

Untersuchungen zur Expression und Funktion der Acetylcholin-Bindeproteine der Posthornschnecke *Biomphalaria glabrata*

Dissertation

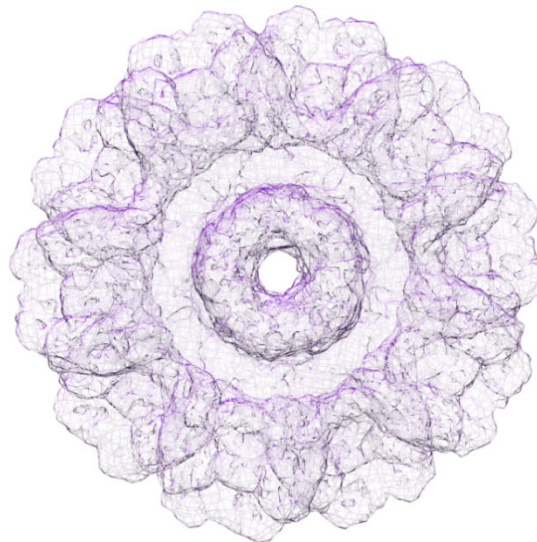
zur Erlangung des akademischen Grades eines
„Doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.) der Fachbereiche:

08 - Physik, Mathematik und Informatik

09 - Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

10 - Biologie

Universitätsmedizin



vorgelegt von

Daniela Treiber

Mainz, Juni 2018

Dekan:	Prof. Dr. Walter Stöcker
Erstgutachter:	Prof. Dr. Jürgen Markl
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Dirk Schneider
Tag der mündlichen Prüfung:	30. August. 2018

Copyright: Die Inhalte dieses Werkes sind urheberrechtliches Eigentum des Instituts für Molekulare Physiologie im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker, er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt“.

Marie Curie (07.11.1867- 04.07.1934)

Inhaltsverzeichnis

A Einleitung	1
1 Proteine der Cys-loop Superfamilie	1
2 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR)	1
3 Acetylcholin-Bindeproteine	3
3.1 Das aktive Zentrum	5
3.2 Acetylcholin-Bindeproteine bei den Planorbidae	6
3.3 Mögliche biologische Funktionen von <i>Bg</i> -AChBP	7
3.4 Die Rolle des AChBP bei der synaptischen Signaltransduktion	8
4 Zur Anatomie der Posthornschnecke <i>B. glabrata</i>	9
5 Zur Bildung der Schale während der Embryonalentwicklung	11
6 Die Schale der Schnecken	12
7 Die verschiedenen CaCO ₃ -Modifikationen	14
8 Zielsetzung der Arbeit	15
B Material & Methoden	16
1 Das Forschungsobjekt: <i>Biomphalaria glabrata</i>	16
1.1 Systematische Einordnung	16
1.2 Lebensweise	16
1.3 Hälterung und Präparation der Tiere	17
2 Chemikalien und Geräte	17
2.1 Allgemeines	17
2.2 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	18
2.3 Verwendete Antikörper	18
2.3.1 Herstellung der Antiseren	18
2.4 Herstellung von Gefrierschnitten	19
2.4.1 Schneiden der Gewebeproben	19
2.4.2 Fixierung der Gewebeproben	19
2.4.3 Herstellung und Verwendung des Einbettmedium (Mowiol®)	19
2.4.4 Mikroskopieren und Fotografieren der Gefrierschnitte	20

3	Molekularbiologische Methoden.....	20
3.1	<i>In-situ</i> -Hybridisierung zur Lokalisierung der mRNA im Gewebe.....	20
3.1.1	Herstellung Isoform spezifischer Sonden.....	20
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
3.1.3	Die Taq™ DNA Polymerase von Invitrogen (Darmstadt).....	21
3.1.4	Die Dioxigenin- Markierung.....	22
3.1.5	Das Punktdiagramm zur Kontrolle der Sonden (<i>Dot-Blot</i>).....	25
3.2	Whole-mount <i>In-situ</i> -Hybridisierung (nach Streit et al., 2005).....	28
3.3	Fluoreszenzmarkierte Sonden.....	30
4	Immunhistologische Methoden.....	31
4.1	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.....	31
4.2	Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie.....	33
4.2.1	Bildung des Antikörper-Markierungs-Komplexes.....	33
4.2.2	Inkubation mit dem Zenon AK-Markierungs-Komplex.....	33
4.3	Die Whole mount-Immunfluoreszenzfärbung.....	35
4.3.1	Bleichen der Gelege.....	35
5	Rekombinante Expression von <i>Bg</i> -AChBP1 und <i>Bg</i> -AChBP2.....	36
5.1	Klonierung.....	36
5.2	Rekombinante Expression in Bakterienzellen.....	36
5.3	Ernte und Aufbrechen der Bakterienzellen.....	37
5.4	DNA und RNA-Verdau.....	37
5.5	Aufbrechen der Einschlusskörperchen.....	37
5.6	Affinitäts-Chromatographie.....	38
5.7	Vorbereitung der Nickel-Sepharose:.....	38
5.8	Aufreinigung:.....	38
5.9	Die Rückfaltung der Proteine.....	39
5.10	Aufkonzentrierung der Proteinlösung.....	39
5.11	Dialyse.....	40
5.12	Abspaltung des Polyhistidin-Tags.....	40
5.13	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	40
6	Gewinnung nativer Proteine.....	42
6.1	Entnahme der Hämolymphe.....	42
6.2	Chromatographische Methoden.....	42

6.2.1	Anionenaustausch-Chromatographie	42
6.2.2	Größenausschluss- Chromatographie.....	43
7	Proteinbiochemische Arbeiten	44
7.1	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	44
7.2	SDS-PAGE	45
7.3	Nicht reduzierende SDS-PAGE	45
7.4	Native PAGE	45
7.5	Coomassiefärbung von Proteinen	45
8	Elektronenmikroskopische Methoden	46
8.1	Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	46
8.2	Verwendete Elektronenmikroskope	46
8.3	Einzelpartikelanalyse	47
8.3.1	Negativkontrastierung der Proteinproben.....	47
8.4	Elektronenmikroskopie an Gewebeschnitten.....	47
8.4.1	Vorbereitung der Gitternetze für die chemische Fixierung	47
8.4.2	Chemische Fixierung von Süßwassertieren	48
8.4.3	Anfertigen von Gewebeschnitten	49
8.4.4	Die Kontrastierung der Gewebeschnitte.....	50
8.5	Erstellung eines 3D-Tomogramms	51
9	3D-Darstellung von Proteinstrukturen	52
10	Bindungsstudien mit amorphem Calciumcarbonat.....	52
	C Ergebnisse	53
1	Isolierung und Charakterisierung der nativen Hämolymphe-proteine	53
1.1	SDS-PAGE der Hämolympheproteine.....	56
2	Western-Blot-Analysen von 15%igen SDS-Gelen.....	58
3	Rekombinante Expression von <i>Bg-AChBP1</i>	60
4	Rekombinante Expression von <i>Bg-AChBP2</i>	62
5	Gewebespezifische Expression von <i>Bg-AChBP1</i> und <i>Bg-AChBP2</i>	63
5.1	<i>Bg-AChBP1</i> und <i>Bg-AChBP2</i> in larvalen Entwicklungsstadien	63
5.2	<i>Bg-AChBP1</i> und <i>Bg-AChBP2</i> in Jungschnecken	65
5.3	<i>Bg-AChBP1</i> -Nachweis im Mantelepithel	66
5.4	<i>Bg-AChBP1</i> -Nachweis im Fußgewebe.....	68

5.5	<i>Bg</i> -AChBP1-Nachweis im Eingeweidesack.....	69
5.6	<i>Bg</i> -AChBP1 und <i>Bg</i> -AChBP2 im Kopfgewebe	71
5.6.1	Immunfluoreszenz-Markierung	71
5.6.2	Doppel-Immunfluoreszenzmarkierung im Gehirn	73
6	Die Syntheseorte von <i>Bg</i> -AChBP1 und <i>Bg</i> -AChBP2	77
6.1	<i>In-situ</i> -Hybridisierung von Whole Mounts	78
6.2	<i>Bg</i> -AChBP-Synthese im Kopf von <i>B. glabrata</i>	79
6.3	Doppel-Fluoreszenzmarkierung des Kopfgewebes	80
6.4	<i>Bg</i> -AChBP1 Synthese im Mantelepithel von <i>B. glabrata</i>	82
7	Elektronenmikroskopische Untersuchung des Mantelepithels	82
8	PAS Färbung zum Nachweis von Glykogen im Mantelepithel	88
9	Vergleich des Mantelgewebes von <i>B. glabrata</i> und <i>L. stagnalis</i>	90
10	Verteilung der potentiellen <i>Bg</i> -AChBP1-Dodekaeder im Mantelepithel	91
11	<i>Bg</i> -AChBP und die Schalenbildung der Schnecke.....	92
11.1	Der Einfluss auf die Kristallisation von Calciumcarbonat.....	92
11.2	Bindungs von <i>Bg</i> -AChBP1 und <i>Bg</i> -AChBP2 an verschiedene CaCO ₃ - Polymorphe	97
11.3	Untersuchungen der Schalenmatrix	98
11.4	Der Einfluss von <i>Bg</i> -AChBP und Mg ²⁺ -Ionen und auf die Bildung von Calciumcarbonat-Polymorphen	102
D Diskussion		103
1	Natives und rekombinantes <i>Bg</i> -AChBP	103
2	Zur Funktion von <i>Bg</i> -AChBP im Nervensystem	105
3	Zur Funktion von <i>Bg</i> -AChBP1 bei der Schalenbildung.....	108
3.1	Die Rolle des Mantelepithels bei der Schalenbildung.....	108
3.2	Die amorphen Calciumcarbonat-Bindeproteine (ACCBP)	109
3.3	Der Einfluss Calciumionen und Calciumcarbonat auf den <i>Bg</i> -AChBP1-Dodekaeder	111
3.4	Die organische Matrix der Schale von <i>B. glabrata</i>	112
4	Eine weitere Perspektive: Manche AChBPs können Phytotoxine binden	114

E Zusammenfassung	116
F Abkürzungsverzeichnis	117
G Abbildungsverzeichnis	118
F Anhang	120
<i>Bg</i> -AChBP Sequenzen:	120
<i>Bg</i> -AChBP1	120
<i>Bg</i> -AChBP2	123
Literaturverzeichnis	126
Danksagung	133
Erklärung	135
Abstract	136

A Einleitung

1 Proteine der Cys-loop Superfamilie

Bei den Proteinen der Cys-loop Superfamilie handelt es sich um membrangebundene Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (ligand-gated ion channels = LGICs). Sie sind für die erregende und hemmende Erregungsübertragung im peripheren- und zentralen Nervensystem verantwortlich. Zu der Familie der Cys-loop-Rezeptoren gehören zum einen Anionenkanäle (GABA_A, Glycin, Glutamat), aber auch Kationenkanäle (Acetylcholin, 5-HT₃). Alle Cys-loop-Rezeptoren haben gemeinsame homologe Strukturen und unterscheiden sich kaum in ihrem grundlegenden Wirkungsmechanismus. Sie sind als Transmembranproteine in der Plasmamembran verankert. Sie bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne (LBD), einer Transmembrandomäne, die es bestimmten Ionen ermöglicht, die Membran zu passieren, und einer intrazellulären Domäne, welche eine Rolle bei der Regulierung und der Leitfähigkeit des Rezeptors spielt (Abb. 1A). Die Ligandenbindedomäne besteht aus fünf ringförmig angeordneten Untereinheiten, es handelt sich also um ein Pentamer. Die fünf aktiven Zentren für die Ligandenbindung liegen jeweils zwischen zwei benachbarten Untereinheiten (Abb. 1B). Die Ligandenbindestelle besteht dabei aus drei Loops der einen Untereinheit (A, B, C; prinzipielle Seite der Ligandenbindestelle), und drei β -Faltblättern der anderen Untereinheit (D, E, F; komplementäre Seite der Ligandenbindestelle). Der Ligand selbst bindet im Bereich des C-Loops an ein Motiv aus mehreren aromatischen Aminosäuren. Die Ligandenbindestelle wird daher auch als „aromatisches Nest“ bezeichnet (siehe A 3.1). Viele Medikamente wie diverse Narkotika entfalten ihre Wirkung, indem sie an Cys-loop-Rezeptoren binden (Thompson et al. 2010).

