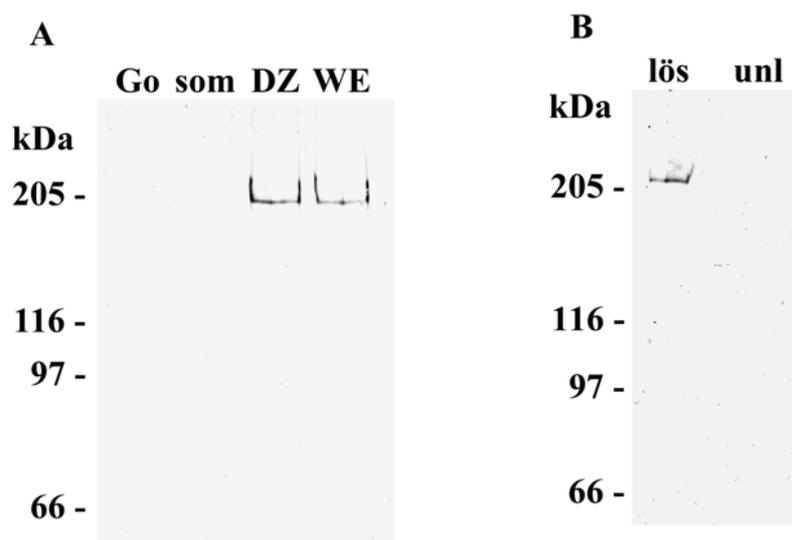


Abb. 2.31.: Lokalisierung von VMP4: **A:** 6% SDS-PAGE, Immunodetektion mit anti-hVMP4-C-Terminus-AK (1:2.500), Spuren 1-4: Fraktionierte *Volvox*-Sphäroide, 3 h nach Pheromonzugabe, Spur 1: Gonidien (Go), Spur 2: "somatic sheet" (som), Spur 3: "deep zone"-Extrakt (DZ), Spur 4: „Waschextrakt“ (WE). **B:** 6% SDS-PAGE, Detektion wie in A, löslicher (lös) und unlöslicher (unl) Anteil eines Ultraschalllysats ganzer Sphäroide, 3 h nach Pheromonzugabe.

Durch Zentrifugation lassen sich Ultraschalllysate von *Volvox carteri* in ihre löslichen und unlöslichen Bestandteile unterteilen, VMP4 befindet sich dabei in der löslichen Fraktion (s. Abb. 4.31.). Genau wie VMP3 ist also auch VMP4 ein lösliches Protein in der inneren Matrix der Alge.

2.2.4. Analyse der *VMP4*-Expression

Die Expressionskinetik des *VMP4*-Gens nach Zugabe des Sexualpheromons wurde mit RT-PCR über Intron 6 und 7 (mit den Oligonukleotiden A8 und Go21, s. 6.4.) und im Western-Blot mit dem anti-hVMP4-C-Terminus-Antikörper untersucht. Wie Abb. 2.32. zeigt kann in vegetativ wachsenden Algen weder die Transkription der *VMP4*-mRNA, noch das Auftreten des VMP4-Proteins detektiert werden. Erst nach sexueller Induktion kommt es zum Ablesen des Gens, der mRNA-Level bleibt dabei nach Einsetzen der Transkription nach 90 min über den gesamten betrachteten Zeitraum von 24 h konstant hoch.

kDa noch zusätzliche Moleküle: zwei hochmolekulare Proteine bei etwa 200 kDa (knapp unterhalb der bekannten Bande), die auch in "deep zone"-Extrakten auftreten (s. z.B. Abb. 2.34.) und bei denen es sich um Abbauprodukte von VMP4 handeln könnte, und zwei Moleküle bei etwa 97 kDa, die möglicherweise auf eine Kreuzreaktion des Antikörpers zurückzuführen sind. Es ist durchaus denkbar, dass die beiden C-terminalen Domänen des VMP4-Proteins, gegen die der Antikörper gerichtet ist, auch in anderen modularen ECM-Proteinen von *Volvox carteri* auftreten. Genau wie alle anderen bekannten sexuell induzierbaren Gene wird auch die *VMP4*-Transkription bei Verletzung der Algen mit einer Spritzenkanüle stimuliert (s. 4.1.5. und Abb. 2.33.).

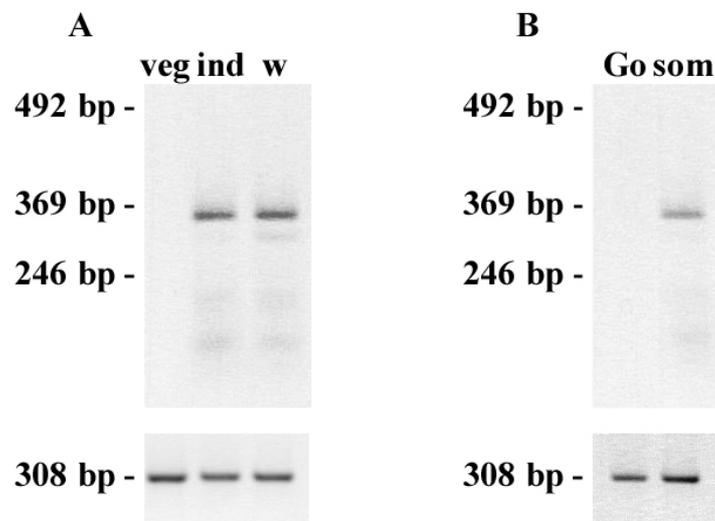


Abb. 2.33.: Nachweis der *VMP4*-Expression nach Verletzung und des Ortes der Transkription mit RT-PCR über Intron 5 und 6 (345 bp, mit den Oligonukleotiden ON 14554 und Go22, s. 6.4.) und von *actin*-mRNA als Kontrolle (s. Abb. 2.32.): **A:** 2% Agarosegel, inverse Darstellung, Spur 1: vegetative Algen (veg), Spur 2: Algen 1 h nach Pheromonzugabe (ind), Spur 3: Algen 1 h nach Verletzung mit einer Spritzenkanüle (w). **B:** 2% Agarosegel, inverse Darstellung, Spur 1: Gonidien (Go), Spur 2: somatische Zellen (som).

2.2.5. Präparative Reinigung von VMP4

Um eine genauere biochemische und enzymatische Analyse des Proteins zu ermöglichen, musste VMP4 aus der "deep zone" von sexuell induzierten Algen gereinigt werden. Da VMP4 genau wie VMP3 in der inneren Matrix von *Volvox carteri* lokalisiert ist und beide Proteine bezüglich ihrer Primärsequenz und ihrer Domänenstruktur große Ähnlichkeit zueinander aufweisen, erfolgte die Reinigung von VMP4 in Ahnlehnung an das bewährte VMP3-Reinigungsschema (s. Abb. 2.10.). Alle Schritte der Proteinreinigung wurden dabei im Western-Blot mit dem anti-hVMP4-C-Terminus-Antikörper verfolgt.

Als Proteinquelle dienten wiederum sexuell induzierte Algen des weiblichen Stammes HK 10, die 16 h nach Zugabe des Sexualpheromons geerntet wurden. Nach Gewinnung der "deep zone"-Extrakte („Schlitzextrakt“ und „Waschextrakte“, Details s. 4.3.2.), wurden die Lösungen mit VMP4 vereinigt und mit zwei Anionenaustauschchromatographien weiter aufgereinigt (Details s. 4.4.2.1. und 4.4.2.2.). Erwartungsgemäß ließ sich beim ersten Reinigungsschritt mit QAE-Sephadex A25 bei pH 9,0 die gesamte Menge an VMP4-Protein aus den Algenextrakten am Säulenmaterial anreichern und erst durch eine Erhöhung der Salzkonzentration auf 300 mM NaCl wieder vollständig eluieren (s Abb. 2.34.).

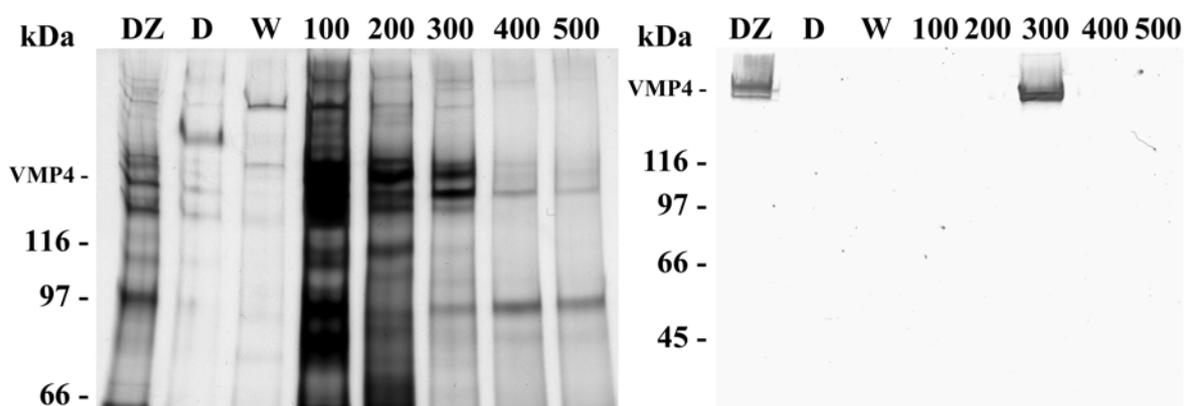


Abb. 2.34.: Reinigung von VMP4 an QAE-Sephadex A25: 6% SDS-PAG, Silberfärbung (linkes Gel) bzw. 8% SDS-PAG, Immunodetektion mit anti-hVMP4-C-Terminus-AK (1:2.500, rechtes Gel). Bei allen Proben war eine Aufkonzentrierung der Proteine durch Fällung mit TCA nötig. Spur 1: 200 μ l TCA-gefällter "deep zone"-Extrakt (DZ), Spur 2-8: TCA-gefällte 1 ml-Aliquots der Chromatographie: Spur 2: Durchlauf (D), Spur 3: Waschfraktion (W), Spur 4: 100 mM NaCl-Eluat (100), Spur 5: 200 mM NaCl-Eluat (200), Spur 6: 300 mM NaCl-Eluat (300), Spur 7: 400 mM NaCl-Eluat (400), Spur 8: 500 mM NaCl-Eluat (500).

Zwar enthielt die 300 mM NaCl-Fraktion nur noch wenige Proteine, auf Höhe des VMP4-Signals waren im silbergefärbtem SDS-PAG aber noch mehrere Banden zu sehen, so dass eine eindeutige Zuordnung unmöglich war. Von den drei im "deep zone"-Extrakt auftretenden Banden im Bereich von 200-215 kDa konnte aber nur eine angereichert werden und zwar diejenige mit dem geringsten Molekulargewicht. Darüber hinaus war die geringe Signalstärke dieser Bande im eingesetzten "deep zone"-Extrakt mit der großen Menge an gereinigtem Protein in der Elutionsfraktion nicht erklärbar. Hinweise auf den Verbleib der anderen Proteine und der Diskrepanz in der Proteinmenge konnten erst später gewonnen werden (s.u.).

Durch eine zweite Anionenaustauschchromatographie an einem HPLC-System mit einer Uno Q1R-Säule (Fa. Biorad) bei pH 8,2 war es möglich die im SDS-PAG eng zusammenliegenden Proteine des ersten Reinigungsschrittes voneinander zu trennen (s. Abb. 2.35.). Wie im Western-Blot zu sehen, konnte das gesamte VMP4-Protein an den Ionenaustauscher binden und eluierte im nachfolgenden Stufengradienten ausschließlich in der Fraktion mit 400 mM NaCl.

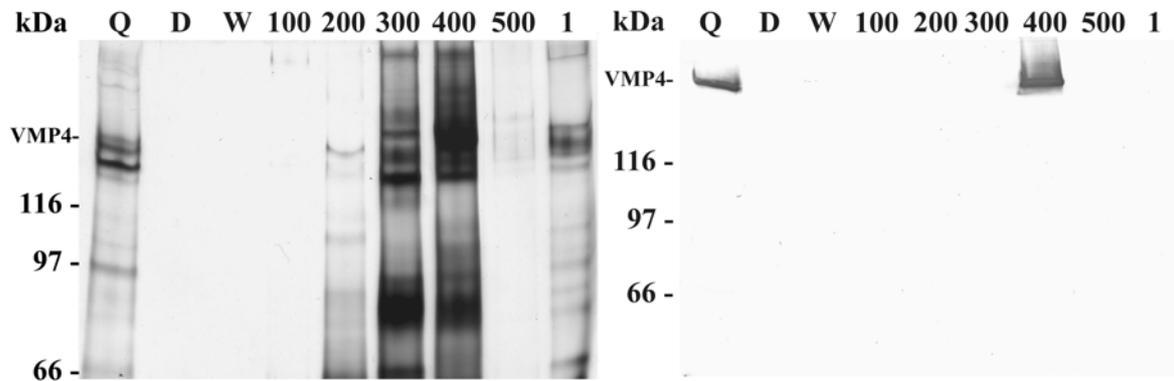


Abb. 2.35.: Reinigung von VMP4 mit der Uno Q1R-Säule: 6% SDS-PAG, Silberfärbung (linkes Gel) bzw. Immunodetektion mit anti-hVMP4-C-Terminus-AK (1:2.500, rechtes Gel). Bei allen Proben war eine Aufkonzentrierung der Proteine durch Fällung mit TCA nötig. Spur 1: 500 μ l TCA-gefällte 100 mM NaCl-Fraktion der QAE-Sephadex-Chromatographie (Q), Spur 2-9: TCA-gefällte 1 ml-Aliquots der HPLC-Fraktionen, Spur 2: Durchlauf (D), Spur 3: Waschfraktion (W), Spur 4: 100 mM NaCl-Eluat (100), Spur 5: 200 mM NaCl-Eluat (200), Spur 6: 300 mM NaCl-Eluat (300), Spur 7: 400 mM NaCl-Eluat (400), Spur 8: 500 mM NaCl-Eluat (500), Spur 9: 1 M NaCl-Eluat (1).

Im SDS-PAG war in der entsprechenden Fraktion mit VMP4 auf Höhe des Immunsignals eine starke Proteinbande zu erkennen, die bei der Färbung mit Silbernitrat hellbraun erschien, ein Effekt der oft bei Glykoproteinen beobachtet wird. Da das Protein im SDS-PAG separat zu liegen kam, konnte wie bei der Reinigung von VMP3 eine präparative Gelelution als letzter Reinigungsschritt verwendet werden (Details s. 4.4.3.2.). In Abb. 2.36. sind die einzelnen Schritte der Reinigung von VMP4 gezeigt, das Protein konnte bis zur Homogenität gereinigt werden.

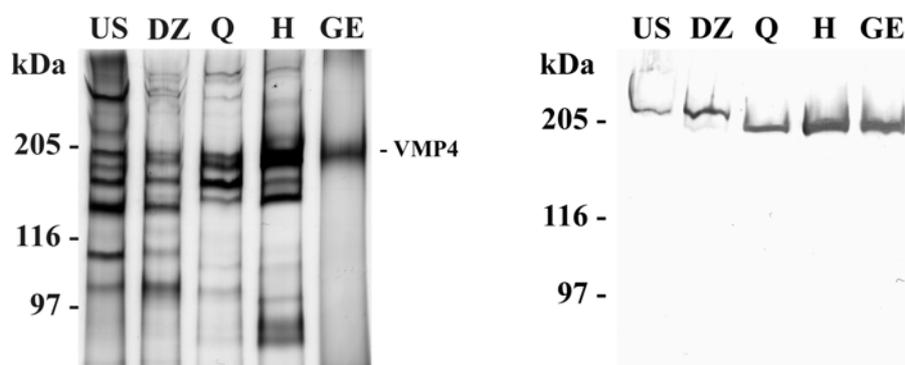


Abb. 2.36.: Reinigung von VMP4: 6% SDS-PAG, Silberfärbung (linkes Gel) bzw. Immunodetektion mit anti-hVMP4-C-Terminus-AK (1:2.500, rechtes Gel). Spur 1: Ultraschalllysat ganzer Algen als Vergleich (US), Spur 2: "deep zone"-Extrakt (DZ), Spur 3: 300 mM NaCl-Fraktion der QAE-Sephadex-Chromatographie (Q), Spur 4: 400 mM NaCl-Fraktion der Uno Q1R-HPLC (H), Spur 5: Eluat nach präparativer SDS-PAGE (GE). Aufgetragen sind jeweils entsprechende mit TCA gefällte Volumina der einzelnen Reinigungsschritte.

Das Gesamtreinigungsschema ist in Abb. 2.37. dargestellt. Wie im Western-Blot deutlich zu sehen ist, scheint die ursprünglich detektierte Bande bei 215 kDa auf die Höhe des niedermolekularen Signals bei 200 kDa zu „springen“, welches auch schon im ungereinigten "deep zone"-Extrakt zu erkennen ist. Derselbe Effekt tritt auf, wenn man "deep zone"-Extrakt für längere Zeit bei 37°C inkubiert, was aber durch Zugabe von EDTA unterbunden werden kann (nicht gezeigt). Alles deutet also auf einen proteolytischen Abbau des Proteins hin, der aber spezifisch sein muss, da bei einem unspezifischen Abbau ein „Schmieren“ des Signals im Western-Blot und kein „Springen“ auf ein definiertes Molekulargewicht zu sehen sein müsste. Dadurch lässt sich sowohl das Verschwinden der beiden hochmolekularen Banden, als auch die starke Zunahme der Menge des niedermolekularen Proteins bei der Reinigung an QAE-Sephadex A25 erklären (s.o.). Obwohl alle Reinigungsschritte einschließlich der Anionenauschromatographie an QAE-Sephadex A25 bereits bei 4°C durchgeführt wurden, konnte das „Springen“ während des Chromatographielaufs nicht verhindert werden. Auch die Zugabe von 1 mM EDTA zu allen Puffern der Reinigung brachte keine Verbesserung.

Wurde VMP4 stattdessen mit fraktionierter Ammoniumsulfatfällung (präzipitiert bei 50%, aber nicht bei 30% Sättigung) und anschließender Gelfiltration (mit Superose 12/HR 10/30-Säule, Fa. Pharmacia) gereinigt, trat der Effekt des „Springens“ nicht auf (nicht gezeigt). Dieser scheint also auf die Reinigung mit einer Anionenaustauschermatrix beschränkt zu sein. Eine Anreicherung im Großmaßstab war mit der alternativen Methode jedoch nicht möglich, da das maximale Auftragsvolumen der Gelfiltration nur 200 µl betrug. Weitere Hinweise auf den Abbau von VMP4 lieferte erst die N-terminale Sequenzierung des gereinigten Proteins (s. 2.2.6.1.).

Bei keiner der Anreicherungen des VMP4-Proteins gleich mit welcher Methode konnte in einen In-Gel-Assay (Casein oder Gelatine als Substrat) ein gleichzeitiges Auftreten einer Proteaseaktivität mit demselben Molekulargewicht detektiert werden. Hierin besteht also ein deutlicher Unterschied zur Reinigung von VMP3.

2.2.6. Biochemische Charakterisierung von gereinigten VMP4

2.2.6.1. Bestimmung der N-terminalen Sequenz von VMP4

Um zu prüfen, ob es sich bei dem gereinigten Protein mit etwa 200 kDa tatsächlich um ein Genprodukt von *VMP4* handelt, wurde der N-Terminus des Proteins ansequenziert. Im Gegensatz zur Analyse von VMP3 war eine Deglykosylierung des Proteins vor der Sequenzierung nicht nötig. Deshalb wurde eine 400 mM NaCl-Fraktion der HPLC (mit ca. 5 µg VMP4, s. 2.2.5.) auf eine PVDF-Membran geblottet, mit Coomassie angefärbt und nach dem Ausschneiden der VMP4-Bande durch automatisierten Edmannabbau ansequenziert. Dabei ergab sich folgende Sequenz: Val-Lys-Thr-Ser-Hyp-Hyp-Phe-Val-Hyp (Hyp: Hydroxyprolin).

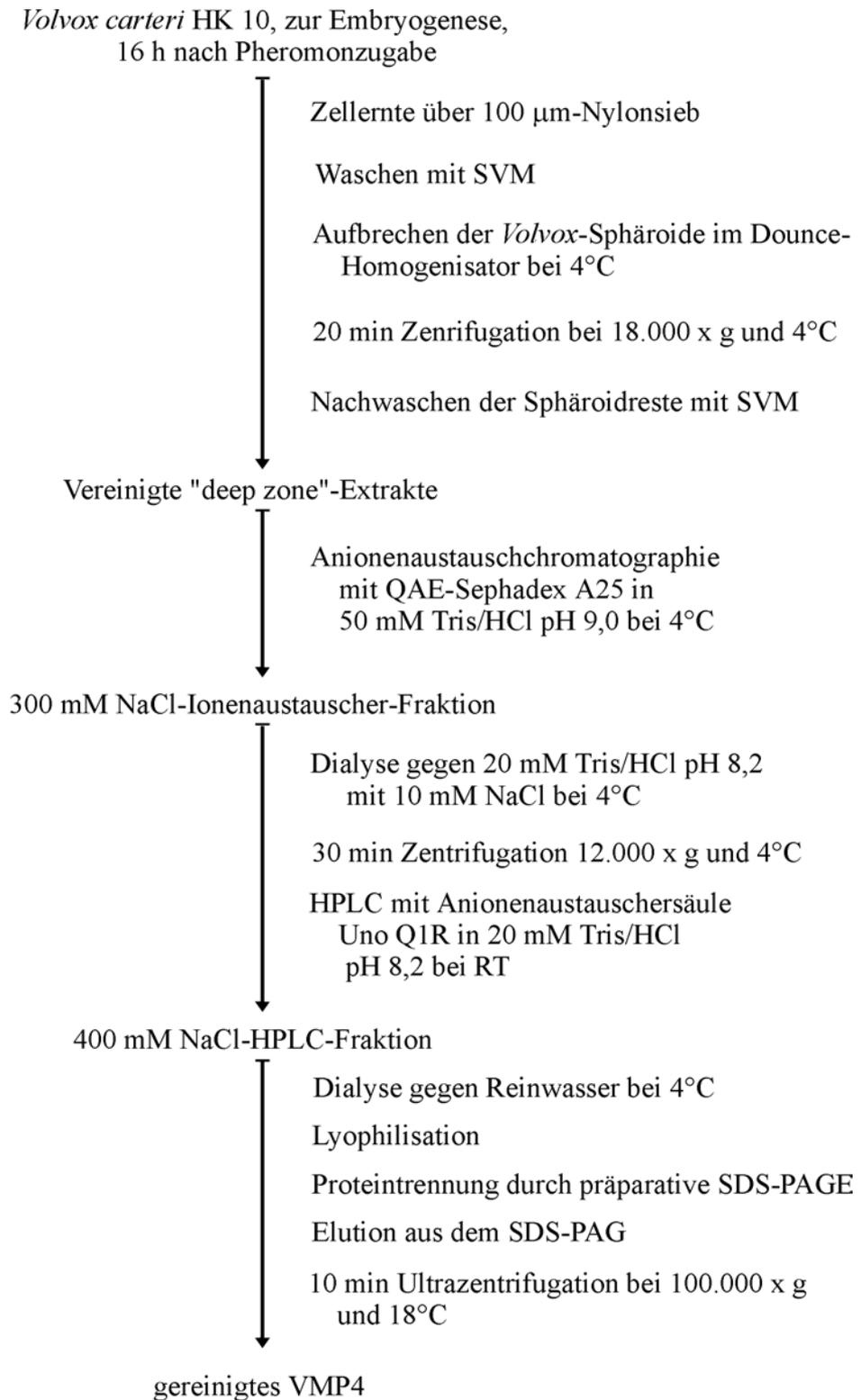


Abb. 2.37.: Reinigungsschema zur präparativen Reinigung von VMP4.

Diese Sequenz stimmt mit einer von *VMP4* codierten überein, beginnt jedoch erst mit Aminosäure 492, d.h. vier Aminosäurereste vor Beginn des Polyprolinbereichs (s. 6.4.). Die gesamte N-terminale, proteasehomologe Domäne von *VMP4* (etwa 52 kDa) fehlt also im gereinigten Protein. Vermutlich wurde sie beim Reinigungsschritt der QAE-Sephadex A25-Chromatographie abgespalten, bei der ein „Springen“ des Immunsignals im Western-Blot zu einem geringeren Molekulargewicht beobachtet werden konnte (s. 2.2.5.). Die Differenz betrug zwar nur etwa 20 kDa, ist wegen des ungewöhnlichen Laufverhaltens prolinreicher Proteine aber nicht aussagekräftig (Andres et al., 1993). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine spezifische proteolytische Spaltung, weil erstens eine definierte Domäne des Proteins abgespalten wurde und zweitens im gereinigten Protein kein „ausgefranst“ N-Terminus vorliegt. Da das Rumpfpotein ohne Proteasedomäne auch schon in der ungereinigten inneren Matrix der Algen nachzuweisen war (s. 2.2.4), könnte es sich zudem um eine physiologisch relevante Prozessierung des *VMP4*-Proteins durch eine Protease aus *Volvox carteri* handeln.

Das Auftreten von Hydroxyprolinen in der ermittelten Aminosäuresequenz des Proteins ist nicht überraschend, weil bislang bei allen bekannten ECM-Proteinen aus *Volvox carteri* eine solche Hydroxylierung der Proline innerhalb des prolinreichen Bereichs gefunden wurde.

2.2.6.2. Deglykosylierung von *VMP4* mit Fluorwasserstoff

Das Laufverhalten von *VMP4* im SDS-PAG und das Vorhandensein eines Poly-(hydroxy-)prolinbereiches im Protein deutet darauf hin, dass es sich bei *VMP4* um ein Glykoprotein handelt. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde salzfreies, teilweise gereinigtes *VMP4*-Protein (400 mM NaCl-Fraktion der HPLC) mit wasserfreiem Fluorwasserstoff versetzt und 90 min auf Eis inkubiert. Wie die Analyse der Probe im Western-Blot in Abb. 2.38. zeigt, vermindert sich durch die Deglykosylierung das Molekulargewicht von *VMP4* von 200 kDa auf etwa 100 kDa.

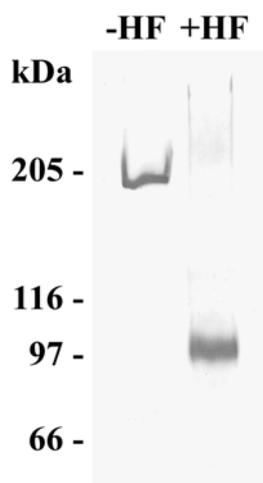


Abb. 2.38.: Deglykosylierung von *VMP4*: 6% SDS-PAG, Immunodetektion mit anti-*VMP4*-C-Terminus-AK (1:2.500), Spur 1: *VMP4* vor Deglykosylierung mit Fluorwasserstoff (-HF), Spur 2: *VMP4* nach Deglykosylierung mit Fluorwasserstoff (+HF).

Der ermittelte Wert von 100 kDa stimmt zwar immer noch nicht mit dem aus der cDNA errechneten Gewicht (73 kDa, ohne N-terminale Domäne) überein, kann aber durch den hohen Prolinanteil im Protein (16 %) und einem damit verbundenen, atypischen Laufverhalten im SDS-PAG erklärt werden (Andres et al., 1993).

2.2.7. Heterologe Expression des N-Terminus in *E. coli*

Wie sich am Ende der Reinigung von VMP4 herausstellte, konnte nur ein Rumpfpotein bestehend aus dem Polyprolinbereich und den vier C-terminalen Domänen angereichert werden. Die N-terminale, proteasehomologe Domäne war bei einer Anionenaustauschchromatographie vollständig abgespalten worden. Bei der Analyse noch ungereinigter Algenextrakte konnte aber mit dem anti-hVMP4-C-Terminus-Antikörper ein Signal mit größerem Molekulargewicht nachgewiesen werden, wobei es sich wahrscheinlich um das noch vollständige VMP4-Protein handelt. Um diese Vermutung zu überprüfen, und um den Verbleib der proteasehomologen Domäne während der Reinigung zu klären, wurde auch der N-terminale Bereich des *VMP4*-Gens heterolog in *E. coli* exprimiert und zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet. Die Expression erfolgte dabei genau wie beim hVMP4-C-Terminus mit Hilfe eines pET11a-Vektors und dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (s 2.2.1.). In Abb. 2.39. ist die Klonierung des Expressionskonstrukts mittels rekombinanter PCR dargestellt. Das Expressionsprodukt (hVMP4-N-Terminus) entspricht den AS 52-492 des VMP4-Proteins (s. 6.4.), also fast der gesamten N-terminalen Domäne, und wurde für eine spätere Reinigung mit einem C-terminalen (His)₆-"tag" versehen.

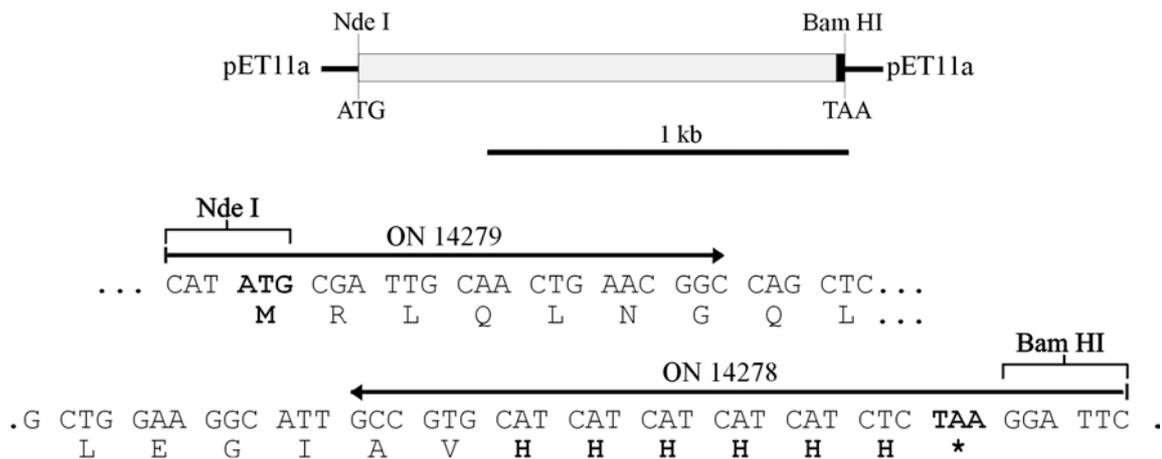


Abb. 2.39.: Schematische Darstellung des Plasmids pET11a/A-Klon/N-Term/1/'3": Das durch PCR hergestellte DNA-Stück wurde über die rekombinanten Restriktionsschnittstellen Nde I und Bam HI in den Expressionsvektor pET11a kloniert. Durch die beiden Oligonukleotide ON 14278 bzw. ON 14279 wurden zusätzliche Nucleotide angefügt, die für das Startcodon (M), einen C-terminalen (H)₆-"tag" und das Stopcodon (*) codieren.

Bei der rekombinanten PCR wurden ungewollt zwei Basenmutationen eingeführt, die im Expressionsprodukt zu Aminosäureaustauschen führten (Position 97: Lys statt Glu und Position 368: Leu statt Phe). Die Fehler konnten aber für die Produktion polyklonaler Antikörper vernachlässigt werden.

Wie schon bei der Expression von hVMP4-C-Terminus war auch für hVMP4-N-Terminus das Maximum der Expression 3 h nach Zugabe von IPTG erreicht (s. Abb. 2.40.). Das Protein lag jedoch in Form unlöslicher "inclusion bodies" vor, und konnte nur mit 6 M Guanidiniumchlorid in Lösung gebracht werden. Die Größe des Expressionsprodukts im SDS-PAG (etwa 44 kDa) weichte deutlich vom erwarteten Molekulargewicht (49 kDa, 478 AS) ab, verfügt aber über einen vollständigen C-Terminus mit (His)₆-"tag" (s. Abb. 2.40.).

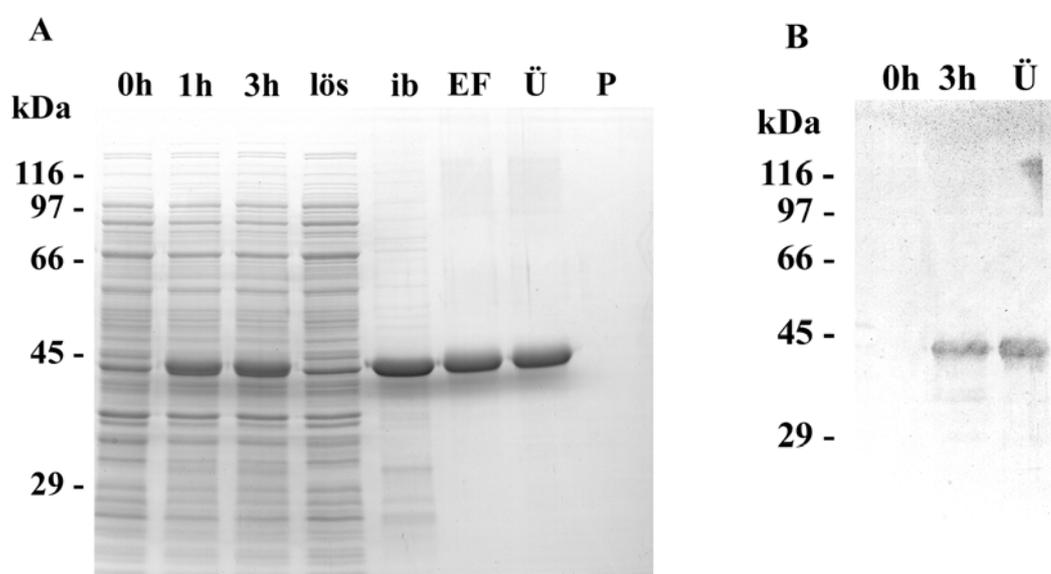


Abb. 2.40.: Expressionskinetik und Reinigung von hVMP4-N-Terminus, **A:** 10% SDS-PAG, Coomassiefärbung, Spur 1, 2 und 3: Bakterienhitzelysate 0 h, 1 h und 3 h nach Start der Expression, Spur 4 und 5: lösliche (lös) und unlösliche (ib) Proteinfraction nach Zellaufschluss, Spur 6: Elutionsfraktion (EF) "2" der Metall-Affinitätschromatographie, Spur 7 und 8: Überstand (Ü) und Pellet (P) nach Dialyse gegen Glycinpuffer. **B:** 10% SDS-PAG, Immunodetektion mit anti-(His)₅-AK (1:1.000, Fa. Qiagen), Spur 1 und 2: Bakterienhitzelysate 0 h und 3 h nach Start der Expression, Spur 3: gereinigter hVMP4-N-Terminus (Ü).

Nach der Reinigung (s. 4.4.1.2.) gestaltete sich jedoch die Rückfaltung von hVMP4-N-Terminus problematisch, weil das Protein bei der Dialyse gegen verschiedene, getestete Puffer immer vollständig präzipitierte. Erst eine vorausgehende Dialyse gegen 8 M Harnstoff bei 20°C ermöglichte schließlich die Rückfaltung des Proteins in einer Dialyse gegen 50 mM Glycin pH 9,0. Aus 100 ml Flüssigkultur konnten so 2 mg hVMP4-N-Terminus gewonnen werden.

Aufgrund des Laufverhaltens im SDS-PAG wurde der N-Terminus des gereinigten Expressionsprodukts ansequenziert. Dabei ergab sich die erwartete Sequenz: MRLQLNGQ. Obwohl also sowohl der N-Terminus, also auch der C-Terminus des Proteins vollständig

vorhanden sind, läuft das Protein im SDS-PAG ungewöhnlicherweise bei nur 44 kDa statt wie errechnet bei 49 kDa.

Genau wie für das heterologe Expressionsprodukt von VMP3 konnte auch für hVMP4-N-Terminus weder bei Verdauen in Lösung (Azokoll, BSA, Casein, Casein-Yellow, Gelatine und RNase A als Substrat), noch in In-Gel-Assays (Casein und Gelatine als Substrat) Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Eine extrazelluläre Expression der proteasehomologen Domäne im Periplasma der Bakterien wurde aufgrund der schlechten Erfahrungen mit VMP3 nicht versucht (s. 2.1.1.).

2.2.8. Produktion und Spezifität der Antikörper gegen den VMP4-N-Terminus

Die Herstellung polyklonaler Antikörper erfolgte wieder wie unter 4.5.1. dargestellt. Beim Test der verschiedenen Serumproben erwies sich das Immunsrum des Kaninchens 1 vom Tag 61 als am besten (s. Abb. 2.41), das Präimmunsrum des Tieres (Tag 1) detektiert im Western-Blot dagegen nichts. Alle folgenden Immunodetektionen wurden mit diesem gereinigten Antikörper (vom Tag 61) durchgeführt (s. 4.5.2.).

Im Ultraschalllysat von *Volvox*-Sphäroiden, die 3 h nach Zugabe des Sexualpheromons geerntet wurden, erkennt der anti-VMP4-N-Terminus-Antikörper ausschließlich ein Protein bei etwa 215 kDa, das auch schon mit dem Antikörper gegen den VMP4-C-Terminus reagiert hat (s. Abb. 2.41.).

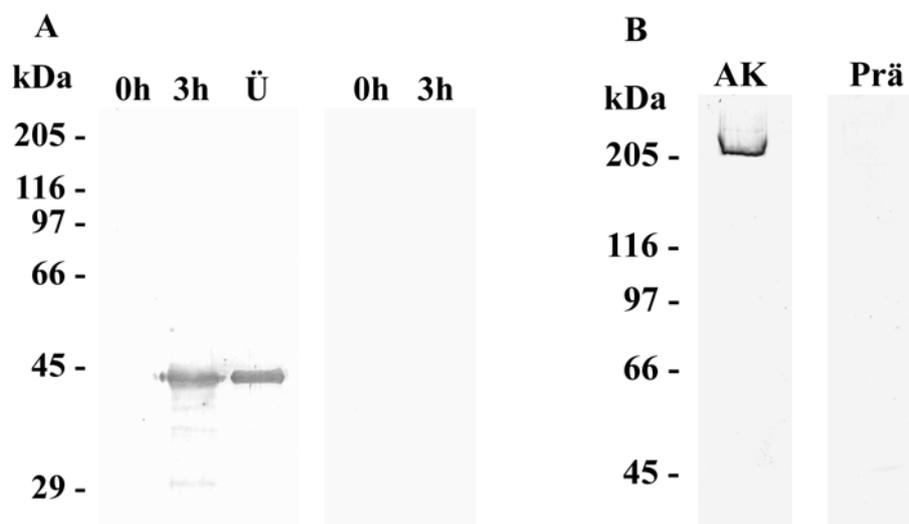


Abb. 2.41.: Test des anti-hVMP4-N-Terminus-Antikörpers, **A:** 10% SDS-PAG, Immunodetektion, Spur 1, 2, 4 und 5: Bakterienhitzelysate 0 h (Spur 1 und 4) bzw. 3 h (Spur 2 und 4) nach Start der Expression, Spur 3: gereinigter hVMP4-N-Terminus (Ü). Spur 1-3 detektiert mit anti-hVMP4-N-Terminus-AK (1:2.500, Tier 1/Tag 61), Spur 4-5 mit Präimmunsrum (1:2.500, Tier 1/Tag 1). **B:** 6% SDS-PAG, Immunodetektion, Spur 1 und 2: *Volvox*-Ultraschalllysat gesamt, 3 h nach Pheromonzugabe. Spur 1 detektiert mit anti-hVMP4-N-Terminus-AK (AK, 1:2.500, Tier 1/Tag 61), Spur 2 mit Präimmunsrum (Prä, 1:2.500, Tier 1/Tag 1).

2.2.9. Analyse von VMP4 mit dem Antikörper gegen den N-Terminus

Um zu prüfen, ob es sich beim Signal des anti-hVMP4-N-Terminus-Antikörper im Western-Blot tatsächlich um das vollständige VMP4-Protein handelt, wurden sowohl die Lokalisation, als auch die Expression von VMP4 nochmals mit diesem Antikörper untersucht (s. 2.2.3. und 2.2.4.). Wie Abb. 2.42. zeigt, erkennt der Antikörper in genau denselben Algen-Fractionen an genau der gleichen Stelle das Protein, an das auch der Antikörper gegen die C-terminalen Domänen von VMP4 bindet (s. auch Abb. 2.31.). Zusätzlich reagiert der Antikörper aber mit einem Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 55 kDa, das ebenfalls nur in den "deep zone"-Extrakten auftritt. Dabei könnte es sich um die bereits abgespaltene N-terminale Domäne von VMP4 handeln. Auch die Expressionskinetik stimmt im Zeitverlauf mit der bereits bekannten überein, im Vergleich zum Antikörper gegen den C-Terminus, detektiert der anti-hVMP4-N-Terminus-Antikörper von den drei hochmolekularen Proteinen aber nur das schwerste (s. auch Abb. 2.32.). Beide Ergebnisse erhärten also den Verdacht, dass das Abspalten der N-terminale Domäne von VMP4 als Einheit auch in der Alge stattfindet.

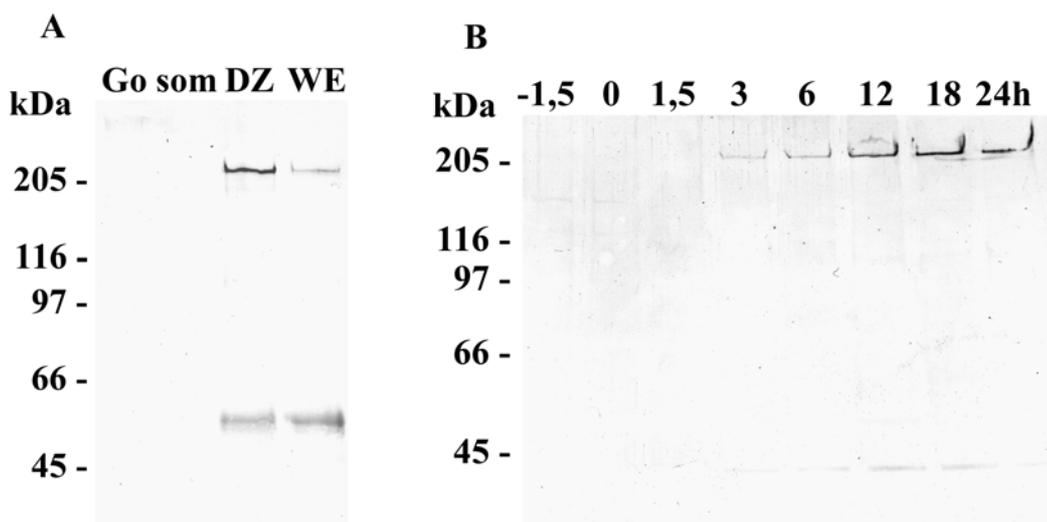


Abb. 2.42: Lokalisation und Expressionskinetik von VMP4: **A:** 8% SDS-PAG, Immunodetektion mit anti-hVMP4-N-Terminus-AK (1:2.500), Spuren 1-4: Fraktionierte *Volvox*-Sphäroide, 3 h nach Pheromonzugabe, Spur 1: Gonidien (Go), Spur 2: "somatic sheet" (som), Spur 3: "deep zone"-Extrakt (DZ), Spur 4: „Waschextrakt“ (WE). **B:** 8% SDS-PAG, Immunodetektion mit anti-hVMP4-N-Terminus-AK (1:2.500), Ultraschalllysate derselben Anzahl sexuell induzierter, ganzer Algen. Die angegebenen Zahlen der Bildüberschrift repräsentieren die Zeit in Stunden seit Pheromonzugabe.

Bei der Reinigung von VMP4 an QAE-Sephadex A25 war ein „Springen“ des Signals im Western-Blot zu einem geringeren Molekulargewicht erfolgt (s. Abb. 2.34. und 2.36.). Die Analyse der Fraktionen dieses Reinigungsschrittes mit den anti-hVMP4-N-Terminus zeigte, dass dabei die N-terminale Domäne des Proteins als Ganzes abgespaltet wird (s. Abb. 2.43.): Der Antikörper

detektierte im "deep zone"-Extrakt vor Auftrag auf den Ionenaustauscher noch das hochmolekulare VMP4-Signal und das im geringen Maße vorhandene niedermolekulare Protein bei 55 kDa. In den Fraktionen der Chromatographie konnte dagegen kein vollständiges VMP4-Protein mehr nachgewiesen werden, dafür war aber die Menge des 55 kDa-Signals, das sich im Durchlauf wiederfand, stark angestiegen. Das VMP4-Rumpfpfprotein eluierte in der 300 mM NaCl-Fraktion (s. Abb. 2.42.). Die Reinigung am Anionenaustauscher scheint also einen spezifischen, proteolytischen Prozess am VMP4-Protein zu aktivieren, der so auch in physiologischer Weise in der Alge selbst abläuft. Dieser Effekt hängt aber nicht mit einer Veränderung des pH-Wertes oder der Salzkonzentration des Algenextraktes zusammen, sondern wird nur durch den Kontakt mit der Ionenaustauschermatrix verursacht (nicht gezeigt).

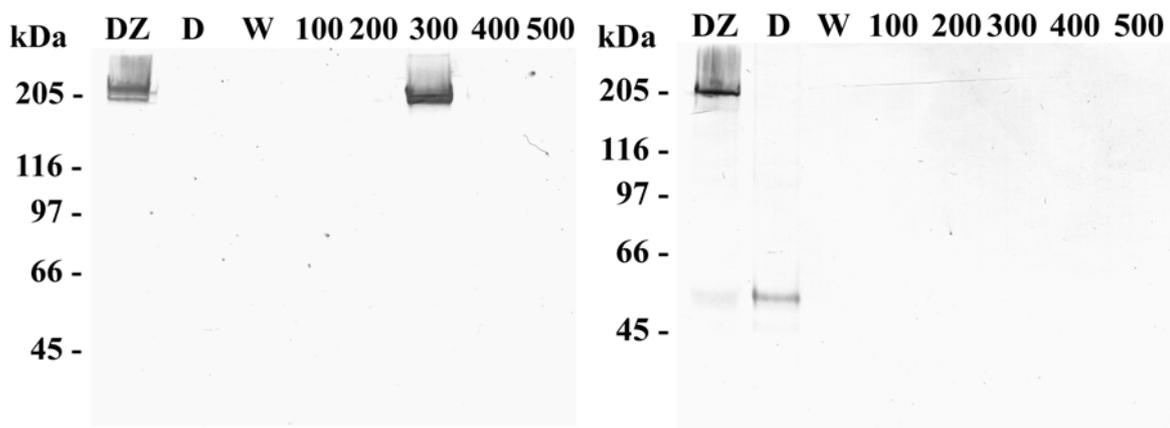


Abb. 2.43.: Reinigung von VMP4 an QAE-Sephadex A25: 8% SDS-PAG, Immunodetektion mit anti-hVMP4-C-Terminus-AK (1:2.500, linkes Gel) bzw. mit dem anti-hVMP4-N-Terminus-AK (1:2.500, rechtes Gel). Bei allen Proben war eine Aufkonzentrierung der Proteine durch Fällung mit TCA nötig. Spur 1: 200 μ l (linkes Gel) bzw. 1 ml (rechtes Gel) TCA-gefällter "deep zone"-Extrakt (DZ), Spur 2-8: TCA-gefällte 1 ml-Aliquots der Chromatographie: Spur 2: Durchlauf (D), Spur 3: Waschfraktion (W), Spur 4: 100 mM NaCl-Eluat (100), Spur 5: 200 mM NaCl-Eluat (200), Spur 6: 300 mM NaCl-Eluat (300), Spur 7: 400 mM NaCl-Eluat (400), Spur 8: 500 mM NaCl-Eluat (500).

Alle Versuche das niedermolekulare Protein bei 55 kDa z.B. unter Verwendung eines Kationenaustauschers (SP-Sephadex A25, Fa. Pharmacia) anzureichern und damit eindeutig als N-terminale Domäne von VMP4 zu identifizieren, waren bislang nicht erfolgreich (nicht gezeigt). In einem In-Gel-Assay mit Gelatine als Substrat zeigt diese Protein aber keine Proteaseaktivität (nicht gezeigt).

3. Diskussion

3.1. Die Proteaseaktivität von VMP3

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für das Protein VMP3 eine Proteaseaktivität nachgewiesen werden. Entsprechend seiner Homologie zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen ist das Enzym auf ein zweifach positiv geladenes Metallion als Kofaktor angewiesen. Überraschenderweise erfolgt aber die Katalyse im Gegensatz zu allen anderen bekannten Metalloproteasen mit Cu^{2+} sehr viel effizienter als mit Zn^{2+} . Einige Metalloproteasen, z.B. die Methionyl-Amino-peptidase (Chang et al., 1990) oder die X-Pro-Amino-peptidase (Orawski & Simmons, 1995), nutzen zwar Co^{2+} bzw. Mn^{2+} für ihre Katalyse, weisen aber ein völlig anders strukturiertes aktives Zentrum auf: Beide Exopeptidasen koordinieren jeweils zwei Metallionen, die in der Enzymreaktion kokatalytisch zusammenwirken. Für einige Zn^{2+} -abhängige Metalloproteasen mit einem zum VMP3 sehr ähnlichen Metallbindemotiv (HExxHxxGxxH), z.B. Astacin (Gomis-Rüth et al., 1994), konnte bei Verwendung anderer Metallionen (z.B. Co^{2+}) erhöhte Aktivitäten gezeigt werden, die aber niemals mehr als 200% des mit Zn^{2+} ermittelten Wertes erreichten. VMP3 ist mit Cu^{2+} als Kofaktor um den Faktor 15 aktiver. Alle bisher bekannten Metalloproteasen zeigen mit Cu^{2+} dagegen entweder gar keine oder nur eine stark verminderte Aktivität (z.B. Yasumasu et al., 1989). Dies konnte in dieser Arbeit auch für Gelatinase (MMP-2) bestätigt werden, die im In-Gel-Assay mit Cu^{2+} nur noch 25% ihrer Aktivität erreichte.

Eine Erklärung für diese Ausnahmestellung von VMP3 könnte im atypischen Metallbindemotiv (QExxHxxGxxH) der VMP-Proteine liegen, in dem ein Glutaminrest die Stelle eines konservierten Histidins einnimmt, das ansonsten aber mit der Konsensussequenz der MMP-Familie identisch ist. Das Glutamin müsste also die Rolle als dritter Metallligand übernehmen (Gomis-Rüth et al., 1993). Bislang konnte in Metalloproteasen nur für die Aminosäuren Histidin, Glutamat, Aspartat und Lysin eine Beteiligung an der Koordination des Metallions nachgewiesen werden (Rawlings et al., 1998). Der Glutaminrest besitzt jedoch mit seiner Säureamidgruppe, in der sowohl das Stickstoffatom, als auch das Sauerstoffatom über ein freies Elektronpaar verfügt, einen funktionellen Rest, der Metallionen chelatieren könnte. In Mutationsexperimenten mit Carboanhydrase II, die ebenfalls Zn^{2+} als Kofaktor benötigt, wurde gezeigt, dass das Enzym bei einem Austausch eines Metallliganden (Histidin) durch Glutamin noch über 60% seiner Ausgangsaktivität verfügt (Christiansen & Cox, 1999). Für die Katalyse von VMP3 ist der Glutaminrest essentiell, ein Austausch durch Leucin führt zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität. Wird das Glutamin dagegen durch Histidin ersetzt, und damit das aktive Zentrum dem der MMP-Familie angeglichen, ist überraschenderweise eine enorme Steigerung der Aktivität auf etwa 500% zu detektieren, falls Zn^{2+} als Metallion verwendet wird. Bietet man dem

veränderten Enzym dagegen Cu^{2+} als Kofaktor an, so kann eine zusätzliche Erhöhung um den Faktor 2,5 nachgewiesen werden. Dieser liegt einerseits deutlich unter dem vom Wildtyp-Protein bekannten Wert (Faktor 15), unterscheidet sich andererseits aber auch wesentlich von der beobachteten Hemmung der Kollagenase 1 (Faktor 0,25), die daselbe Metallbindemotiv wie das mutierte VMP3-Protein besitzt. Daraus lässt sich folgern, dass der Glutaminrest tatsächlich ein Ligand des Metallions ist und zum größten Teil, aber nicht ausschließlich für die effizientere Katalyse mit Cu^{2+} verantwortlich ist. Vielmehr scheinen auch noch andere Elemente des VMP3-Proteins für die Bindung von Cu^{2+} optimiert zu sein. Welches Metallion VMP3 aber *in vivo* als Kofaktor verwendet, lässt sich mit den zur Verfügung stehenden Daten und Methoden nicht eindeutig klären. Dem *Volvox*-Medium wird jedenfalls aktiv kein zweiwertiges Kupfersalz zugesetzt (Provasoli & Pintner, 1959). Trotzdem muss dieses Ion im ausreichendem Maße vorhanden sein, weil auch Enzyme der Photosynthese (Plastocyanin) und der Atmungskette (Cytochrom-Oxidase) Kupferionen als Kofaktor benötigen und anderenfalls überhaupt kein Algenwachstum stattfinden würde (Stryer, 1994).

Für Metalloproteasen werden verschiedene Katalysemechanismen diskutiert. Allen gemeinsam ist die Aktivierung eines Wassermoleküls im aktiven Zentrum durch das gebundene, positiv geladene Metallion. Das Wassermolekül gibt dabei ein Proton an einen als Base reagierenden Aminosäurerest ab und greift dann als Hydroxydion die zu spaltende Polypeptidkette an. Bei Metalloproteinasen mit dem Sequenzmotiv HExxH oder HxxEH dient der konservierte Glutamatrest zur Aufnahme dieses Protons (Rawlings et al., 1998). Wie die Homologie zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen vermuten lässt, sollte auch das Glutamat im Metallbindemotiv der VMP-Familie dieselbe Funktion erfüllen. Tatsächlich verliert VMP3 nach Mutation dieses Glutamats zu Alanin seine gesamte enzymatische Aktivität, der Aminosäurerest ist also für die enzymatische Katalyse essentiell. Für Metalloproteasen aus der zu den VMPs verwandten Astacin/Serralysin-Familie wird aufgrund von Röntgenstrukturdaten beim Katalysemechanismus noch ein weiterer Aminosäurerest (Tyrosin) beschrieben, der im Übergangszustand als vierter Metallligand und/oder als Protonendonator/-akzeptor dienen könnte (Grams et al., 1996). An der entsprechenden Position (zweite Aminosäure nach dem Methionin-Turn, s. 1.1) befindet sich bei den Mitgliedern der VMP-Familie ein Arginin, für das eine ähnliche Funktion denkbar wäre und deshalb für folgende Punktmutationen in Betracht gezogen werden sollte. Bei den MMPs befindet sich an dieser Aminosäureposition dagegen ein Prolin, das keine der vorgeschlagenen Funktionen erfüllen kann.

VMP3 lässt sich schon durch geringe Mengen an GM 6001 (Galardin), einem Peptidanalogue mit einer terminalen Hydroxamatgruppe, vollständig hemmen. Von GM 6001 ist aber auch bekannt, dass es ein Inhibitor fast aller bekannten MMPs ist (Grobelyny et al., 1992). Das aktive Zentrum von

VMP3 scheint also trotz des Vorhandenseins des atypischen Glutaminrests und trotz anderer molekularer Veränderungen dem der MMPs noch sehr ähnlich zu sein.

Wie die Sequenzierung des N-Terminus des aktiven VMP3-Proteins gezeigt hat, wird das Enzym schon in seinem aktiven Zustand sezerniert und ist im Vergleich zu den meisten MMPs nicht erst nach der Abspaltung eines Propeptids voll funktionsfähig (Nagase & Woessner, 1999). Ebenso ist die Anwesenheit von Ca^{2+} als Aktivator nicht notwendig, die Metallsalzhängigkeit von VMP3 beschränkt sich auf Zinkionen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, das - wie z.B. in MMP-1 (Lovejoy et al., 1994) - im VMP3-Molekül ein zusätzliches, strukturelles Zinkion vorliegt. Eine entsprechende Konsensussequenz im *VMP3*-Gen fehlt jedoch.

Für die heterolog in *Escherichia coli* exprimierte Proteasedomäne (hVMP3-N-Terminus) von VMP3 konnte keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Dies könnte zum einen an den erst später identifizierten posttranslationalen Modifikationen des VMP3 (Prolinhydroxylierung, Glykosylierung), zum anderen an den vielfach auftretenden Cysteinresten (10) des Expressionsprodukts liegen. Bei der Expression einer extrazellulären Domäne im Cytosol eines Prokaryonten können weder die für eine Aktivität möglicherweise essentiellen Proteinmodifikationen durchgeführt werden, noch ist eine native Faltung des Enzyms durch das richtige Knüpfen von Disulfidbrücken gewährleistet. Zwar zeigen die in *E. coli* exprimierten, pflanzlichen Metalloproteasedomänen von *At1-MMP* aus *Arabidopsis thaliana* (Maidment et al., 1999), von *Cs1-MMP* aus *Cucumis sativus* (Delorme et al., 2000) und *GmMMP2* aus *Glycin max* (Golldack et al., 2002) nach ihrer Aufreinigung Proteaseaktivität, die Expressionsprodukte beinhalten aber nur einen bzw. keinen einzigen Cysteinrest. Wie gezeigt, ist aber das Vorhandensein von Disulfidbrücken für die Aktivität von VMP3 essentiell.

Für VMP3 konnte enzymatische Aktivität bislang nur in einem unphysiologischen In-Gel-Assay mit Gelatine als Substrat gezeigt werden. Alle Versuche Gelatine und verschiedene andere Substrate in Lösung zu verdauen waren jedoch nicht erfolgreich. Eventuell ist eine vorherige Konditionierung, d.h. Entfaltung, der Moleküle bei der SDS-PAGE nötig, um von VMP3 als Substrat erkannt zu werden. Dies könnte auf eine enge Substratspezifität des Enzyms hindeuten, zumal Casein im In-Gel-Assay nicht abgebaut werden konnte. Ähnlich wie in den Gelatinemolekülen (denaturiertes Kollagen) liegen auch in vielen ECM-Proteinen aus *Volvox carteri* (hydroxy-)prolinreiche Bereiche vor, so dass es sich bei Gelatine um ein Substrathomologes handeln könnte. Für VMP4 konnte gar keine Proteaseaktivität gefunden werden, was zumindest auf ein anderes Substratspektrum als für VMP3 schließen lässt. Weitere Hinweise auf die Substratspezifität wären durch die Verwendung von kommerziell erhältlichen Modellpeptiden möglich, deren Verdau sich z.B. photometrisch verfolgen lässt.

Um aber genauere Aussagen über die Katalyse und Funktion von VMP3 machen zu können, ist die Identifikation des natürlichen Substrats unabdingbar. Einige Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, waren jedoch nicht erfolgreich.

3.2. Die Lokalisierung und der modulare Aufbau von VMP3 und VMP4

Genau wie die Vertreter der MMP-Familie besitzen VMP3 und VMP4 eine modulare Domänenstruktur (Nagase & Woessner, 1998). Beide Proteine sind entsprechend ihres Signalpeptids in der "deep zone" der extrazellulären Matrix von *Volvox carteri* lokalisiert. Bei VMP3 werden von der Signalpeptidase zwei verschiedene, aber ähnliche Spaltstellen erkannt. Die "deep zone" der Algen besteht vor allem aus glykosylierten, hydroxyprolinreichen Proteinen, die z.T. miteinander quervernetzt sind (Ender et al., 2002) und wahrscheinlich eine strukturelle Funktion erfüllen (Ender et al., 1999). Es wurden aber auch schon zwei Enzyme nachgewiesen (Amon et al., 1998): eine Chitinase (sogenannter Klon A) und eine Cysteinprotease (sogenannter Klon B), welche ebenfalls eine Chitinbindedomäne trägt, für die aber noch keine Proteaseaktivität gezeigt werden konnte. Beide Proteine werden genau wie VMP3 und VMP4 nach sexueller Induktion und nach Verletzung der Algen exprimiert. Bei der "deep zone" könnte es sich somit um ein eigenständiges, extrazelluläres „Kompartiment“ der Alge handeln, das eine spezifische Enzymausstattung besitzt.

Die N-terminale Proteasedomäne ist in allen vier Mitgliedern der *VMP*-Familie stark konserviert und beinhaltet ihr charakteristisches Metallbindemotiv (QExxHxxGxxH). Bei den beiden verwendeten Antikörpern traten jedoch keine Kreuzreaktionen auf. Die N-terminale Domäne scheint in ihrer Funktion und Struktur selbständig zu sein, da sie im VMP3 unabhängig von der Länge des Polyprolinbereichs enzymatisch aktiv ist und vom VMP4-Protein als Einheit abgespalten wird. Die Verwandtschaft der *VMP*-Gene beschränkt sich nicht nur auf die abgeleitete Aminosäuresequenz, sondern zeigt sich auch in der konservierten Lage und Größe einiger Introns (nicht gezeigt). Davon lässt sich ein gemeinsamer Ursprung aller *VMP*-Gene ableiten, der evolutorisch nicht allzu weit zurückliegen kann und eventuell mit einem Übergang zur Vielzelligkeit einherging. Dieses Ereignis fand bei *Volvox carteri* erst vor 50-75 Millionen Jahre statt (Larson et al., 1992). Erstaunlicherweise konnte in der EST("enhanced sequence tags")-Datenbank von *Chlamydomonas reinhardtii* (Asamizu et al., 1999 und Asamizu et al., 2000), dem nächsten einzelligen Verwandten von *Volvox*, keine cDNA gefunden werden, die für das VMP-Metallbindemotiv codiert. Kürzlich wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe ein weiteres Mitglied der *VMP*-Familie aus *Volvox carteri* identifiziert (als *S9* bezeichnet; Shimizu et al., 2002), das sich von *VMPI* (Hallmann et al., 2001) jedoch nur durch sieben zusätzliche C-terminale

Aminosäuren unterscheidet. In Southern-Blot-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich im *Volvox*-Genom noch eine Vielzahl weiterer *VMP*-Gene befinden (Hallmann, et al., 2001). *Volvox carteri* besitzt jedoch nicht nur Metalloproteinasen der *VMP*-Familie, es sind auch zwei proteasehomologe Gene bekannt deren Metallbindemotiv exakt dem der MMPs entspricht: Ein *LSG2* genanntes Gen, das von den somatischen Zellen im Stadium der Seneszenz exprimiert wird (Shimizu et al., 2002), und ein weiteres durch das Sexualpheromon induzierbares Gen (*Sph8/4*, PD Dr. A. Hallmann, pers. Mitteilung).

Wie gezeigt sind *VMP3* und *VMP4* stark glykosyliert, was ihr Laufverhalten im SDS-PAGE dramatisch beeinflusst. Die molekulare Masse von *VMP3* wurde mit 475 kDa bestimmt (cDNA: 73 kDa), das Molekulargewicht von *VMP4* beträgt 215 kDa (cDNA: 123 kDa). Die Zuckerreste sind dabei wahrscheinlich in für *Volvox* typischer Weise an die hydroxylierten Proline des prolinreichen Bereichs der Proteine angefügt. Die Zuckerreste könnten für eine Verankerung der Enzyme über nicht-kovalente Wechselwirkungen mit dem strukturellen Netzwerk innerhalb der extrazellulären Matrix der Alge verantwortlich sein. Für *VMP3* ist das Vorhandensein zumindest eines kleinen Teils der prolinreichen Domäne notwendig für die richtige Lokalisation des Proteins. Das rekombinante *VMP3 δ* , bei dem dieser Bereich vollständig deletiert wurde, konnte nicht in die "deep zone" sezerniert werden und wurde wahrscheinlich auch nicht vollständig prozessiert. Für eine andere Gruppe von Proteinen aus der ECM von *Volvox carteri*, den Pherophorinen wurde dagegen gezeigt, dass die Polyprolinomäne auf die Lokalisierung der Proteine keinen Einfluss hat (Rappel, 1998).

Die C-terminalen Domänen von *VMP4* wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die beiden C2-Domänen sind homolog zu Proteinbindebereichen ("apple Domäne") der Kallikrein-Peptidase (Seidah et al., 1990) und könnten ebenfalls an der Verankerung des Proteins in der ECM oder an der Substraterkennung beteiligt sein, wie dies für die C-terminale Hemopexin-Domäne der MMPs beschrieben wird (Bode, 1995). Da bereits ein polyklonaler Antikörper gegen die C1/C2-Domänen existiert, sollten sich gebundene (Substrat-)Proteine durch Koimmunopräzipitation identifizieren lassen.

3.3. Die Expression und die Regulation von *VMP3* und *VMP4*

VMP3 und *VMP4* wurden ursprünglich als Gene identifiziert, deren Expression durch das Sexualpheromon initiiert wird (Haas, 1994 und Amon, 1995). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsrate von *VMP3* nach der sexuellen Induktion zwar stark ansteigt, aber auch in vegetativ wachsenden Algen schon eine geringe Menge an *VMP3*-mRNA und *VMP3*-Protein vorliegt. Dagegen ist die *VMP4*-Expression auf den sexuellen Lebensweg der Alge beschränkt. In asexuell wachsenden Algen konnte weder das *VMP4*-Transkript, noch das *VMP4*-

Protein detektiert werden. Die Expression erfolgt in *Volvox carteri* wie bei bislang allen untersuchten sexuell induzierbaren Genen auch bei Verletzung der Algen und immer in den somatischen Zellen (Amon et al., 1998 und Ender et al., 1999). Das gleiche gilt für die Expression der anderen Mitglieder der VMP-Familie *VMP1*, *VMP2* und *S9*. Auch ihre Transkription erfolgt bei sexueller Induktion (bisher nur für *VMP1* und *VMP2* untersucht) und Verletzung in den somatischen Zellen (Hallmann et al., 2001). Nach Pheromonzugabe bleiben die erhöhten mRNA-Niveaus von *VMP3* und *VMP4* im betrachteten Zeitraum (18 bzw. 24 h) erhalten, gleichzeitig reichert sich immer mehr VMP3- und VMP4-Protein in der "deep zone" der Algen an. Bei anderen sexuell induzierbaren Genen, wie z.B. dem *Klon B* oder dem *DZ-HRGP*, ist dagegen nach 4-6 h wieder ein Abfall der mRNA-Menge zu beobachten (Amon et al., 1998 und Ender et al., 1999). Das ungewöhnlich lang vorliegende Transkript der beiden Gene könnte auf eine Rolle der Enzyme beim Prozess der sexuellen Induktion hindeuten, da auch das Sexualpheromon mindestens 6-8 h im Kulturmedium anwesend sein muss, um ein endgültiges Einschlagen des sexuellen Lebenswegs zu bewirken (Gilles et al., 1984).

Da, wie bereits oben erwähnt, die enzymatische Aktivität von VMP3 weder von der Abspaltung eines Propeptids, noch von der Ca^{2+} -Konzentration abhängig ist, scheint die Regulation des Enzyms ausschließlich auf die Transkriptionsebene beschränkt zu sein. Eine weitere Möglichkeit die VMP3-Aktivität zu kontrollieren, könnte in der räumlichen Begrenzung seines Aktionsradius bestehen. Wie gezeigt handelt es sich bei VMP3 um ein Molekül mit einem sehr großen Molekulargewicht, das in der viskosen und von Quervernetzungen durchzogenen "deep zone" der Algen nicht ohne weiteres diffundieren kann. Durch eine lokal begrenzte Sekretion des Enzyms in der ECM wäre es somit möglich, die Enzymaktivität auf genau diesen Bereich zu beschränken. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Proteins mit der Immunogoldmethode konnten aber keine distinkten Zonen mit VMP3 detektiert werden (PD Dr. A. Hallmann, pers. Mitteilung). Bei VMP4 wäre noch ein zusätzlicher Mechanismus der Enzymregulation denkbar: Wie gezeigt, wird die N-terminale Proteasedomäne des Enzyms zum einen bei der Reinigung mit einem Anionenaustauschermaterial als Ganzes abgespalten, zum anderen liegt sie auch schon in unbehandelten Extrakten der Algen ohne das VMP4-Rumpfprotein vor. Es ist also wahrscheinlich, dass dem Effekt am Ionenaustauscher ein physiologischer Prozess in *Volvox carteri* zugrunde liegt. Der Kontakt mit den positiv geladenen Gruppen des Ionenaustauschermaterials könnte sich in einer Konformationsänderung des Proteins auswirken, wodurch dann eine (autokatalytische) Proteasespaltstelle zugänglich wird. Für MMP-1 wurde gezeigt, dass z.B. die Zugabe von bestimmten Ionen oder Detergenzien in einer autokatalytischen Aktivierung des Enzyms resultiert (Birkedal-Hansen et al., 1993). Der gleiche Prozess wäre auch durch eine *Volvox*-Protease in der "deep zone" der Alge möglich. Eine solche Proteasekaskade ist bereits für humane MMPs beschrieben (He et al., 1989). Ein zweites denkbare Szenario wäre die Abtrennung eines VMP4-

Inhibitors durch die Ionenaustauschchromatographie. Auch dadurch könnte wieder eine Proteasespaltstelle zugänglich werden, oder die VMP4-Proteasedomäne sich autokatalytisch abspalten. Dieses Prinzip tritt z.B. bei der Regulation der Enzymaktivität der humanen MMPs durch TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) auf (Gomez et al., 1997).