2 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR)

Acetylcholin-Rezeptoren (AChR) sind Cys-loop-Rezeptoren mit Acetylcholin als biologischem Liganden. Bezüglich ihrer Ligandenbindung kennt man zahlreiche (fördernde) Agonisten und (hemmende) Antagonisten, und die AChR werden nach ihren beiden Haupt-Agonisten Nikotin bzw. Muskarin in zwei Gruppen eingeteilt: muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) und nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR). Letztere können also durch Nikotin aktiviert werden; sie spielen eine wichtige neurophysiologische Rolle. Ihre extrazelluläre Ligandenbindedomäne (nAChR-LBD) ist für die klinische Forschung von besonderem Interesse, da Fehlfunktionen mit Syndromen wie Alzheimer, Schizophrenie und der Abhängigkeit von Nikotin in Verbindung gebracht werden. Am besten untersucht ist die nAChR-LBD der neuromuskulären Endplatte. Zwei ihrer fünf Untereinheiten gehören zum Sequenztyp α , die anderen drei zu den Typen β , γ und δ (Anstelle der δ -Untereinheit liegt

während der Embryonalentwicklung eine ϵ -Untereinheit vor). Die Ligandenbindestellen im Pentamer werden hier stets zwischen einer α -Untereinheit und einer benachbarten Untereinheit eines anderen Typs gebildet. Daher befinden sich in der nAChR-LBD der neuromuskulären Endplatte insgesamt nur zwei Ligandenbindedomänen. Im Gegensatz dazu bestehen die nAChR des zentralen Nervensystems nur aus α - und β -Untereinheiten (Karlin 2002). Beim Menschen fand man bisher neun unterschiedliche α -Untereinheiten (α_2 bis α_{10}) und drei unterschiedliche β -Untereinheiten (β_2 - β_4). Es wurden auch Homopentamere beschrieben, die komplett aus α -Untereinheiten bestehen. Dies ist zum Beispiel der Fall bei dem zerebralen α_7 -Rezeptor, dem eine wichtige Rolle bei der Bildung des Langzeitgedächtnisses zugeschrieben wird (Leonard und Bertrand 2001). Wegen der Transmembrandomäne ist die Kristallisation des kompletten Rezeptors schwierig. Die erste hoch aufgelöste Struktur eines nAChR wurde mithilfe der 3D-Elektronenmikroskopie am nAChR des elektrischen Organs des Zitterrochens *Torpedo marmorata* erstellt (Unwin 2005).

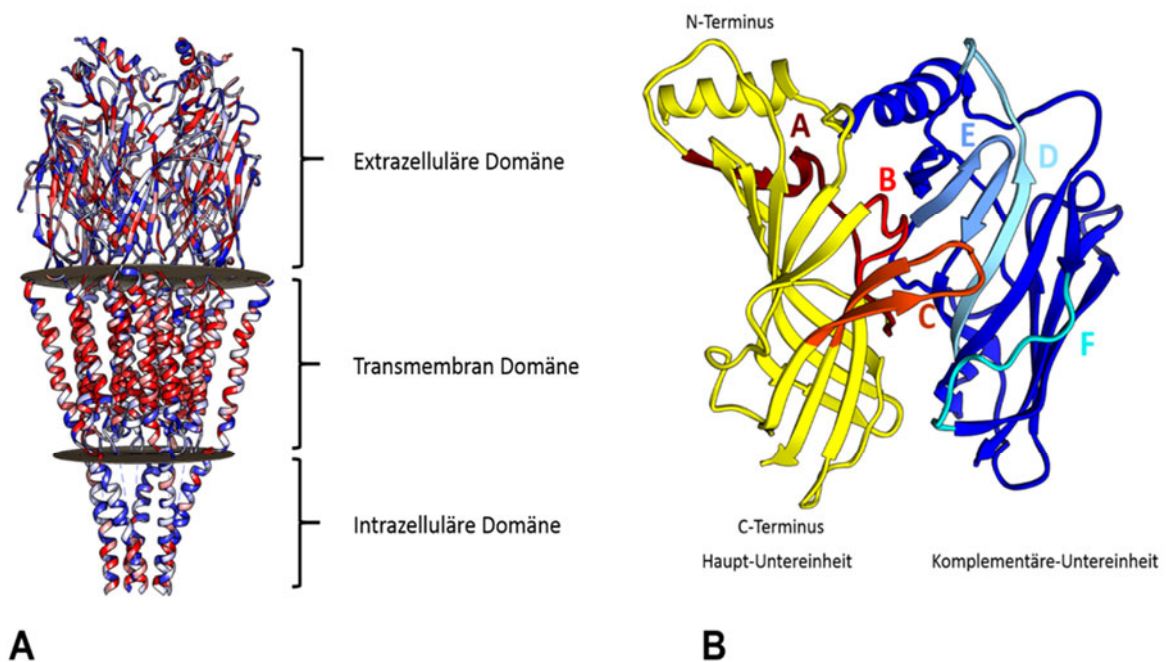


Abbildung 1: Membrangebundener nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor und ein aktives Zentrum der Ligandenbindedomäne. (A) nAChR des Zitterrochens (*Torpedo marmorata*; pdb-ID: 2BG9). Es ist die Hydrophobizität nach der Kyte-Doolittle Skala dargestellt. Dabei markiert die starke blaue Farbe sehr hydrophile Bereiche. Schwache blaue Bereiche sind schwach hydrophil. Die weißen Bereiche sind neutral, während die rosa Bereiche schwach hydrophob, und die stark roten Bereiche stark hydrophob sind. Man kann sehr gut erkennen, dass der Bereich der Transmembran Domäne stark hydrophob wirkt. **(B)** Dimer eines Acetylcholin-Bindeproteins (*Bg-AChBP2*; pdb-ID: 4AOE). Das AChBP besteht aus 5 gleichen Untereinheiten, von denen hier zwei benachbarte gezeigt sind. Die an der Ligandenbindung beteiligten Loops und β -Faltblätter sind farblich herausgestellt. Jeweils eine Haupt-Untereinheit und eine komplementäre Untereinheit bilden in ihrer Mitte die Bindedomäne bestehend aus den drei Loops A,B und C der Hauptdomäne und den drei β -Sheets und Loops E, D und F. (Lage der Loops entnommen aus (Thompson et al. 2010). Beide Untereinheiten sind über Salzbrücken miteinander verbunden (Saur et al. 2012); diese sind hier nicht dargestellt.

3 Acetylcholin-Bindeproteine

Das Acetylcholin-Bindeprotein (AChBP) wurde erstmals bei Untersuchungen der Spitzschlammschnecke *Lymnaea stagnalis* entdeckt (Ls-AChBP), und seine dreidimensionale Struktur wurde kristallographisch aufgeklärt (Brejc et al. 2001; Brejc et al. 2002). Es handelt sich hierbei um ein strukturelles und funktionelles Homolog der Ligandenbindedomäne eines $\alpha 7$ -nAChR-Homopentamers (neuronaler Typ). Wegen ihrer Wasserlöslichkeit spielen die Acetylcholin-Bindeproteine seither eine große Rolle bei Studien zur nAChBP-LBD-Funktion. Da die AChBPs aus fünf gleichen Untereinheiten bestehen, können sie gleichzeitig bis zu fünf Liganden binden.

AChBPs wurden bisher außer bei *L. stagnalis* bei folgenden Schnecken nachgewiesen und detailliert untersucht: dem Kalifornischen Seehasen *Aplysia californica* (Hansen et al. 2005), dem Japanischen Meerohr *Haliothis discus hannai* (Huang et al. 2009) der Süßwasser-Lungenschnecke *Bulinus truncatus* (Celie et al. 2005) und der Posthornschnecke *Biomphalaria glabrata* (Saur et al. 2012). Es kommt aber auch bei der Muschel *Pinctada fucata* vor (Ma et al. 2007), sowie bei dem Anneliden *Capitella teleta* (McCormack et al. 2010; Billen et al. 2012). Von einem ähnlichen Protein bei der mittelamerikanischen Kammspinne *Cupiennius salei* wurde berichtet (Torkkeli et al. 2015). Obwohl die Sequenzen der Acetylcholin-Bindeproteine insgesamt nur mäßig mit denen der Acetylcholin-Rezeptoren übereinstimmen, sind alle wichtigen Bereiche konserviert, vor allem auch die für die Ligandenbindung notwendigen aromatischen Aminosäuren sowie die Tertiärstruktur. Da es sich um ein wasserlösliches Protein handelt, ist es viel einfacher zu kristallisieren als der membrangebundene Rezeptor. Durch die strukturelle Homologie können die gewonnenen funktionellen Ergebnisse sehr gut auf den Rezeptor übertragen werden (Smit et al. 2003).

Das von unserer Arbeitsgruppe untersuchte *Bg*-AChBP der planorbiden Schnecke *Biomphalaria glabrata* zeigt eine auffällige Besonderheit: Hier kommt das AChBP nicht nur als Homopentamer, sondern darüber hinaus als Homo-Dodekaeder vor, indem sich zwölf Homopentamere entsprechend zusammenlagern (Saur et al. 2012).

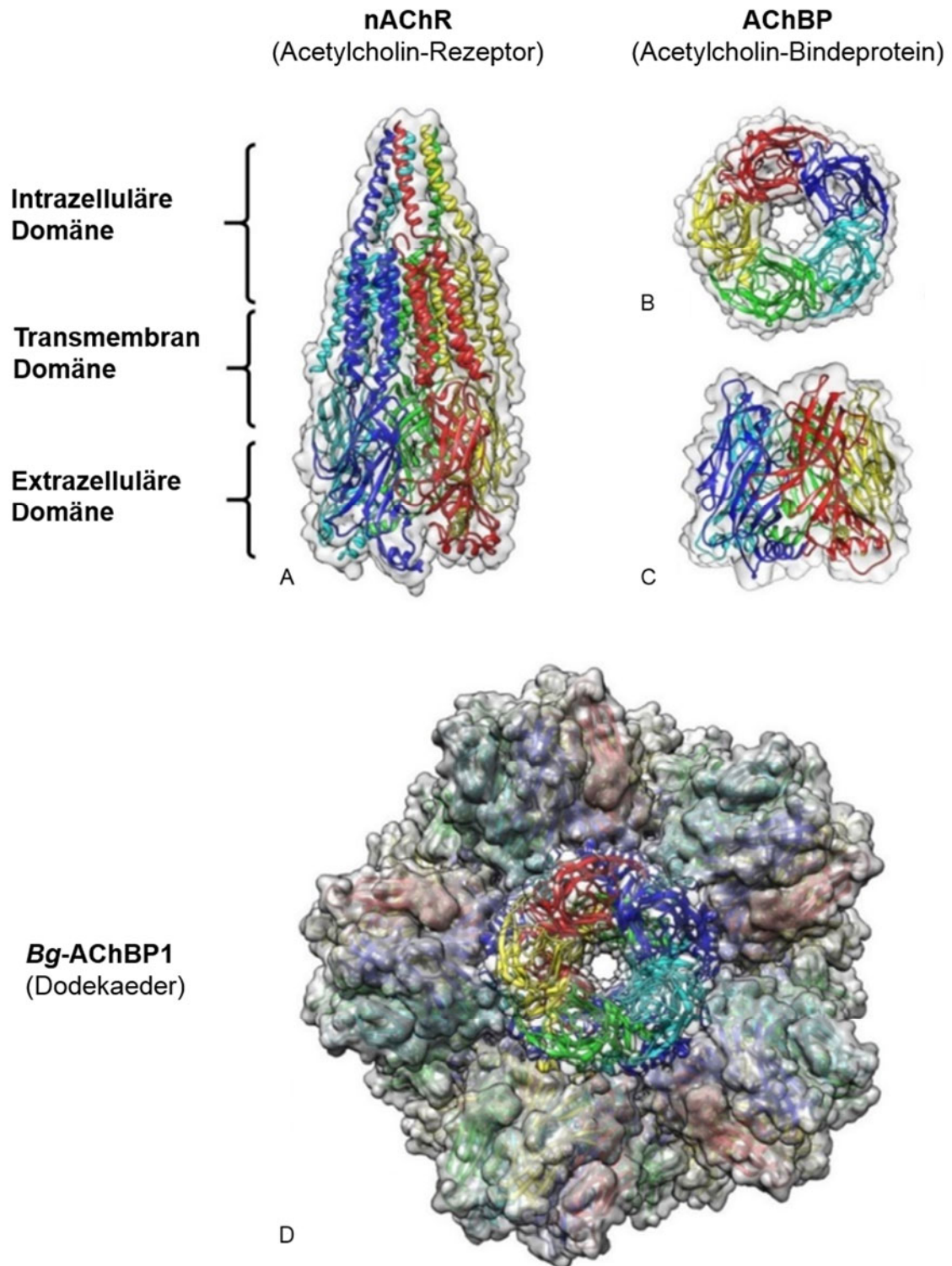


Abbildung 2: nAChR-Pentamer, AChBP-Pentamer und AChBP-Dodekaeder. (A) nikotinischer Acetylcholinrezeptor. (B,C) AChBP ist ein Homopentamer, bestehend aus fünf $\alpha 7$ -Untereinheiten ((B) Aufsicht, (C) Seitenansicht). Es ist funktionell und strukturell ein Homolog der extrazellulären Ligandenbindedomäne (LBD) des nAChR. (D) *Bg*-AChBP1-Dodekaeder aus zwölf Homopentameren (pdb-ID: 4AOD, EMBD : 2055).