3.4. Die Funktion der VMPs

Bislang konnten aus der extrazellulären Matrix von *Volvox carteri* zwei Proteasen gereinigt werden, deren genaue Funktion bekannt ist: das H-Lysin, das im asexuellen Lebenszyklus die mütterliche Zellwand zur Freisetzung der Sphäroide der nächsten Generation abbaut (Jaenicke & Waffenschmidt, 1979), und das S-Lysin, welches beim sexuellen Lebensweg den Spermien das Vordringen zu den von extrazellulärer Matrix umgebenen Eizellen ermöglicht (Waffenschmidt et al., 1990). Diese Enzyme werden als Ca^{2+} -abhängige Serinproteasen beschrieben, wobei aber das H-Lysin nur die Zellwand asexuell wachsende Algen auflösen kann, das S-Lysin hingegen die somatische Hülle sowohl asexueller, als auch sexueller Sphäroide angreift. Beide Proteasen zeigen im SDS-PAG ein ähnliches Molekulargewicht (H-Lysin: 26 kDa, S-Lysin: 34 kDa) und spalten beide nicht näher charakterisierte hydroxyprolinreiche Glykoproteine aus der ECM der Alge (Jaenicke & Waffenschmidt, 1981). Von keinem der Lysine ist aber die Aminosäure- oder DNA-Sequenz und das genaue natürliche Substrat bekannt, ebenso ist der Zeitpunkt und der Ort ihrer Expression unklar.

Aus dem Expressionsmuster von *VMP3* und *VMP4* lassen sich verschiedene mögliche Funktionen ableiten (s. 3.3.). Da beide Gene nach Zugabe des Sexualinduktors verstärkt transkribiert werden, ist eine Beteiligung an der postulierten, extrazellulären Signalverstärkung des Pheromons denkbar (Sumper et al., 1993). In dieser Theorie wird vorgeschlagen, dass nach Pheromonzugabe in *Volvox carteri* vermehrt Proteine exprimiert werden, die entweder aufgrund ihrer Homologie ähnliche biologische Aktivität wie der Induktor selbst besitzen (sogenannte Pherophorine), oder durch ihre proteolytische Aktivität induktorhomologe Domänen aus der ECM der Alge freisetzen und/oder eventuelle Induktionsinhibitoren in der ECM abbauen (beschrieben in Hallmann et al., 1998). Dadurch würde es im Laufe der Zeit zu einer Anreicherung von pheromonhomologen Proteinen in der extrazellulären Matrix kommen, die das externe Signal verstärken und an die reproduktiven Zellen weiterleiten. *VMP3* und *VMP4* wären Kandidaten für die Pherophorinspaltung bzw. den Abbaus des Inhibitors. In dieser Arbeit konnte aber für Algen, die enzymatisch aktives *VMP3* überexprimieren kein veränderter Phänotyp und keine Beeinflussung der sexuellen Induktion bzw. der Spaltung von Pherophorin II beobachtet werden. Eventuell könnten aber andere Mitglieder der *VMP*-Familie diese Aufgaben erfüllen. Wie Abb. 3.1. zeigt werden nach sexueller Induktion der Algen mindestens drei weitere mit EDTA hemmbare Proteasen exprimiert, die wie *VMP3* Gelatine

als Substrat erkennen. Es ist durchaus denkbar, dass es sich dabei um die Genprodukte von *VMP1* und *VMP2* handelt. Da *VMP3* als einziges Enzym auch in vegetativ wachsenden Algen auftritt, könnte es eine Rolle bei der Aktivierung der anderen sexuell induzierbarer Proteasen (z.B. *VMP4*) spielen.

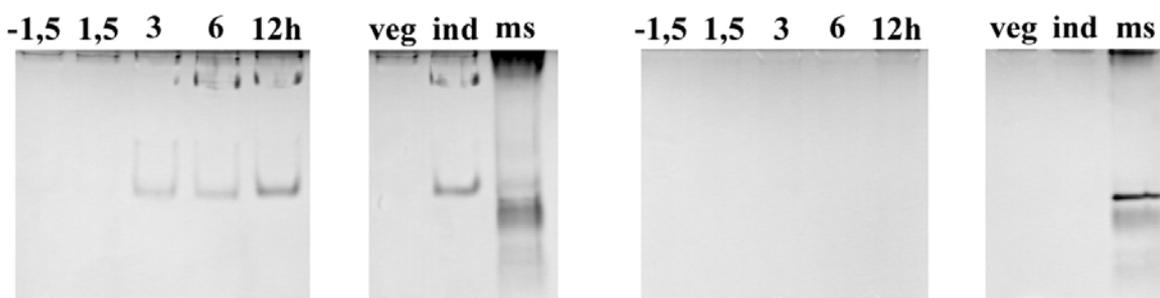


Abb. 3.1.: Untersuchung von Ultraschalllysaten ganzer Algen nach Pheromonzugabe und unter mikrobiellem Stress im In-Gel-Assay: Ohne EDTA (linke Seite) bzw. mit EDTA (rechte Seite), inverse Darstellung. Spur 1: 1,5 h vor, Spur 2: 1,5 h nach, Spur 3: 3 h nach, Spur 4: 6 h nach, Spur 5: 12 h nach Zugabe des Sexualpheromons, Spur 6: vegetativ wachsende Algen (veg), Spur 7: Algen 12 h nach Pheromonzugabe (ind), Spur 8: Algen unter mikrobiellem Stress (ms).

Eine weitere Funktion für die *VMP*-Familie könnte in der Reparatur der extrazellulären Matrix liegen. Alle bekannten sexuell induzierbaren Gene werden auch nach Verletzung der Algen exprimiert, so dass bereits ein evolutionärer Zusammenhang der Signaltransduktion der beiden Prozesse vermutet wurde (Amon et al., 1998). Bei der Verletzung der Algen kommt es zur Beschädigung der ECM, v.a. der "deep zone". Um den Sphäroid als Ganzes zu bewahren und vor dem Auseinanderfallen zu schützen ist eine Neusynthese der ECM unabdingbar. Dazu sind einerseits Strukturproteine, wie z.B. die Pherophorine, zum anderen auch modifizierende Enzyme, z.B. Proteasen wie die *VMPs* nötig. Durch Verletzung wird aber auch das Eindringen von Pathogenen in den Organismus erleichtert. Wie Abb. 3.1. zeigt wird durch Kontamination von *Volvox carteri* mit nicht näher bestimmten Mikroorganismen die Expression einer Reihe von (Metallo-)Proteasen induziert, die sich von denen bei der sexuellen Induktion beobachteten deutlich unterscheiden. Auch hierbei könnte es sich um bereits bekannte oder noch unbekannte *VMPs* handeln. In der Sojabohne konnte kürzlich eine Matrix-Metalloproteinase nachgewiesen werden, die ausschließlich nach pathogenem Befall der Pflanzen auftritt (Yingqing et al., 2001). Daneben wurde auch in anderen höheren Pflanzen bei der Wundheilung und/oder bei der Abwehr von Pathogenen vermehrt metallsalzabhängige Proteaseaktivität detektiert (Hildmann et al., 1992 und Pautot et al., 1993). Auch in *Volvox carteri* selbst werden nach Verletzung zwei Enzyme in die "deep zone" sezerniert, denen eine Funktion bei der Abwehr von Pathogenen zugesprochen wird (die schon oben erwähnte Chitinase und Cysteinprotease; Amon et al., 1998).

Ein Vertreter der *VMP*-Familie (*S9*) wird ebenso wie eine *MMP*-Gen aus der Gurke (*Cs-MMP*; Delorme et al., 2000.) mit der Seneszenz von somatischen Zellen in Zusammenhang gebracht (Shimidzu et al., 2002). Daten über die codierten Proteine fehlen aber.

Matrix-Metalloproteinasen werden in Pflanzen aber nicht nur auf externe Signale hin exprimiert, sondern können auch bei der Entwicklung des Organismus eine entscheidende Rolle spielen: Eine Mutation im *MMP*-homologen *At2-MMP*-Gen von *Arabidopsis thaliana* wirkt sich nicht nur negativ auf das Wachstum und die Morphogenese aller Organe aus, sondern resultiert auch in einem verspäteten Blühen und einer verfrühten Seneszenz der Pflanze (Golldack et al., 2002).

Die genauen Funktionen von *VMP3* und *VMP4* werden sich jedoch mit letzter Sicherheit nur durch Kenntnis der *in vivo*-Substrate klären lassen. Nachfolgende Untersuchungen sollten sich deswegen v.a. auf diesen Punkt konzentrieren.

4. Material und Methoden

4.1. Kultivierung von *Volvox carteri*

Falls nicht anders angegeben, diente der weibliche Stamm *Volvox carteri* f. *nagariensis* Iyengar HK 10 als Versuchsorganismus (Starr, 1969). Dieser wurde morphologisch und genetisch als Wildtyp-Organismus angesehen.

4.1.1. Stammkulturhaltung

Die axenische Kultivierung der Algenstämme erfolgte in einem Klimaraum bei 28°C in Glasmröhrchen mit 10 ml sterilem *Volvox*-Medium pH 8,0 (SVM; Provasoli & Pintner, 1959). Ein synchrones Algenwachstum wurde durch einen 16 h Licht (20⁰⁰-12⁰⁰ Uhr MEZ bei 10.000 Lux) / 8 h Dunkel (12⁰⁰-20⁰⁰ Uhr MEZ)-Zyklus erreicht, wobei die Algen nach einer Generationszeit (48 h) in frische Kulturröhrchen überimpft werden mussten (Starr, 1970). Asynchron wachsende Kulturen wurden nur alle sieben Tage in frisches Medium überführt.

4.1.2. Anzucht im analytischen Maßstab

Zur Anzucht kleinerer Algenmengen wurden 1 l-Fernbachkolben (FBK) mit 800 ml SVM verwendet, die unter ständigem Rühren über Pasteurpipetten steril belüftet und unter den standardisierten Temperatur- und Belichtungsbedingungen (s. 4.1.1.) kultiviert wurden. Üblicherweise wurde die Kultur mit drei synchron wachsenden Algen des gewünschten Entwicklungsstadiums gestartet und nach drei Generationszeiten (6 Tagen) geerntet, so dass sich dann im FBK etwa 4.000 Organismen gebildet hatten.

4.1.3. Anzucht im Großmaßstab

Größere Algenmengen wurden in Glaskolben mit 20 l SVM gezogen. Diese wurden im Klimaraum bei 28°C mit Druckluft steril belüftet, gerührt und auf einer Beleuchtungsbank dem standardisierten Belichtungszyklus (s. 4.1.1.) ausgesetzt. Als Vorkultur diente üblicherweise eine Algenkultur im analytischen Maßstab (etwa 4.000 Organismen, s. 4.1.2.). Die Ernte erfolgte nach einer oder zwei weiteren Generationszeiten (2 oder 4 Tagen) zum Zeitpunkt des jeweils gewünschten Entwicklungsstadiums (ca. 40.000 oder 500.000 Organismen).

4.1.4. Anzucht von sexuell induzierten Algen

In der Regel wurde die sexuelle Entwicklung der Algen durch das in *Saccharomyces cerevisiae* heterolog exprimierte Sexualpheromon („(Sexual)-Induktor“) eingeleitet (Haas & Sumper, 1991), wobei die Konzentration des Pheromons im Kulturmedium den zur sexuellen Induktion mindestens

nötigen Grenzwert um das Hundertfache überstieg, um die vollständige Induktion aller Algen der Kultur zu gewährleisten.

Alternativ erfolgte die sexuelle Induktion auch durch das von männlichen Algen (Stamm 69-1b; Adams et al., 1990) ins Kulturmedium abgegebene physiologische Pheromon, wiederum zugegeben im hundertfachen Überschuss. Die biologische Aktivität des isolierten Induktors wurde zuvor in einem bereits beschriebenen Bioassay bestimmt (Starr, 1969).

Sollten Vergleiche zwischen vegetativ wachsenden und sexuell induzierten Algen bezüglich ihrer Genexpression oder Proteinzusammensetzung angestellt werden, wurde eine Algenkultur vegetativ kultiviert und frühestens eine Generationszeit vor – falls möglich aber erst zur – Pheromonzugabe auf zwei Ansätze verteilt, wobei der eine dann sexuell induziert, der andere vegetativ kultiviert wurde. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Arbeiten erfolgte bei diesen Experimenten die Induktion der Algen stadiumspezifisch kurz vor der Freisetzung der Tochterorganismen („zum Release“, 17^o Uhr MEZ; Haas, 1994 und Amon, 1995). Die Kulturen wurden dann zum gewünschten Zeitpunkt möglichst gleichzeitig geerntet und parallel weiterverarbeitet. Um den Erfolg der sexuellen Induktion zu überprüfen, wurde immer ein Teil der Kulturen solange weiterkultiviert bis morphologisch sexuelle Organismen vorlagen.

4.1.5. Herstellung mechanisch verletzter Algen

Durch einmalige Passage einer wenig konzentrierten, vegetativ kultivierten Algensuspension (1/20 VT des Kulturvolumens) über eine 0,5 mm Kanüle konnten Algensphäroide mechanisch verletzt werden (Amon et al., 1998). Unter dem Mikroskop war dabei ein Auf- bzw. Einreißen der Sphäroidhülle zu erkennen, herausgelöste Gonidien oder freigesetzte Teile der Sphäroidhülle wurden nicht beobachtet. Nach Verletzung wurde die Algensuspension mit SVM wieder auf das ursprüngliche Kulturvolumen gebracht und gemäß den Standardbedingungen (s. 4.1.2.) weiterkultiviert.

Alternativ wurden Algen auch durch Einschneiden mittels einer mikrochirurgischen Schere (Fa. FST) unter dem Stereomikroskop verletzt (Hallmann et al., 2001).

Bei vergleichenden Experimenten zwischen vegetativen, sexuell induzierten und mechanisch verletzten Algen wurde wie unter 4.1.4. verfahren.

4.1.6. Test auf Sensitivität gegenüber dem Sexualpheromon

Um eventuelle Abweichungen von *Volvox*-Transformanden in ihrer Sensitivität gegenüber dem Sexualpheromon im Vergleich zum Wildtyp zu bestimmen, wurde in Anlehnung an den bekannten Bioassay zur Bestimmung der Pheromonaktivität (Starr, 1969) folgender Test durchgeführt: Je ein Organismus der zu untersuchenden Transformanden im Entwicklungsstadium „zum Release“ wurde in 2 ml SVM in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte überführt, zu einem variablen

Zeitpunkt mit einer variablen Menge an Sexualpheromon versetzt und unter Standardbedingungen kultiviert (s. 4.1.1.). Nach 50 h hatten sich etwa 120 Algen gebildet, die unter dem Mikroskop morphologisch als vegetative bzw. sexuelle Organismen bestimmt und gezählt werden konnten. Da in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Pheromonzugabe und der zugegebenen Pheromonmenge die Zahl der sexuellen Sphäroide variierte, konnten so die für eine vollständige sexuelle Induktion der Transformande nötigen Grenzwerte bestimmt werden.

4.2. Ernte und Aufschluss von *Volvox*-Sphäroiden

4.2.1. Isolierung von innerer Matrix, Gonidien und Sphäroidhüllen

Volvox-Sphäroide kurz vor dem Start der Embryogenese (8⁰⁰ Uhr MEZ) wurden über ein 100 µm-Nylonsieb geerntet, mit SVM gewaschen und mit SVM auf etwa 1/50 VT der anfänglichen Kultur gebracht. Durch dreimalige Passage der Algensuspension über eine 0,4 mm-Kanüle konnten dann die Sphäroide aufgebrochen werden, so dass sich nach anschließender Zentrifugation (5 min, Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM, RT) Sphäroidhüllen ("somatic sheet") und Gonidien im grünen Pellet befanden, die innere Matrix („Schlitzextrakt“, "deep zone"-Extrakt) aber den klaren, stark viskosen Überstand bildete (Godl et al., 1997). Dieser wurde zur weiteren Reinigung nochmals zentrifugiert (s.o.). Nach Resuspendieren des Pellets in SVM mit 7% Percoll (v/v) und einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, Hettich Rotina, 1.000 UpM, 4°C) konnten Gonidien und eventuell herausgelöste somatische Einzelzellen im Pellet von den im Überstand aufschwimmenden Sphäroidhüllen getrennt werden (Tam & Kirk, 1991). Anschließend wurden die Sphäroidhüllen über ein 100 µm-Nylonsieb mit SVM gewaschen und eingeeengt, die Gonidien aber zur Abtrennung von verschleppten Sphäroidhüllen durch ein 40 µm-Nylonsieb gewaschen und auf einem 10 µm-Nylonsieb aufgefangen, wobei sich die somatischen Einzelzellen dann im Durchlauf befanden. Der Erfolg der einzelnen Isolationsschritte wurde dabei stets unter dem Mikroskop verfolgt.

4.2.2. Präparation der inneren Matrix ("deep zone"-Extrakt, „Schlitzextrakt“) im Großmaßstab

Zur Präparation des Schlitzextraktes zur anschließenden Proteinreinigung wurden jeweils vier 20 l-Algenkulturen 16 h nach sexueller Induktion (s. 4.1.4.) zum Zeitpunkt der Embryogenese über ein 100 µm-Nylonsieb geerntet, mit Wasser gewaschen und auf etwa 200 ml eingeeengt. Das Aufbrechen der Sphäroide erfolgte durch mehrmaliges Bewegen der Algensuspension in einem Dounce-Homogenisator ("tight fit") auf Eis solange, bis unter dem Mikroskop keine intakten Sphäroide mehr zu erkennen waren. Bei der nachfolgenden Zentrifugation (20 min, Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor, 10.000 UpM, 4°C) erhielt man den Schlitzextrakt als klaren, stark viskosen

Überstand (ca. 150 ml). Das grüne Algenpellet wurde in etwa 200 ml SVM sorgfältig resuspendiert und erneut zentrifugiert (s.o.), so dass wiederum ein klarer Überstand („Waschextrakt 1“) anfiel, der ebenso Proteine der inneren Matrix enthielt. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt („Waschextrakt 2 und 3“), die aufgeplatzten Algen also insgesamt dreimal mit SVM nachgewaschen.

Zur Proteinreinigung wurden sowohl der Schlitzextrakt, als auch die Waschextrakte verwendet, soweit sie laut Western Blot und Immunodetektion das gewünschte Protein enthielten (s. 4.5.3).

4.2.3. Präparation des EDTA-Extraktes

Die Herstellung des EDTA-Extraktes von *Volvox*-Sphäroiden folgte einer bereits beschriebenen Methode (Sumper et al., 1993): Algen wurden zum gewünschten Zeitpunkt über ein 40 µm-Nylonsieb geerntet, mit SVM gewaschen und bei -20°C eingefroren. Durch langsames Auftauen der Probe setzten sich die Organismen am Boden ab, der Überstand wurde abgenommen und die Algen mit 50 mM NaCl gewaschen (2 min Zentrifugation bei RT, Eppendorf-Zentrifuge, 4.000 UpM). Nach Aufbrechen der Sphäroide durch dreimalige Passage über eine 0,4 mm-Kanüle und erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die Algen nochmals mit 50 mM NaCl gewaschen (s.o.), dann mit 1% SDS in 0,5 M NaCl versetzt und 5 min bei 95°C ausgekocht. Lag nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, s.o.) ein noch grünes Algenpellet vor, so wurde das Auskochen der Algen mit SDS solange wiederholt, bis sich nur noch farblose "ghosts" im Pellet befanden. Nach erneutem Waschen mit 50 mM NaCl (s.o.) wurden diese dann mit 100 mM EDTA in 1% Mega-9 versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Der EDTA-Extrakt konnte nach Zentrifugation für 10 min bei RT (Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM) als Überstand gewonnen werden.

4.2.4. Herstellung von Ultraschalllysaten

Eingeengte Algensphäroide oder isolierte Sphäroidbestandteile (s. 4.2.1.) wurden je nach Ausgangsmenge einer zwei- bis fünfmaligen Ultraschallbehandlung unterzogen ("Sonifier Cell Disruptor B15", Fa. Branson, Stufe 2-5, je 20 sec im Eis-Wasser-Bad, dazwischen 1 min Pause), bis unter dem Mikroskop eine vollständige Zellyse beobachtet werden konnte. In anschließenden Zentrifugationsschritten (10 min, Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM, 4°C) wurden dann die löslichen Zellbestandteile (Überstand) von den unlöslichen (Pellet) getrennt.

4.3. Molekularbiologische Methoden

4.3.1. Allgemeine molekularbiologische Methoden

4.3.1.1. Bakterienkultur

Zur Klonierung von Genkonstrukten wurde ausschließlich *Escherichia coli* Stamm DH5 α , zur Proteinexpression der Stamm BL21(DE3) verwendet (s. 4.6.3.2.). Die Kultivierung erfolgte bei 37°C in 2x YT- oder LB-Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin unter Schütteln (180 UpM) bzw. auf AXI- oder LBA-Agarplatten. Für die Langzeitlagerung wurden 828 μ l einer frischen Bakterienkultur in der stationären Wachstumsphase mit 172 μ l sterilem 87%igem Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

4.3.1.2. Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Fällung von DNA aus Lösung wurde der Ansatz mit 1 VT 4 M Ammoniumacetat und 2 VT Isopropanol (p.A., -20°C) versetzt, gemischt und 10 min bei RT inkubiert (Sambrook et al., 1989). Nach Zentrifugation für 15 min bei 14.000 UpM und RT (Eppendorf-Zentrifuge) wurde der Überstand verworfen, das weiße DNA-Pellet mit 30 μ l 70%igem Ethanol (p.A., -20°C) gewaschen (5 min zentrifugieren, s.o.), 5 min bei 37°C getrocknet und anschließend im gewünschten Volumen Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

Alternativ wurde die DNA-Lösung mit 3/5 VT 20% PEG 6000 in 2,5 M NaCl gemischt und für mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Dann wurde weiter wie bei der Ammoniumacetat/Isopropanol-Fällung (s.o.) verfahren, die Zentrifugationsschritte dabei aber bei 4°C durchgeführt.

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte gemäß Sambrook et al. (1989) durch photometrisches Vermessen der Lösung bei 260 nm, wobei eine O.D. von eins etwa einer DNA-Konzentration von 50 μ g/ml entspricht.

4.3.1.3. Gelelektrophorese von DNA

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte in 1-2%igen Agarosegelen in TPE-Puffer mit 0,5 mg/l Ethidiumbromid (Sambrook et al., 1989). Bei Molekülgrößen < 300 bp fanden auch 3%ige Gele aus FMC NuSieve-GTG-Agarose (Fa. Biozym) in obigem Puffer Verwendung. Die Proben wurden mit 0,2 VT 6x DNA-Probenpuffer versetzt und je nach Elektrophoreseapparatur bei einer konstanten Stromstärke von 60-140 mA getrennt. Die Detektion der DNA erfolgte durch UV-Licht induzierte Fluoreszenz bei 254 nm bzw. bei 306 nm für präparative Zwecke.

Die Ergebnisse einer Elektrophorese wurden auf einem Geldokumentationsystem mit UV-Durchlicht und Thermodrucker der Fa. Vilber („Vilber Lourmat“ mit „Bio 1D“-Software, Version 5.01) festgehalten. Aufgrund der besseren Darstellung wurde immer das inverse Bild ausgewertet.

4.3.1.4. Reinigung von DNA aus Lösung und Agarosegelen

Größere DNA-Moleküle wurden mit Hilfe von "Prep-a-Gene" (Fa. Bio-Rad, 1994) oder dem "High Pure PCR Product Purification Kit" (Fa. Roche, 1999), kleinere Moleküle (< 200 bp) mit "Nucleotrap" (Fa. Macherey-Nagel, 2000) jeweils nach Vorschrift der Hersteller aus Lösungen oder Agarosegelen eluiert. Die Elution erfolgte stets in Wasser.

4.3.2. Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Reinigung von kleineren Mengen an Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen und zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten erfolgte nach einem vereinfachten Protokoll der Fa. Qiagen (Qiagen, 1998) ohne Verwendung der Reinigungsfilter und -säulen, basierend auf der Methode der alkalischen Lyse nach Ish-Horowicz und Burke (1981). Dabei wurden 2 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur (in 2x YT-Medium mit Ampicillin) abzentrifugiert (zweimal 5 min, Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM, RT), die Bakterienpellets in je 200 µl Puffer P1 sorgfältig resuspendiert, mit 200 µl Puffer P2 versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer P3 und vorsichtigem Mischen wurden die Ansätze 5 min auf Eis gehalten und anschließend zweimal zentrifugiert (s.o.). Der Überstand wurde dann mit 1 ml Ethanol (p.A., -20°C) versetzt, das Gemisch zentrifugiert (s.o.) und das anfallende, weiße DNA-Pellet mit 100 µl 70%igem Ethanol (p.A., -20°C) gewaschen (3 min Zentrifugation, s.o.), getrocknet (5 min bei 37°C) und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

Größere Mengen Plasmid-DNA von hohem Reinheitsgrad für die DNA-Sequenzierung und die Transformation von *Volvox carteri* wurden mit Hilfe des Plasmid-Purification-Kits der Fa. Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers gewonnen (Qiagen, 1998). Die Konzentrationsbestimmung der resultierenden DNA-Lösung erfolgte durch Messen der Extinktion bei 260 nm (s. 4.3.1.2.).

4.3.3. Klonierung von DNA

4.3.3.1. Präparation von Plasmidvektoren

Als Vektoren fanden pUC18-Plasmide (Viera & Messing, 1982), pBlueskript II SK-Plasmide (Fa. Stratagene) und pET11a-Plasmide (Fa. Novagen) Verwendung. Zur Präparation wurden 2-10 µg Plasmid mit einem 5-10fachen Überschuss an Restriktionsenzymen in einem von den Enzymen abhängigen Puffersystem (Gesamtvolumen 50 µl) und bei geeigneter Temperatur 2-15 h inkubiert. Nach Auftrennung des gesamten Ansatzes durch Gelelektrophorese (s. 4.3.1.3.) wurden die Banden der richtigen Größe unter UV-Licht (306 nm) ausgeschnitten und aus dem Agarosegel eluiert (s. 4.3.1.4.). Die Bestimmung der Reinheit und Menge des eluierten DNA-Fragments erfolgte durch Analyse eines Aliquots auf einem weiteren Agarosegel.

Entstanden beim Verdau des Vektors kompatible Enden oder wurde nur ein Restriktionsenzym verwendet, war eine Dephosphorylierung des Vektors an den 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase (CIP, Fa. Roche) nötig, um eine Religation bei einem folgenden Ligationsschritt auszuschließen (Sambrook et al., 1989). Dazu wurde das bereits geschnittene Plasmid in 1x One-Phor-All-Puffer (Fa. Pharmacia) bei einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 1 U CIP versetzt und 30 min bei 37° C inkubiert. Falls geeignete Pufferbedingungen vorlagen, erfolgte die CIP-Zugabe noch vor dem Auftrag des Restriktionsverdau auf das Agarosegel (s.o.). Die Inaktivierung der CIP und eine Konzentrierung der Lösung wurde durch Reinigung der DNA (wie unter 4.3.1.4. beschrieben) erreicht.

4.3.3.2. Spaltung von DNA durch Restriktionsenzyme

Zur Analyse von Plasmiden wurden 0,5-1 µl DNA-Lösung einer Plasmidisolierung (ca. 0,5 µg, s. 4.3.2.) mit je 2 U Restriktionsenzym versetzt und im entsprechenden Puffer und bei geeigneter Temperatur 1 h inkubiert (Gesamtvolumen 10 µl). Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf einem Agarosegel (s. 4.3.1.3.) aufgetrennt und die entstandenen DNA-Fragmente auf ihre Richtigkeit überprüft..

Bei der präparativen Herstellung von DNA-Fragmenten wurde genau wie bei der Präparation von Vektoren verfahren (s. 4.3.3.1.), wobei eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase aber unnötig war.

4.3.3.3. Ligation von DNA

Für die Ligation wurden ca. 200 ng Plasmidvektor und ein zweifacher molarer Überschuss an Insert-DNA in 1x One-Phor-All-Puffer (Fa. Pharmacia) und 1 mM ATP mit T4-DNA-Ligase (Fa. Pharmacia) 4-16 h inkubiert . Bei glatten Enden ("blunt ends") wurden 10 U Ligase eingesetzt, die Ligation erfolgte bei 18°C. Bei kohäsiven Enden ("sticky ends") wurde dagegen 1 U Ligase verwendet und bei 12° C inkubiert. Nachfolgend wurden *E. coli*-Zellen üblicherweise mit dem gesamten Ligationsansatz transformiert (s. 4.3.3.4.).

4.3.3.4. Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* (Stämme DHα und BL21(DE3)) für die Transformation wurden nach einer modifizierten Methode von Hanahan (1983) hergestellt. Hierzu wurden 100 ml 2x YT-Medium mit 1 ml einer stationär gewachsenen Übernachtskultur (ebenfalls in 2x YT-Medium) angeimpft und bei 37°C und 180 UpM bis zu einer O.D.₅₇₈ von 0,3-0,4 kultiviert. Nach Sedimentation der Bakterien (10 min, Hettich Rotina, 4.000 UpM, 4°C) wurden diese in 30 ml kaltem TBFI resuspendiert und 10 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Bakterien erneut zentrifugiert (5 min, Hettich Rotina, 2.000 UpM, 4°C), vorsichtig in 4 ml kaltem TBFII aufgenommen und für 15 min in einem

Eis-Wasser-Bad geschwenkt. Die so erhaltenen kompetenten Zellen konnten dann aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert werden.

Zur Transformation wurden üblicherweise 50 μl der kompetenten Bakterien mit dem Ligationsansatz (s. 4.3.3.3.) bzw. mit 200 ng Plasmid-DNA versetzt und zunächst 30 min in einem Eis-Wasser-Bad inkubiert. Anschließend erfolgte für 90 sek ein Hitzeschock bei 42°C und nach Zugabe von 500 μl SOC-Medium eine Inkubation bei 37°C für 45 min. Danach wurden im allgemeinen 40 μl , 120 μl und 400 μl der Bakteriensuspension auf je eine AXI-Platte oder LBA-Platte ausgebracht und für 15 h bei 37°C kultiviert. Hierbei wirkte die vektorcodierte β -Lactamase als Selektionsmarker. Bei Verwendung von AXI-Platten konnte zusätzlich das Blau-Weiß-"screening" zur Detektion positiver Transformanden genutzt werden. Diese Transformanden wurden durch Kolonie-PCR (s. 4.3.5.2.) und Restriktionsverdauung (s. 4.3.3.2.) weiter untersucht.

4.3.3.5. Klonierung von PCR-Produkten

Zur Aufkonzentrierung wurde der PCR-Ansatz (s. 4.3.5.) zunächst mit Ammoniumacetat/Isopropanol gefällt (s. 4.3.1.2.). Um überstehende Enden aufzufüllen, wurde das Pellet in 5 μl 2 mM dNTP gelöst, mit 1 μl 10x T4-DNA-Polymerase-Puffer, 1 μl T4-DNA-Polymerase (8 U/ μl , Fa. Pharmacia) und 3 μl Wasser versetzt und 15 min bei 12°C inkubiert. Dann wurde der gesamte Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt (s. 4.3.1.3.) und die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel in 7 μl Wasser eluiert (s. 4.3.1.4.). Nach Zugabe von 1 μl 10 mM ATP, 1 μl 10x One-Phor-All-Puffer (Fa. Pharmacia) und 1 μl T4-Polynukleotidkinase (10 U/ μl , Fa. Pharmacia) erfolgte die Phosphorylierung der 5'-Enden des PCR-Produktes für 30 min bei 37°C . Die Reaktion wurde durch 10 min Erhitzen auf 65°C abgestoppt. Ein Aliquot des Ansatzes wurde danach zur Mengenabschätzung auf einem Agarosegel analysiert und eine entsprechende Menge zur Ligation in einen Plasmidvektor (üblicherweise pUC18/Sma I/CIP oder pBluescript II SK/Sma I/CIP) verwendet (s. 4.3.3.3.).

Sollten im PCR-Produkt vorhandene Restriktionsschnittstellen direkt zur Klonierung verwendet werden, so wurde die DNA nach der Isopropanolfällung sofort im geeigneten Enzympuffer aufgenommen und mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Gelelution der gewünschten Bande konnte das PCR-Produkt sofort für eine Ligation in einen entsprechend präparierten Plasmidvektor verwendet werden. Eine Behandlung mit T4-DNA-Polymerase bzw. T4-Polynukleotidkinase war dann nicht nötig.

4.3.5. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR diente sowohl analytisch zum spezifischen Nachweis bestimmter Nukleinsäuren, als auch präparativ zur Herstellung rekombinanter Gene (Saiki et al., 1988). Alle verwendeten Lösungen und Gefäße wurden vor Verwendung sterilisiert.

4.3.5.1. Amplifikation von DNA

Standardreaktionen zur Amplifikation von (rekombinanter) DNA fanden in einem Volumen von 50 oder 100 µl mit 1x PCR-Puffer, 100 µM dNTPs, 1 µM sense-Oligonukleotid, 1 µM anti-sense-Oligonukleotid und 1-2 U Taq-Polymerase (Fa. Roche) statt. Als template wurden 10-50 ng gereinigte (Plasmid)-DNA benutzt; die PCR lief dabei über 25 Zyklen.

Entsprechend der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide, der Länge des zu amplifizierenden DNA-Stücks und den Parametern des verwendeten PCR-Thermalcyclers wurden die Einzelschritte der Reaktion den jeweiligen Erfordernissen angepasst. Allen Reaktionen gemeinsam war jedoch eine anfängliche Denaturierung der DNA für 1 min bei 95°C ("hot start"), gefolgt von einem variablen, zyklischen Drei-Temperaturprogramm (Denaturierung bei 95°C, Anlagerung der Oligonukleotide bei 50-60°C, Kettenverlängerung bei 72°C) und einer abschließenden Kettenverlängerung für 7 min bei 72°C.

Wurde die PCR in Thermalcyclern ohne Deckelheizung durchgeführt, musste der Reaktionsansatz mit ca. 20 µl Paraffinöl überschichtet werden, um eine Evaporation der Lösung bei hohen Temperaturen zu verhindern.

Sollten längere DNA-Fragmente mit hoher Genauigkeit produziert werden, fanden Enzymsysteme mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität ("proof-reading") Verwendung (Expand High Fidelity und Expand Long Template der Fa. Roche, Advanced Polymerase Mix der Fa. Clontech).

4.3.5.2. Kolonie-PCR mit *E. coli*

Diese Art der PCR diente zur Analyse eventuell positiv transformierter *E. coli*-Klone (s. 4.3.3.4.). Dabei wurde eine *E. coli*-Kolonie mittels eines sterilen Zahnstochers von einer Kulturplatte in 50 µl steriles Wasser überführt, resuspendiert und durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C lysiert. Nach Abkühlen auf RT wurden dann 5 µl dieses Lysats für eine PCR (Ansatzgröße 50 µl) mit 30-35 Zyklen eingesetzt (s. 4.3.5.1.).

4.3.5.3. Genomische PCR mit *Volvox carteri*

Bei der Transformation von *Volvox carteri* wird das fremde DNA-Stück ausschließlich über heterologe Rekombination z.T. mehrfach ins Genom integriert, d.h. aus geringen Mengen der genomischen DNA positiver Transformanden sollte sich durch PCR das erfolgreich transformierte

DNA-Stück amplifizieren lassen (Hallmann et al., 1997). Dazu wurden ca. 100 *Volvox*-Sphäroide nach Passage über eine 0,4 mm Kanüle pelletiert (zweimal 2 min, Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM, RT), in 10 µl sterilen, warmen Lysepuffer für die genomische PCR resuspendiert und für 5 min bei 95°C lysiert. Dieses Lysat wurde im noch heißen Zustand sofort mit 200 µl 50 mM Tris/HCl pH 7,5 verdünnt. 1 µl des Lysats wurden dann für eine PCR mit 40 Zyklen (Ansatzgröße 50 µl, s. 4.3.5.1.) eingesetzt.

4.3.5.4. RT-PCR mit *Volvox carteri*

Die Methode der RT-PCR diente zum spezifischen Nachweis von bestimmten mRNA-Species in *Volvox carteri*. Dabei wurden ca. 20 µl dichte Algensuspension (eingengt über ein 40 µm-Nylonsieb) mit 80 µl sterilem, warmen „Kirk“-Lysepuffer versetzt und 10 min bei 30°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM, RT) wurde der die mRNA enthaltende grüne Überstand abgenommen und in PCR-Gefäße portioniert (4 x 20 µl) ohne jedoch die pelletierten weißen Algensphäroide aufzuwirbeln (modifiziert nach Hallmann & Sumper, 1994a). Die Präzipitation der RNA erfolgte dann durch Zugabe von je 60 µl absolutem Ethanol (p.A., -20°C) und Inkubation bei -20°C für mindestens 1 h. In diesem Zustand war die RNA ca. zwei Wochen ohne Qualitätsverlust lagerungsfähig. Vor der RT-PCR wurde die RNA pelletiert (15 min, Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM, 4°C), mit 10 µl 70%igem Ethanol (p.A., -20°C) gewaschen (5 min zentrifugieren, s.o.) und 5 min an Luft getrocknet.

Nach Zugabe der RT-Komponenten (2 µl 5x RT-Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 0,5 µl RNAGuard (Fa. Pharmacia), 5 µl 2 mM dNTPs, 1,5 µl H₂O, 10 pmol anti-sense-Oligonukleotid und 0,5 µl Reverse Transkriptase (Superscript II, Fa. Gibco)) zum RNA-Pellet, erfolgte die reverse Transkription für 45 min bei 42°C.

Für die anschließende PCR (35-40 Zyklen) wurden dem RT-Ansatz dann 10 µl 10x Extender-Puffer, 50 pmol sense-Oligonukleotid, 40 pmol anti-sense-Oligonukleotid und 1 µl Taq-Polymerase (Fa. Roche) zugegeben und mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt (s. 4.3.5.1.). Die Oligonukleotide wurden dabei immer so gewählt, das die PCR über genomische Intronsequenzen führte, um das Produkt der gespleißten mRNA von einem eventuell auftretenden größeren Signal (verursacht durch verschleppte genomische DNA) unterscheiden zu können.

4.3.6. Synthese und Bezug von Oligonukleotiden

Die Eigensynthese von Oligonukleotiden erfolgte nach der Phosphoramidit-Methode auf einem DNA-Synthesizer „OLIGO 1000“ der Fa. Beckmann gemäß den Angaben des Herstellers (Beckmann, 1992). Die synthetisierten Oligonukleotide wurden mit dem "Fast-Deprotection-Kit" der Fa. Beckmann (Beckmann, 1993) aufgearbeitet, bis zur Trockenheit in einer Vakuumzentrifuge eingengt, in sterilem Wasser gelöst und photometrisch vermessen. Die spezifische Sequenz der

Oligonukleotide wurde bei der Berechnung der Konzentration berücksichtigt (Sambrook et al., 1989).

Alternativ wurden Oligonukleotide bei der Fa. MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

4.3.7. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde gemäß der enzymatischen Didesoxy-Methode von Sanger et al. (1977) mit der T7-Polymerase (Fa. Pharmacia) nach einem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Doppelsträngige Plasmid-DNA (ca. 5 µg) wurde zuvor alkalisch denaturiert (ad 0,4 M NaOH, 15 min Inkubation bei RT; Hattori & Sakaki, 1986) und anschließend gefällt (ad 600 mM Ammoniumacetat und 4 VT Ethanol (p.A., -20°C), Inkubation mindestens 20 min bei -20°C), pelletiert (5 min, Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM, 4°C), gewaschen (30 µl 70%iges Ethanol (p.A., -20°C), 5 min zentrifugieren, (s.o.)) und an Luft getrocknet. Als Primer dienten synthetische Oligonukleotide (s. 4.3.6.); die Markierung der synthetisierten DNA erfolgte durch Verwendung von radioaktivem [³⁵S]-α-dATP (Fa. Amersham).

Nach Hitzedenaturierung der Ansätze (2 min, 95°C) wurden diese zur Trennung der DNA-Fragmente vollständig auf temperierbare 6%ige Polyacrylamidkeilgele (AA:Bis 19:1, 6 M Harnstoff in 1x TBE-Puffer, 0,2-0,6 mm dick, 60 cm lang (Sambrook et al., 1989)) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 1800 V und 60°C für ca. 4 h. Anschließend wurden die Gele 30 min in 10%iger Essigsäure fixiert, auf einem 3MM Whatman-Papier getrocknet (30 min bei 80°C, Geltdrockner Fa. Bio-Rad), und ca. 16 h auf einem Röntgenfilm autoradiographiert.

Einige Sequenzierungen wurden auch von der Fa. Entelechon, Regensburg durchgeführt.

4.3.8. Transformation von *Volvox carteri*

Bei der Transformation von *Volvox carteri* diente der Stamm 153-48 als DNA-Rezipient (Adams et al., 1990). Dieser besitzt als einzigen genetischen Unterschied zum Wildtypstamm HK 10 im *nitA*-Gen eine Punktmutation (Gruber et al., 1992), was zum Verlust der Enzymaktivität der codierten Nitratreduktase führt. Organismen des Stammes 153-48 können somit – im Gegensatz zum Wildtyp – Nitrat als Stickstoffquelle nicht nutzen und sind auf den Zusatz von Ammoniumchlorid ins Kulturmedium angewiesen. Dieser genetische Defekt lässt sich aber durch Transformation mit dem vollständigen Wildtyp-*nitA*-Gen beheben, so dass die Alge dann wieder im Standard-Kulturmedium wachsen kann (Schiedlmeier et al., 1994). Man macht sich diese Ergebnisse in der Praxis dadurch zu nutze, dass man zusammen mit dem gewünschten DNA-Stück auch das Wildtyp-*nitA*-Gen als Selektionsmarker in den Stamm 153-48 transformiert (Hallmann & Sumper, 1994b). Die Kotransformationsraten liegen dabei üblicherweise zwischen 40 und 60 Prozent.

Je Transformation wurde eine Algenkultur im analytischen Maßstab (etwa 4.000 Organismen des Stammes 153-48 in SVM mit 1 mM Ammoniumchlorid) und 5 µg Plasmid pVcNR1 (mit Wildtyp-

nitA-Gen) bzw. 5 µg zu transformierende Plasmid-DNA eingesetzt. Die Transformation der Algen erfolgte dabei durch Beschuss mit mit der entsprechenden DNA beschichteten Goldpartikeln (1 µm Durchmesser, Fa. Bio-Rad) über eine Partikelkanone ("Biolistic PDS-1000/He-System", Fa. Bio-Rad).

Nach der Transformation wurden die Algen in Petrischalen mit je 20 ml Selektionsmedium (Standard-SVM) bis zu zwölf Tage bei 28°C im standardisierten Belichtungszyklus kultiviert (s. 4.1.1.) und ab dem fünften Tag nach der Transformation unter dem Stereomikroskop täglich auf positive, grüne Transformanden hin untersucht. Diese wurden dann in frisches Selektionsmedium in 24-well-Mikrotiterplatten überführt und dort bis zur vollständigen Analyse, z.B. durch genomische PCR (s. 4.3.5.3.), kultiviert.

4.3.9. Klonierschemata der angefertigten Genkonstrukte

Nachfolgend sind in den Abb. 4.1.-4.8. schematisch die Übersichtspläne zur Herstellung aller in dieser Arbeit verwendeten genetischen Konstrukte dargestellt. Dabei sind i.a. der Plasmidname, verwendete Restriktionsenzyme und Oligonukleotide, eventuelle Dephosphorylierung (CIP) und entstehende Fragmentgrößen angegeben. Genauere Angaben zur jeweiligen Klonierung sind in der Abbildungsunterschrift angeführt oder es wird auf den Ergebnisteil verwiesen. Sequenz und Lage der verwendeten Oligonukleotide und Restriktionsschnittstellen sind im Anhang aufgeführt (s. 6.1.-6.4.).

Plasmid	Gen	Genbereich	Anmerkung
A-Klon-VLP	<i>VMP4</i>	Nukl. 68(Go57)-4827(Go3)	Volllängen-cDNA
A5'-Race	<i>VMP4</i>	Nukl. 516-1840(A11)	cDNA, über I ₃ , I ₄
pgen4/22-Bb/4	<i>Sph4/22</i>	Nur Vektoranteil zur „Umklonierung“ benutzt	
pSph22/3-1A/7	<i>VMP3</i>	Nukl. 997(ON 14345)-1437(ON 14371)	cDNA, über I ₄
pSph22/3-1B/5	<i>VMP3</i>	Nukl. 0(ON 14372)-641(ON 14369)	cDNA, über I ₁ , I ₂
pSph22/3-E1B/3	<i>VMP3</i>	Nukl. 662(Eco RI)-5467(Eco RI)	genom., I ₂ -3'-NTR
pSph22/3-E2B/4	<i>VMP3</i>	Nukl. -3,5 kb(Eco RI)-662(Eco RI)	genom., Prom.-I ₂
pSph22/3-K7/7	<i>VMP3</i>	Nukl. 216(ON 14352)-1015(ON 14359)	cDNA, über I ₂ , I ₃
pSph22/3-P1/9	<i>VMP3</i>	Nukl. 1601(Pst I)-3544(Pst I)	genom., I ₃ -3'-NTR
pSph22/3-P2/2	<i>VMP3</i>	Nukl. 3544(Pst I)-5467(Eco RI)	genom., 3'-NTR

Tab. 4.1.: Zu Beginn der Arbeit vorhandene Ausgangsplasmide: genom.: genomische DNA, I_x: Intron X, 3'-NTR: 3'-nicht-translatierte Region („Nachlauf“), Nukl.(Y): Nukleotidposition (mit Restriktionsschnittstelle Y bzw. Oligonukleotid Y), Prom.: Promotorregion.

Alle im Endprodukt auftretende mittels PCR hergestellte DNA-Stücke bzw. alle durch Ligation entstandene Restriktionsschnittstellen wurden sequenziert, alle angeführten Fragmente und PCR-Stücke vor Ligation über ein Agarosegel gereinigt (s. 4.3.1.3.) und geluliert (s. 4.3.1.4.).

Alle zur Klonierung verwendete Plasmide lagen bereits zu Beginn der Arbeit vor, und wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. A. Hallmann zur Verfügung gestellt (s. Tab. 4.1.).

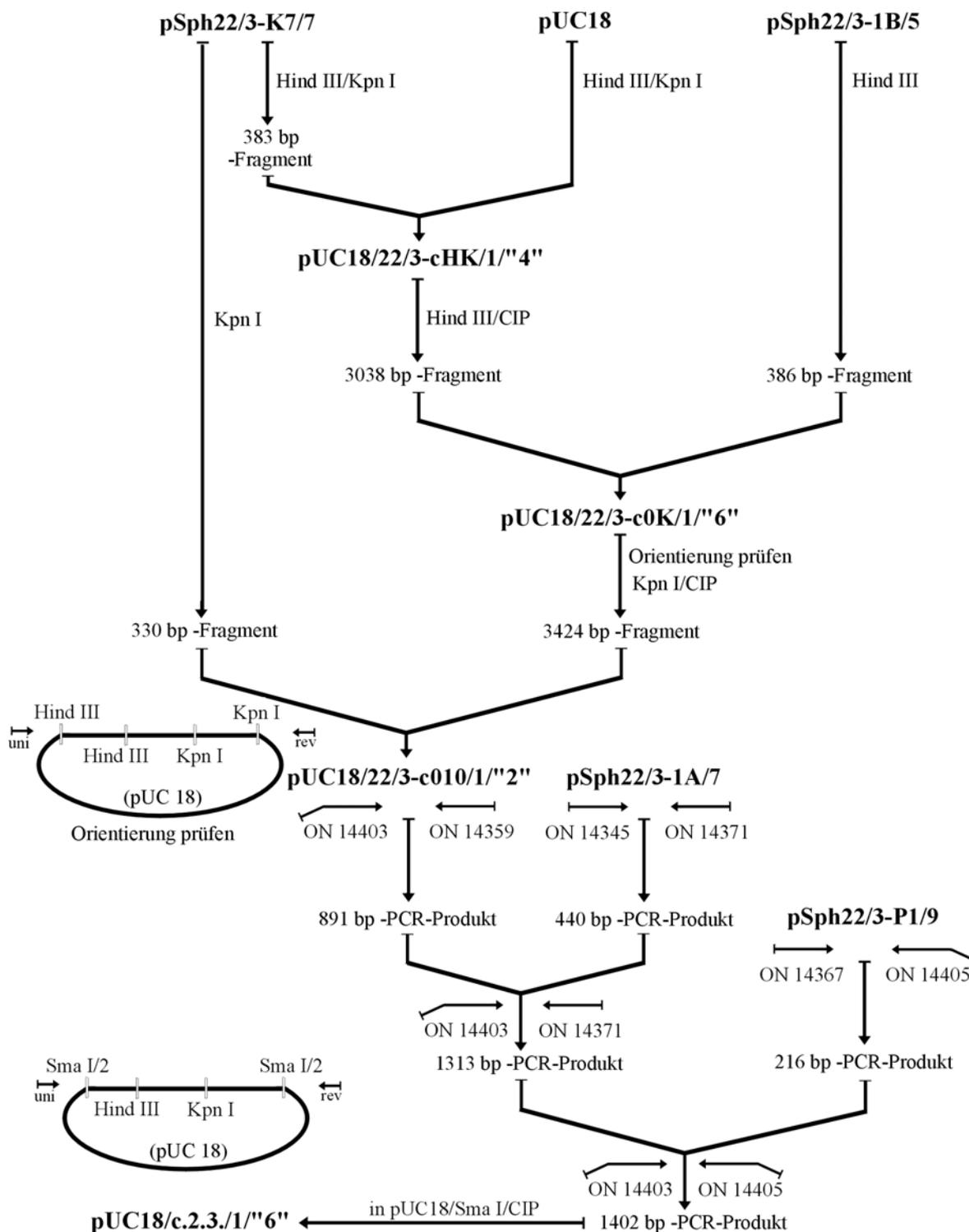


Abb. 4.1.: Konstruktion eines cDNA-Klons, der den gesamten N-terminalen Bereich von *VMP3* abdeckt: Zunächst wurden durch drei Klonierschritte die Inserts der Plasmide pSph22/3-K7/7 und pSph22/3-1B/5 zusammengesetzt. Das entstandene DNA-Stück (pUC18/22/3-c010/1/'2'') diente dann als Ausgangspunkt für zwei rekombinante PCRs nach Horton et al. (1989), da zum Anfügen der beiden restlichen Genfragmente (aus pSph22/3-1A/7 und pSph22/3-P1/9) geeignete Restriktionsschnittstellen fehlten. Das resultierende PCR-Produkt (in pUC18/c.2.3./1/'6'', Nukl. 131-1492) war ursprünglich als Expressionsprodukt geplant, ON14403 und ON14405 (mit (Ser)₂-(His)₆-tag) sind deshalb rekombinante Oligonukleotide. Hind III: Nukl. 364 Kpn I: Nukl. 747.

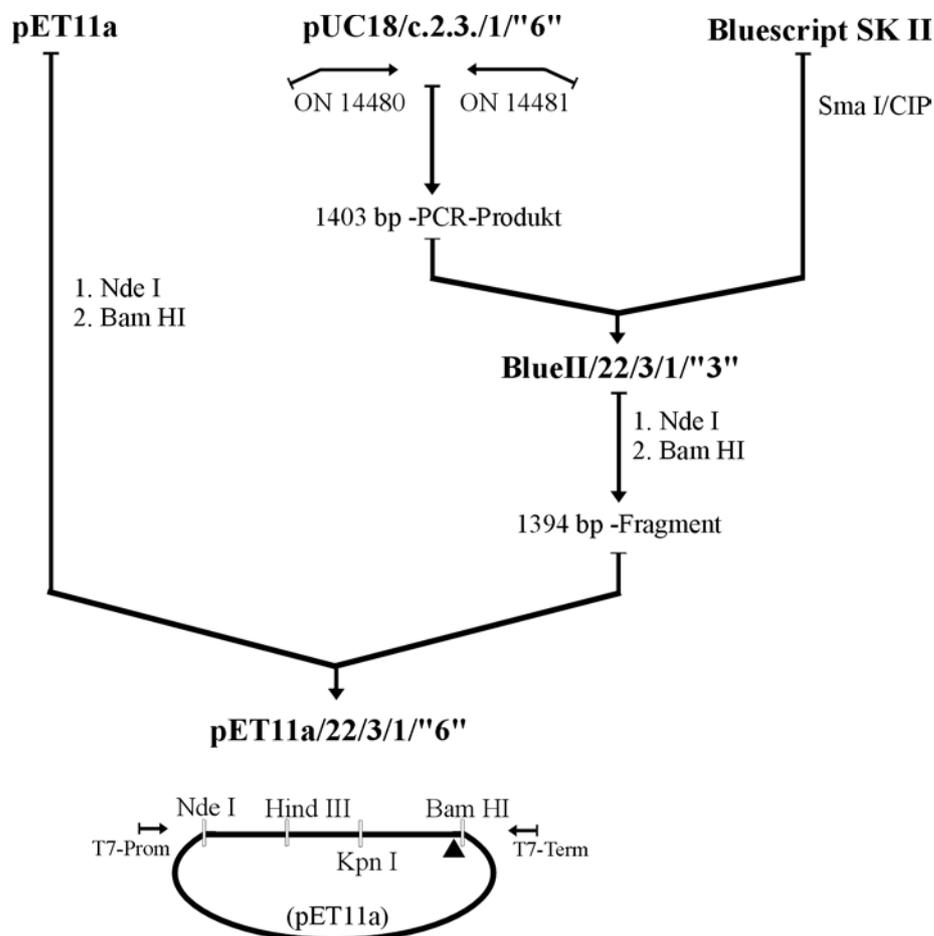


Abb. 4.2.: Konstruktion eines Expressionsplasmids für hVMP3-N-Terminus: Ausgehend vom Plasmid pUC18/c.2.3./1/'6'' (Nukl. 131-1492, mit (Ser)₂-(His)₆-tag am C-Terminus, s. Abb. 4.1.) wurde durch rekombinante PCR mit ON 14480 (mit Nde I-Schnittstelle) und ON 14481 (mit (Ser)₂-(His)₆-tag, Stopcodon und Bam HI-Schnittstelle) ein DNA-Fragment erzeugt, das für den gesamten N-terminalen Bereich von VMP3 codiert (AS 22-476, s. 6.2.). Nach anschließendem Umklonieren in den Expressionsvektor pET11a über die rekombinant eingefügten Restriktionsschnittstellen (Nde I und Bam HI) konnte das VMP3-Genfragment (Plasmid pET11a/22/3/1/'6'') in *E. coli* exprimiert werden. Das schwarze Dreieck kennzeichnet die Lage des "tags". Hind III: Nukl. 364 Kpn I: Nukl. 747.

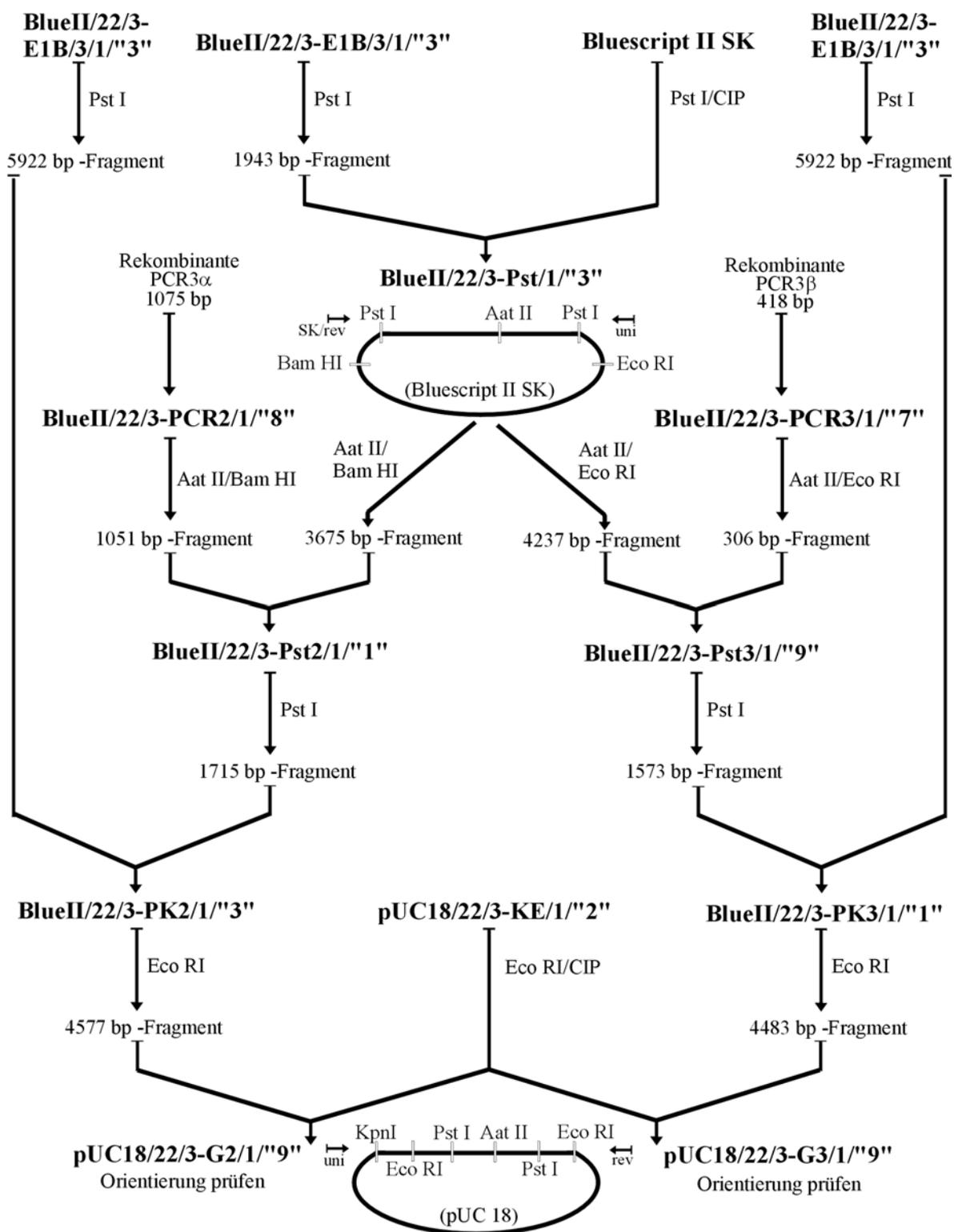


Abb. 4.3.: Konstruktion von *VMP3 α* und *VMP3 β* : Ausgehend vom genomischen Klon BlueII/22/3-E1B/3/1/'3'' (s. Abb. 4.4.) wurden in einem Pst I-Pst I-Stück (mit gesamten Polyprolinbereich) durch rekombinante PCR (3 α und 3 β , s. 2.1.8.) zwei verkürzte Genfragmente mit endständiger Aat II-Schnittstelle erzeugt. Diese wurden über eine Aat II- (im Polyprolinbereich) und eine Vektorschnittstelle (Bam HI bzw. Eco RI) wieder in das Pst I-Pst I-Stück und dann in den Ausgangsklon gesetzt und mit dem *VMP3*-Promotorbereich versehen (aus pUC18/22/3-KE/1/'2'', s. Abb. 4.4.). Aat II: Nukl. 2868, Eco R I: Nukl. 662 und 5467, Pst I: Nukl. 1601 und 3544.

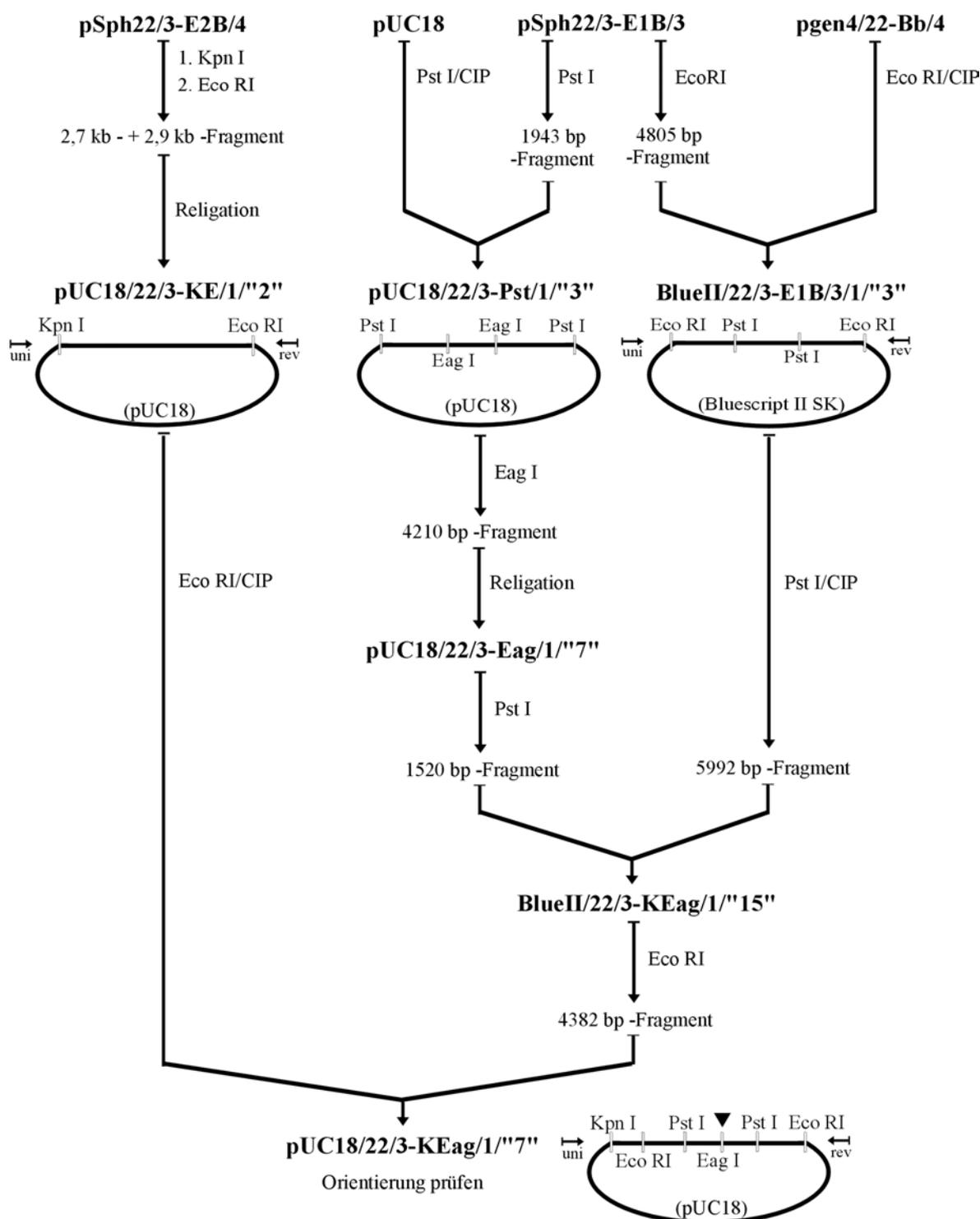


Abb. 4.4.: Konstruktion von *VMP3*: Ein Pst I-Pst I-Fragment (aus pSph22/3-E1B/3, mit gesamten Polyprolinbereich) wurde mit Eag I geschnitten, religiert (pUC18/22/3-Eag/1/'7'') und wieder in den Ausgangsklon eingesetzt. Dieser musste zur Generierung passender Vektorschnittstellen erst umkloniert werden (mit pgen4/22-Bb/4 zu BlueII/22/3-E1B/3/1/'3''). Nach Verkürzung auf etwa 2,5 kb (aus pSph22/3-E2B/4 zu pUC18/22/3-KE/1/'2'') wurde schließlich der *VMP3*-Promotorbereich angefügt. Das schwarze Dreieck kennzeichnet die religierten Eag I-Schnittstellen. Eag I: Nukl. 2718 und 3141, Eco R I: Nukl. 662 und 5467, Pst I: Nukl. 1601 und 3544.

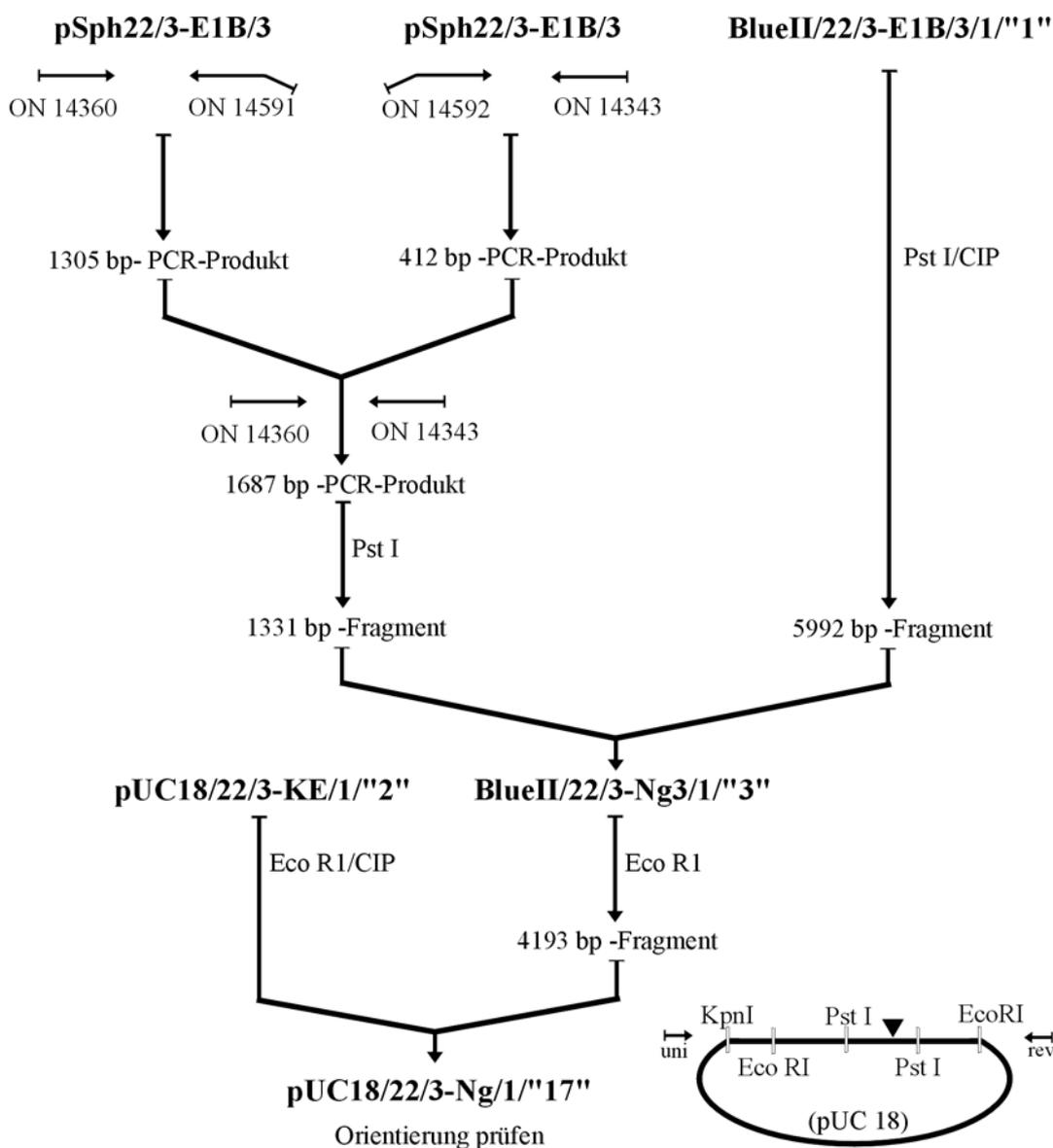


Abb. 4.5.: Konstruktion von *VMP3 δ* : Mit Hilfe einer rekombinanten PCR nach Horton et al. (1989) wurden in einem Pst I-Pst I-Fragment der gesamte Polyprolinbereich und die restlichen fünf C-terminalen Aminosäuren von *VMP3* deletiert und stattdessen ein (Gly)₂-(His)₆-tag angefügt (ON 14591 und ON 14592). Das verkürzte Pst I-Pst I-Stück wurde dann in den Ausgangsklon (BlueII/22/3-E1B/3/1/3'', s. Abb. 4.4.) gesetzt und mit dem *VMP3*-Promotorbereich versehen (pUC18/22/3-KE/1/2'', s. Abb. 4.4). Das schwarze Dreieck kennzeichnet die Lage der Deletion und des "tags". Eco RI: Nukl. 662 und 5467, Pst I: Nukl. 1601 und 3544.