3.1 Das aktive Zentrum

Bei den Acetylcholin-Bindeproteinen befinden sich die Ligandenbindestellen wie bei allen Cys-loop-Rezeptoren jeweils zwischen zwei benachbarten Untereinheiten, die dazu jeweils eine prinzipielle Seite und eine komplementäre Seite beitragen (Abb. 3B). Dieses aktive Zentrum wird unter anderem von fünf aromatischen Aminosäuren gebildet. Von Art zu Art unterscheiden sich diese Aminosäuren etwas in ihrer Position und der Aminosäure selbst (Tab. 1). Während der Ligandenbindung werden die beteiligten Aminosäuren näher an den Liganden herangezogen. So kommt es, besonders im Bereich des C-loop, zu einer Konformationsänderung. Der C-loop klappt wie eine Tür nach innen, zum Protein hin (Celie et al. 2004).

Tabelle 1: Die an der Ligandenbindung beteiligten aromatischen Aminosäuren der AChBPs dreier Mollusken im Vergleich.

<i>Bg</i> -AChBP1 (Saur et al. 2012)	<i>Bg</i> -AChBP2 (Saur et al. 2012)	<i>Ls</i> -AChBP (Celie et al. 2004)	<i>Ac</i> -AChBP (Hansen et al. 2005)
TRP 55 (W)	TRP 55 (W)	TRP 53 (W)	TYR 55 (Y)
PHE 92 (F)	TYR 92 (Y)	TYR 89 (Y)	TYR 93 (Y)
TRP 146 (W)	TRP 146 (W)	TYR 185 (Y)	TYR 188 (Y)
TYR 186 (Y)	TYR 186 (Y)	TRP 143 (W)	TRP 147 (W)
TYR 193 (Y)	Phe 193 (F)	TYR 192 (Y)	TYR 195 (Y)

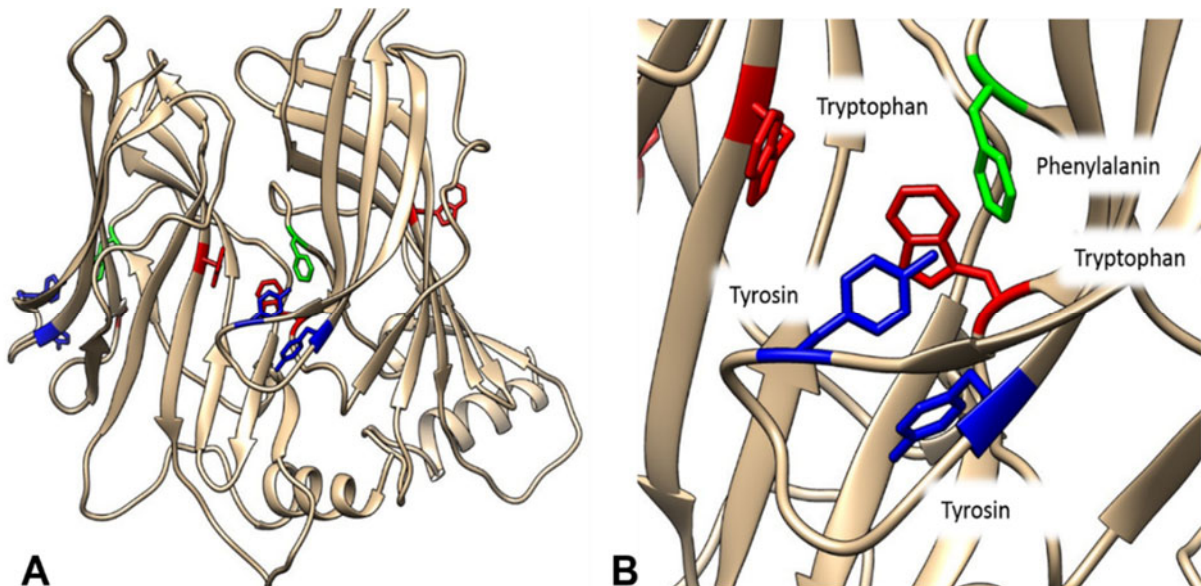


Abbildung 3: Die Ligandenbindestelle von AChBP. (A) zeigt zwei benachbarte Untereinheiten von *Bg*-AChBP. (B) Die an der Ligandenbindung beteiligten aromatischen Aminosäuren (*Bg*-AChBP1 pdb-ID: 4AOD).

3.2 Acetylcholin-Bindeproteine bei den Planorbidae

Innerhalb der Familie der Planorbidae, den Tellerschnecken, wurde AChBP zuerst bei *Bulinus truncatus* entdeckt und genauer untersucht; allerdings handelt es sich hier um ein Pentamer (Celie et al. 2005). Rosettenförmige Proteine mit 20-25 nm Durchmesser, wurden schon früh bei mehreren Planorbiden inklusive *Biomphalaria glabrata* mittels Elektronenmikroskopie in der Hämolymphe gesehen (Wood und Mosby 1975) und von Lieb et al. (2006) erstmalig näher biochemisch charakterisiert („Rosettenprotein“), aber erst Saur et al. (2012) erkannten sie als dodekaedrische AChBPs. Dabei ist zu bemerken, dass die Hämolympheproteine dieser Planorbiden zu ca. 95% aus einem multimeren Hämoglobin bestehen, dass von Lieb et al (2006) näher charakterisiert wurde. In *B. glabrata* kommen zwei AChBP-Isoformen als Homo-Oligomere vor, deren Polypeptidketten aus jeweils 205 Aminosäuren bestehen. Die Molekülmasse beträgt laut Sequenz 25 kDa (ca. 31 kDa im natürlichen glykosylierten Zustand). Während die Isoform *Bg*-AChBP1 sicher Dodekaeder bildet, weil sie dies in rekombinanter Form ebenfalls macht, ist das bei *Bg*-AChBP2 nicht klar: Hier ergibt das rekombinante Protein lediglich Pentamere und eventuell Dipentamere (Abb. 4, (Saur et al. 2012)). Das Auftreten von Dipentameren wird von einem verwandten Protein berichtet, dem Amorphes-Calciumcarbonat-Bindeprotein (ACCBP) (Ma et al. 2007; Huang et al. 2009). Die Hämolymphe von *B. glabrata* besteht allerdings zum größten Teil aus Hämoglobin. Lediglich 5% der Hämolymphe bestehen aus Hämocyanin, Glykogen alpha-Rosetten und den Acetylcholin-Bindeproteinen (Lieb et al. 2006).

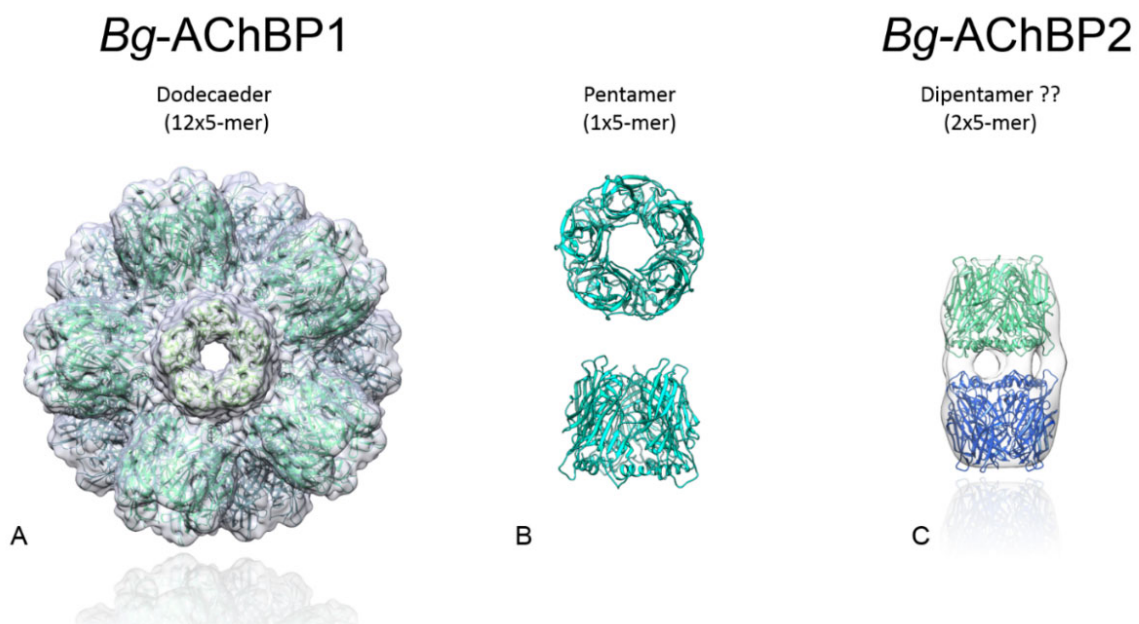


Abbildung 4: Die zwei Isoformen des *Bg*-9AChBP. Beide Isoformen kommen in ihrer Grundstruktur, dem Pentamer vor. **(A)** *Bg*-AChBP1 lagert sich zusätzlich zu einem Dodekaeder zusammen. **(B)** *Bg*-AChBP2 kann möglicherweise ein Dipentamer ausbilden; inwieweit es im Tier auch als Dodekaeder vorkommt ist unklar (Saur et al. 2012).

3.3 Mögliche biologische Funktionen von *Bg*-AChBP

Bisher wurden den Acetylcholin-Bindeproteinen drei sehr verschiedene biologische Funktionen zugeschrieben (Abb. 5).

- Als Hauptfunktion gilt die Modulation der Erregungsübertragung am synaptischen Spalt durch die reversible Bindung von Acetylcholin (Smit et al. 2001).
- Einige AChBPs sind in der Lage, amorphes Calciumcarbonat zu binden und spielen wohl eine Rolle bei der Schalenbildung der Schnecken bzw. der Mollusken. Man bezeichnet diese Varianten als ACCBPs (Amorphes-Calciumcarbonat-bindende Proteine) (Ma et al. 2007; Huang et al. 2009; Su et al. 2013).
- Da einige Giftstoffe wie z.B. Curare oder Conotoxin als Antagonisten irreversibel an den nAChR binden und diesen damit funktionell ausschalten, wurde die Bindung verschiedener pflanzlicher Giftstoffe (Algen-Phytotoxine) an AChBP getestet. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass AChBP in der Lage ist, Phytotoxine zu binden und so die Tiere vor einer möglichen Vergiftung schützen könnte (Bourne et al. 2010).

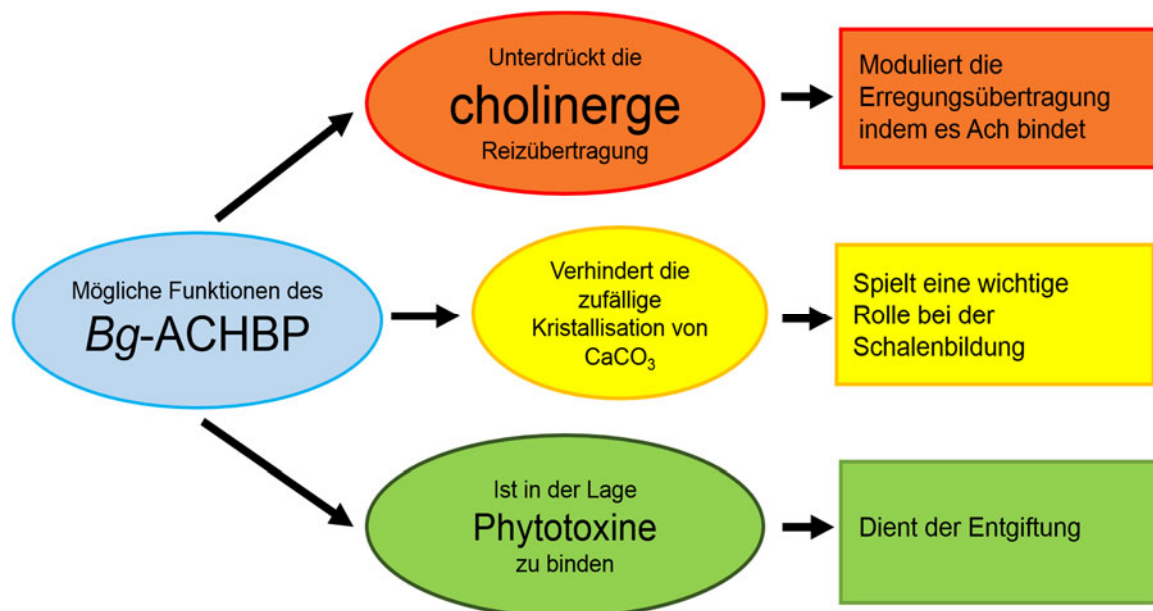


Abbildung 5: Schematische Darstellung: Drei mögliche Funktionen der Acetylcholin Binde-Proteine. Einfluss auf die Reizübertragung zwischen Prä- und Postsynapse im synaptischen Spalt (rot). Einfluss auf die Kristallisation des Calciumcarbonats bei der Schalenbildung (gelb), und die Rolle der Entgiftung bei der Aufnahme von Phytotoxinen durch die Nahrung (grün).

3.4 Die Rolle des AChBP bei der synaptischen Signaltransduktion

An chemischen Synapsen erfolgt die Übertragung eines Signals mithilfe von Neurotransmittern. Diese werden an der präsynaptischen Membran ausgeschüttet, diffundieren durch den synaptischen Spalt und binden an den entsprechenden Rezeptor der postsynaptischen Zelle. Handelt es sich bei diesem Rezeptor um einen Ionenkanal, wird dieser geöffnet. Ionen können dabei selektiv ein- oder ausströmen. Hierdurch wird die Antwort der postsynaptischen Zelle ausgelöst. Man unterscheidet hierbei Anionen- und Kationenkanäle. Um das aktive Signal zu beenden, muss der Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Dies geschieht bei vielen Tieren auf zweierlei Weise: Entweder wird der Neurotransmitter von der präsynaptischen Zelle wieder aufgenommen oder er wird durch spezifische Enzyme gespalten und somit inaktiviert. Dies geschieht im Falle des Acetylcholins durch das Enzym Acetylcholinesterase. Ein dritter Weg existiert bei Gastropoden: Ihre Gliazellen sind in der Lage, aktiv die Erregungsübertragung zu regulieren, indem sie ein AChBP in den synaptischen Spalt sezernieren, der Acetylcholin reversibel bindet (Abb. 6). Da die Acetylcholinesterase nur freies Acetylcholin hydrolysiert, wird angenommen, dass es sich bei dem beschriebenen Mechanismus um eine Art Puffersystem handelt (Smit et al. 2001; Smit et al. 2003). Die Gliazellen der Mollusken verteilen sich gleichmäßig über das gesamte Gehirn, sie variieren allerdings in ihrer Dichte und Regional in der Art ihrer Subtypen. Daher wird vermutet, dass es lokal begrenzte Unterschiede im Einfluss von AChBP auf die Signaltransduktion gibt (Smit et al. 2003).

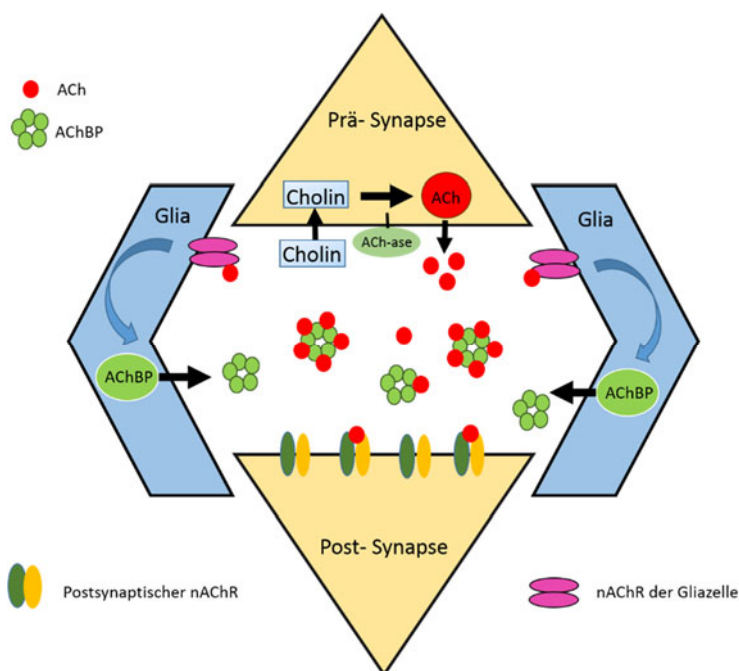


Abbildung 6: Regulation der Erregungsübertragung im synaptischen Spalt durch das AChBP. Acetylcholin (ACh) wird von der Präsynapse in den synaptischen Spalt abgegeben und bindet an den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (nAChR) an der Postsynapse. Wird eine gewisse Ach-Konzentration überschritten, beginnt die Acetylcholinesterase (Ach-ase) Acetylcholin in Cholin und Essigsäure zu spalten. ACh bindet auch an einen nAChR der Gliazellen. Diese beginnen daraufhin mit der Freisetzung von AChBP. AChBP kann überschüssiges ACh reversibel binden, und wirkt so als eine Art Puffersystem (Smit et al. 2001).

4 Zur Anatomie der Posthornschnecke *B. glabrata*

Als Schnecke weist *B. glabrata* eine charakteristische Gliederung in Kopf, Fuß, Mantel und Eingeweidesack auf (Abb. 7A). Dabei ist der Eingeweidesack langgestreckt und spiralg in einem Gehäuse eingerollt. *B. glabrata* ist eine linksgewundene Schnecke. Der Cephalopedalcomplex trägt vorne eine Mundöffnung. Zur Nahrungsaufnahme besitzt *B. glabrata* eine sogenannte Rassel- oder Reibezunge (Radula), diese dient dem Zerkleinern der Nahrung (Abb. 7B). Der anschließende Oesophagus-Magen-Darmtrakt beschreibt eine Schleife, da Anfang und Ende zur Gehäuseöffnung hin orientiert ist. Unter der Schale befindet sich eine sogenannte Pseudokieme (Abb. 7C). Es handelt sich hier um eine Ausstülpung des Mantels durch das Atemloch, welches dem Gasaustausch dient. *B. glabrata* ist ein Zwitter. Links neben der Pseudokieme befindet sich unter dem Mantelrand die kleine weibliche Geschlechtsöffnung, etwas weiter vorne das Gonotrema, die äußere männliche Geschlechtsöffnung (Abb. 7B). Sie besitzen ein zweikammriges Herz. Im Dach der Mantelhöhle befindet sich ein dichtes Netz aus feinen Kapillaren, die dem Gasaustausch dienen. Zum zentralen Nervensystem zählen mehrere Nervenknoten, sogenannte Ganglien. Cerebral- Pedal- und Pleuralganglion sind in einem gemeinsamen Schlundring konzentriert. In der Mitte befindet sich das Cerebralganglion, welches als Koordinationszentrum dient. Zum Fuß hin verläuft das sogenannte Fußganglion (Pedalganglion). Das Pleuralganglion ist mit Cerebral- und Pedalganglion verbunden. Zur Seite der Mundhöhle und zum Vorderdarm hin verläuft außerdem das Buccalganglion (Abb. 7D). Der Boden der Mantelhöhle ist durch eine Längsfurche zweigeteilt. Links davon befindet sich die sogenannte Rektalleiste, deren Funktion bisher noch nicht bekannt ist. Im Bindegewebe des Mantels befinden sich runde Körperchen, welche bereits 1977 von Sminia et al., an Untersuchungen der Schnecke *Lymnaea stagnalis* beobachtet und als Calciumcarbonat-Zellen beschrieben wurden. Diese Zellen enthalten sehr große Vakuolen, welche mit Calcium, Magnesium, Carbonat und Phosphat gefüllt sind. Sie dienen höchstwahrscheinlich dem Transport und der Lagerung. Da die gefüllten Vakuolen sehr hart sind, werden oft die gesamten Zellen bei der Präparation für die Elektronenmikroskopie, der chemischen Fixierung, aus dem Gewebe herausgelöst und erscheinen als runde Löcher.

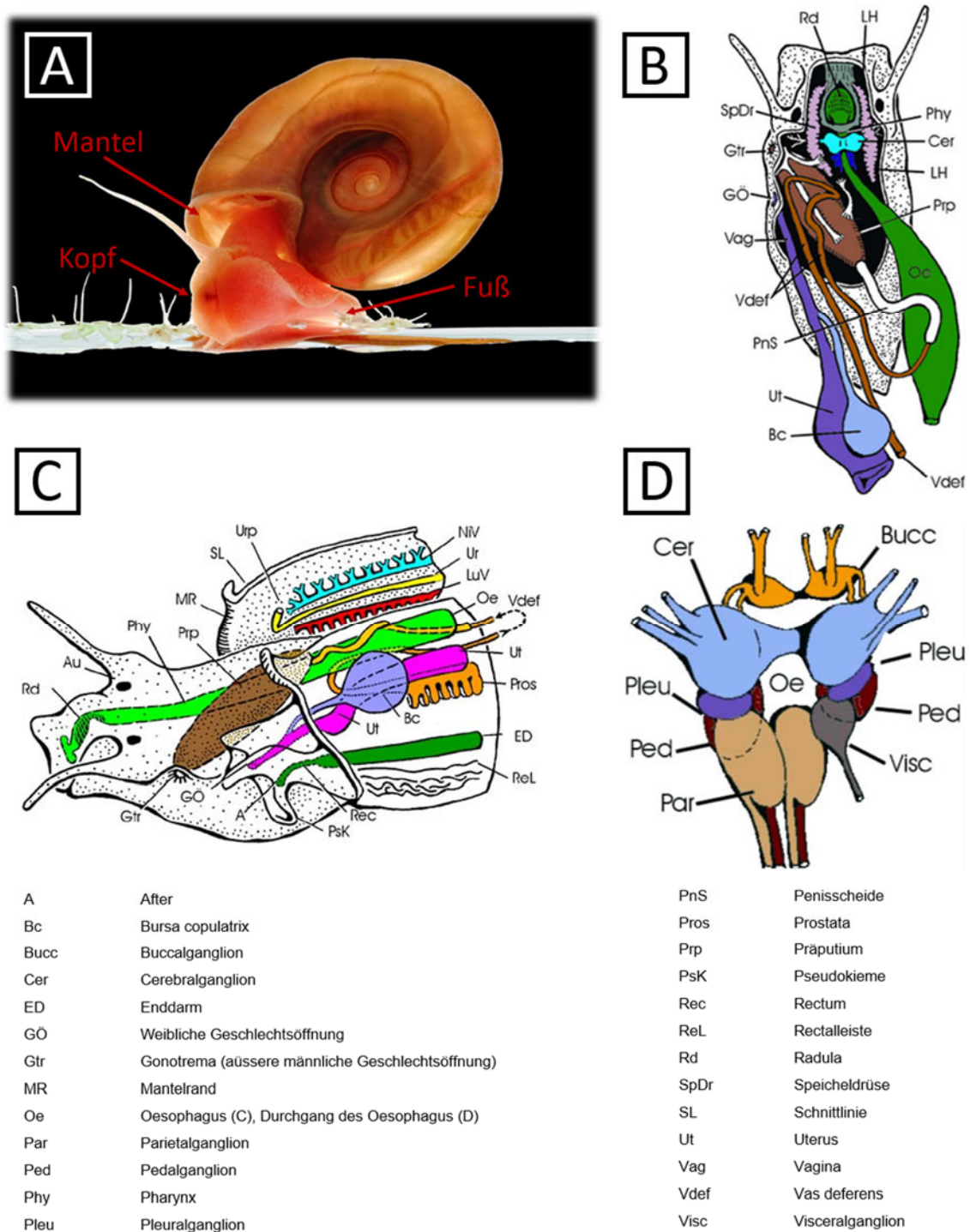


Abbildung 7: Körperbauplan von *Biomphalaria glabrata*. (A) Fotografie von C. Kühne, AG Markl. Der Körper der Schnecke kann in Kopf, Fuß, Mantel und Eingeweidesack unterteilt werden. Der Eingeweidesack ist vollkommen von der Schale bedeckt und daher nicht zu sehen. (B) Übersicht der inneren Organe, Verdauungstrakt und Fortpflanzungsorgane. Im oberen Teil des Kopfes sind das Cerebralganglion und die Radula mit anschließendem Oesophagus zu erkennen. Dieser wird begleitet von seitlich nach hinten verlaufenden Speicheldrüsen. Links neben dem Oesophagus sind die Geschlechtsorgane zu erkennen. (C) zeigt den Cephalopedalkomplex. Das Manteldach ist geöffnet. Die männliche Geschlechtsöffnung (Gtr) befindet sich hinter dem linken Fühler. Als Ausstülpung des Mantels ist die sogenannte Pseudokieme zu sehen (PsK). Sie dient der Osmoregulation und dem Gasaustausch. In (D) ist eine Übersicht des Ganglienkomplexes dargestellt. Der Schlundring bestehend aus Cerebral-Pedal- und Pleuralganglion. Am vorderen Ende befinden sind die Buccalganglien, diese verlaufen nach vorne zur Mundhöhle hin. (Grafiken B, C und D entnommen aus: WENK & RENZ Parasitologie Biologie der Humanparasiten Georg Thieme Verlag 2003 ISBN 3-13-135461-5).