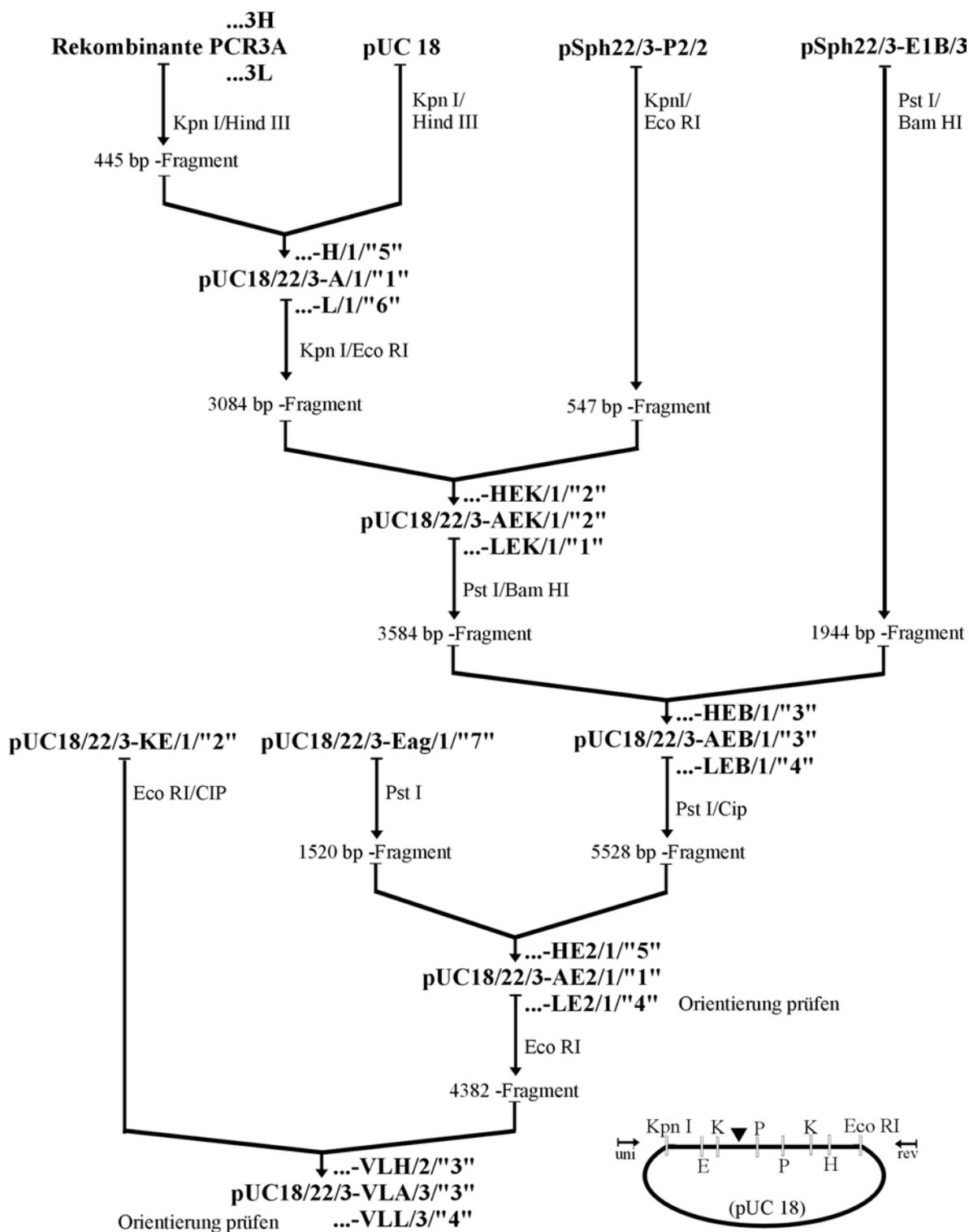


Abb. 4.6.: Konstruktion von *VMP3 γ -H*, *-L*, und *-A*: Ausgehend vom Plasmid Sph22/3-E1B/3 wurden durch rekombinante PCR nach Horton et al. (1989) drei Punktmutationen und zwei neue Restriktionsschnittstellen (Hind III, Bam HI) in ein Kpn I-Pst I-Stück eingeführt (s. 2.1.10.). Die rekombinanten PCR-Fragmente wurden mit Genstücken aus dem Ausgangsklon, aus pSph22/3-P2/2, pUC18/22/3-Eag/1/7" (mit verkürzten Polyprolinbereich, s. Abb. 4.4.) und pUC18/22/3-KE/1/2" (mit *VMP3*-Promotorbereich, s. Abb. 4.4.) wieder zum vollständigen *VMP3 γ -Gen* ergänzt. Das schwarze Dreieck kennzeichnet die Lage der Punktmutationen. Eco RI(E): Nukl. 662 und 5467, Hind III(H): 4864, Kpn I(K): Nukl. 1209 und 4555, Pst I(P): Nukl. 1601 und 3544.

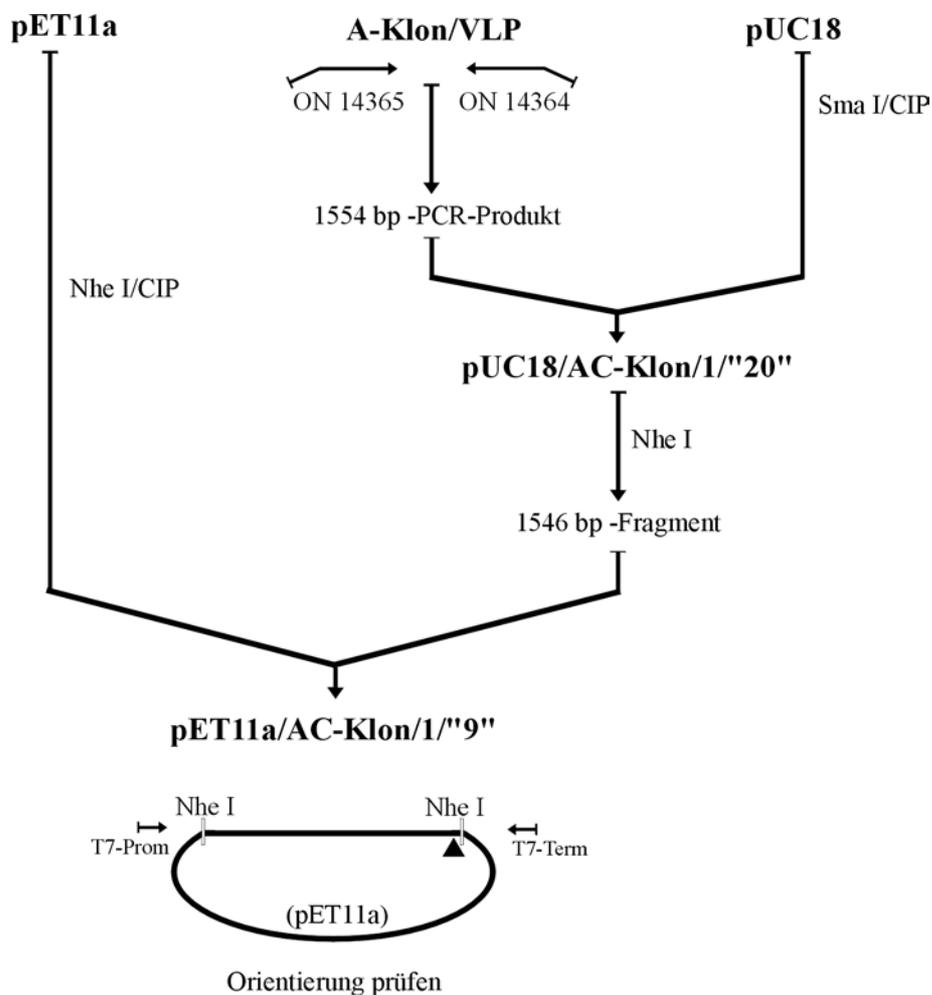


Abb. 4.7.: Konstruktion eines Expressionsplasmids für hVMP4-C-Terminus: Ausgehend vom cDNA-Volllängenklon A-Klon/VLP wurde durch rekombinante PCR mit ON 14365 (mit Nhe I-Schnittstelle) und ON 14364 (mit (His)₆-tag, Stopcodon und Nhe I-Schnittstelle) ein DNA-Fragment erzeugt, das für fast den gesamten C-terminalen Bereich von VMP4 codiert (AS 639-1143, s. 6.4.). Nach anschließendem Umklonieren in den Expressionsvektor pET11a über die rekombinant eingefügten Restriktionsschnittstellen (Nhe I) konnte das VMP4-Genfragment (Plasmid pET11a/AC-Klon/1/'9'') in *E. coli* exprimiert werden. Das schwarze Dreieck kennzeichnet die Lage des (His)₆-tags.

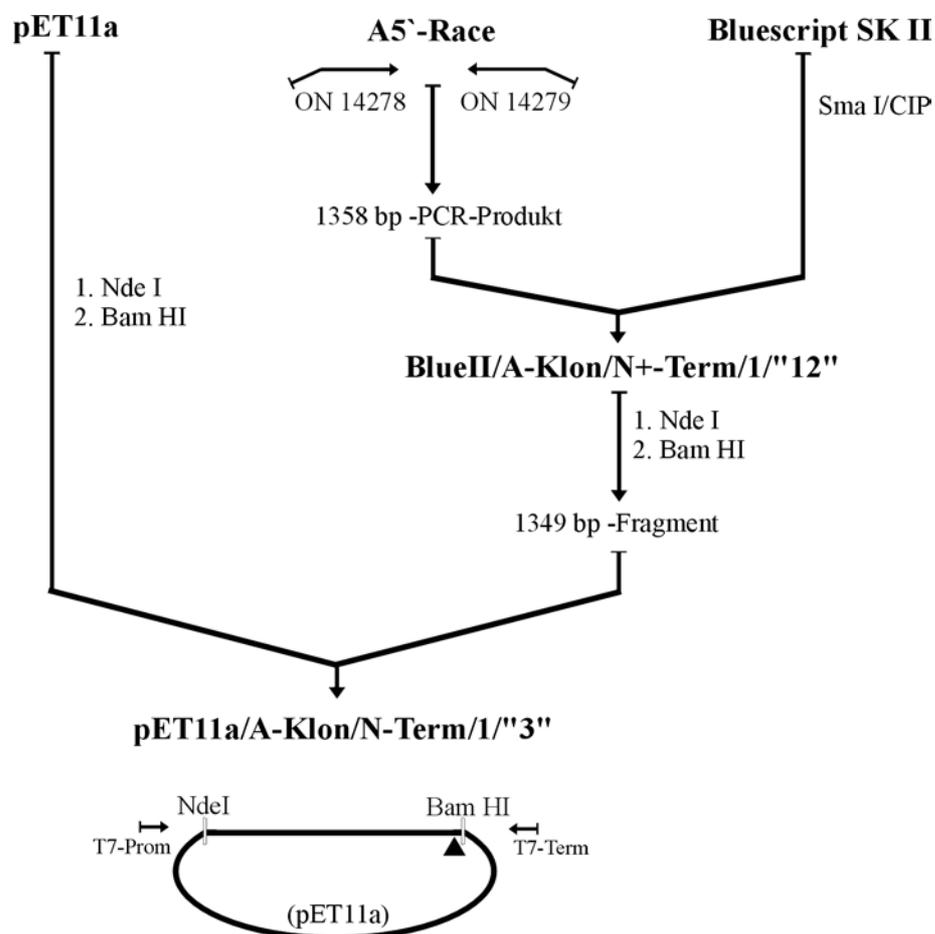


Abb. 4.8.: Konstruktion eines Expressionsplasmids für hVMP4-N-Terminus: Ausgehend vom cDNA-Klon A5'-Race wurde durch rekombinante PCR mit ON 14278 (mit Nde I-Schnittstelle) und ON 14279 (mit (His)₆-tag, Stopcodon und Bam HI-Schnittstelle) ein DNA-Fragment erzeugt, das für einen Teil des N-terminalen Bereich von VMP4 codiert (AS 52-492, s. 6.4.). Nach anschließendem Umklonieren in den Expressionsvektor pET11a über die rekombinant eingefügten Restriktionsschnittstellen (Nde I und Bam HI) konnte das VMP4-Genfragment (Plasmid pET11a/A-Klon/N-Term/1/'9'') in *E. coli* exprimiert werden. Das schwarze Dreieck kennzeichnet die Lage des (His)₆-tags.

4.4. Proteinbiochemische Methoden

4.4.1. Heterologe Genexpression in *E. coli*

Um größere Proteinmengen z.B. zur Produktion polyklonaler Antikörper zu erhalten, wurden verschiedene Abschnitte der *VMP3*- und *VMP4*-cDNA heterolog in *E. coli* exprimiert. Dabei wurde das pET-System der Fa. Novagen verwendet, bei dem das gewünschte cDNA-Stück in Abhängigkeit eines spezifischen T7-Promotors von der viralen T7-RNA-Polymerase transkribiert werden kann (Novagen, 1997). Bei dem hier verwendeten Plasmid pET11a ist die Transkription zusätzlich durch den *lac*-Operator kontrolliert, so dass eine Expression der cDNA nur nach vorheriger Induktion mit IPTG erfolgen kann (Studier & Moffat, 1986). Die zur Transkription benötigte T7-RNA-Polymerase liegt im Expressionstamm BL21(DE3) genomisch integriert vor, und steht ebenfalls unter der Kontrolle des *lac*-Operators.

Bei der Herstellung der Expressionskonstrukte wurden die cDNA-Fragmente ohne eventuelle physiologische Signalpeptidsequenzen aber zusätzlich mit einem C-terminalen (His)₆-tag versehen, um dann die entsprechend intrazellulär lokalisierten Proteine über eine Ni-NTA-Matrix reinigen zu können.

4.4.1.1. Kultivierung und Induktion

Die Konstruktion des zu exprimierenden cDNA-Stücks und die Ligation in den Expressionsvektor pET11a wurde im *E. coli*-Stamm DH5 α durchgeführt; erst nach vollständiger Überprüfung der Richtigkeit der DNA-Sequenz erfolgte eine Transformation in BL21(DE3)-Zellen: ca. 50 ng gereinigtes Plasmid wurden mit 50 μ l kompetenten Zellen versetzt (s. 4.3.3.4.), und vom Transformationsansatz dann 2 μ l und 20 μ l auf LBA-Platten gegeben. Für die Expression des N-terminalen Bereichs von *VMP3* wurde der Vektor pET11a/22/3/1/"6" verwendet, die Plasmide pET11a/A-Klon/N-Term/1/"3" und pET11a/AC-Klon/1/"9" ermöglichten die Expression des N- bzw. C-terminalen Teils von *VMP4*. Nach Inkubation ü.N. bei 37°C wurde eine Einzelkolonie in 4 ml LB-Medium übertragen und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer O.D.₆₀₀ von 0,6-0,8 (2-3 h) kultiviert (Novagen, 1997). Ein Teil der Bakteriensuspension wurde dann zur Erstellung einer Dauerkultur (s. 4.3.1.1) verwendet, der Rest bis zu 16 h bei 4°C gelagert und als Vorkultur genutzt. Zur Erstellung von Vorkulturen dienten auch die angelegten Dauerkulturen, es musste dann aber bis zum Erreichen der erforderlichen Kulturdichte mit längeren Inkubationszeiten gerechnet werden (5-6 h für eine O.D.₆₀₀ von 0,6-1,0).

Für eine Hauptkultur von 100 ml wurden 2 ml exponentiell wachsende Vorkultur benötigt (s.o.). Diese wurde zuerst zentrifugiert (2 min, Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM, 4°C), das Pellet danach in frischem LB-Medium resuspendiert und damit die Hauptkultur gestartet. Deren Kultivierung erfolgte bei 37°C in einem Schüttelinkubator solange, bis eine O.D.₆₀₀ von 0,8-1,0

erreicht war (2-3 h). Die Kultur wurde dann auf 1 mM IPTG gebracht und noch 3 h unter denselben Bedingungen weiter inkubiert, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots entnommen wurden, um den Verlauf der Expression mittels einer SDS-PAGE zu verfolgen.

Zum Zeitpunkt der maximalen Expression des gewünschten Proteins (etwa 2-3 h nach Induktion) wurde die Zellsuspension dann 5 min auf Eis gekühlt, 5 min zentrifugiert (Hettich Rotina, 4.000 UpM, 4°C) und das Bakterienpellet in 10 ml 50 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen.

4.4.1.2. Proteinreinigung und -rückfaltung

Nach der Zellernte erfolgte der Aufschluss der Bakterien mit 100 µg/ml Lysozym in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 und 1% Triton X-100 durch Inkubation für 15 min bei 30°C. Eine anschließende Behandlung mit Ultraschall ("Sonifier Cell Disruptor B15", Fa. Branson, Stufe 2-3, dreimal 15 sec im Eis-Wasser-Bad, dazwischen 1 min Pause) bewirkte eine Fragmentierung der viskosen bakteriellen DNA. In einem Zentrifugationsschritt (20 min, Sorvall-Zentrifuge, SS-34-Rotor, 10.000 UpM, 4°C) konnten dann die löslichen Proteine (Überstand) von den unlöslichen (Pellet, sogenannte "inclusion bodies") getrennt werden.

Alle in dieser Arbeit exprimierten Proteine (hVMP3-N-Terminus, hVMP4-N-Terminus und hVMP4-C-Terminus) lagen als unlösliche "inclusion bodies" vor. Diese wurden zunächst zur Abtrennung eventuell anhaftender, löslicher Proteine mit 0,5% Triton X-100 in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen, wobei eine vollständige Resuspendierung des Pellets meist nur durch Ultraschallbehandlung möglich war (s.o.). Durch zweiminütige Zentrifugation bei RT (Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM) sedimentierte das unlösliche Protein zwar leicht, musste aber zur Affinitätsreinigung über den (His)₆-tag wieder in Lösung gebracht werden. Dies wurde durch Denaturierung mit 8 M Harnstoff (hVMP3-N-, und hVMP4-C-Terminus) bzw. 6 M Guanidiniumhydrochlorid (hVMP4-N-Terminus) in 1x Binding-buffer erreicht. Weiterhin unlösliche Bestandteile konnten durch Zentrifugation (s.o.) abgetrennt werden.

Zur weiteren Aufreinigung wurde Ni-NTA-Agarose (Fa. Qiagen) verwendet, die Proteine mit (His)₆₋₁₀-Sequenzen auch unter denaturierenden Bedingungen mit hoher Affinität bindet. Für jedes der drei Expressionsprodukte wurde bei RT eine separate Chromatographiesäule mit 2 ml Bettvolumen (BV) an Affinitätsmatrix gegossen, mit 3 BV Wasser gewaschen, mit 5 BV 1x Charge-buffer konditioniert und mit 3 BV 1x Binding-buffer (mit 8 M Harnstoff bzw. 6 M Guanidiniumhydrochlorid) äquilibriert (Novagen,1997). Nach Auftrag der Proteinlösung wurde die Säule mit 10 BV 1x Binding-buffer und 6 BV 0,3x Wash-buffer gewaschen und dann das Protein mit insgesamt 6 BV 1x Elute-buffer (dreimal 2 ml-Fractionen) eluiert, wobei alle Puffer 8 M Harnstoff bzw. 6 M Guanidiniumhydrochlorid enthielten. Das Säulenmaterial konnte nach Waschen mit 3 BV 1x Strip-buffer und erneuter Äquilibrierung (s.o.) wiederverwendet werden.

Nach Analyse der Fraktionen der Chromatographie auf einem SDS-PAG wurden Elutionsfraktionen mit dem gewünschten Protein vereinigt und im Falle von hVMP3-N- bzw. VMP4-C-Terminus (in 8 M Harnstoff) zur Renaturierung 16 h bei 4°C gegen 50 mM Glycin pH 9,0 unter mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert (Qiagen, 1997). hVMP4-N-Terminus (in 6 M Guanidiniumhydrochlorid) musste zur Renaturierung erst bei RT gegen 8 M Harnstoff pH 7,0 dialysiert werden, um bei der Dialyse gegen Glycinpuffer (s.o.) vollständig in Lösung zu bleiben. Die so gereinigten und renaturierten, aber verdünnten Expressionsprodukte, wurden in Ultrafiltrationsröhrchen der Fa. Pall wieder aufkonzentriert (Sorvall-Zentrifuge, SS-34-Rotor, 7.000 UpM, 4°C).

4.4.2. Reinigung von VMP 3 und VMP 4 aus *Volvox carteri*

Die Reinigung der Proteine VMP3 und VMP4 aus der inneren Matrix von *Volvox carteri* wurde durch die vorhergehende Produktion polyklonaler Antikörper gegen heterolog exprimierte Teilbereiche dieser Proteine ermöglicht (s. 4.5.1). Demzufolge wurden alle Reinigungsschritte durch Immunodetektion im Western Blot analysiert (s. 4.5.3.).

Beide Proteine befanden sich im „Schlitzextrakt“ bzw. den „Waschextrakten“ sexuell induzierter Algen (s. 4.2.2.).

4.4.2.1. Ionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex A25

Als erster Schritt zur Reinigung der Proteine wurde eine Anionenaustauschchromatographie an QAE-Sephadex A25 (Fa. Pharmacia) gewählt. Dazu wurde das Ionenaustauschermaterial mindestens 16 h bei 4°C in Äquilibriumspuffer (50 mM Tris/HCl pH 9,0 mit 10 mM NaCl) gequollen, wobei 5g Trockenmaterial ein Bettvolumen (BV) von ca. 25 ml ergaben (Pharmacia, 1998). Das nachfolgende Gießen des gequollenen Materials in eine Chromatographiesäule erfolgte wie alle weiteren Schritte bei 4°C. Mithilfe einer Peristaltikpumpe (Fa. LKB Pharmacia) wurde die Flussgeschwindigkeit während des gesamten Chromatographielaufs bei 1 ml/min gehalten. Nach ausgiebigem Waschen der Säule mit Äquilibriumspuffer (mindestens 10 BV) konnte das Proteingemisch aufgetragen werden, wobei für 150-200 ml „Schlitz-“ oder „Waschextrakt“ etwa 30 ml Bettvolumen benötigt wurden. Danach wurde die Säule wieder mit Äquilibriumspuffer gewaschen (etwa 5 BV) und anschließend mit einem Stufengradienten mit ansteigender Kochsalzkonzentration eluiert. Dabei wurden Lösungen mit 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM und 1 M NaCl in 50 mM Tris/HCl pH 9,0 verwendet, das jeweilige Fraktionsvolumen betrug 2 BV. Nach intensivem Waschen mit Äquilibriumspuffer konnte die Säule wiederverwendet werden. Sowohl VMP3, als auch VMP4 wurden unter den genannten Bedingungen vollständig an den Ionenaustauscher gebunden, eluierten dann aber in verschiedenen Fraktionen (VMP3: v.a. 100 mM NaCl, VMP4: 300 mM NaCl).

4.4.2.2. HPLC mit einer Uno Q 1R-Säule

Im zweiten Reinigungsschritt wurde wiederum das Prinzip der Anionenaustauschromatographie genutzt, hier fand allerdings ein HPLC-System der Fa. Dionex und eine Uno Q1R-Säule der Fa. Bio-Rad (Bettvolumen 1,3 ml) Verwendung. Fraktionen des ersten Reinigungsschrittes (s. 4.4.2.1.) mit VMP3 oder VMP4 wurden zuerst bei 4°C unter Rühren gegen Startpuffer (20 mM Tris/HCl pH 8,2 mit 10 mM NaCl) dialysiert, dann zentrifugiert (30 min, Sorvall-Zentrifuge, SS-34-Rotor, 10.000 UpM, 4°C) und anschließend mit Hilfe eines "superloop" (Fa. Pharmacia, entspricht in etwa einer Probenschleife von 50 ml) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die vorher mit 3 BV Startpuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Der Verlauf der Chromatographie bei RT wurde dabei mittels eines Photometers mit angeschlossenem Schreiber bei einer Wellenlänge von 214 nm und 280 nm dokumentiert. Nachfolgend wurde die Säule solange mit Startpuffer gewaschen, bis die Absorptionwerte wieder dem Ausgangswert entsprachen. Die Elution der Säule erfolgte mit einem manuell gesteuerten Stufengradienten mit steigender NaCl-Konzentrationen (100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM und 1 M in 20 mM Tris/HCl pH 8,2). Das jeweilige Fraktionsvolumen folgte dabei den parallel gemessenen Absorptionwerten (ca. 3-10 ml).

Beide Proteine – VMP3 und VMP4 – wurden vollständig an das Säulenmaterial gebunden und eluierten bei 100 mM NaCl (VMP3) bzw. 400 mM NaCl (VMP4). In beiden Fraktionen lagen die jeweiligen Proteine relativ sauber vor, so dass eine eindeutige Zuordnung der Signale der Immunodetektion im Western Blot zu einer Bande im mit Silber gefärbten SDS-PAG möglich war.

4.4.2.3. Proteinelution aus SDS-Polyacrylamidgelen

Durch präparative Auftrennung der jeweiligen Eluate aus dem zweiten Reinigungsschritt (s. 4.4.2.2.) auf einem SDS-PAG nach Laemmli (Laemmli, 1970) und anschließender Gelelution konnten die Proteine VMP3 und VMP4 bis zur Homogenität gereinigt werden. Dazu wurden die entsprechenden Fraktionen ü.N. bei 4°C erschöpfend gegen destilliertes Wasser dialysiert, nachfolgend lyophilisiert und in ca. 200 µl Wasser aufgenommen. Die gesamte Proteinlösung wurde dann auf einem 6% SDS-PAG aufgetrennt, die Randspuren einer Silberfärbung unterzogen und aus dem restlichen Gel der Bereich ausgeschnitten, der sich auf Höhe der entsprechenden VMP3- bzw. VMP4-Proteinbanden befand. Durch mehrmalige Passage über ein engmaschiges Metallgitter wurden die Gelstücke zerkleinert, mit ca. 2 ml Wasser versetzt und für 20 h bei 28°C kräftig gerührt, wodurch die Proteine durch Diffusion aus dem Gel eluierten. Nach anschließender Ultrazentrifugation (10 min, Kontron-Zentrifuge, TFT80.2-Rotor, 40.000 UpM, 18°C) zur Abtrennung der Gelfragmente befanden sich die Proteine im Überstand.

4.4.3. Proteintransfer auf eine PVDF-Membran zur Ansequenzierung des N-Terminus

Sowohl von den gereinigten Proteinen VMP3 und VMP4 (s. 4.4.2.), als auch von ihren gereinigten, heterolog exprimierten Teilbereichen (s. 4.4.1) wurde zur Überprüfung ihrer Aminosäuresequenz der N-Terminus ansequenziert. Dazu wurden mindestens 2 µg Protein auf einem SDS-PAG aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet (s. 4.5.3.). Als Transferpuffer diente dabei 50 mM Borsäure pH 9,0 in 10% Methanol, in welchem PVDF-Membran und 3MM Whatman-Papiere vor dem Gellauf für 1 h gelagert wurden. Die Membran war vorher zusätzlich schon 30 min in 100% Methanol geschwenkt worden. Das Blotten erfolgte für 2-3 h bei 1 mA/cm² Membran. Nachfolgend konnte das Protein nach Anfärben der Membran mit Coomassie (10 min in 0,1% Coomassie R250 in 50% Methanol, entfärben mit 50% Methanol und 10% Eisessig, dann 60 min wässern) sichtbar gemacht und aus der Membran ausgeschnitten werden. Das Membranstück wurde dann direkt für die Sequenzierung auf einem Gasphasensequenzator eingesetzt.

4.4.4. Deglykosylierung mit Fluorwasserstoff

Eine vollständige Deglykosylierung von Proteinen wurde durch Behandlung mit Fluorwasserstoff erreicht (Mort & Lamport, 1977). Zur vollständigen Entsalzung wurden Fraktionen der HPLC mit VMP3 bzw. VMP4 (s. 4.4.2.2.) bei 4°C erschöpfend gegen destilliertes Wasser dialysiert und nachfolgend lyophilisiert. Anschließend wurden die Proben mit ca. 500 µl frisch kondensiertem, wasserfreiem Fluorwasserstoff versetzt, für 90 min auf Eis inkubiert und der Fluorwasserstoff dann im Stickstoffstrom vorsichtig verblasen. Anhaftende Fluorwasserstoffreste wurden in einer Vakuumzentrifuge ("speed-vac", 15-30 min) entfernt, die Proben danach in einem kleinen Volumen 50 mM Tris/HCl pH 9,0 resuspendiert und eventuell mit 1 M Tris-Base neutralisiert.

4.4.5. Radioaktive Markierungen

4.4.5.1. [³⁵S]-Sulfat- und [³³P]-Phosphat-Puls-Markierung von *Volvox*-Embryonen unter Anwesenheit von Ellmann`s Reagenz

Zur Ernte von *Volvox*-Embryonen wurde eine Kultur im analytischen Maßstab (800 ml, s. 4.1.2.) zum Abschluss der Embryogenese (ca. 12³⁰ MEZ) über ein 100 µm-Nylonsieb geerntet, mit sulfat- bzw. phosphatfreiem SVM gewaschen, in 30 ml desselben Mediums aufgenommen und zweimal vorsichtig durch eine 0,6 mm-Kanüle gedrückt. Die dadurch freigesetzten *Volvox*-Embryonen konnten nach Abtrennung der aufgebrochenen mütterlichen Sphäroide über ein 100 µm-Nylonsieb auf einem 40 µm-Nylonsieb aufkonzentriert werden (Wenzl & Sumper, 1986). Anschließend wurden die Embryonen in je 2 ml sulfat- bzw. phosphatfreiem SVM aufgenommen, in einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte unter Standardbedingungen (s. 4.1.1.) bis kurz vor Start der Inversion (16⁰⁰ MEZ) inkubiert, mit 0,1 M Ellmann`s Reagenz (5,5`-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) in 0,3 M NaHCO₃ ad 2 mM versetzt und ü.N. weiterkultiviert. Zu je 200 µl der

dann desintegrierten Embryonen wurden 4 μCi [^{35}S]-Sulfat bzw. 10 μCi [^{33}P]-Phosphat gegeben und 90 min in einem 1,5 ml-Eppendorfcup bei 28°C unter Schütteln bei Gelblicht (15.000 Lux) markiert (Sumper et al., 2000). Nach Zentrifugation (5 min, Eppendorfzentrifuge, 14.000 UpM, RT) befanden sich radioaktiv markierte Zellwandproteine im Überstand.

4.4.5.2. [^{35}S]-Sulfat-Puls-Chase-Markierung

Eine *Volvox*-Kultur im analytischen Maßstab vor Start der Embryogenese (8⁰⁰ MEZ) wurde über ein 40 μm -Nylonsieb geerntet, mit sulfatfreiem SVM gewaschen und in 8 ml desselben Mediums aufgenommen. Zweimal 2,5 ml dieser Algensuspension wurden dann in einem „Sarstedt-Röhrchen“ mit dem Sexualpheromon (ad 1 pM) versetzt und bei 28°C unter Rühren bei Gelblicht (15.000 Lux) inkubiert (Wenzl & Sumper, 1986). Nach 45 min wurden zusätzlich je 100 μCi [^{35}S]-Sulfat zugegeben und 2 h markiert („Puls“). Anschließend wurden die Algen mit SVM frei von Radioaktivität gewaschen, und unter den obigen Bedingungen noch 8 h weiter inkubiert („Chase“), wobei alle 2 h je 1 ml Algensuspension als Probe entnommen wurde.

4.4.6. In-Gel-Aktivitätstest (Zymographie)

Viele Enzyme aus der Familie der extrazellulären Metalloproteasen besitzen die Eigenschaft nach Lauf in einem SDS-PAG nach Laemmli (Laemmli, 1970) wieder vollständig renaturieren zu können, d.h. die Proteine besitzen auch im Gel ihre volle proteolytische Aktivität. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Verwendung sogenannter Zymogramme oder In-Gel-Assays zu nutze, bei denen ein Substratprotein der Protease mit in das Gel polymerisiert wird (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1994). Unter geeigneten Bedingungen kann sich das Enzym nach dem Gellauf wieder in seine native Form rückfalten und an der Stelle, an der es aufgrund seiner elektrophoretischen Mobilität zu liegen kommt, das Substrat verdauen. Die niedermolekularen Fragmente des prozessierten Proteins können dann aus dem Gel herausgewaschen werden; nach Färbung des Gels mit Coomassie erhält man dann farblose Banden auf blauem Hintergrund.