(<https://www.vektorbiologie.uni-tuebingen.de/buch/index.htm>, <http://www.parasitologie-wenk-renz.de/ts/index.html>).

5 Zur Bildung der Schale während der Embryonalentwicklung

Bereits vor über hundert Jahren wurde die „Entwicklung der Tellerschnecke“ von Carl Rabl beschrieben. Er unterteilte die Embryonalentwicklung in drei Perioden. In der ersten Periode beschreibt er den Beginn der Embryonalentwicklung bis zur Bildung der Keimblätter. Dann in der zweiten Periode die Bildung der Keimblätter bis zur Störung der bilateralen Symmetrie. In der dritten und letzten Periode beschreibt er nun das Ende der Embryonalentwicklung. In diesem Stadium werden die Organe und die Schale ausgebildet. Die erste gebildete Schale wird als dünnes, strukturloses Häutchen beschrieben. Nach und nach nimmt das ektodermale Schalenfeld an Größe zu. Das Material zum Aufbau der Schale stammt aus der sogenannten Schalendrüse, eine dickwandige Einsenkung des Ektoderms. (Rabl 1879). Die Schalenbildung während der Embryonalentwicklung von *Biomphalaria glabrata* wurde dann 1991 mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden untersucht (Bielefeld und Becker 1991). Nach Befruchtung der Eizelle entwickelt sich eine Larve. Ab einem Stadium von ca. 35 Stunden konnte eine Invagination der Larve beobachtet werden, ab hier beginnt die Bildung der Schale. Schon ab 40 Stunden ist dann die erste Schicht des Periostracum zu erkennen. Calcium konnte bereits ab einem Stadium von ca. 45 Stunden detektiert werden. Nach der Entwicklung der Mantelhöhle, ab etwa 60 Stunden, werden weitere fächerförmige Einheiten an die äußere Schicht des Periostracum angeschlossen. Ab einem Alter von 65 Stunden beginnen die Torsion und die charakteristische Windung der Schale. Nach einem Alter von ca. fünf Tagen schlüpfen die Larven schließlich und verlassen die schützende Hülle (Bielefeld und Becker 1991).

6 Die Schale der Schnecken

Limnische Schnecken benötigen einen gewissen Gehalt an Calcium und Magnesium-Ionen in ihrer Umgebung um erhebliche Mengen an Calciumcarbonat zu binden (WENK & RENZ Parasitologie Biologie der Humanparasiten). Die Schale der Mollusken besteht im Wesentlichen aus drei Schichten. Einem Periostracum, welches als Schutzschicht die Schale nach außen hin begrenzt, und zwei Schichten mineralisierter CaCO_3 -Kristalle. Die Schalenhaut oder Periostracum besteht vor allem aus Conchin (Abb. 8). Dieses Proteingemisch hat ähnliche mechanische und chemische Eigenschaften wie z.B. das Keratin der Haare. Die Schalenhaut stellt einen wirksamen Schutz gegen Korrosion dar. Das darauffolgende Ostracum besteht aus einer Prismen- und einer Scheibenschicht. Diese bestehen zum größten Teil aus Aragonit. Nach innen wird die Schale durch das Hypostracum begrenzt. Das Gehäuse der Schnecken kann in zwei unterschiedliche Bereiche eingeteilt werden. Zum einen in einen festen kristallinen Bereich, der zum großen Teil aus Aragonit und anderen Calciumcarbonat-Modifikationen besteht, und zum anderen aus einer organischen Matrix. Die organische Matrix besteht aus Polysacchariden, Proteinen, Glykoproteinen, Proteoglykanen oder Glycosaminoglykanen. Diese Matrix kann wiederum in zwei weitere Fraktionen eingeteilt werden, eine wasserlösliche und eine nicht wasserlösliche. Die Matrix scheint einen Einfluss auf die Bildung der verschiedenen Calciumcarbonat-Polymorphe zu haben. Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass die adulte Schale bei einigen marinen Gastropoden, wie den tropischen Schnecken *Cypraea leviathan*, *Phalium granulatum* und *Lobatus gigas* hauptsächlich aus Aragonit besteht. Ein kleinerer Teil, ca. 1,5% der Schale, besteht aus Vaterit. Je älter die gebildete Schale, desto niedriger der Vaterit-Anteil (Hasse et al. 2000). Es wird angenommen, dass die organische Matrix möglicherweise mittels Säuregruppen, aber auch mittels Phosphat- und Sulfatgruppen mit Calciumcarbonat in Wechselwirkung tritt (Marxen et al. 1998). In diesem Zusammenhang spielt der mit Extrapallialflüssigkeit gefüllte schmale Raum zwischen Schale und Mantel eine besondere Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteine, welche sich in diesem wässrigen Raum befinden, sowohl die Morphologie des Gehäuses als auch den Phasenwechsel der verschiedenen CaCO_3 -Kristallstrukturen beeinflussen können, indem sie selektiv z.B. Aragonit oder Calcit binden (Xie et al. 2016). Auch die Präzipitationsrate des Calciumcarbonats wird durch diese Proteine beeinflusst. Experimente an der Perlauster *Pinctada fucata* haben gezeigt, dass der tägliche Entzug dieser wässrigen Schicht die Schalenbildung erheblich stört (Xie et al. 2016). Viele Proteine sind ganz direkt an Biomineralisations-Prozessen beteiligt. Perlucin beeinflusst z.B. die Bildung von Calcit in der Perlmutschicht bei Muscheln. Aber solche Proteine sind nicht nur bei Mollusken bekannt, auch in der Eierschale von Gänsen wird Calcit durch den Einfluss von einem Protein namens Ansocalcin gebildet (Arakaki et al. 2015).

Bei *Biomphalaria glabrata* konnten bereits Proteine in der Schalenmatrix nachgewiesen werden, welche möglicherweise einen Einfluss auf die Schalenbildung haben. Aber um welche Proteine es sich dabei genau handelt ist noch nicht geklärt. Eines dieser Proteine hat eine Molekülmasse von 19,6 kDa und wurde als Dematopontin identifiziert (Marxen et al. 2003).

Wie Vorversuche in unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, sind in der Extrapallialflüssigkeit auch AChBP-Dodekaeder vorhanden und daher möglicherweise in der Lage, die Kristallisation von CaCO_3 zu beeinflussen. Welche CaCO_3 -Modifikation in die Schale eingebaut wird, bestimmen offenbar Proteine innerhalb der wasserunlöslichen Matrix der Schale.

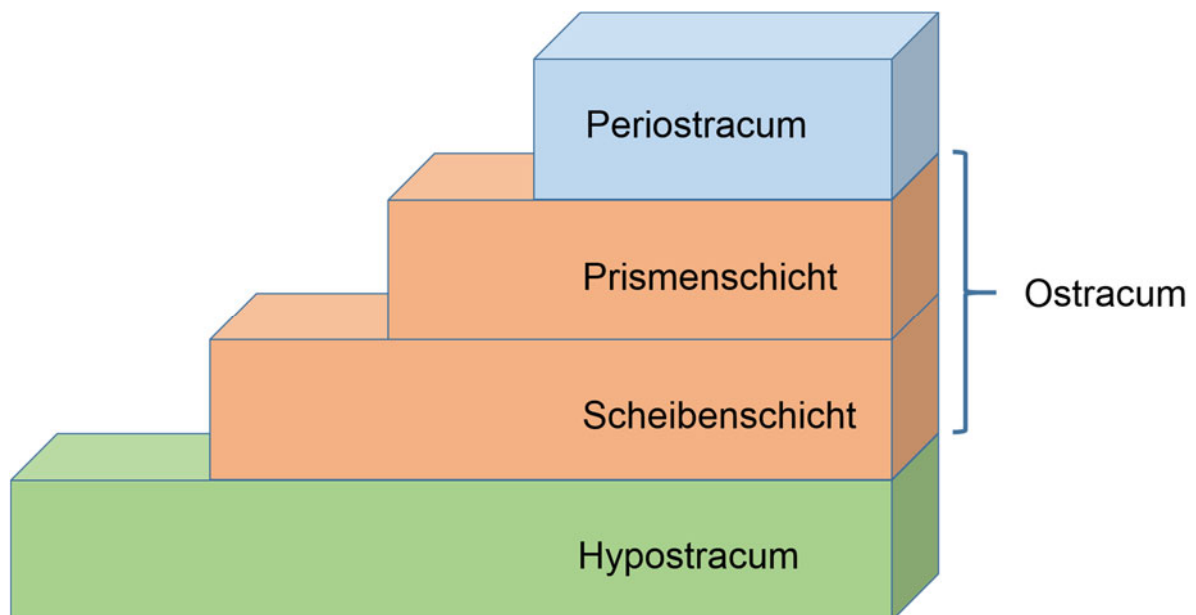


Abbildung 8: Schematische Darstellung der grundlegenden Schichten der Schneckenhausschale: Die Schalenhaut, das Periostracum begrenzt die Schale nach außen hin (**blau**). Das Ostracum bildet einen calciumcarbonatreichen Bereich (**orange**), welcher aus einer Prismenschicht und einer Scheibenschicht besteht. Das Hypostracum begrenzt die Schale nach innen.

7 Die verschiedenen CaCO₃-Modifikationen

Amorphes Calciumcarbonat ist sehr instabil und kommt nur sehr selten in der Natur vor. Einige Organismen haben Mechanismen entwickelt, CaCO₃ in seinem amorphen Zustand zu halten, um dann im Zuge der Biomineralisation organisch-anorganische Hybridmaterialien, mit sehr komplexem Aufbau, zu bilden (Cölfen und Antonietti 2005). Eine Übersicht über die ersten Erkenntnisse zu Biomineralisationsprozessen wurde bereits 1989 veröffentlicht (Lowenstam und Weiner 1989). Der Aufbau und die Bildung sogenannter Einkristalle (Cölfen und Antonietti 2005) wurde bereits bei Cocolithen (Cölfen und Antonietti 2005; Henriksen et al. 2004) und Seeigeln genauer untersucht (Donnay und Pawson 1969). Bei Untersuchungen der larvalen Stadien einiger Muscheln (*Mercenaria mercenaria* und *Crassostrea gigas*) konnte gezeigt werden, dass dabei amorphes Calciumcarbonat als Vorläuferphase von Aragonit bei der Schalenentwicklung dient (Weiss et al. 2002). Amorphes Calciumcarbonat kann zu drei verschiedenen Modifikationen (Polymorphen) auskristallisieren. Zum dem hexagonalen Vaterit, dem rhombischen Aragonit und zu dem trigonalen Calcit. Die Kristallisation erfolgt hierbei stufenweise (Abb. 9). Ausgehend von der amorphen Form wird zuerst Vaterit, dann Aragonit und zuletzt Calcit gebildet. Die unterschiedlichen Modifikationen haben unterschiedliche Materialeigenschaften (Wang et al. 2014). Calcit ist hierbei die stabilste Modifikation, welche auch in der Natur auch am häufigsten zu finden ist. Sie kommt z.B. in Eierschalen (z.B. bei *Gallus gallus* (Reyes-Grajeda et al. 2004)), dem Panzer von Krebschere (z.B. *Homarus americanus* und *Cancer pagurus* (Boßelmann et al. 2007)), bei Seesternen (z.B. bei *Pisaster giganteus* (Gayathri et al. 2007)) oder auch bei Seeigeln (Politi et al. 2004) vor. In Molluskenschalen findet sich überwiegend Aragonit (Dauphin und Denis 2000). Häufig treten Calciumcarbonat-Modifikationen gemeinsam auf. So können Molluskenschalen neben Aragonit auch Calcit sowie geringe Mengen von Vaterit enthalten. Obwohl am Beispiel der Cocolithen bereits deutlich gezeigt werden konnte, dass zur korrekten Kristallisation und Bildung des richtigen Polymorphs organische Gerüste notwendig sind, ist der Einfluss der organischen Matrix, deren genaue Zusammensetzung und der Prozess der Kristallisation noch nicht vollständig erforscht.

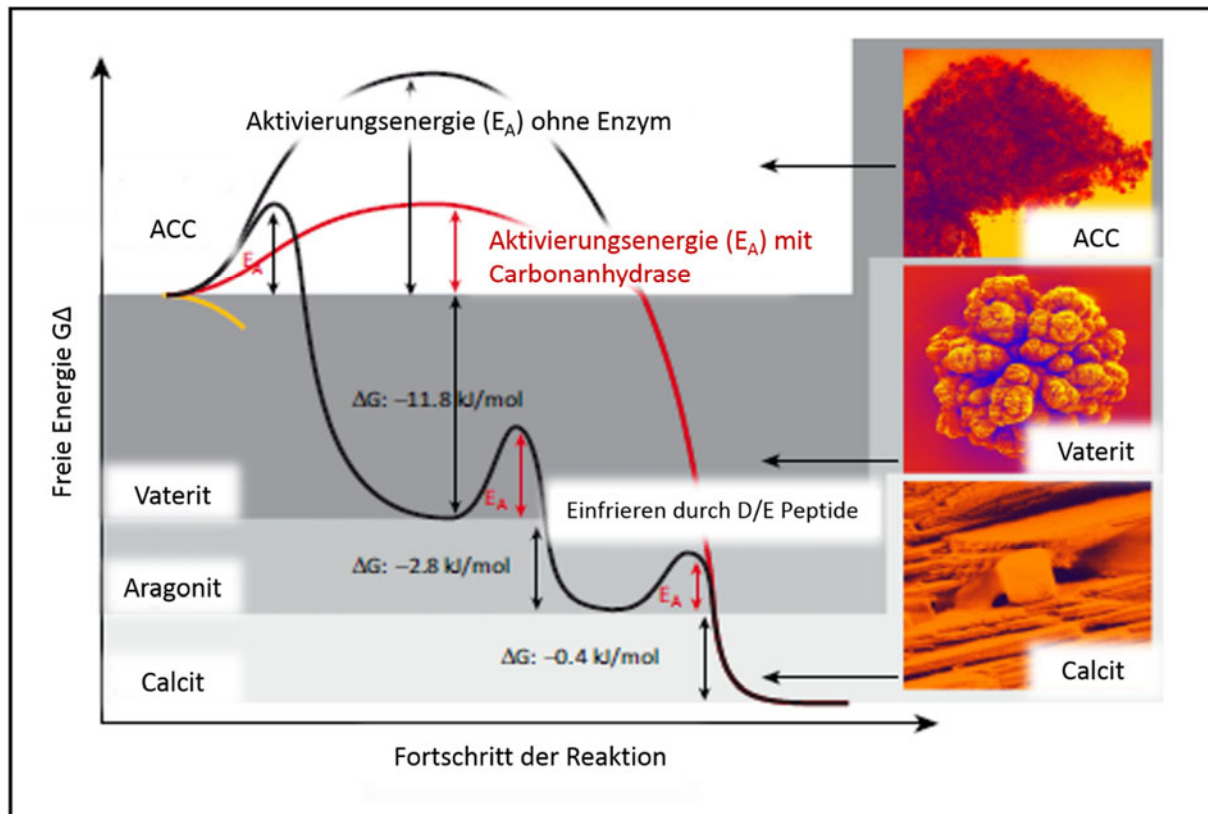


Abbildung 9: Die stufenweise Kristallisation von Calciumcarbonat. Amorphes Calciumcarbonat kristallisiert über Vaterit und Aragonit bis hin zum Calcit. Calcit ist hierbei die stabilste Form der Calciumcarbonat Modifikationen (Verändert nach: Wang X., Schröder H.C., Müller, W.E.G (2014) Trends Biotech 32, Pages 441–447 entnommen).

8 Zielsetzung der Arbeit

Durch 3D-Elektronenmikroskopie und Homologiemodellierung wurde ein detaillierter Einblick in die Struktur der Acetylcholin-Bindeproteine von *Biomphalaria glabrata* gewonnen (Saur et al. 2012). Dies wurde durch rekombinante Expression beider Isoformen und gerichtete Mutagenese flankiert und führte schließlich zu einer 3D-Rekonstruktion des Dodekaeders mit einer Auflösung von 3.7 Å (Dissertation: Rusitzka 2016).

Vor diesem Hintergrund stellte sich im Rahmen meiner Arbeit vor allem die Frage nach gewebespezifischen Expressionsmustern und biologischen Funktionen der beiden Isoformen des AChBP in *B. glabrata*, mit besonderem Augenmerk auf den ungewöhnlichen Dodekaeder und die Unterschiede zwischen *Bg*-AChBP1 und *Bg*-AChBP2. Dabei sollte ich mich auf die ersten beiden bisher diskutierten Funktionen konzentrieren (Rolle im Nervensystem und Rolle bei der Schalenbildung), während eine mögliche Rolle bei der Entgiftung im Rahmen meiner Arbeit nicht untersucht werden sollte.

B Material & Methoden

1 Das Forschungsobjekt: *Biomphalaria glabrata*

1.1 Systematische Einordnung



Abbildung 10: Die Posthornschnecke *Biomphalaria glabrata*.

Stamm:	Mollusca
Klasse:	Gastropoda
Überklasse:	Orthogastropoda
Unterklasse:	Heterobranchia
Überordnung:	Pulmonata
Ordnung:	Basomathophora
Familie:	Planorbidae
Art:	<i>Biomphalaria glabrata</i>

1.2 Lebensweise

Die Posthornschnecke *Biomphalaria glabrata* ist eine Süßwasserschnecke und erreicht im adulten Stadium eine Größe von 1-2 cm. Sie bewohnt ruhige pflanzenreiche Gewässer in den Tropen und Subtropen. Zeitweise können einige dieser Gewässer sogar austrocknen, aber Überschwemmungen machen es möglich, dass die Schnecken diese Gebiete neu- oder wiederbesiedeln. Dies wird durch ihre hermaphrodite Lebensweise begünstigt. Die Schnecken können bis zu 12 Monate alt werden. *Biomphalaria glabrata* gehört zu der Familie der Planorbidae, den Tellerschnecken. Sie verwenden als einzige Familie der Gastropoda Hämoglobin als respiratorisches Protein. Durch den hohen Hämoglobingehalt in ihrer Hämolymphe erscheinen die Tiere rot. Ebenso wie die rote Farbe ist auch das scheibenförmige, linksgewundene Gehäuse ein charakteristisches Merkmal dieser Tiere. Das für Mollusken typische Hämolympheprotein Hämocyanin konnte bei *Biomphalaria glabrata* in geringen Mengen und strukturell „defizient“ nachgewiesen werden. Wegen seiner extrem geringen Menge wird angenommen, dass es nicht am Sauerstofftransport beteiligt ist (Lieb et al. 2006). Die Gattung *Biomphalaria* ist von großer medizinischer Bedeutung als Zwischenwirt und Vektor des Pärchenegels *Schistosoma mansoni*, dem Erreger der Bilharziose.

1.3 Hälterung und Präparation der Tiere

Die Versuchstiere wurden in den institutseigenen Süßwasseraquarien bei einer konstanten Temperatur von 20°C gehalten. Sie wurden 3-4-mal die Woche gefüttert und je nach Größe in verschiedene Anzuchtbecken umgesetzt. Um Eier mit einem definierten Alter zu erhalten, wurden frische Gelege in kleinere, leere Becken umgesetzt. Tag und Uhrzeit der Gelege-Entnahme wurden notiert. Zur Präparation wurden adulte Tiere mit einer Größe von ungefähr 2 cm verwendet. Vor Gewinnung der Hämolymphe wurden die Tiere auf Eis betäubt, anschließend wurde der Fuß mit einer Kanüle penetriert. Die auslaufende Körperflüssigkeit wurde mit einer Pipette aufgefangen. Nach der Entnahme wurden die Tiere durch einen mechanischen Schlag getötet. Die Arbeit mit diesen Gastropoden ist nicht genehmigungspflichtig. Es wurde jedoch sorgfältig darauf geachtet, das mögliche Leiden der Tiere auf ein Minimum zu beschränken.

2 Chemikalien und Geräte

2.1 Allgemeines

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in Analysequalität von folgenden Firmen bezogen: Biozym Scientific GmbH (Hessisch-Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Fluka (Buchs, Schweiz), GE Healthcare (München), Gilson Inc. (Middleton, USA), Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt), Quiagen (Hilden); Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München), und Whatman GmbH (Dassel). Um zu verhindern, dass die Proteine ausfallen, wurden für alle Arbeiten mit Proteinen sogenannte „low bind-tubes for proteomics“ der Firma Eppendorf (Hamburg) verwendet. Die 200 µl PCR-Reaktionsgefäße stammten von Thermo Fischer Scientific (Darmstadt). Die 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße wurden von Brand (Wertheim) und die Petrischalen und Falcons von der Firma Greiner (Heidelberg) bezogen. Die Zentrifugationen wurden in kleinen Tischzentrifugen der Firma Eppendorf (Hamburg; Modelle 5415R und 5424) durchgeführt. Für größere Volumina wurde entweder eine Megafuge (1.0R) von Heraeus (Fulda), oder einer Sorvall Zentrifuge der Firma Du Pont Instruments (Bad Homburg, jetzt Thermo Fischer Scientific; Modell RC-5B) verwendet. Wägearbeiten wurden mit Analyse- und Laborwagen der Firma Mettler (Gießen) durchgeführt. Die Wasserbäder und Heizblöcke stammen von der Firma Julabo (Seebach). Alle pH-Wert Bestimmungen wurden mit dem Digital-pH-Meter 646 der Firma Knick (Berlin) durchgeführt. Zum Sonifizieren der Proben wurde der Ultraschallgenerator Labsonic 1510 der Firma Braun (Melsungen) mit einer Titansonde verwendet. Photometrische Messungen erfolgten mit einem Biophotometer von Eppendorf (Hamburg). Zusätzlich stand ein Nanodrop 1000 der Firma Thermo Fischer scientific (Wilmington, USA) zur Verfügung. Die

Elektrophoresekammern inklusive Zubehör stammten von der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen). Die Apparaturen für die Durchführung der Western-Blots stammten von der Firma cti (Idstein). Für die Polymerase Kettenreaktionen wurden die Thermocycler T Gradient 96 und T Personal combi der Firma Biometra (Göttingen) verwendet. Die Digitalfotos der SDS-Gele wurden mit der Spiegelreflexkamera Canon EOS 1100D angefertigt. Um den Kontrast besser erkennen zu können, wurden sie dabei auf eine Leuchtplatte der Firma Roth (Karlsruhe) gelegt. Die Agarosegele wurden mit einem UV-Transilluminator TFX-20M (Vilber Lorumat GmbH, Eberhard-Zell), und einer Sony XC-75E S/W Kamera der Firma Sony (Berlin) dokumentiert. Alle Gefrierschnitte wurden mit dem Gefriermikrotom HM 500 der MIKROM International GmbH (Waldorf) angefertigt. Zusätzliche Chemikalien und Geräte werden an entsprechender Stelle im Text erwähnt.