Zur Analyse von Metalloproteasen aus *Volvox carteri* wurden in dieser Arbeit SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli (Laemmli, 1970) bestehend aus einem Trenngel mit 8% oder 10% Acrylamid und 0,2% Gelatine als Substrat und einem fünfprozentigen Sammelgel (ohne Gelatine) hergestellt. Im Gegensatz zur Standardmethode nach Laemmli wurden die Proben vor dem Auftrag mit 1 VT nicht-reduzierendem 2x Probenpuffer (d.h. ohne DTT) versetzt und nicht aufgekocht (stattdessen 5 min bei RT), um eine irreversible Denaturierung der Enzyme zu verhindern. Nach der elektrophoretischen Trennung (ca. 3 h bei 14 mA) wurden die Gele kurz mit Wasser gewaschen und dann unter Schwenken bei 28°C für 48 h in SVM mit 0,02% NaN_3 , 0,1 mM ZnCl_2 und 1% Triton X-100 (viermaliger Pufferwechsel) und für 24 h im selben Puffer ohne Detergenz (zweimaliger Pufferwechsel) inkubiert. Anschließend wurden die Gele für 30 min mit

Coomassie gefärbt, bis zum Sichtbarwerden der Banden wieder entfärbt und ü.N. gewässert. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit einem Geldokumentationscenter (Fa. Vilber Lourmat) und zugehöriger Software (Version 5.01). Dabei wurde immer das inverse Bild verwendet.

Sollte die proteolytische Aktivität der Enzyme unter verschiedenen Bedingungen (z.B. pH-Wert, Temperatur, Salzkonzentration) untersucht werden, so wurden fünf Spuren des Gels mit derselben Proteinmenge beladen, das Gel nach dem Lauf zerschnitten, und je eine Spur in den jeweiligen Lösungen inkubiert.

Zur Analyse der Aktivität wurden den Standardpuffern (s.o.) folgende Inhibitoren in der angegebenen Konzentration zugesetzt: 1 mM EDTA (Stammlösung: 0,5 M in H₂O pH 8,0), 1 mM EGTA (0,5 M in 2 M NaOH), 2 mM 1,10-Phenanthrolin (0,2 M in Ethanol; Dawson et al., 1987), 0,5 mM PMSF (50 mM in Ethanol) und 10 µM GM 6001/Galardin (10 mM in Ethanol; Grobelny et al., 1992).

Bei Tests auf Metallsalzabhängigkeit wurde das Gel zunächst 4 h in SVM mit 0,02% NaN₃, 1 mM EDTA und 1% Triton X-100 geschwenkt, alle folgenden Puffer (s.o.) enthielten dann zusätzlich das gewünschte Metallsalz in einer Konzentration von 2 mM und 1 mM EDTA.

4.4.7. SDS-PAGE nach Davies und Stark

Bei der Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von VMP3 aus *Volvox carteri* wurde ein Molekulargewichtsstandard aus z.T. quervernetzten Phosphorylase-b-Proteinen der Fa. Sigma verwendet. Dieser enthält Moleküle mit 97, 195, 292, 389, 487 und 584 kDa, gehorcht bei einer Auftrennung auf einem SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) aber nicht der linearen Proportionalitätsbeziehung zwischen elektrophoretischer Mobilität und dem Logarithmus des Molekulargewichts, weswegen zur Analyse ein SDS-PAGE nach Davies und Stark (Davies & Stark, 1970) benutzt wurde, das die geforderte Proportionalität gewährleistet:

Zur Proteintrennung wurden somit Gele mit 4% Acrylamid (Stammlösung: 30% AA + 0,8% Bis) in 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0 mit 7,5 mM SDS und 3% TEMED ohne Sammelgel hergestellt (Start der Polymerisation: ad 0,3 mg/ml Ammoniumpersulfat) und die Proteinproben mit 1 VT 2x Probenpuffer (100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0, 35 mM SDS, 1% Mercaptoethanol, 6 M Harnstoff, 0,015% Bromphenolblau) versetzt. Nach Inkubation der Proben und des Molekulargewichtsstandards (20 µg/Spur) für 5 min bei 37°C erfolgte der Gellauf in 66 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,0 mit 2,3% SDS bei 12 mA für etwa 24 h. Nach dem Lauf konnte das Gel gemäß den üblichen Methoden gefärbt oder geblottet werden.

4.4.8. Biochemische Standardmethoden

4.4.8.1. SDS-PAGE nach Laemmli

Im allgemeinen wurden zur Analyse von Proteinen SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli verwendet (Laemmli, 1970 und Cleveland et al., 1977). Dabei fanden Trenngele mit 5-12% und Sammelgele mit 4-5% Acrylamid Verwendung. Die Proben wurden vor dem Lauf mit 1 VT 2x Probenpuffer nach Laemmli versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt, die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 12-25 mA für 1-3 h.

4.4.8.2. Coomassie-Färbung von SDS-PAGs

Die Färbung von SDS-PAGs und proteolytischen In-Gel-Assays (s. 4.4.6.) erfolgte mit Coomassie (10-30 min in 0,25% Coomassie R250/G250, 42,5% Ethanol, 10% Eisessig und 5% Methanol) nach Cooper (1981). Entfärbt wurde mit 30% Methanol und 7% Eisessig.

4.4.8.3. Silberfärbung von SDS-PAGs

Zur Detektion kleinerer Proteinmengen im SDS-PAG wurde eine Methode nach Blum et al. (1987) benützt. Dabei wurde das Gel fixiert (1 h in 50% Methanol, 12% Eisessig und 0,02% Formaldehyd), gewaschen (je 10 min in 50% Ethanol bzw. 30% Ethanol), konditioniert (1 min 0,2 g/l Na-Thiosulfat), in Färbelösung geschwenkt (20 min in 0,1% Silbernitrat und 0,03% Formaldehyd) und schließlich entwickelt (6% Na₂CO₃ in 0,02% Formaldehyd und 0,04% Na-Thiosulfat). Die Farbreaktion wurde mit 5% Eisessig abgestoppt.

4.4.8.4. Fluorographie

Die Fluorographie von SDS-PAGs nach Bonner & Laskey (1974) diente zur Verstärkung radioaktiver Signale durch PPO (2,5-Diphenyl-Oxazol). Bei dieser Methode wird DMSO-gelöstes PPO zuerst im Gel eingelagert und dort anschließend mit Wasser ausgefällt. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte nach Trocknen des Gels mit geeigneten Röntgenfilmen (Fa. Amersham) oder unter Verwendung eines Phospho-Imaging-System der Fa. Packard.

4.4.8.5. TCA-Fällung von Proteinen

Verdünnte Proteinlösungen wurden vor Auftrag auf ein SDS-PAG mit 1/5 VT 3 M Trichlor-essigsäure (TCA) und 1/10 VT 1 mg/ml Na-Desoxycholat versetzt, gemischt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 min, Eppendorf-Zentrifuge, 14.000 UpM, 4°C) wurde das gefällte Protein mit 1/10 VT Aceton (-20°C) gewaschen (15 min zentrifugieren, s.o.) und das anfallende Pellet in 1x Probenpuffer nach Laemmli aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt. Falls nötig wurde mit 1 M Tris-Base neutralisiert.

4.4.8.6. Proteinmengenbestimmung mit BCA

Zur Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA) wurden Lösungen der Fa. Sigma verwendet (Reagenz A: BCA-Lösung, Reagenz B: 4% Kupfer(II)-sulfat-Lösung). Je 1 ml Probe wurden mit 100 µl Reaktionslösung (50 VT Reagenz A + 1 VT Reagenz B) versetzt, gemischt, 30 min bei 37°C inkubiert und nach Abkühlen bei einer Wellenlänge von 563 nm photometrisch vermessen (Holtzhauer, 1997). Der Proteingehalt der Probe wurde dann durch Vergleich mit Absorptionswerten von BSA-Eichlösungen graphisch ermittelt.

4.5. Immunologische Methoden

4.5.1. Produktion polyklonaler Antikörper

Die Produktion polyklonaler Antikörper in Kaninchen erfolgte bei Dr. Pineda Antikörper-Service, Berlin. Dazu wurden die solubilisierten Expressionsprodukte der VMP-3-, bzw. VMP-4-Domänen in Lösung (s. 4.4.1.2.) mit einer Proteinkonzentration von ca. 2,5 mg/ml bei RT verschickt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte über 2 Monate hinweg, wobei an Tag 1, 20 und 40 je 200 µg Antigen subkutan verabreicht wurden (Dr. Pineda, persönliche Mitteilung). Die erste Serumprobe (25 ml) wurde am Tag 61 geliefert und dem Kaninchen dann - nach erfolgreichem Test auf spezifische Antikörperproduktion - zu einem späteren Zeitpunkt (ca. Tag 80) nochmals ca. 50 ml Blut entnommen.

4.5.2. Aufreinigung der Antikörper

Um störende Wechselwirkungen von Serumprotein während der Immunodetektion zu verhindern und um die spezifische Aktivität der Antikörper zu erhöhen, wurden die Immunsereen wie folgt aufgearbeitet (alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt):

Je 7 ml Immunsereum (anti-hVMP3-N-Terminus: Tag 85, anti-hVMP4-N-Terminus: Tag 61, anti-hVMP4-C-Terminus: Tag 61) wurden zunächst zentrifugiert (30 min, Sorvall-Zentrifuge, 3.000 xg) und der Überstand dann mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung pH 7,4 unter Rühren tropfenweise ad 50 % Sättigung gebracht. Die Fällung erfolgte für 14 h unter ständigem, langsamen Rühren. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 min, Sorvall-Zentrifuge, 12.000 xg) wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 3 ml 0,14 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0 resuspendiert und für 13 h gegen 2x 5 l desselben Puffers dialysiert. Nach der Dialyse wurde ungelöstes Protein abzentrifugiert (30 min, Sorvall-Zentrifuge, 10.000 xg) und verworfen, der Überstand aber weiter über Protein-A-Sepharose (Fa. Pharmacia) gereinigt (s.u.).

Protein-A-Sepharose wurde in 0,14 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0 suspendiert, ü.N. bei 4°C gelagert, anschließend in eine Chromatographiesäule gegossen (Bettvolumen ca. 5 ml) und mit 40 ml 0,14 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0 äquilibriert. Nach Auftrag der vorgereinigten

Antikörperlösung (s.o.) wurde das Säulenmaterial bei einem Fluss von 200 µl/min solange mit 0,14 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0 gewaschen, bis eine O.D.₂₈₀ von ≤ 0,03 erreicht war. Die Elution der Antikörper erfolgte dann bei derselben Flussgeschwindigkeit mit 0,1 M Eisessig pH 3,0 + 0,15 M NaCl in Fraktionen zu 2 ml, wobei im Fraktionsgefäß zur Neutralisierung des Eluats schon 200 µl 1 M Tris-Base vorgelegt waren. Nach Vereinigung der Fraktionen mit einer O.D.₂₈₀ ≥ 1,0 wurden diese gegen 5 l PBS dialysiert, ad 0,03 % NaN₃ gebracht, portioniert und bei -20 °C gelagert. Aus 7 ml Immuneserum konnten üblicherweise ca. 4 ml Antikörperlösung mit einer Proteinkonzentration von ca. 8,5 mg/ml gewonnen werden (1 O.D.₂₈₀ entspricht 1,4 mg/ml IgG.)

Die Regeneration der Protein-A-Sepharose erfolgte durch Waschen mit 0,1 M Eisessig pH 3,0 + 0,15 M NaCl, 70%igem Ethanol und 2 M Harnstoff pH 8,0; das Säulenmaterial konnte dann nach erneuter Äquilibrierung sofort wiederverwendet werden oder wurde in 0,14 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0 + 0,02 % NaN₃ gelagert.

4.5.3. Western Blotting und Immunodetektion

Nach elektrophoretischer Trennung von Proteingemischen mittels SDS-PAGE wurde das erhaltene Proteinmuster durch „Blotten“ nach der "semidry"-Methode (Novablot-Apparatur, Fa. Pharmacia) auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen übertragen, die Proteine waren dann einer weiteren Analyse mit Antikörpern zugänglich (Towbin et al., 1979 und Quarrie et al., 1985).

Der Proteintransfer erfolgte in einem kontinuierlichen Puffersystem (Transferpuffer: 50 mM Tris/HCl + 35 mM Glycin pH 8,3) bei 1 mA/cm² Membran für 90 min, wobei die Membran (Anodenseite) und das SDS-Gel (Kathodenseite) zwischen jeweils drei Lagen puffergetränkte 3MM Whatman-Papiere platziert wurden. Whatman-Papiere und Membranen wurden vor dem Transfer ca. 30 min in Transferpuffer eingelegt, PVDF-Membranen zuvor zusätzlich 30 min mit 100% Methanol benetzt.

Für die Immunodetektion wurden die gereinigten polyklonalen Antikörper aus Kaninchen gegen die heterolog exprimierten VMP-Domänen (s. 4.5.2.) als Primärantikörper eingesetzt, als Sekundärantikörper fanden mit alkalischer Phosphatase (bei Nitrocellulosemembranen) oder mit Meerrettich-Peroxidase (bei PVDF-Membranen) gekoppelte anti-rabbit-IgG-Antikörper Verwendung (Fa. Sigma bzw. Fa. Amersham). Beide Verfahren ergaben vergleichbare Resultate, die unten angegebenen Verdünnungen lieferten dabei die besten Resultate.

(Standard)-Proteine wurden auf den Membranen mit Ponceau S-Lösung sichtbar gemacht.

Für eine Farbdetektion mit alkalischer Phosphatase wurde die Membran nach dem Transfer 1 h mit PBS-T blockiert und dann 1 h mit Primärantikörperlösung (1:2.500 in PBS-T) überschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS-T für je 15 min, folgte eine einstündige Inkubation in Sekundärantikörperlösung (1:10.000 in PBS-T). Dann wurde die Membran dreimal je 10 min mit PBS-T gewaschen, kurz in TNK geschwenkt und anschließend 10 min in AP-Puffer äquilibriert.

Die Farbreaktion erfolgte mit BCIP und NBT (150 µg/ml und 37,5 µg/ml in AP-Puffer) bei RT und wurde durch Waschen der Membran mit Wasser abgestoppt.

Sollte die Detektion mittels Meerrettich-Peroxidase (ECL-Reaktion) erfolgen, so wurde die Membran 15 min in 10 % Milchpulver in PBS-T blockiert, kurz in PBS-T geschwenkt und dann für 1 h mit Primärantikörperlösung (1:1.000 in PBS-T) inkubiert. Nachdem die Membran dann zweimal für 15 min mit PBS-T gewaschen wurde, wurde sie für 15 min mit Sekundärantikörperlösung (1:5.000 in PBS-T) überschichtet und erneut zweimal für 10 min in PBS-T geschwenkt. Für die enzymatische Chemolumineszenzreaktion der Meerrettich-Peroxidase wurde die Membran anschließend 1 min mit Substratlösung (1 VT "Detection reagent 1" + 1 VT "Detection reagent 2", Fa. Amersham) inkubiert und dann ein Röntgenfilm aufgelegt.

4.5.4. Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation von VMP3 erfolgte mit anti-rabbit-IgG-Antikörper beladenen, magnetisierbaren Metallkügelchen ("Dynabeads", M450) der Fa. Dynal, die mit Hilfe eines Dauermagneten „präzipitiert“ werden können. Dabei wurde nach der direkten Methode der Immunopräzipitation wie folgt vorgegangen (Dynal, 1996):

Zuerst wurden 100 µl Dynabead-Suspension in einem silanisierten Eppendorfcup viermal mit PBS-T gewaschen, dann mit 100 µl Antikörperserum bzw. Präimmunserum gegen hVMP3-N-Terminus (1:20 in PBS-T, s. 4.5.1.) versetzt und ü.N. bei 4°C gerollert. Während dieser Inkubation wurden die Metallkügelchen mit IgG-Molekülen aus den jeweiligen Kaninchenseren beladen. Nach Präzipitation der Kügelchen und Verwerfen des Überstandes, wurden diese erneut viermal mit PBS-T gewaschen und dann mit je 500 µl einer dialysierten, eingeengten HPLC-Fraktion der VMP3-Reinigung (s. 4.4.2.2., ursprüngliches Volumen 20 ml) als Antigenquelle wie oben inkubiert. Bei dieser Inkubation wurden VMP3-Moleküle von den spezifischen an die Metallkügelchen gebundenen Antikörpern erkannt und in der nachfolgenden Präzipitation aus der Lösung „gefischt“. Nach viermaligem Waschen mit PBS-T wurden die Kügelchen dann mit 80 µl nicht-reduzierenden Probenpuffer (ohne DTT) für die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli versetzt (Laemmli, 1970 und Cleveland et al., 1977), 10 min bei RT inkubiert und dann kräftig gemixt, präzipitierte VMP3-Moleküle befanden sich dann im Überstand.

4.6. Puffer, Lösungen, Medien und Organismen

4.6.1. Puffer und Lösungen

AP-Puffer (alkalische Phosphatase)	100 mM Tris/HCl pH 9,5 1,0 M NaCl 50 mM MgCl ₂
Binding-buffer (8x)	40 mM Imidazol 4 M NaCl 160 mM Tris/HCl pH 7,9
BCIP-Lösung	50 mg/ml in DMF
Charge-buffer (8x)	400 mM NiSO ₄
DNA-Probenpuffer (6x)	0,08% Bromphenolblau 0,08% Xylencyanol 30% Glycerin (87%ig) in TE-Puffer pH 8,0
Elute-buffer (4x)	4 M Imidazol 2 M NaCl 80 mM Tris/HCl pH 7,9
Extender-Puffer (10x)	200 mM Tris/HCl pH 8,8 100 mM KCl 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 20 mM MgSO ₄ 1% Triton X-100 1 mg/ml BSA
„Kirk“-Lysepuffer für RT-PCR	50 mM Tris/HCl pH 8,0 300 mM NaCl 5 mM EGTA 2% SDS

Lysepuffer für die genomische PCR	100 mM NaOH 2 M NaCl 0,5% SDS
NBT-Lösung	75 mg/ml in 70% (v/v) DMF
One-Phor-All-Puffer (10x)	100 mM Tris-Acetat pH 7,5 100 mM Mg-Acetat 500 mM K-Acetat
P1	50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A (DNasefrei)
P2	200 mM NaOH 1% SDS
P3	3 M K-Acetat pH 5,5
PBS (phosphat buffered saline)	139 mM NaCl 3 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	PBS mit 0,1% Tween 20
PCR-Puffer (5x)	250 mM Tris/HCl pH 8,8 250 mM NaCl 12,5 mM MgCl ₂ 10 mM DTT
Ponceau-S-Lösung	2% Ponceaurot in 3 % TCA
Probenpuffer nach Laemmli (2x)	100 mM Tris/HCl pH 6,8 4% SDS 20% Glycerin

	0,05% Bromphenolblau 3% DTT
RT-Puffer (5x)	250 mM Tris/HCl pH 8,3 200 mM KCl 30 mM MgCl ₂
Strip-buffer (4x)	400 mM EDTA 2 M NaCl 80 mM Tris/HCl pH 7,9
T4-DNA-Polymerase-Puffer (10x)	670 mM Tris/HCl pH 8,8 170 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 100 mM 2-Mercaptoethanol 67 mM MgCl ₂ 67 mM EDTA 1,6 mg/ml BSA
TBE (Tris-Borat-EDTA)	90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA
TBFI	30 mM K-Acetat 100 mM KCl 50 mM MnCl ₂ 15% (v/v) Glycerin (87%ig) mit Essigsäure ad pH 5,8 steril filtrieren
TBFII	10 mM MOPS/NaOH pH 7,0 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % (v/v) Glycerin (87%ig) steril filtrieren

TE (Tris-EDTA)	10 mM Tris/HCl pH 8,0 2 mM EDTA
TNK	10 mM Tris/HCl pH 7,5 100 mM NaCl 100 mM KCl
TPE (Tris-Phosphat-EDTA)	90 mM Tris/Phosphorsäure pH 8,0 2 mM EDTA
Wash-buffer (8x)	480 mM Imidazol 4 M NaCl 160 mM Tris/HCl pH 7,9
4.6.2. Medien	
AXI (Ampicillin-X-Gal-IPTG)	0,8% Bacto-Trypton 0,5% Hefe-Extrakt 0,5% NaCl mit NaOH ad pH 7,0, autoklavieren, dann steril ad 50 µg/ml Ampicillin 40 µg/ml X-Gal 9 µg/ml IPTG
LB (Luria-Bertani)	1% Bacto-Trypton 0,5% Hefe-Extrakt 1% NaCl mit NaOH ad pH 7,5
LBA	LB steril ad 50 µg/ml Ampicillin
Plattenmedium	jeweiliges Medium mit 1,5% Agar
SOC	2% Bacto-Trypton 0,5% Hefe-Extrakt

	0,05% NaCl
	0,02% KCl
	mit NaOH ad pH 7,0, autoklavieren, dann steril ad
	10 mM MgCl ₂
	20 mM Glukose
SVM (steriles <i>Volvox</i> -Medium)	0,5 mM Ca(NO ₃) ₂
	0,16 mM MgSO ₄
	0,16 mM Na-Glycerophosphat
	0,67 mM KCl
	3,8 mM Glycylglycin
	2,1 µM FeCl ₃
	1,2 µM MnCl ₂
	0,2 µM ZnCl ₂
	0,1 µM Na ₂ MoO ₄
	0,05 µM CoCl ₂
	12 µM EDTA
	1 nM Biotin
	0,1 nM Vitamin B ₁₂
	mit NaOH ad pH 8,0
2x YT	1% Bacto-Trypton
	1% Hefe-Extrakt
	0,5% NaCl
	mit NaOH ad pH 7,0
2x YT + Ampicillin	2x YT steril ad 50 µg/ml Ampicillin
4.6.3. Organismen	
4.6.3.1. <i>Volvox carteri</i>-Stämme	
HK 10	weiblich, Wildtyp, (Starr, 1968)
69-1b	männlich, Wildtyp (Adams et al., 1990)
153-48	weiblich, Defekt im <i>nitA</i> -Gen (Adams et al., 1990)

4.6.3.2. *E. coli*-Stämme

DH5 α	<i>F</i> , Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>supE44</i> , <i>relA1</i>
BL21(DE3)	<i>F</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_b</i> (r_b^- , m_b^-), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ (DE3)

4.7. Chemikalien, Enzyme und Materialien

Adefo , Nürnberg	Filmfixierer
Amersham , Braunschweig	anti-mouse-IgG-Peroxidase-Konjugat, anti-rabbit-IgG-Peroxidase-Konjugat, ECL-Reagenzien, Radiochemikalien ([³³ P]-Phosphat, [³⁵ S]- α -dATP, [³⁵ S]-Sulfat), Röntgenfilme
Baker , Deventer, UK	Ammoniumacetat, Ethanol
Beckmann , Krefeld	Oligonukleotid-Fast-Deprotection-Kit
Biomol , Hamburg	GM 6001
Bio-Rad , München	Goldpartikel, Macrocarrier, Prep-a-Gene-Kit, Rupture-Disks, Stopping-Screens
Biozym , Hameln	NuSieve-GTG-Agarose, AccuGel, Protogel
Calbiochem , La Jolla, USA	Casein-Yellow
Clontech , Heidelberg	Advanced Polymerase Mix
Costar , Cambridge, UK	Mikrotiterplatten
Difco , Detroit, USA	Agar, Bacto-Trypton, Hefe-Extrakt
DuPont , Dreieich	Verstärkerfolien
Dynal , Oslo, Norwegen	anti-rabbit-IgG-Dynabeads M450
Fluka , Buchs	Imidazol, Kupfer(II)-chlorid, Mega-9, Nickelsulfat
Gibco BRL , Eggenstein	Harnstoff ultrapure, Superscript II Reverse Transkriptase
Kodak , New Haven, USA	Filmentwickler, Röntgenfilme
Macherey-Nagel , Düren	Nucleotrap-Kit
MBI Fermentas , Vilnius, Estland	λ -Eco 911-DNA-Standard, λ -Hind III-DNA-Standard, Restriktionsenzyme
Merck , Darmstadt	Bromphenolblau, EDTA, Formaldehyd, Gelatine, Glycin, Natriumazid, PMSF, TCA, Xylencyanol
Millipore Waters , Bedford, USA	PVDF-Membranen (0,45 μ m)
MWG Biotech , Ebersberg	Oligonukleotide

New England Biolabs, Beverly, USA	DNA-Molekulargewichtsstandard, Restriktionsenzyme
Pall, Dreieich	Ultrafiltrationsröhrchen
Pharmacia, Freiburg	One-Phor-All-Puffer (10x), Paraffinöl, Percoll, Protein-A-Sephrose, QAE-Sephadex A25, RNAGuard, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, T4-DNA-Polynukleotidkinase, T7-DNA-Polymerase
Qiagen, Hilden	anti-(His) ₅ -Antikörper, Ni-NTA-Agarose, Plasmid isolation-Kits
Roche, Basel, Schweiz	Ampicillin, Alkalische Phosphatase (CIP), ATP, ddNTPs, dNTPs, Expand High Fidelity PCR-System, Expand Long Template PCR-System, High Pure PCR Product Purification Kit, PWO-DNA-Polymerase, T4-Polynukleotidkinase-Puffer (10x), Taq-DNA-Polymerase
Roth, Karlsruhe	Agarose, BCIP, DTT, Essigsäure, IPTG, NBT, X-Gal
Schleicher & Schüll, Dassel	Nitrocellulose-Membranen (BA85, 0,45 µm)
Serva, Heidelberg	Ammoniumpersulfat, Casein, Coomassie Brilliant Blue G250 und R250, Dialyseschläuche, Guanidiniumhydrochlorid, 2-Mercaptoethanol, SDS, TEMED, Tween 20, Triton X-100
Sigma, Deisenhofen	anti-mouse-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat, anti-rabbit Alkalische-Phosphatase-Konjugat, Azokoll, BCA-Lösung, Biotin, BSA, EGTA, Ellmann's Reagenz, Ethidiumbromid, Fluorwasserstoff, Glycylglycin, Kollagenase, Lysozym, MOPS, Natriumglycerophosphat, PEG 600, 1, 10-Phenanthrolin, Ponceau S, Proteinmolekulargewichtsstandards, Restriktionsenzyme, Spermidin, Vitamin B ₁₂
USB, Cleveland, USA	Tris
Whatmann, Maidstone, USA	3MM-Chromatographiepapier

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von der Fa. **Merck**, Darmstadt oder der Fa. **Sigma**, Deisenhofen bezogen.

4.8. Geräte

Analysenwaage: **Mettler**

Automatische Pipetten: **Abimed**

Beleuchtung für *Volvox*-Stammkulturhaltung: **General Electric** und Eigenbau

Biologic Particle Delivery System PDS-1000, **Bio-Rad**

Blotting-Apparatur: **Pharmacia LKB**

Brutschränke: **Heraeus**

DNA-Synthesizer : Oligo 1000, **Beckmann**

Elektrophoreseapparat für Agarosegele: **Pharmacia** und Eigenbau

Elektrophoreseapparat für PAGE: **Biometra** und Eigenbau

Feinwaagen: **Sartorius**

Flachbettstreiber: **Kipp & Zonen**

Gefriertrockenanlage: **Christ**

Geldokumentationscenter: **Vilber Lourmat**

HPLC-Apparatur: **Dionex**

HPLC-Probenschleife: "superloop", **Pharmacia**

HPLC-Säule: Uno Q 1R, **Bio-Rad**

Inkubatoren: **Eppendorf**

Kühlzentrifugen: Sorvall RC 5B, **DuPont**

Magnetrührer: **Heidolph**

Membran-Vakuumpumpe: MD8C, **Vacuubrand**

Mikrochirurgische Schere: **FST**

PCR-Thermalcycler: Typ cetus, 2400 und 9600, **Perkin Elmer**

Peristaltikpumpe: **Pharmacia LKB**

Phasenkontrastmikroskop: Dialux, **Leitz**

Phospho-Imaging-System: Cyclone, **Packard**

Photometer: **Pharmacia**

Schüttelinkubator: **Eppendorf, Infors**

Schütteltisch: **Infors**

Schüttelwasserbad: **New Brunswick Scientific**

Sequenziergelelektrophorese : 2010 Makrophor, **Pharmacia LKB**

Spannungsquellen: **Biometra** und **Pharmacia**

Stereomikroskope: **Leica, Wild**

Sterilbank: Class 100, **Gelaire**

Taumeltisch: MR 2000, **Heidolph**

Tischautoklaven: **Zirbus**

Tischzentrifuge: **Eppendorf, Heraeus, Hettich**

Ultraschallgerät: Sonifier B15, **Branson**

Ultraschallwasserbad: Sonorex RK100, **Bachhofer**

Ultrazentrifuge: TGA 50, **Kontron**

UV-Detektor: Typ 420, **Kontron**

UV-Leuchttisch: **Desaga**

Vakuum-Geltrockner: **Bio-Rad**

Vakuumzentrifuge ("speed-vac"): **Uniequip**

„Vortex“-Gerät: **Heidolph**

Wasserbäder: **Büchi, Lauda**

Wasserentionierungsanlage: MilliQ Plus, **Millipore Waters**

5. Zusammenfassung

Die vielzellige Grünalge *Volvox carteri* kann durch Sekretion eines Pheromons vom asexuellen Lebenszyklus in eine sexuelle Lebensphase wechseln. Bei diesem als sexuelle Induktion bezeichneten Prozess kommt es sowohl zu biochemischen Modifikationen verschiedener Proteine in der extrazellulären Matrix der Alge, als auch zur Veränderung des Expressionsmusters der somatischen Zellen. Eine Gruppe solcher sexuell induzierbarer Gene bilden die sogenannten *VMPs*, eine Familie von Metalloproteasen. Die *VMPs* zeigen Homologie zu bekannten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), codieren aber für ein atypisches Metallbindemotiv (QExxHxxGxxH statt üblicherweise HExxHxxGxxH). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Expression und die Genprodukte von *VMP3* und *VMP4* untersucht.

Die Menge an *VMP3*-mRNA, die im geringen Maße auch in vegetativ wachsenden Algen nachgewiesen werden konnte, wird 1 h nach Zugabe des Sexualpheromons erheblich gesteigert und bleibt für mindestens 18 h auf diesem erhöhtem Niveau erhalten. Eine Verletzung vegetativ wachsender Algen führt ebenfalls zu einer Transkriptionssteigerung von *VMP3*. Die Transkription findet dabei in beiden Fällen ausschließlich in den somatischen Zellen statt. Durch Produktion von polyklonalen Antikörpern gegen ein heterologes Expressionsprodukt (hVMP3-N-Terminus) des N-terminalen, proteasehomologen Bereichs von *VMP3* war es möglich das *VMP3*-Protein in der "deep zone" der extrazellulären Matrix von *Volvox carteri* zu lokalisieren. Dabei handelt es sich um ein stark glykosyliertes Protein mit einer apparenten Masse von 475 kDa. *VMP3* konnte bis zur Homogenität gereinigt werden, und zeigt in einem In-Gel-Assay (Zymographie) mit Gelatine als Substrat Proteaseaktivität. Durch Deletionen in einem Bereich des *VMP3*-Gens, der für eine hydroxyprolinreiche Domäne mit struktureller Funktion codiert, und Expression der resultierenden Gene in *Volvox carteri*, konnte das Molekulargewicht von *VMP3* auf 190 kDa (*VMP3* α), 130 kDa (*VMP3* β) und 120 kDa (*VMP3* γ) gesenkt werden. Alle drei rekombinanten Proteine sind wie das Wildtyp-Protein in der "deep zone" der Alge zu finden und besitzen dieselbe enzymatische Aktivität. Unter Verwendung eines modifizierten In-Gel-Assays und des rekombinanten Proteins *VMP3* γ war es möglich die enzymatischen Eigenschaften von *VMP3* quantitativ zu analysieren. Bei *VMP3* handelt es sich um eine Metalloprotease mit einem pH-Optimum zwischen 7 und 8, deren Aktivität vom MMP-Inhibitor GM 6001 vollständig gehemmt wird. *VMP3* γ zeigt im In-Gel-Assay mit Cu^{2+} als Kofaktor eine 15mal höhere Aktivität als mit Zn^{2+} , welches bei Metalloproteasen typischerweise als Metallion genutzt wird. Durch ortsgerichtete Mutagenese im Metallbindemotiv von *VMP3* γ (QExxHxxGxxH) und Expression der veränderten Gene in *Volvox carteri*, konnte zum einen gezeigt werden, dass sowohl der Glutamin- (*VMP3* γ -L) als auch der Glutamatrest (*VMP3* γ -A) für die enzymatische Aktivität essentiell sind. Zum anderen konnte

nachgewiesen werden, dass der Glutaminrest zu einem großen Teil für die bevorzugte Verwendung von Cu^{2+} -Ionen bei der Katalyse verantwortlich ist (VMP3 γ -H): Bei der Mutation des konservierten Glutaminrestes zu Histidin erfolgte zwar eine Erhöhung der Aktivität mit Zn^{2+} auf 500%, die Verwendung von Cu^{2+} als Kofaktor resultierte aber nur noch in einer Aktivitätssteigerung um den Faktor 2,5.

Im Gegensatz zu *VMP3* konnte die Transkription von *VMP4* nur nach sexueller Induktion oder Verletzung der Algen detektiert werden, nicht aber in vegetativ wachsenden Organismen. Die mRNA von *VMP4* ist in den somatischen Zellen in einem Zeitraum von 1 h bis mindestens 24 h nach Pheromonzugabe auf einem konstant hohem Niveau nachzuweisen. Sowohl der N-terminale, als auch der C-terminale Bereich von *VMP4* wurden heterolog in *E. coli* exprimiert und die Expressionsprodukte (hVMP4-N-Terminus bzw. hVMP4-C-Terminus) zur Herstellung polyklonaler Antikörper verwendet. Mit Hilfe dieser Antikörper konnte VMP4 als extrazelluläres Protein in der "deep zone" der Algen identifiziert werden. VMP4 ist glykosyliert und besitzt eine apparente molekulare Masse von 215 kDa. Im "deep zone"-Extrakt der Algen detektieren die Antikörper auch niedermolekulare Proteine, bei denen es sich vermutlich um spezifisch proteolytisch prozessiertes VMP4 handelt; die N-terminale, proteasehomologe Domäne (55 kDa) wird dabei als Einheit abgespalten. Im Laufe der Reinigung von VMP4 erfolgte diese Spaltung auch bei einer Chromatographie mit dem Anionenaustauschermaterial QAE-Sephadex A25, so dass nur das Rumpfpotein (beginnend mit der Polyhydroxyproline-domäne) bis zur Homogenität gereinigt werden konnte. VMP4 zeigt im verwendeten In-Gel-Assay im Gegensatz zu VMP3 keine Proteaseaktivität.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Hallmann, A., Amon, P., Godl, K., Heitzer, M., Sumper, M. (2001) Transcriptional activation by the sexual pheromone and wounding: a new gene family from *Volvox* encoding modular proteins with (hydroxy)proline-rich and metalloproteinase homology domains. *Plant J.* 26, 583-93.