2.2 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Bei allen molekularbiologischen und mikrobiologischen Arbeiten, wurden autoklavierte Geräte verwendet (120°C und 1 bar Überdruck). Wenn erforderlich wurde autoklaviertes und entmineralisiertes Wasser verwendet. Bei allen Arbeitsschritten wurden Latex Einmalhandschuhe verwendet. Bei Arbeiten mit Chemikalien wie Acrylamid oder Ethidiumbromid, und den entsprechenden Gelen, wurden Nitril-Handschuhe getragen. Es wurde außerdem darauf geachtet, dass sich Nukleinsäure Lösungen und Enzyme nicht länger als nötig in ungekühltem Zustand befanden.

2.3 Verwendete Antikörper

2.3.1 Herstellung der Antiseren

Die Antiseren wurden von der Firma Charles River-Laboratories (Kißlegg) hergestellt. Hierfür wurden zwei Kaninchen über einen Zeitraum von ca. 2 Monaten immunisiert. Es wurden Injektionen mit rekombinantem *Bg-AChBP1* bzw. *Bg-AChBP2* verabreicht. Die resultierenden Seren konnten dann auf ihre Spezifität hin untersucht werden.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper zum Nachweis von *Bg-AChBP*.

Antikörper	Typ	Verdünnung	Verdünnung	Antigen	Quelle
		Histologie	Biochemie		
anti- <i>Bg-AChBP1</i>	polyklonal/ Kaninchen	1:250	1:10 000	<i>Bg-AChBP1</i>	Charles River- Laboratories (Kißlegg)
anti- <i>Bg-AChBP2</i>	polyklonal/ Kaninchen	1:50	1:10 000	<i>Bg-AChBP2</i>	Charles River- Laboratories (Kißlegg)

2.4 Herstellung von Gefrierschnitten

2.4.1 Schneiden der Gewebeproben

Alle Gefrierschnitte wurden mit dem Gefriermikrotom HM 500 OM der Firma Microm (Waldorf) angefertigt. Im Inneren des Mikrotoms wurde je nach Art und Beschaffenheit des Gewebes eine Boxtemperatur von -23 °C bis -27 °C eingestellt, und eine Objekttemperatur von -20 °C bis -25 °C. Um Eiskristallbildung im Gewebe zu verhindern, wurde ein Gefäß mit Isopentan (2-Methylbutan) in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Gewebeproben wurden schnell in das Gefäß mit Isopentan gegeben, und somit schockgefroren. Das Gefäß mit den jeweiligen Gewebeproben konnte, wenn es nicht sofort verwendet wurde, bei -80 °C aufbewahrt werden. Um die Gefrierschnitte anzufertigen, wurde zunächst ein Stück der Gewebeprobe mithilfe eines Einbettmediums (*Cryo embedding compound, Microm, Waldorf*) auf dem Objektisch des Mikrotoms befestigt. Es wurden die vorgereinigten und gebrauchsfertigen Objektträger *Polysine® Slides* (Menzel Gläser, Thermo Scientific, Gerhard Menzel GmbH Braunschweig) verwendet. Von allen Gewebeproben wurden 5 µm bis 7 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Alle Schnitte wurden abgedeckt, und über Nacht, bei Raumtemperatur trocknen gelassen (Schaffeld und Markl 2004).

2.4.2 Fixierung der Gewebeproben

Um die Wasserlöslichen Proteine im Gewebe zu fixieren, wurde zuerst eine 20 minütige Vorfixierung in Chloroform/ Methanol 2:1, bei -20°C durchgeführt (Paul et al. 1991). Danach erfolgte die eigentliche Fixierung ebenfalls bei -20°C für 10 min. in reinem Aceton. Dann wurden die Schnitte bei Raumtemperatur trocknen gelassen, und mit einem Fettstift (*PAP PEN, Micro-BioTec, Gießen*) umrandet. Jetzt konnten die Schnitte für die *In-situ*-Hybridisierung (B 3.1) oder die Immunfluoreszenzmikroskopie (B 4.1, 4.2) verwendet werden. Eingebettet wurden alle Schnitte in dem Einbettmedium Mowiol® (Schaffeld und Markl 2004).

2.4.3 Herstellung und Verwendung des Einbettmedium (Mowiol®)

Es wurden 6 g Glycerin, 2,4 g Mowiol® und 6 ml H₂Odest. für mindestens 2 Stunden gerührt. Danach wurden 12 ml 0,2 M Tris/Cl Lösung (pH 8,5) dazugegeben, und bei 52 °C weiter über Nacht gerührt. Am nächsten Morgen wurden noch 0,1 % DABCO und die Fluoreszenzmarkierung DAPI (1:1000) hinzugegeben. DAPI lagert sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA an, und ermöglicht es alle Zellkerne sichtbar zu machen. Um ungelöste Partikel zu entfernen wurde es vor Gebrauch bei 5000 rpm, für 20 min., bei 20 °C, in der Heraeus Zentrifuge (Thermo Fischer Scientific) ab zentrifugiert. Zum Einbetten der Gewebeschnitte wurde das Mowiol® mit einer abgeschrägten Pipettenspitze luftblasenfrei auf die Schnitte aufgetragen. Mit 24 x 60 mm Deckgläsern konnten die Schnitte abgedeckt werden.

Um ein Verblässen der Farbstoffe zu verhindern wurden alle Schnitte lichtgeschützt aufbewahrt, und über Nacht trocknen gelassen.

2.4.4 Mikroskopieren und Fotografieren der Gefrierschnitte

Zum Mikroskopieren wurde das Epifluoreszenzmikroskop *Leitz DM BRD* (Leica, Wetzlar) verwendet. Dieses ist mit der Quecksilberhöchstdrucklampe (Hb050) vom Typ L1, und den Objektiven PL Fluotar (10x, 25x, 40x, 65x, 100x) ausgestattet. Die Bilder wurden mit der am Mikroskop angebrachten Kamera (Leica DC 500) aufgenommen, und in das Programm Paint Shop Pro (PSP, Jasc Software, Eden Prairie, Minnesota, USA) eingelesen. Die Bilder wurden im .tiff Format gespeichert.

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 *In-situ*-Hybridisierung zur Lokalisierung der mRNA im Gewebe

Die Methode der *In-situ*-Hybridisierung beruht auf der Paarung von komplementären Basen auf zwei Nukleinsäure Einzelsträngen. Hierbei lag der eine Strang als mRNA in der Gewebeprobe vor, der andere kam von einer zuvor hergestellten, und indirekt mit Dioxigenin markierten Sonde. Die Sonde bestand meist aus DNA, da diese stabiler ist als RNA ist, und sich sehr leicht vermehren lässt. Da DNA doppelsträngig ist, musste diese zuvor denaturiert werden. Das Resultat der *In-situ*-Hybridisierung waren Hybridmoleküle aus der mRNA der Gewebeprobe, und der cDNA (complementary DNA) der hergestellten Sonde. Durch die Dioxigeninmarkierung war es möglich, diese Hybridmoleküle mittels anti-Dioxigenin Antikörpern zu lokalisieren und durch eine Farbreaktion bildlich darzustellen.

3.1.1 Herstellung Isoform spezifischer Sonden

Primerdesign

Alle für meine Arbeit verwendeten Primer Sequenzen wurden mit dem Programm GENEIOUS Version 8 (Kearse et al. 2012) angefertigt und überprüft. Die isoform-spezifischen Sonden wurden mit Hilfe von Frau Dr. Julia Markl am Institut für molekulare Physiologie erstellt. Bei der Primer-Auswahl wurden folgende Punkte beachtet:

- Die Olinukleotide sollten optimaler Weise eine Länge von 15 bis 25 Basen haben.
- Der CG-Gehalt sollte zwischen 40% und 60% betragen.
- Die Primer sollten nicht selbstkomplementär sein.
- Sie sollten keine Haarnadelstrukturen ausbilden.
- Es sollte keine Komplementarität zwischen dem *forward*- und dem *reverse*-Primer geben.

- Die Anlagerungstemperaturen der Primer-Paare sollten zueinander passen.

Alle Primer wurden von der Firma Sigma- Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Sie wurden in einer Konzentration von 100 μM in doppeltdestiliertem Wasser gelöst, und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Für die Polymerase-Kettenreaktionen wurden jeweils 10 pmol *forward*- und *reverse*- Primer eingesetzt.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein enzymabhängiges Verfahren mit welchem sich definierte Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Abschnitte amplifizieren lassen. Künstliche, selbst konzipierte Olinukleotid-Primer, dienen dabei als Ausgangspunkt für die DNA-Polymerase und definieren somit den zu amplifizierenden Bereich. Die PCR besteht aus mehreren aufeinander folgenden Schritten:

- **Der Denaturierung:** Durch eine Temperaturerhöhung auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ wird die DNA denaturiert, indem die Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen aufgespalten werden. Die Nukleinsäure liegt danach einzelsträngig vor.
- **Der Primerbindung:** Die Temperatur wird abgekühlt, auf die für die Primer optimale Anlagerungs-Temperatur. Die Primer binden jeweils an das 3'-Ende der Gensequenz.
- **Die Verlängerung:** Während der Polymerase-Bindung und der DNA-Synthese synthetisiert die DNA-Polymerase bei einer Temperatur von $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ vom Primer ausgehend in Richtung 5'-Ende den komplementären Strang.

Der Ablauf dieser 3 Punkte kann so lange wiederholt werden, bis die benötigte DNA-Menge hergestellt ist. So entstehen exponentiell DNA-Fragmente in einer bestimmten Menge. Die Glycerin-Kulturen der verwendeten Plasmide, welche die beiden *Bg*-AChBP Isoformen enthielten, stammten aus dem arbeitsgruppeneigenen Kühlvorrat, und wurden im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. Vanessa Möller erstellt.

3.1.3 Die Taq™ DNA Polymerase von Invitrogen (Darmstadt)

Die Taq-Polymerase ist die thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (Taq), aus welchem sie ursprünglich isoliert wurde. Sie ist außerordentlich hitzebeständig und hat ein Temperaturoptimum welches bei 72°C liegt. Es wurden unterschiedliche Enzym-, MgCl_2 - und dNTP- Konzentrationen getestet um die optimalen Bedingungen für die jeweilige Reaktion zu ermitteln.

Tabelle 3: Verwendete Komponenten um die Größe der Plasmid DNA zu kontrollieren.

Dream Taq™ Green PCR Master Mix	5 µl
<i>forward</i> Primer	1 µl
<i>reverse</i> Primer	1 µl
Plasmid DNA	0,5 µl
H ₂ O	2,5 µl

Tabelle 4: PCR Programm zur Größenkontrolle der Plasmid DNA.

Denaturierung	95°C; 2 min	
Denaturierung	95°C, 10 s	} 30 mal
Anlagerung der Primer	60°C (<i>Bg</i> -AChBP1), 64°C (<i>Bg</i> -AChBP2); 30 s	
Elongation	72°C; 30 s	
Finale Elongation	72°C, 10 min	
Kühlung	4°C	

Alle Schritte der Polymerase-Kettenreaktion wurden vollautomatisch in dem Thermocycler T Gradient 96 der Firma Biometra (Göttingen) durchgeführt.

3.1.4 Die Dioxigenin- Markierung

Nachdem die Größe des Plasmids kontrolliert wurde, konnten die Sonden hergestellt werden. Hierzu wurden die mit Dioxigenin markierten dNTPs (DIG-dNTPs, Roche Mannheim) verwendet. Spezifische anti-Dioxigenin Antikörper (*Anti-DIG-AP Fab-fragments*, Roche Mannheim) mit alkalischer Phosphatase konnten so an die jeweiligen Sonden gebunden werden und durch die Zugabe des Substrates BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indoxylphosphat) und dem Redox-Farbstoff NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid), als violette bis blaue Färbung, im Gewebe sichtbar gemacht werden. Hierbei hydrolysiert das Enzym Alkalische Phosphatase das Indolylphosphat zu 5-Brom-4-chlorindolyl und Phosphat. Das 5-Brom-4-chlorindolyl wird vom Sauerstoff der Luft zum Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert. Für die weiteren Versuche wurde das PCR-Produkt mit dem PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (EURx Ltd., Gdansk, Polen) aufgereinigt. Hierzu wurden die Banden der Gelelektrophoresen verwendet. Somit konnten verschiedene Verunreinigungen, wie z.B. überschüssige Ethidiumbromide, Taq-DNA-Polymerasen oder andere Proteine und Lipide entfernt werden.