6. Anhang

6.1. Verwendete Oligonukleotide

VMP 3:

ON 14333	5'- ATTCCAATATGGCCAAGTG -3'
ON 14343	5'- TGAATGAGAGAATCACGAG -3'
ON 14345	5'- GCC GAG ATC TCT CGC ATG -3'
ON 14346	5'- GAATATTTGCATGGAGTGAG -3'
ON 14359	5'- CAT GCG AGA GAT CTC GGC -3'
ON 14360	5'- ATC ATG CAG GAG GCC ATC -3'
ON 14367	5'- AC AGC GAC CGC AAG ATC TT-3'
ON 14369	5'- G GAA TGC CGT AGT GTT AAG -3'
ON 14371	5'- CA GAG GTA GAC ACG CAA AG -3'
ON 14372	5'- CACTTAATCTGGTCTGAAGC -3'
ON 14403	5'- AAG GCC TCT CCA GGC CCA TCA AGC A -3'
ON 14405	5'- T AAG CTT TTA GTG (ATG) ₅ (AGA) ₂ GAG CGT CTC AAG CAC GGA A -3'
ON 14480	5'- A CAT ATG GCT CCA GGC CCA TCA AGC -3'
ON 14481	5'- T GGA TCC TTA (ATG) ₅ AGA A -3'
ON 14591	5'- GA CTA GTG (ATG) ₅ ACC TCC GAG CGT CTC AAG CAC GGA -3'
ON 14592	5'- C GGA GGT (CAT) ₅ CAC TAG TCT GCT GGA CCG CTT G -3'
ON 14617	5'- TA CGA CGT CGG CGC CGA TGG GAG CGT -3'
ON 14618	5'- AT CCG ACG TCG CCG GTA GCG GTG AGT TGC -3'
ON 14659	5'- C AAT GAT GGC GAC ACG GCT -3'
ON 14660	5'- TTTAAGCTTGGATCCAGGACAGTACACGCAGGA -3'
ON 14661	5'- G GAT GGC CTC GTG CAT GAT CGT AGC CCA AC -3'
ON 14662	5'- G GAT GGC CTC CAG CAT GAT CGT AGC CCA AC -3'
ON 14663	5'- GTG GAT GGC CGC CTG CAT GAT CGT AGC CCA -3'
ON 14664	5'- CG ATC ATG CAC GAG GCC ATC CAC AAC TAT G -3'
ON 14665	5'- ACG ATC ATG CTG GAG GCC ATC CAC AAC TAT G -3'
ON 14666	5'- ATC ATG CAG GCG GCC ATC CAC AAC TAT GGT -3'

VMP 4:

A8	5'- CTC GTT GAG TCC CCA ATG -3'
Go21	5'- GAC ACA CAA AGG TCG AAC -3'

Go22	5'- TT GCG ATG CTT TGC CAA G -3'
ON 14278	5'- A CAT ATG CGA TTG CAA CTG AAC GGC CAG -3'
ON 14279	5'- A GGA TCC TTA GTG (ATG) ₅ CAC GGC AAT GCC TTC CAG -3'
ON 14364	5'- T GCT AGC TTA GTG (ATG) ₅ ATA CAC TTG GAA ACA AGA CCT -3'
ON 14365	5'- A GCT AGC ACT GCC GGC GAC CTG C -3'
ON 14554	5'- CGA CCC CCC CGT CCA CAG C -3'

6.2. Aminosäure- und cDNA-Sequenz von *VMP3*

1	ATG	TGG	CAG	AAG	GCG	CTT	CCG	ACG	CTT	TTG	CTG	CTC	GTC	GCG	GCC	GCG	48
1	M	W	Q	K	A	L	P	T	L	L	L	L	V	A	A	A	16
← ON 14480 →																	
49	CAG	GTT	GCG	CGA	GGG	GCT	CCA	GGC	CCA	TCA	AGC	AAT	GCT	CCA	GGC	CAA	96
17	Q	V	A	R	G	A	P	G	P	S	S	N	A	P	G	Q	32
← ON 14403 →																	
97	TCA	AGC	AAT	GCT	CCA	GGT	CAA	ATC	AAG	AAG	CAA	ACT	TTG	CAA	GGT	CAG	144
33	S	S	N	A	P	G	Q	I	K	K	Q	T	L	Q	G	Q	48
145	ATG	GCT	TAC	GTC	ACT	CTG	GAT	AAT	GGC	GAA	GAG	CAG	TGG	GCT	ATT	GTC	192
49	M	A	Y	V	T	L	D	N	G	E	E	Q	W	A	I	V	64
193	AAC	GAT	CAA	GAC	AAG	AAG	GTC	ACA	CCC	CTT	ACA	AAG	GGC	TAC	AAG	CCA	240
65	N	D	Q	D	K	K	V	T	P	L	T	K	G	Y	K	P	80
241	CCC	AAG	GAC	AAG	GAC	AAG	GAT	AAA	AAG	GAT	AAG	GAT	TTC	GAG	CCC	GGA	288
81	P	K	D	K	D	K	D	K	K	D	K	D	F	E	P	G	96
289	ACG	GTT	GTA	AGC	TTG	GAC	TGT	GAC	ATC	GAT	GCT	AGT	GGC	ACT	TGC	ACA	336
97	T	V	V	S	L	D	C	D	I	D	A	S	G	T	C	T	112
337	CCG	TCG	GCG	GGC	GCC	ACA	ACA	AAT	ATT	GTG	GCA	GCA	GTG	CCG	GCG	ATT	384
113	P	S	A	G	A	T	T	N	I	V	A	A	V	P	A	I	128
385	ACC	CCT	GTA	GTC	TAC	CAG	CGG	CTG	TTG	GTC	ATC	ATC	CTG	AAC	TAC	TCG	432
129	T	P	V	V	Y	Q	R	L	L	V	I	I	L	N	Y	S	144
433	AGC	TGC	GGC	TAT	TCC	GCG	ACA	GCC	ACG	GAG	GAT	GCA	GTA	CGC	AGC	GTC	480
145	S	C	G	Y	S	A	T	A	T	E	D	A	V	R	S	V	160
481	TTC	CTG	GGG	CCA	AAC	GGT	GAT	GGC	ACC	GGT	GGC	GTT	GCG	CAA	AAG	TAC	528
161	F	L	G	P	N	G	D	G	T	G	G	V	A	Q	K	Y	176
← ON 14369 →																	
529	ACG	CAA	TGC	TCG	TAC	GGC	AAG	TTC	AAC	CTT	AAC	ACT	ACG	GCA	TTC	CAG	576
177	T	Q	C	S	Y	G	K	F	N	L	N	T	T	A	F	Q	192
577	ACG	GTG	GTC	GTC	TAC	CCG	GCC	TGC	TCC	ACC	GCT	GCC	ACA	GCT	CAA	TGC	624
193	T	V	V	V	Y	P	A	C	S	T	A	A	T	A	Q	C	208
625	AGC	TGG	TGG	ACT	CTT	TCC	AAT	GAT	GGC	GAC	ACG	GCT	GCC	AAG	GCC	GTA	672
209	S	W	W	T	L	S	N	D	G	D	T	A	A	K	A	V	224
673	CTG	GGT	ACC	ACT	GCT	TTC	AGC	GGT	TTC	ACC	CAC	TAT	GCC	TAC	GTC	GTA	720
225	L	G	T	T	A	F	S	G	F	T	H	Y	A	Y	V	V	240

1681	CCA	GAT	CCT	GCA	TGG	GCT	AAC	TTG	CCA	ACA	AGC	CCT	GAC	CCG	CCA	AGC	1728
561	P	D	P	A	W	A	N	L	P	T	S	P	D	P	P	S	576
1729	CCC	AAT	CCG	CCA	AGC	CCT	GAC	CCG	CCA	AGC	CCC	GAT	CCG	CCA	AGC	GCA	1776
577	P	N	P	P	S	P	D	P	P	S	P	D	P	P	S	A	592
1777	CCG	CCG	CCA	AGC	CCT	CCA	CCT	CCA	AGC	CCA	CCG	CCG	CCA	AAC	CCT	CCA	1824
593	P	P	P	S	P	P	P	P	S	P	P	P	P	N	P	P	608
1825	CCA	CCA	AGC	CCA	CCG	CCG	CCA	AAC	CCT	CCA	CCG	CCA	AGC	CCA	CCA	CCG	1872
609	P	P	S	P	P	P	P	N	P	P	P	P	S	P	P	P	624
1873	CCA	AGC	CCT	CCA	CCG	CCA	AGC	CCA	CCG	CCT	CCT	AAC	CCA	CCA	CCG	CCA	1920
625	P	S	P	P	P	P	S	P	P	P	P	N	P	P	P	P	640
1921	AGC	CCG	CCG	CCG	CCT	AGT	CCA	CGG	CCG	CCG	ACG	CCC	CCA	CCG	CCA	AGC	1968
641	S	P	P	P	P	S	P	R	P	P	T	P	P	P	P	S	656
1969	CCA	CCG	CCA	CCC	CGG	CCT	CCG	CCT	CGT	CCC	CCA	CCA	ACG	CGT	CGG	TCG	2016
657	P	P	P	P	R	P	P	P	R	P	P	P	T	R	R	S	672
2017	CCG	CCA	CCG	ACA	TCG	TCA	CCA	CCG	CCG	CCG	GTA	GCG	GTG	AGT	TGC	TAG	2064
673	P	P	P	T	S	S	P	P	P	P	V	A	V	S	C	*	688

6.3. Genomische Sequenz von *VMP3*

	10	20	30	40	50	Intron1	60
ATGTGGCAGA	AGGCGCTTCC	GACGCTTTTG	CTGCTCGTCG	CGGCCGCGCA	GGGTGAGCCG		
70	80	90	100	110	120		
ACGTGATGTT	CCTCAAATCT	TTCCCGATGT	ACACATGACA	TATATAAATA	TCAAGACCTT		
130	140	150	160	170	180		
TTTTTTACCT	GCGTACGTCA	TAAGCCCACA	TCTTGAGGCG	TCGCGCCTTT	GGTATTATC		
190	200	210	220	230	240		
GTAAAGCCAG	GTGCTTAATT	CCAGTTAATG	CCGGAATGAG	ACCGTTTTCC	CCCAAGTTTG		
250	260	270	280	290	300		
CGATACATAG	AGCTTAATTC	TTGATTATCA	ATGCCTATAA	CTGACGTTTT	ATATTTGTAG		
310	320	330	340	350	360		
CCATCAGCCG	TTACTAGCTA	TGAACCTGGC	GGCTTCCCCC	TCTGCTCCGT	TTCACATGGA		
370	Intron1	380	390	400	410	420	
TGGACTCTGC	AGTTGCGCGA	GGGGCTCCAG	GCCCATCAAG	CAATGCTCCA	GGCCAATCAA		
430	440	450	460	470	480		
GCAATGCTCC	AGGTCAAATC	AAGAAGCAAA	CTTTGCAAGG	TCAGATGGCT	TACGTCACTC		
490	500	510	520	530	540		
TGGATAATGG	CGAAGAGCAG	TGGGCTATTG	TCAACGATCA	AGACAAGAAG	GTCACACCCC		
550	560	570	580	590	600		
TTACAAAGGG	CTACAAGCCA	CCCAAGGACA	AGGACAAGGA	TAAAAAGGAT	AAGGATTTTCG		
610	620	Intron2	630	640	650	660	
AGCCCCGAAC	GGTTGTAAGC	TTGGTAAGTG	GCACATTTAT	GGCTTATATA	GCTCGTCCAT		
<u>Eco RI</u>	670	680	690	700	710	720	
GGAATTCAAT	TCCAGCGGCA	GACACCATAT	TGCAACATGA	ACCGCCATGC	ACGTGCAGAA		
730	740	750	760	770	780		
TCACCTGGAA	AAACAACACT	CGCTAGTGTC	CCCCTTTGCC	ACTCGTGCCA	GGAGCACCTA		
790	800	810	820	830	840	Intron2	840
TGCGTTAACA	CAGGTGCTAA	GCTTTGGCAT	GTGAACCATG	ATGCATCCAC	AGGACTGTGA		

850	860	870	880	890	900
CATCGATGCT	AGCGGCACTT	GCACACCGTC	GGCGGGCGCC	ACAACAAATA	TTGTGGCAGC
910	920	930	940	950	960
AGTGCCGGCG	ATTACCCCTG	TAGTCTACCA	GCGGCTGTTG	GTCATCATCC	TGAACTACTC
970	980	990	1000	1010	1020
GAGCTGCGGC	TATTCGCGA	CAGCCACGGA	GGATGCAGTA	CGCAGCGTCT	TCCTGGGGCC
1030	1040	1050	1060	1070	1080
AAACGGTGAT	GGCACCAGTG	GCGTTGCGCA	AAAGTACACG	CAATGCTCGT	ACGGCAAGTT
1090	ON 14369	1110	1120	1130	1140
CAACCTTAAC	ACTACGGCAT	TCCAGACGGT	GGTCGTCTAC	CCGGCCTGCT	CCACCGCTGC
1150	1160	1170	1180	ON 14659	1190
CACAGCTCAA	TGCAGCTGGT	GGACTCTTTC	CAATGATGGC	GACACGGCTG	CCAAGGCCGT
<u>Kpn I</u>	1220	1230	1240	1250	1260
ACTGGGTACC	ACTGCTTTCA	GCGGTTTCAC	CCACTATGCC	TACGTCGTAC	CGCCCGGAAT
1270	1280	1290	1300	1310	1320
CCCATGCGGC	TGGGCGGGGT	TGGCTCTGCT	GCCAGGAAAA	CAGATCTGGC	TGGCAACCAT
1330	1340	ON 14661-3	1360	ON 14664-6	Intron3
GAATTACGGT	GTATACCGTT	GGGCTACGAT	CATGCAGGAG	GCCATCCACA	ACTATGTTGA
1390	1400	ON 14360	1420	1430	1440
GGTTTGACCT	TGTGTTCTAG	GACAATACAG	CCGTTATGCT	GCTTAACATG	GCGCCCATGT
1450	1460	1470	1480	1490	1500
ATGGTGGCTT	GCTAGGCTAT	CCTTAATCTG	AATTTCCAAG	GGTCTGCCTG	CCCATCCCAA
1510	1520	1530	1540	1550	1560
GTTTGCTTCC	CTTGCAAGTG	CCATAGTATG	CTGAGGTCCC	TTGGTCCTTG	AGGTGTACAA
1570	1580	1590	<u>Pst I</u>	1610	1620
GGGCCCAGTA	GATCCCAAAG	GCACGGCAAC	TTTGAAGTGC	AGTGCTTGCT	AAAGGATGCG
1630	ON 14660	1650	1660	Intron3	1680
CAATTAAATT	CCTGCGTGTA	CTGTCCCTCCT	GCGTCCATGC	CCACAGGTCT	GTGGCACTCC
1690	1700	1710	1720	1730	1740
TGGCAGAACG	GCTGGGAGTA	CGAGGACTAC	TCGACCGCCA	TGGGCCGTGG	TGACGCCTGC
1750	ON 14345	1770	1780	1790	1800
CCCAACGCCG	CCGAGATCTC	TCGCATGGGC	TGGGCCACAC	CCGCACCAGG	CGGCGGGGCC
1810	ON 14359	1830	1840	1850	1860
ATCAGCTCTG	CTTCGTTTGC	TCCAGGTTCC	GCACTTGCCCT	TTGCCCTGCC	CGCCACCTAC
1870	1880	1890	1900	1910	1920
CTCACTGGCG	ACGGCAACTA	CCTGCGAGTG	GTGCCCGACT	GGCTGCCCAC	CTACAGCAAC
1930	1940	1950	1960	1970	1980
AACACGCTTG	CTAAGAACCT	CTACATCGCC	GTGAGGGTTC	CCAAGAGTGG	CGATGCCGCC
1990	2000	2010	2020	2030	Intron4
CTTACCGCCA	CATACTCACC	CAAGCTCAAC	ATTCACGAAG	TCAATGCAAC	TATGGTGAGC
2050	2060	2070	2080	2090	2100
ACTGTACGCT	GTGTGGTTCC	GTGGTTATGG	ATGGGTAGGT	GAGCAAATCG	GTAGGTGGGG
2110	2120	2130	2140	2150	2160
GAAGGAATGA	GTGGCTCGAC	AGGCAAGTGA	AATGTGTTGT	ACCCACTTCC	ACTGTTTATA
2170	2180	2190	2200	2210	2220
TGGTAGTGAA	AACAACAAAA	TGTGCCATTT	TTACAATATC	TCTTGGGCCC	ACACCTGGCT
2230	2240	2250	2260	2270	2280
CGTATGGGCA	CTCGTTACAC	CTCTCTATCT	GGGTAAGGCA	ACCTGGAGGT	GTAACACACA
2290	2300	2310	2320	2330	2340
CACAGCTACA	CACACACACA	CACACATCTG	TACACACACA	CACATCTGCA	CACACACACA
2350	2360	2370	2380	2390	2400
CACACATCTG	CACACAATGT	CGTTTTTCGCA	CTGCGCGCGC	GTTCTGACTG	TCATACTGCC
2410	Intron4	2430	2440	ON 14367	2460
CATCTTCCTT	GCAGGACAAT	GCTTACCAG	CCTCATACCA	AAACAGCGAC	CGCAAGATCT
2470	2480	2490	2500	2510	2520
CTTTCGTCCG	GGCAATCTCC	TCCAATGTAA	GGGCCAATTT	GACAGCCTAC	CAGCTGGTGG
2530	2540	2550	ON 14371	2570	2580
TTTACGCGGC	ATCCTGGGTG	GGCCCAGACA	CTTTGCGTGT	CTACCTCTGC	CGATACGATG

2590	2600	2610	2620	ON 14617	2640
TCTCGCCGGA	TGAGTGCCCC	CCACTTCCG	TGCTTGAGAC	GCTCCCATCG	GCGCCGCCGA
2650	2660	2670	ON 14591	2690	2700
GCCCGCCTCC	CCCCAGCCCG	CCGCCGCCAC	GACCACCGCC	CCCGAGCCCC	GTGCCGCCCA
2710	Eag I	2730	2740	2750	2760
CCCCGCCGCC	GAGCCCACGG	CCGCCCTCAA	GTCCGCGACC	GCCCAACCCA	CCCCCAGGC
2770	2780	2790	2800	2810	2820
CGCCGTCCGC	CAGGCCGCCG	CCCAGGCCGC	CACCAAGGCC	GTCGTCACCC	AGGCCGCCAC
2830	2840	2850	2860	Aat II	2880
CCCCTGACCC	GTCACCCCCG	CCGCCGAGCC	CACCATCACC	TCCGACGTCG	CCGAGCCCTC
2890	2900	2910	2920	2930	2940
CAGATCCTGC	ATGGGCTAAC	TTGCCAACAA	GCCCTGACCC	GCCAAGCCCC	AATCCGCCAA
2950	2960	2970	2980	2990	3000
GCCCTGACCC	GCCAAGCCCC	GATCCGCCAA	GCGCACCGCC	GCCAAGCCCT	CCACCTCCAA
3010	3020	3030	3040	3050	3060
GCCCACCGCC	GCCAAACCCT	CCACCACCAA	GCCCACCGCC	GCCAAACCCT	CCACCGCCAA
3070	3080	3090	3100	3110	3120
GCCCACCACC	GCCAAGCCCT	CCACCGCCAA	GCCCACCGCC	TCCTAACCCA	CCACCGCCAA
3130	3140	Eag I	3150	3160	3170
GCCCGCCGCC	GCCTAGTCCA	CGGCCGCCGA	CGCCCCCACC	GCCAAGCCCA	CCGCCACCCC
3190	3200	3210	3220	3230	3240
GGCCTCCGCC	TCGTCCCCCA	CCAACGCGTC	GGTCGCCGCC	ACCGACATCG	TCACCACCGC
ON 14618	3260	ON 14592	3280	3290	3300
CGCCGGTAGC	GGTGAGTTGC	TAGTCTGCTG	GACCGCTTGT	GAAGCAATAA	AAACCATAGT
3310	ON 14346	3330	3340	3350	3360
AAAACCTCACT	CCATGCAAAT	ATTCTCTTAC	GAATGCCGCT	GTCAACTCCT	GGGAGGGCAG
3370	3380	3390	3400	3410	3420
GGGGAATGTT	TGCCGCATGT	AAGGGGGGTT	GTCTGCGGAC	ACTTTATTTA	GTTCTTGACA
3430	3440	3450	3460	3470	3480
AGCGACACCT	GCGCATCGTG	CGTGTGTGGA	AGTGCCTGTG	GAAGTGCAGC	GCATTACGTT
3490	3500	3510	3520	3530	3540
GTTTCCCAAC	CTTACCATCA	ATCCCGTCCA	CGCACACTTT	CCTGAGAAAG	TGCGACGGTC
Pst I	3550	3560	3570	3580	3590
TGCAGCATGA	AAGTCCTTTG	CCTTACTGGC	TGCCAGCCCG	CTTCCTTACC	TGTCCTCTTG
3610	3620	3630	ON 14343	3650	3660
CACATGCTTG	CGTATGGCTT	AACCTACCTT	CGTGATTCTC	TCATTTCATC	CCCTCACGTT
3670	3680	3690	3700	3710	3720
CGCGCTCGCG	CCTTTGTCCCT	CTAGGCGTTT	ATCGGTGGCG	ACAGCTCAAC	GGTAGCCGCG
3730	3740	3750	3760	3770	3780
TCAGACCAGC	CCCCGCTTCA	GCGCCGCCGA	CTGCACCAGT	AAAGTGACA	CTGCCGCAGC
3790	3800	3810	3820	3830	3840
AGCAGGGCGA	CTTGCGAAAG	GCAAGGAAGA	AATCAACGTA	CGTCGATTCC	TTGGAAGAAC
3850	3860	3870	3880	3890	3900
CGACGCTGGG	GAAGTTGGGG	TTTGCCAGCT	TGCTCGTGCT	GTGCCACCAC	TATGCTGGTT
3910	3920	3930	3940	3950	3960
CAATAGCGAA	CGCGATCAGT	CCTGTAATGC	AGCCTGAGAA	GCCGGCAGCC	ATTGCGCCGT
3970	3980	3990	4000	4010	4020
GGGGNCAATC	CAAGGAGATA	TTGGCAATGA	AGAGAAGTAA	GAGAGAGCGA	GAACGGGCAC
4030	4040	4050	4060	4070	4080
CAACGCAACA	CATGTGGTGG	CGATGCTGTA	TGCACGTATT	GTTTGCTGCT	TTCATTTTGT
4090	4100	4110	4120	4130	4140
GCATACTTCG	TACAGCGCAA	GCAGGTCGAC	CGGAGTACAG	TAATCCTACA	ACAGTAATCC
4150	4160	4170	4180	4190	4200
GGATACAGCG	AACAGCTGAT	ACGGCCGCAA	TCGAGTAATG	AATCGGGCTC	GCGTGACAGG
4210	4220	4230	4240	4250	4260
TGACGGTTCG	GTTATTACGC	ATCGAAACCT	GTCATACGGG	GGTTGGGTAG	GCAGCACAAC
4270	4280	4290	4300	4310	4320
CGACCCGCGCT	AGGAACGGGA	CCGTGCGCGC	TCCCTAGGAA	CCCCGAAGGC	ACACGTGGGG

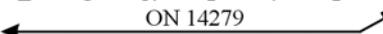
Anhang

4330	4340	4350	4360	4370	4380
AGAGCGGGGT	GAGGGTAGAA	GGCTGTCTGG	CCCCGCGTCC	ACCAAGAGGG	ACTACTCCGA
4390	4400	4410	4420	4430	4440
ACTCAGGACG	CGCATACATG	TGCGTTCAAC	ACTCCCATGC	AGTTTGCCGC	GACCTTTGTT
4450	4460	4470	4480	4490	4500
TCTGCTGAAG	TAACAGTTCA	CTACTCGGAT	GAGAGTATGA	GGGAGCCGCA	CCTCCATGCG
4510	4520	4530	4540	4550	4560
TATGTATCGT	ATGTATGTAA	ATTTATGCTG	CATCAATTTT	CAGAACTCCA	GGTACCGTGT
4570	4580	4590	4600	4610	4620
GGGTAGTAGG	CTGTGATCAT	GTTGCGAGAA	TGTACGGCGT	TACGGCAGTG	GATCTAACTG
4630	4640	4650	4660	4670	4680
GGTTACCCGT	GCTGCGTTTT	GGGGGTATTC	CACCACTCAT	TCGCATGGCG	ATGACAAAGG
4690	4700	4710	4720	4730	4740
CCAGCGTAAG	CCAACACGGT	AGTCCTGCGT	TTATCAGTTA	CACACACTCG	TGTTTCAGCTG
4750	4760	4770	4780	4790	4800
CTTGCTAGCA	GTCGGGTTGC	AATGTGGGTT	GAATCGTGCC	GTACACCCGA	AGACGGTGCC
4810	4820	4830	4840	4850	4860
AGCATCGTAT	GTATTGGCCA	GGGAAGCTCT	GCGCACGAAT	TTTCAGTAAG	CATTCTGTGG
4870	4880	4890	4900	4910	4920
ACCAAGCTTG	CCAGCGTGTG	GTGCACGCCG	TAGAGCTTCC	CGCATTACTT	CATTCTTCCA
4930	4940	4950	4960	4970	4980
TGTCGTACGT	TGTTGCATAG	AAGTCGCAGT	GGGCACGAGG	AAGCCGGGTG	GCAAAAAGGT
4990	5000	5010	5020	5030	5040
ACATGATGGC	TTCCCGGAAT	GTTTCGTGCG	AACAGGTGAA	TTGTCTTTAT	CTCTACTTAG
5050	5060	5070	5080	5090	5100
CTTAAGGCAA	TCATCGGTGC	CCTGGGTTTT	CATAATCATA	ACTCGGGATG	GAGCTCTCCT
5110	5120	5130	5140	5150	5160
AGCTAGGCTT	CGTTCGAGC	AGTATAATAG	CTGGTAGGCT	CACGGGACGG	TGATTACACA
5170	5180	5190	5200	5210	5220
TGTAATGCGC	CGCTCCCTTT	AACTGCTTGA	TAGCTTATTT	GCTTGCTCTC	CAATGTGTTG
5230	5240	5250	5260	5270	5280
TGGCCGTGGA	GTACAGCAAG	GGCGGTGATT	AAGGCCAGGC	AGTACTTTTA	GGGGACTGTA
5290	5300	5310	5320	5330	5340
ACAGTAAGTA	TTGTTTACCG	GCCCGCATGT	AACCCCAGGC	GGTGTATGTA	CGTGGCCATG
5350	5360	5370	ON 14333	5390	5400
CACACATCAG	TTGTTGTCTA	GTGGGATATT	CCAATATGGC	CAAGTGCACC	GAAGCGTGGG
5410	5420	5430	5440	PolyA 5450	5460
GCAAAATAAT	TCATCGATCT	ATTGTATTAC	GTGGTTCGGG	CTGTAAACAAC	GCCTGCTCTA
<u>Eco RI</u>	5480	5490	5500	5510	5520
TCTTCCGAAT	TCCTCTGGAG	TCCCCGAGCC	TGCAAGGAGA	GGTAAATGCC	ATATATGCAC
5530	5540	5550	5560	5570	5580
CTTCCGCAAC	CTCATTCAT	TCATATTTTG	GTTTTCAACA	AAGGAAGCAA	GCATCTCCAT
5590	5600	5610	5620	5630	5640
CCCAGCTCAA	GCAGTCTCTC	AGATGCAGGC	CTGTCTCCCA	GGGCTGCGCC	TAAGCAGGGG
5650	5660	5670	5680	5690	5700
TACATGGGTA	GCAGCAGTAC	AAGTTTGAGT	AACGAAATGA	CAGTCCCTTG	AATTACAAGG
5710	5720	5730	5740	5750	5760
AGGTACAGCA	GCAGGACGAG	TTAAGAGGCC	TTATACTACC	TGTTGTACAT	GCACTCATGC
5770	5780	5790	5800		
CTTGCATTAA	GCCAGGGAAC	CATCGGCAAG	GGCAGGTTA		

6.4. Aminosäure- und cDNA-Sequenz von *VMP4*

1	ATG	AGG	ACG	GAG	CTA	GTA	TTC	TCT	TTA	GTG	GTC	GCG	CTG	GTC	ACA	GCC	48
1	M	R	T	E	L	V	F	S	L	V	V	A	L	V	T	A	16
49	ACA	CAA	GTG	GCG	GAG	ATT	TGT	AGT	GCA	GCC	ACA	ATT	GCC	ATG	CGC	CCA	96
17	T	Q	V	A	E	I	C	S	A	A	T	I	A	M	R	P	32
97	CGG	CCG	CCA	CTC	CCA	CGA	GGC	ATC	CCG	CCA	CCA	CCA	GCT	GGG	ATC	ATC	144
33	R	P	P	L	P	R	G	I	P	P	P	P	A	G	I	I	48
145	GCC	AGC	AAC	CGA	TTG	CAA	CTG	AAC	GGC	CAG	CTC	GTT	TTC	GCC	ACG	GTC	192
49	A	S	N	R	L	Q	L	N	G	Q	L	V	F	A	T	V	64
193	GAC	CAG	CCG	GGT	ACC	CAG	TGG	CTG	GTT	CGT	GAC	AGT	GAG	GGG	GTG	CTG	240
65	D	Q	P	G	T	Q	W	L	V	R	D	S	E	G	V	L	80
241	ATA	CCG	CTT	GGC	AAG	GGG	TAT	CAA	CCT	CCG	GCG	AGG	GAC	TCG	AAT	GGC	288
81	I	P	L	G	K	G	Y	Q	P	P	A	R	D	S	N	G	96
289	GAA	CCG	TTA	TTG	CCG	GGC	TCT	GTG	GTA	CAG	CTG	GAC	TGT	GTC	TAC	AAT	336
97	E	P	L	L	P	G	S	V	V	Q	L	D	C	V	Y	N	112
337	GTG	ACA	ACT	GGC	GAG	TGC	ATA	CCC	GAT	GCC	TCT	ACA	ATT	ATA	ATC	GCT	384
113	V	T	T	G	E	C	I	P	D	A	S	T	I	I	I	A	128
385	GGA	AAA	TCC	ACA	ACG	TCC	CTG	GTG	ACC	TTA	GAC	CCC	ACC	ATC	CCA	CTA	432
129	G	K	S	T	T	S	L	V	T	L	D	P	T	I	P	L	144
433	CGT	CTT	CTG	GTC	ATT	ATC	CTG	GAT	TAC	CCC	CAA	TGT	GGC	TTC	CCT	GCC	480
145	R	L	L	V	I	I	L	D	Y	P	Q	C	G	F	P	A	160
481	ACT	GTC	ACC	GAG	GAT	GAT	ATC	CGC	ACA	ATC	TTC	CTC	GGT	CCA	AAC	CGT	528
161	T	V	T	E	D	D	I	R	T	I	F	L	G	P	N	R	176
529	GAT	GGC	AAC	GGG	GGT	ATG	GCA	CAA	AAA	TTC	AGA	CAG	TGC	TCC	TAC	AAC	576
177	D	G	N	G	G	M	A	Q	K	F	R	Q	C	S	Y	N	192
577	AAT	TTT	GGA	CTC	AAT	GTC	ACT	GCG	TTG	AGG	GTT	GTC	CGT	GTG	ACT	GAT	624
193	N	F	G	L	N	V	T	A	L	R	V	V	R	V	T	D	208
625	AAT	TGC	ACC	ACA	CCG	ATA	TCA	AGT	ACT	TGT	AGC	TAC	TGG	GCA	ATG	CAG	672
209	N	C	T	T	P	I	S	S	T	C	S	Y	W	A	M	Q	224
673	TTC	AAA	GCA	GAC	CAA	GCT	GTC	AGG	GCC	ATC	ATC	GGC	CTT	GGG	GCG	TTC	720
225	F	K	A	D	Q	A	V	R	A	I	I	G	L	G	A	F	240
721	GTA	TCA	TTT	ACC	CAC	TAC	GCC	TAC	GTG	CTC	CCA	CCA	GCC	TTG	CGG	GGA	768
241	V	S	F	T	H	Y	A	Y	V	L	P	P	A	L	R	G	256
769	AAT	TGC	GCT	TGG	GAA	GGG	TTG	GCC	ATC	GTA	CCC	AGC	GGC	CAT	GTG	ATG	816
257	N	C	A	W	E	G	L	A	I	V	P	S	G	H	V	M	272
817	TTT	TTG	CAA	ACT	TCC	GTC	TAC	GGT	CTG	TAT	AGA	TGG	GGA	ACC	ATC	ATG	864
273	F	L	Q	T	S	V	Y	G	L	Y	R	W	G	T	I	M	288
865	CAG	GAG	GCC	CTC	CAC	GAC	TAC	GGG	CTG	TGG	CAT	TCA	TGG	CGT	AAC	AAC	912
289	Q	E	A	L	H	D	Y	G	L	W	H	S	W	R	N	N	304

Anhang

913	ATC	GAG	TAC	GAG	GAC	CGC	TCA	ACT	GCC	ATG	GGC	CGT	GGC	AAC	GCC	TGC	960			
305	I	E	Y	E	D	R	S	T	A	M	G	R	G	N	A	C	320			
961	CCC	AAC	GCT	ATG	GAG	ATA	TCC	TGC	ATG	GGC	TGG	GCC	ACC	CCT	GCG	ACT	1008			
321	P	N	A	M	E	I	S	C	M	G	W	A	T	P	A	T	336			
1009	GGG	GGC	GGC	CAG	CTT	GAC	AAG	GAT	AAG	CTG	TCT	CCA	GCA	GGA	TCG	CCC	1056			
337	G	G	G	Q	L	D	K	D	K	L	S	P	A	G	S	P	352			
1057	CGG	ACC	TTT	TTC	CTG	CCA	GCC	ACT	TCC	CTC	ACC	GGC	AAC	TAC	AGC	TTC	1104			
353	R	T	F	F	L	P	A	T	S	L	T	G	N	Y	S	F	368			
1105	TTG	CGT	GTG	CTG	CCA	AAC	TGG	CTA	AAT	GAC	ACA	TAC	AAC	AGT	CCA	AAC	1152			
369	L	R	V	L	P	N	W	L	N	D	T	Y	N	S	P	N	384			
1153	GGT	AAA	AAC	CTG	TAT	ATT	GCC	TTT	CGC	GTT	GCA	AAG	AAT	GGT	GAC	GAG	1200			
385	G	K	N	L	Y	I	A	F	R	V	A	K	N	G	D	E	400			
1201	GCT	CTG	GAA	GCT	GAG	TTT	GCA	TCC	AAG	ATA	AAC	GTG	CAT	GAA	GTC	AAC	1248			
401	A	L	E	A	E	F	A	S	K	I	N	V	H	E	V	N	416			
1249	GCT	ACG	ATG	Intron4			GAC	AAT	GGC	TGC	GCA	AAA	GAT	ATC	TAC	AGC	AAA	CAG	GAC	1296
417	A	T	M	D	N	G	C	A	K	D	I	Y	S	K	Q	D				432
1297	CGC	AAA	ATT	CAG	TTC	ATT	GGA	GCG	ACG	GAG	TCC	ATG	TCC	CAG	ATG	GTA	1344			
433	R	K	I	Q	F	I	G	A	T	E	S	M	S	Q	M	V	448			
1345	TTA	GAT	GCT	TAT	AAC	TTG	ATT	GTA	TAC	GCC	GGA	GCC	TCT	TTT	GTT	ACG	1392			
449	L	D	A	Y	N	L	I	V	Y	A	G	A	S	F	V	T	464			
1393	GAC	ATC	CTG	AGG	GTG	CAT	CTC	TGC	CGC	TAT	GTG	ACC	TCA	CCG	CTG	GAG	1440			
465	D	I	L	R	V	H	L	C	R	Y	V	T	S	P	L	E	480			
																				
1441	TGT	CCC	TCC	CTC	AGC	ATG	CTG	GAA	GGC	ATT	GCC	GTG	AAA	ACA	AGC	CCA	1488			
481	C	P	S	L	S	M	L	E	G	I	A	V	K	T	S	P	496			
1489	CCA	TTC	GTC	CCA	CCG	CCA	CCA	AGC	CCA	CTA	TTA	ACA	AGC	CCA	CGT	CCC	1536			
497	P	F	V	P	P	P	P	S	P	L	L	T	S	P	R	P	512			
1537	CCG	AGC	CCA	CGA	CCC	CCG	AGA	CCA	TCA	CCA	CCA	AGC	CCA	CCG	CCG	CCA	1584			
513	P	S	P	R	P	P	R	P	S	P	P	S	P	P	P	P	528			
1585	CCA	AGC	CCA	CCG	CCG	CCG	CCA	AGC	CCA	CCG	CCA	CCA	CCA	AGC	CCA	CCG	1632			
529	P	S	P	P	P	P	P	S	P	P	P	P	P	S	P	P	544			
1633	CCG	CCA	CCA	AGC	CCA	CCG	CCG	CCA	CCA	AGC	CCA	CCG	CCG	CCA	CCA	AGC	1680			
545	P	P	P	S	P	P	P	P	P	S	P	P	P	P	P	S	560			
1681	CCA	CCG	CCG	CCA	CCA	AGC	CCA	CCG	CCG	CCA	CCA	AGC	CCA	CCG	CCG	CCA	1728			
561	P	P	P	P	P	S	P	P	P	P	P	S	P	P	P	P	576			
1729	CCA	AGC	CCA	CCG	CCG	CCA	CCA	AGC	CCA	CGA	CAC	CCC	CCT	TCA	CCG	CCA	1776			
577	P	S	P	P	P	P	P	S	P	R	H	P	P	S	P	P	592			
																				
1777	CCA	AGG	CCA	CGA	CCC	CCC	CGT	CCA	CAG	CCA	CCA	AGC	CCA	CCA	AGC	CCA	1824			
593	P	R	P	R	P	P	R	P	Q	P	P	S	P	P	S	P	608			

Anhang

1825	AGC	CCG	CCC	AGT	CCG	CGC	ACT	GAT	AAT	GTG	GTC	GCC	TGG	ATT	ACC	CAG	1872
609	S	P	P	S	P	R	T	D	N	V	V	A	W	I	T	Q	624
1873	CCT	GAT	ACT	GGC	CGT	ATT	GTG	CAG	TTC	TCA	AAT	TCT	GGT	GTA	GCC	GGC	1920
625	P	D	T	G	R	I	V	Q	F	S	N	S	G	V	A	G	640
1921	GAC	CTG	CTG	CTT	GCC	CCG	GTC	GAC	ACA	CAA	AGG	TGC	AAC	TAT	TCT	CAA	1968
641	D	L	L	L	A	P	V	D	T	Q	R	S	N	Y	S	Q	656
1969	ATG	TGG	CTG	ATC	AAA	GTG	GTG	GAC	ACT	GAT	GCT	GCC	GTA	CAC	ACG	GTG	2016
657	M	W	L	I	K	V	V	D	T	D	A	A	V	H	T	V	672
2017	CAT	CCC	AGT	CAC	AAC	ACC	AGT	TTG	TGT	TGG	GGT	GTA	AGA	GGG	GGC	TCA	2064
673	H	P	S	H	N	T	S	L	C	W	G	V	R	G	G	S	688
2065	TAT	GAT	GAC	ACG	GCT	GTG	GTG	GAG	TTG	CAA	CCA	TGC	CTA	GAT	GGT	GGC	2112
689	Y	D	D	T	A	V	V	E	L	Q	P	C	L	D	G	G	704
2113	AGC	TTG	GCA	AAG	CAT	CGC	AAA	TGG	ATC	ATC	CAG	CAG	TCC	TGT	ACC	CCG	2160
705	S	L	A	K	H	R	K	W	I	I	Q	Q	S	C	T	P	720
2161	GGA	CAG	GTC	CAT	CTT	TTT	GCA	CAA	CAC	AGC	GGC	AGT	TGC	CTG	GAC	ATA	2208
721	G	Q	V	H	L	F	A	Q	H	S	G	S	C	L	D	I	736
2209	TAC	ATG	GCA	CAA	AGC	AGG	GTG	ATT	CAG	TGG	GGC	TGC	CAT	TGG	GGA	CTC	2256
737	Y	M	A	Q	S	R	V	I	Q	W	G	C	H	W	G	L	752
2257	AAC	GAG	CGC	TTT	ATG	ATC	CGT	GGG	TGG	AAC	CAG	CAA	GGA	CTT	GTG	ACT	2304
753	N	E	R	F	M	I	R	G	W	N	Q	Q	G	L	V	T	768
2305	TCT	ACA	CCC	TGG	TAC	GCT	ACA	GCC	CAA	TCA	CCA	TGG	TTT	ACC	TGT	GAT	2352
769	S	T	P	W	Y	A	T	A	Q	S	P	W	F	T	C	D	784
2353	GGC	AAC	ACT	CCC	GGC	GAC	CCG	CCT	GCG	TGG	GTT	CTA	CCG	CTG	GGG	GGA	2400
785	G	N	T	P	G	D	P	P	A	W	V	L	P	L	G	G	800
2401	GGC	GGT	ATC	GTT	CAG	GCT	CTG	GCC	GCT	GCC	GGC	GTA	ACA	GGC	AGC	GGA	2448
801	G	G	I	V	Q	A	L	A	A	A	G	V	T	G	S	G	816
2449	CTT	ATT	GCC	CGA	GGT	GGC	TCA	CAG	ACA	CAG	TCC	CCA	TCC	GAA	ATG	TGG	2496
817	L	I	A	R	G	G	S	Q	T	Q	S	P	S	E	M	W	832
2497	CTG	GTC	AGG	ACG	GAG	GAC	GCT	CCG	GCT	GCA	ATT	CAC	ACC	TTT	CGC	CTC	2544
833	L	V	R	T	E	D	A	P	A	A	I	H	T	F	R	L	848
2545	AGC	AAT	AAC	ATG	AGC	TTG	TGC	TGG	GGA	GTA	CGA	GGA	GGA	TCA	ATG	GAC	2592
849	S	N	N	M	S	L	C	W	G	V	R	G	G	S	M	D	864
2593	AAC	GGC	GCT	GCG	GTG	GAG	CTG	CAG	TCG	TGC	CTA	GGT	GGC	GAT	GGT	GGT	2640
865	N	G	A	A	V	E	L	Q	S	C	L	G	G	D	G	G	880
2641	GAT	AAC	CTG	CTG	CCA	GAC	CAC	CGC	AAA	TGG	ATC	GTC	CTA	GAC	TCC	TGC	2688
881	D	N	L	L	P	D	H	R	K	W	I	V	L	D	S	C	896
2689	ATC	GTG	GGC	CAG	GTC	TAC	ATG	GTT	GCG	AAG	CAT	AGC	GGA	AAA	TGC	ATC	2736
897	I	V	G	Q	V	Y	M	V	A	K	H	S	G	K	C	I	912

Anhang

2737	ACC	ATG	GAT	TCA	GGA	AGT	GGC	AAT	CAG	CTG	GTT	CAG	TTG	GAC	TGC	AAT	2784
913	T	M	D	S	G	S	G	N	Q	L	V	Q	L	D	C	N	928
2785	TGG	GGC	AAC	GCG	CAG	CTC	TTT	GGC	ATT	CGT	GGC	TGG	ATT	CAG	ACA	GGA	2832
929	W	G	N	A	Q	L	F	G	I	R	G	W	I	Q	T	G	944
2833	CTT	CCG	ATT	GCG	CCT	TCT	ACA	GTG	GAG	TAC	AGT	TCA	GCA	GGC	AAT	CCG	2880
945	L	P	I	A	P	S	T	V	E	Y	S	S	A	G	N	P	960
2881	CGG	TGG	TTT	ACC	TGT	AAT	GGA	ACC	ACA	GCC	ATA	GGC	GAG	TCT	CCA	TCG	2928
961	R	W	F	T	C	N	G	T	T	A	I	G	E	S	P	S	976
2929	TCA	TGC	TTT	CAA	TAC	ACA	AAT	ATA	GCA	GGC	TAC	AAT	ATT	CGC	TCT	GTT	2976
977	S	C	F	Q	Y	T	N	I	A	G	Y	N	I	R	S	V	992
2977	TCG	ACA	GCA	GAC	ATG	AAA	GAA	TGC	AGA	GCT	GCA	TGC	AAC	ACG	GAG	CCA	3024
993	S	T	A	D	M	K	E	C	R	A	A	C	N	T	E	P	1008
3025	AGT	TGT	GTT	TTC	GCT	GTG	CGC	AAT	GAT	GCT	CCA	CTT	TGC	TAC	TTG	AAA	3072
1009	S	C	V	F	A	V	R	N	D	A	P	L	C	Y	L	K	1024
3073	AGC	GCG	CCC	TTA	TAC	GGC	CCC	GAC	GGC	GTC	AAC	GAG	GAG	GAT	GGT	GCT	3120
1025	S	A	P	L	Y	G	P	D	G	V	N	E	E	D	G	A	1040
3121	ATT	GAA	CAA	GCA	TGC	TGG	ATC	CGT	GCT	AAC	TAT	GGG	CGC	TTC	TAT	TGC	3168
1041	I	E	Q	A	C	W	I	R	A	N	Y	G	R	F	Y	C	1056
3169	ATC	GAC	AAT	TGG	GAT	GTC	AAC	GGA	GAC	CCT	GCA	GCA	GTG	AGC	AGC	AGC	3216
1057	I	D	N	W	D	V	N	G	D	P	A	A	V	S	S	S	1072
3217	AGC	AGC	ACA	GAC	TAC	GTG	GAC	TGT	TCT	ATG	GCT	TCT	TAC	CAA	CAA	GGC	3264
1073	S	S	T	D	Y	V	D	C	S	M	A	S	Y	Q	Q	G	1088
3265	TAC	AGC	CTG	GAC	CAG	TGC	ATG	AAC	GAG	TGC	CTC	GGC	AAT	CCT	TAT	TGT	3312
1089	Y	S	L	D	Q	C	M	N	E	C	L	G	N	P	Y	C	1104
3313	CAG	TTC	TTT	GTG	CTG	TCA	ACC	AAT	GGC	GAT	TGT	TAT	CTC	AAA	ACG	CAC	3360
1105	Q	F	F	V	L	S	T	N	G	D	C	Y	L	K	T	H	1120
3361	CCC	ATG	CGC	GGT	ACC	TGT	GGC	GTC	ACG	GAG	TAC	AGG	CCC	GAT	ATT	GCA	3408
1121	P	M	R	G	T	C	G	V	T	E	Y	R	P	D	I	A	1136
	← ON 14364 →																
3409	AGG	TCT	TGT	TTC	CAA	GTG	TAT	TAA									3432
1137	R	S	C	F	Q	V	Y	*									1144

7. Literaturverzeichnis

- Adams, C.R., Stamer, K.A., Miller, J.K., McNally, J.G., Kirk, M.M., Kirk, D.L.** (1990) Patterns of organellar and nuclear inheritance among progeny of two geographically isolated strains of *Volvox carteri*. *Curr. Genet.* **18**, 141-53.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid Res.* **25**, 3389-3402.
- Amon, P.** (1995) Identifikation Sexualpheromon-kontrollierter Gene und Charakterisierung der Genprodukte aus *Volvox carteri* f. *nagariensis*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Amon, P., Haas, E., Sumper, M.** (1998) The sex-inducing pheromone and wounding trigger the same set of genes in the multicellular green alga *Volvox*. *Plant Cell* **10**, 781-9.
- Andres, D.A., Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Brown, M.S.** (1993) Mutational analysis of alpha-subunit of protein farnesyltransferase. Evidence for a catalytic role. *J. Biol. Chem.* **268**, 1383-90.
- Asamizu, E., Miura, K., Kucho, K., Inoue, Y., Fukuzawa, H., Ohyama, K., Nakamura, Y., Tabata, S.** (2000) Generation of expressed sequence tags from low CO₂ and high CO₂ adapted cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *DNA Res.* **7**, 305-7.
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Fukuzawa, H., Tabata, S.** (1999) A large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Generation of 3433 non-redundant expressed sequence tags. *DNA Res.* **6**, 369-73.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F.** (1998) Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, San Diego, USA.
- Beckmann** (1992) Oligo 1000 DNA Synthetisizer operating instructions. Beckmann Instruments Inc., Fullerton, USA.
- Beckmann** (1993) Ultra fast cleavage and deprotection kit instructions. Beckmann Instruments GmbH, München.
- Bio-Rad** (1994) Prep-a-gene DNA purification system, instruction manual. Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA.
- Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G.I., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A., Engler, J.A.** (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **4**, 197-250.
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Elektrophor.* **8**, 93-99.
- Bode, W.** (1995) A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain. *Structure* **3**, 527-30.

- Bode, W., Gomis-Rüth, F.X., Stöcker, W.** (1993) Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzicins". FEBS Lett. **311**, 134-140.
- Bonner, W.M., Laskey, R.A.** (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. **46**, 83-8.
- Chang, Y.H., Teichert, U., Smith, J.A.** (1990) Purification and characterization of methionine aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. **265**, 19892-7.
- Christianson, D.W., Cox, J.D.** (1999) Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes. Annu. Rev. Biochem. **68**, 33-57.
- Claes, H.** (1971) Autolyse der Zellwand bei Gameten von *Chlamydomonas reinhardtii*. Arch. Mikrobiol. **108**, 199-207.
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., Laemmli, U.K.** (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodiumdodecylsulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. **252**, 1102-6.
- Cooper T.G.** (1981) Biochemische Arbeitsmethoden. W. de Gruyter-Verlag, Berlin, 49-51.
- Cresnar, B., Mages, W., Müller, K., Salbaum, J.M., Schmitt, R.** (1990) Structure and expression of a single actin gene in *Volvox carteri*. Curr. Genet. **18**, 337-46.
- Darden, W.H.** (1966) Sexual differentiation in *Volvox aureus*. J. Protozool. **13**, 239-55.
- Davies, G.E., Stark, G.R.** (1970) Use of dimethyl suberimidate, a cross-linking reagent, in studying the subunit structure of oligomeric proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **66**, 651-6.
- Dawson, R.M., Elliot, D.C., Elliot, W.H., Jones, K.M.** (1987) Data for biochemical research. 3rd edition, Clarendon press, Oxford, UK.
- Delorme, V.G.R., McCabe, P.F., Kim, D.-J., Leaver, C.J.** (2000) A matrix metalloproteinase gene is expressed at the boundary of senescence and programmed cell death in cucumber. Plant. Physiol. **123**, 917-27.
- Dynal** (1996) Cell separation and protein purification – technical handbook, 2nd edition. Dynal, Oslo, Norwegen.
- Ender, F., Godl, K., Wenzl, S., Sumper, M.** (2002) Evidence for autocatalytic cross-linking of hydroxyproline-rich glycoproteins during extracellular matrix assembly in *Volvox*. Plant Cell, in press.
- Ender, F., Hallmann, A., Amon, P., Sumper, M.** (1999) Response to the sexual pheromone and wounding in the green alga *Volvox*: induction of an extracellular glycoprotein consisting almost exclusively of hydroxyproline. J. Biol. Chem. **274**, 35023-8.

- Ertl, H., Hallmann, A., Wenzl, S., Sumper, M.** (1992) A novel extensin that may organize extracellular matrix biogenesis in *Volvox carteri*. *EMBO J.* **11**, 2055-62.
- Fini, M.E., Cook, J.R., Mohan, R., Brinckerhoff, C.E.** (1998) in *Matrix Metalloproteinases* (Parks, W.C. & Mecham, R.P., Hrsg.) 229-356, Academic Press, San Diego, USA.
- Gilles, R., Gilles, C., Jaenicke, L.** (1983) Sexual differentiation of the green alga *Volvox carteri*: Involvement of extracellular phosphorylated proteins. *Naturwissenschaften* **70**, 571-572.
- Gilles, R., Gilles, C., Jaenicke, L.** (1984) Pheromone-binding and matrix-mediated events in sexual induction of *Volvox carteri*. *Z. Naturforsch.* **39c**, 584-92.
- Godl, K., Hallmann, A., Rappel, A., Sumper, M.** (1995) Pherophorins: a family of extracellular matrix glycoproteins from *Volvox* structurally related to the sex-inducing pheromone. *Planta* **196**, 781-7.
- Godl, K., Hallmann, A., Wenzl, S., Sumper, M.** (1997) Differential targeting of closely related ECM glycoproteins: the pherophorin family from *Volvox*. *EMBO J.* **16**, 25-34.
- Golldack, D., Popova, O.V., Dietz, K.-J.** (2002) Mutation of the matrix metalloproteinase *At2-MMP* inhibits growth and causes late flowering and early senescence in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **277**, 5541-7.
- Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H., Thorgeirsson, U.P.** (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell. Biol.*, **74**, 111-22.
- Gomis-Rüth, F.X., Grams, F., Yiallourous, I., Nar, H., Kusthardt, U., Zwilling, R., Bode, W., Stöcker, W.** (1994) Crystal structures, spectroscopic features, and catalytic properties of cobalt(II), copper(II), nickel(II) and mercury(II) derivatives of zinc endopeptidase astacin. A correlation of structure and proteolytic activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 17111-7.
- Gomis-Rüth, F.X., Stöcker, W., Huber, R., Zwilling, R., Bode, W.** (1993) Refined 1,8 Å X-ray crystal structure of astacin, a zinc-endopeptidase from the crayfish *Astacus astacus* L. Structure determination, refinement, molecular structure and comparison with thermolysin. *J. Mol. Biol.* **229**, 945-68.
- Graham, J.S., Xiong, J., Gillikin, J.W.** (1991) Purification and developmental analysis of a metalloendoproteinase from the leaves of *Glycine max*. *Plant. Physiol.* **97**, 786-92.
- Grams, F., Dive, V., Yiotakis, A., Yiallourous, I., Vassiliou, S., Zwilling, R., Bode, W., Stöcker, W.** (1996) Structure of astacin with a transition-state analog inhibitor. *Nature Struct. Biol.* **3**, 671-5.
- Grobelyny, D., Poncz, L., Galarzy, R.E.** (1992) Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin and *Pseudomonas aeruginosa* elastase by peptide hydroxamic acids. *Biochemistry* **31**, 7152-4.

- Gross, J., Lapière, C.M.** (1962) Collagenolytic activity in amphibian tissue: a tissue culture assay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **48**, 1014-22.
- Gruber, H., Goetinck, S.P., Kirk, D.L., Schmitt, R.** (1992) The nitrate reductase-encoding gene of *Volvox carteri*: map location, sequence and induction kinetics. Gene **120**, 75-83.
- Haas, E.** (1994) Identifikation und Charakterisierung von Sexualpheromon-kontrollierten Genen und Genprodukten aus *Volvox carteri* f. *nagariensis*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Haas, E., Sumper, M.** (1991) The sexual inducer of *Volvox carteri*. Its large-scale production and secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. **294**, 282-4.
- Hallmann, A., Amon, P., Godl, K., Heitzer, M., Sumper, M.** (2001) Transcriptional activation by the sexual pheromone and wounding: a new gene family from *Volvox* encoding modular proteins with (hydroxy)proline-rich and metalloproteinase homology domains. Plant J. **26**, 583-93.
- Hallman, A., Godl, K., Wenzl, S., Sumper, M.** (1998) The highly efficient sex-inducing pheromone system of *Volvox*. Trends Microbiol. **6**, 185-9.
- Hallmann, A., Kirk, D.L.** (2000) The developmentally regulated ECM glycoprotein ISG plays an essential role in organizing the ECM and orienting the cells of *Volvox*. J. Cell Sci. **113**, 4605-17.
- Hallmann, A., Rappel, A., Sumper M.** (1997) Gene replacement by homologous recombination in the multicellular green alga *Volvox carteri*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 7469-74.
- Hallmann, A., Sumper, M.** (1994a) An inducible arylsulfatase of *Volvox carteri* with properties suitable for a reporter-gene system. Eur. J. Biochem. **221**, 143-50.
- Hallmann, A., Sumper, M.** (1994b) Reporter genes and highly regulated promoters as tools for transformation experiments in *Volvox carteri*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 11562-6.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. J. Mol. Biol. **166**, 557-80.
- Harlow, E., Lane, D.** (1988) Antibodies – a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Hattori, M., Sakaki, Y.** (1986) Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. Anal. Biochem. **152**, 232-8.
- He, C.S., Wilhelm, S.M., Pentland, A.P., Marmer, B.L., Grant, G.A., Eisen, A.Z., Goldberg, G.I.** (1989) Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 2632-6.
- Hildmann, T., Ebnet, M., Pena-Cortes, H., Sanchez-Serrano, J.J., Willmitzer, L., Prat, S.** (1992) General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding. Plant Cell **4**, 1157-70.
- Hochuli, E., Piessecki, S.** (1992) Interaction of hexahistidine fusion proteins with nitrilotriacetic acid-chelated Ni²⁺-ions. Methods: A companion to Methods of Enzymology **4**, 68-72.

- Holtzhauer, M.** (1997) Biochemische Labormethoden. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R.** (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61-8.
- Ish-Horowicz, D., Burke, J.F.** (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2989-98.
- Jaenicke, L., Waffenschmidt, S.** (1979) Matrix-lysis and release of daughter spheroids in *Volvox carteri* – a proteolytic process. *FEBS Lett.* **107**, 250-3.
- Jaenicke, L., Waffenschmidt, S.** (1981) Liberation of reproductive units in *Volvox* and *Chlamydomonas*: proteolytic processes. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **94**, 375-86.
- Kelland, J.L.** (1964) Inversion in *Volvox*. Ph.D. Thesis, Princeton University, USA.
- Kieliszewski, M.J., Lamport, D.T.A.** (1994) Extensin: repetitive motifs, functional sites, posttranslational codes, and phylogeny. *Plant J.* **5**, 157-72.
- Kinoshita, T., Fukuzawa, H., Shimada, T., Saito, T., Matsuda, Y.** (1992) Primary structure and expression of a gamete lytic enzyme in *Chlamydomonas reinhardtii*: similarity of functional domains to matrix metalloproteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1228-32.
- Kirk, D.L.** (1998) *Volvox*: Molecular-genetic origins of multicellularity and cellular differentiation. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Kirk, D.L., Birchem, R., King, N.** (1986) The extracellular matrix of *Volvox*: a comparative study and proposed system of nomenclature. *J. Cell Sci.* **80**, 207-31.
- Kirk, D.L., Kirk, M.M.** (1983) Protein synthetic patterns during the asexual life cycle of *Volvox carteri*. *Dev. Biol.* **96**, 493-506.
- Kirk, D.L., Kirk, M.M.** (1986) Heat shock elicits production of sexual inducer in *Volvox*. *Science* **231**, 51-4.
- Kleiner, D.E., Stetler-Stevenson, W.G.** (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal. Biochem.* **218**, 325-9.
- Kubo, T., Saito, T., Fukuzawa, H., Matsuda, Y.** (2001) Two tandemly-located matrix metalloproteinase genes with different expression patterns in the *Chlamydomonas* sexual cell cycle. *Curr. Genet.* **40**, 136-43.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Larson, A., Kirk, M.M., Kirk, D.L.** (1992) Molecular phylogeny of the volvocine flagellates. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 85-105.
- Lovejoy, B., Hassell, A.M., Luther, M.A., Weigl, D., Jordan, S.R.** (1994) Crystal structures of recombinant 19-kDa human fibroblast collagenase complexed to itself. *Biochemistry* **33**, 8207-17.
- Macherey-Nagel** (2000) Nucleotrap – Properties and application. Macherey-Nagel GmbH, Dürren.

- Maidment, J.M., Moore, D., Murphy, G.P., Murphy, G., Clark, I.M.** (1999) Matrix metalloproteinase homologues from *Arabidopsis thaliana*. Expression and activity. *J. Biol. Chem.* **274**, 34706-10.
- Mainx, F.** (1929) Über die Geschlechterverteilung bei *Volvox aureus*. *Arch. Protistenkd.* **67**, 205-14.
- McGeoch, D.J.** (1985) On the predictive recognition of signal peptide sequences. *Virus Res.* **3**, 271-86.
- Mort, A.J., Lamport, D.T.A.** (1977) Anhydrous hydrogen fluoride deglycosylates glycoproteins. *Anal. Biochem.*, **82**, 289-309.
- Nagase, H., Woessner, J. Jr.** (1999) Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-94.
- Nomura, K., Shimizu, T., Kinoh, H., Sendai, Y., Inomata, M., Suzuki, N.** (1997) Sea urchin hatching enzyme (envelysin): cDNA cloning and deprivation of protein substrate specificity by autolytic degradation. *Biochemistry* **36**, 7225-38.
- Novagen** (1997) pET System – Manual. 7th edition, Novagen Inc., Madison, USA.
- Orawski, A.T., Simmons, W.H.** (1995) Purification and properties of membrane-bound aminopeptidase P from rat lung. *Biochemistry* **34**, 11227-11236.
- Overton, E.** (1889) Beitrag zur Kenntniss der Gattung *Volvox*. *Bot. Centralb.* **39**, 65-72.
- Pak, J.H., Liu, C.Y., Huangpu, J., Graham, J.S.** (1997) Construction and characterization of the soybean leaf metalloproteinase cDNA. *FEBS Lett.* **404**, 283-8.
- Parks, W.C., Mecham, R.P.** (1998) Matrix metalloproteinases. Academic Press, San Diego, USA.
- Pautot, V., Holzer, F.M., Reisch, B., Walling, L.L.** (1993) Leucine aminopeptidase: an inducible component of the defence response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9906-10.
- Pharmacia** (1998) Ion exchange chromatography – principles and methods. Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden.
- Pommerville, J.C., Kochert, G.** (1981) Changes in somatic cell structure during senescence in *Volvox carteri*. *Eur. J. Cell Biol.* **24**, 236-43.
- Pringsheim, E.G.** (1970) Identification and cultivation of european *Volvox* spp. *Antonie van Leeuwenhoek* **36**, 33-43.
- Provasoli, L., Pintner, I.J.** (1959) Artificial media for freshwater algae; problems and suggestions. In *Ecology of Algae*. Special Publication No. 2, Pymatuning Laboratory of Field Biology. Hrsg., C.A. Tryon, R.T. Hartmann. University of Pittsburgh, USA, 84-96.
- Qiagen** (1997) The QIAexpressionist – A handbook for high-level expression and purification of 6xHis tagged proteins. 3rd edition, Qiagen GmbH, Hilden.
- Qiagen** (1998) Plasmid purification handbook. Qiagen GmbH, Hilden.

- Quarrie, S.A., Galfre, G.** (1985) Use of different hapten-protein-conjugates immobilized on nitrocellulose to screen monoclonal antibodies to abscisic acid. *Anal. Biochem.* **151**, 389-99.
- Rappel, A.** (1998) *Volvox* als entwicklungsbiologisches Modell: Ausbau der molekulargenetischen Manipulierbarkeit. Dissertation, Universität Regensburg.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J.** (2000) MEROPS: the peptidase database. *Nucl. Acid Res.* **28**, 323-5.
- Roche** (1999) High pure PCR product purification kit instructions. Roche, Basel, Schweiz.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A.** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour New York, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-8.
- Schiedlmeier, B., Schmitt, R., Müller, W., Kirk, M.M., Gruber, H., Mages, W., Kirk, D.L.** (1994) Nuclear transformation of *Volvox carteri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5080-4.
- Schlösser, U.W.** (1976) Entwicklungsstadien- und sippenspezifische Zellwand-Autolysine bei der Freisetzung von Fortpflanzungszellen in der Gattung *Chlamydomonas*. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **89**, 1-56.
- Seidah, N.G., Sawyer, N., Hamelin, J., Mion, P., Beaubien, G., Brachpapa, L., Rochemont, J., Mbikay, M., Chretien, M.** (1990) Mouse plasma kallikrein: cDNA structure, enzyme characterization, and comparison of protein and mRNA levels among species. *DNA Cell Biol.* **9**, 737-48.
- Shimizu, T., Inoue, T., Shiraishi, H.** (2002) Cloning and characterization of novel extensin-like cDNAs that are expressed during late somatic cell phase in the green alga *Volvox carteri*. *Gene* **284**, 179-87.
- Snell, W.J., Eskue, W.A., Buchanan, M.J.** (1989) Regulated secretion of a serine protease that activates an extracellular matrix-degrading metalloprotease during fertilization in *Chlamydomonas*. *J. Cell. Biol.* **109**, 1689-94.
- Starr, R.C.** (1968) Cellular differentiation in *Volvox*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**, 1082-8.
- Starr, R.C.** (1969) Structure, reproduction, and differentiation in *Volvox carteri* f. *nagariensis* Iyengar, strains HK 9 and 10. *Arch. Protistenk.* **111**, 204-22.
- Starr, R.C.** (1970) Control of differentiation of *Volvox*. *Dev. Biol. (Suppl.)* **4**, 59-100.

- Starr, R.C., Jaenicke, L.** (1974) Purification and characterization of the hormone initiating sexual morphogenesis in *Volvox carteri* f. *nagariensis* Iyengar. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 1050-54.
- Stryer, L.** (1994) Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Studier, F.W., Moffat, B.A.** (1986) Use of bacterial T7 RNA polymerase to direct selective high level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. **189**, 113-30.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W.** (1990) Use of T7 RNA-polymerase to direct expression of cloned genes. Meth. Enzymol. **185**, 60-89.
- Sumper, M., Berg, E., Wenzl, S., Godl, K.** (1993) How a sex pheromone might act at a concentration below 10^{-16} M. EMBO J. **12**, 831-6.
- Sumper, M., Hallmann, A.** (1998) Biochemistry of the extracellular matrix of *Volvox*. Int. Rev. Cytol. **180**, 51-85.
- Sumper, M., Nink, J., Wenzl, S.** (2000) Self-assembly and cross-linking of *Volvox* extracellular matrix glycoproteins are specifically inhibited by Ellmann's reagent. Eur. J. Biochem. **267**, 2334-9.
- Tam, L-W., Kirk, D.L.** (1991) Identification of cell-type-specific genes of *Volvox carteri* and characterization of their expression during the asexual life cycle. Dev. Biol. **145**, 51-60.
- Templeton, N.S., Brown, P.D., Levy, A.T., Margulies, I.M., Liotta, L.A., Stetler-Stevenson, W.G.** (1990) Cloning and characterization of human tumor cell interstitial collagenase. Cancer Res. **50**, 5431-7.
- Towbin, H., Straehlin, T., Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 4350-4.
- Tschochner, H., Lottspeich, F., Sumper, M.** (1987) The sexual inducer of *Volvox carteri*. Purification, chemical characterization and identification of its gene. EMBO J. **6**, 2203-7.
- Van Leeuwenhoek, A.** (1700) Concerning the worms in sheeps, livers, gnats and animalicula in the excrement of frogs. Phil. Trans. R. Soc. Lond. **22**, 509-18.
- Van Wart, H.E., Birkedal-Hansen, H.** (1990) The cystein switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 5578-82.
- Viera, J., Messing, J.** (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertionmutagenesis and sequencing. Gene **19**, 259-68.
- Wada, K., Sato, H., Kinoh, H., Kajita, M., Yamamoto, H., Seiki, M.** (1998) Cloning of three *Caenorhabditis elegans* genes potentially encoding novel matrix metalloproteinases. Gene **211**, 57-62.

- Waffenschmidt, S., Knittler, M., Jaenicke, L.** (1990) Characterization of a sperm lysin of *Volvox carteri*. *Sex. Plant Reprod.* **3**, 1-6.
- Wenzl, S., Sumper, M.** (1982) The occurrence of differently sulphated cell surface glycoproteins correlates with defined developmental events in *Volvox*. *FEBS Lett.* **143**, 311-15.
- Wenzl, S., Sumper, M.** (1986) Early event of sexual induction in *Volvox*: chemical modification of the extracellular matrix. *Dev. Biol.* **115**, 119-128.
- Yasumasu, S., Iuchi, I., Yamagami, K.** (1989) Isolation and some properties of low choriolytic enzyme (LCE), a component of the hatching enzyme of the teleost, *Oryzias latipes*. *J. Biochem. (Tokyo)* **105**, 212-8.
- Yongqing, L., Dammann, C., Bhattacharyya, K.** (2001) The matrix metalloproteinase gene *GmMMP2* is activated in response to pathogenic infections in soybean. *Plant Physiol.* **127**, 1788-97.