Tabelle 5: Verwendete Komponenten für die Dioxigenin-Markierung.

10 x PCR Puffer – MgCl (Invitrogen)	5 µl
50mM MgCl ₂ (Invitrogen)	1,5 µl
PCR DIG-labeling Mix (Roche)	1 µl
forward Primer	1 µl
reverse Primer	1 µl
Taq DNA-Polymerase rekombinant (Invitrogen)	0,5 µl
DNA (10pM/ µl)	1 µl
H ₂ O	39 µl

Tabelle 6: PCR-Programm für die Dioxigenin-Markierung.

Denaturierung	94°C; 3 min
Denaturierung	94°C, 45 s
Anlagerung der Primer	60°C (<i>Bg-AChBP1</i>), 64°C (<i>Bg-AChBP2</i>); 30 s
Elongation	72°C; 1min
Finale Elongation	72°C, 10 min
Kühlung	4°C

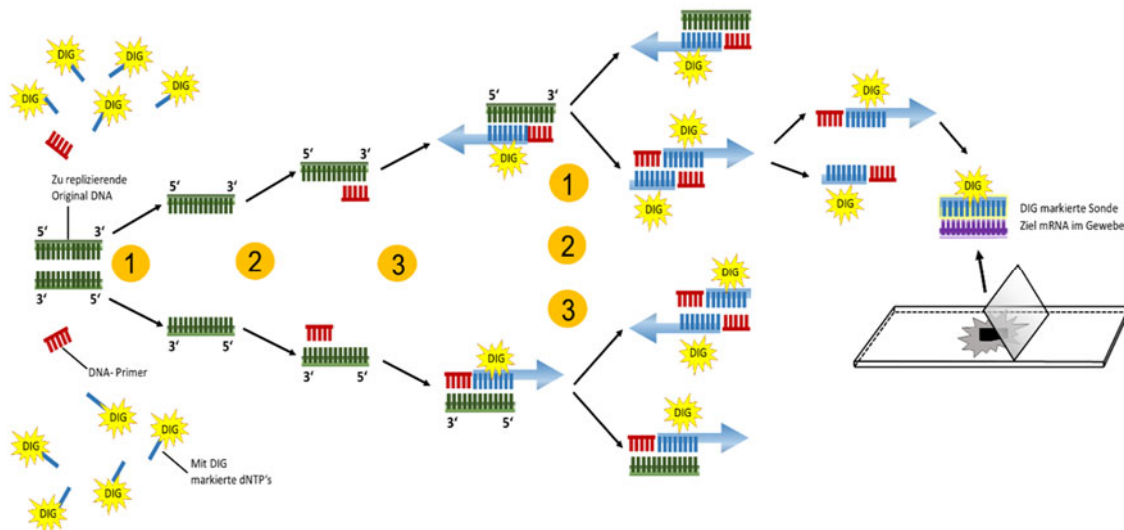


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Herstellung der DIG markierten Sonden. (1) Die zu replizierende DNA wurde bei 94°C denaturiert. Die Primer-Hybridisierung (2) erfolgte für die *Bg-AChBP1* Primer bei 60°C, und für die *Bg-AChBP2* Primer bei 64°C. Die Elongation (3) erfolgte bei 72°C. Die DNA-Polymerase füllte die fehlenden Stränge mit den DIG markierten dNTPs auf. Die Schritte 1 bis 3 wurden 30-mal wiederholt (Tab. 6). Kurz vor Gebrauch wurden dann die Sonden durch Erhitzen bei 95 °C, für 5 min. denaturiert. So konnten sie an die einzelsträngige mRNA im Gewebe hybridisieren, und diese sichtbar machen.

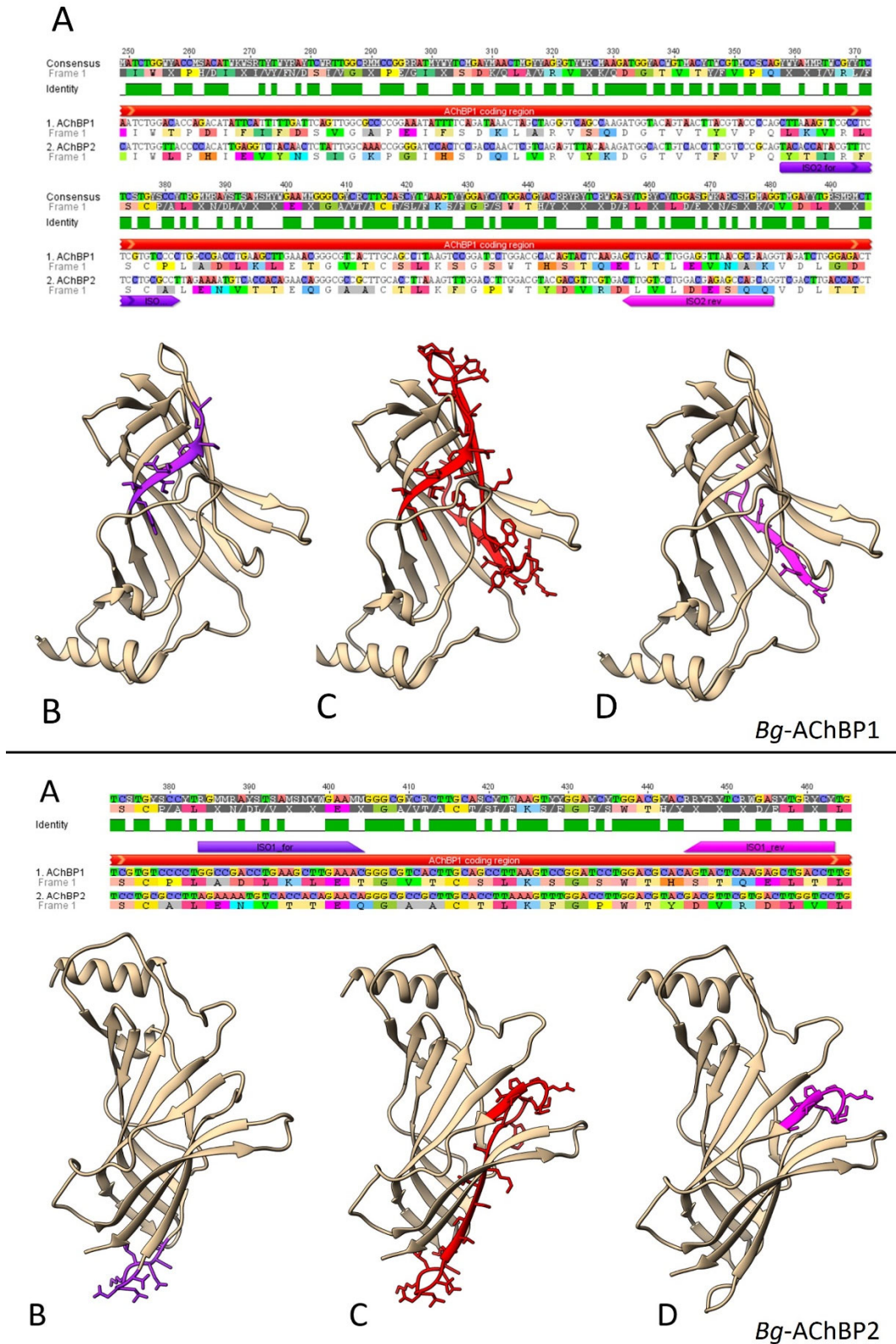


Abbildung 12: Verwendete Primersequenzen zur Herstellung sequenzspezifischer Sonden. Im oberen Teil der Abbildung sind die Sequenzen für *Bg*-AchBP1 (80 Basen), im unteren Bereich die für *Bg*-AchBP2 (123 Basen) dargestellt. (A) zeigt jeweils die Sequenzen des *forward*- und des *reverse* Primer zur Erstellung der Sonden. Zur Veranschaulichung wurde der korrespondierende Sequenzabschnitt für den *forward* Primer (B), der korrespondierende Sequenzabschnitt für den *reverse* Primer (D), und der korrespondierende Sequenzabschnitt für die daraus resultierende Sonde (C), in einer Untereinheit des jeweiligen *Bg*-AchBP Pentamers markiert.

(pdb-ID: *Bg*-AchBP1= 4AOD; *Bg*-AchBP2= 4AOE).

3.1.5 Das Punktdiagramm zur Kontrolle der Sonden (*Dot-Blot*)

Durch verschiedene sogenannte *Dot-Blots*, konnten nun die hergestellten Sonden bestätigt werden. Zum einen konnte überprüft werden, ob die Sonden mit „DIG“ markiert wurden und bei welchen Konzentrationen sie die besten Ergebnisse liefern, zum anderen ob sie spezifisch binden.

***Dot-Blot* Analyse zur Kontrolle der Dioxigenin- Markierung und der Konzentration**

Es wurden unterschiedliche Verdünnungen (Abb. 13) der Plasmidproben tropfenweise auf eine *Protan Nitrocellulose Transfer Membran* (Whattmann GmbH, Dassel) aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde ein Marker mit mehreren bestimmten, aber artfremden DNA Abschnitten, verwendet. Es wurde je 1 µl Probe auf die Membran aufgetragen. Sobald die Tropfen getrocknet waren, wurde die Membran für 10 min., bei Raumtemperatur, in Malleinsäurepuffer inkubiert. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit 1 g *Blocking-Reagenz* in 50 ml Malleinsäurepuffer blockiert. Danach konnte der anti-Dioxigenin Antikörper (*Anti-DIG-AP Fab-fragments*, Roche Mannheim) aufgetragen werden. Es wurden jeweils 2 µl anti-DIG-Antikörper mit 15 ml AP Puffer gemischt, und bei Raumtemperatur für 30 min. auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran für 2-mal 15 min. mit 1x Waschpuffer gewaschen, und für 2 min. mit AP Puffer gespült. Für die Farbreaktion wurden jeweils 15 ml AP Puffer mit 99 µl NBT und 49,5 µl BCIP gemischt, und auf die Membran gegeben. Nach ca. 10 min. war eine Farbreaktion zu beobachten. Die Reaktion wurde durch waschen in H₂O dest. gestoppt.

***Dot-Blot* zur Kontrolle der Sonden-Spezifität**

Es wurde jeweils 1 µl Plasmidprobe der beiden Isoformen in verschiedenen Verdünnungen auf eine Nitrocellulosemembran aufgetragen. (Abb. 13). Die Plasmidproben wurden denaturiert, indem die jeweilige Membran für 5 min. auf ein in Denaturierungspuffer getränktes *Cellulosepapier (chromatography paper 3MM Chr* Whattmann GmbH, Dassel) gelegt wurde. Nachdem die Membran getrocknet war, wurde ebenso mit dem Neutralisierungs- und dem Äquilibrierungspuffer verfahren (Tab. 7). Die Fixierung erfolgte dann für 30 min. bei 80°C im Trockenschrank. Die freien unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wurden durch zweimaliges Waschen mit Äquilibrierungspuffer, für jeweils 5 Minuten blockiert. Danach erfolgte eine 30-minütige Prähybridisierung mit dem Hybridisierungspuffer bei 68°C im Wärmeschrank mit Rotor in 50 ml Reaktionsgefäßen. Die Sonden wurden vor gebrauch für 10 Minuten, bei 95°C, im Thermocycler denaturiert. Danach kamen sie sofort auf Eis, um ein erneutes Zusammenlagern der Einzelstränge zu verhindern. Sie wurden so schnell wie möglich auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 68 °C, über Nacht, im Wärmeschrank mit Rotor. Am nächsten Tag wurde die Membran zuerst 3 x 5 min. mit der

Waschlösung I und 1 x 5 min. mit der Waschlösung II bei 68 °C gewaschen. Danach wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierungslösung für 30 min., bei Raumtemperatur blockiert. Der anti-DIG Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1: 7500 aufgetragen und für 60 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 3 x 5 min. mit dem Waschpuffer und 1 x 10 min. mit dem AP Puffer gewaschen. Nun erfolgte die Farbreaktion. Pro 15 ml AP Puffer wurden 99 µl NBT und 49,5 µl BCIP hinzugegeben. Nach ca. 10 min. erfolgte eine Farbreaktion. Die Reaktion konnte durch mehrmaliges waschen mit H₂O dest. gestoppt werden.

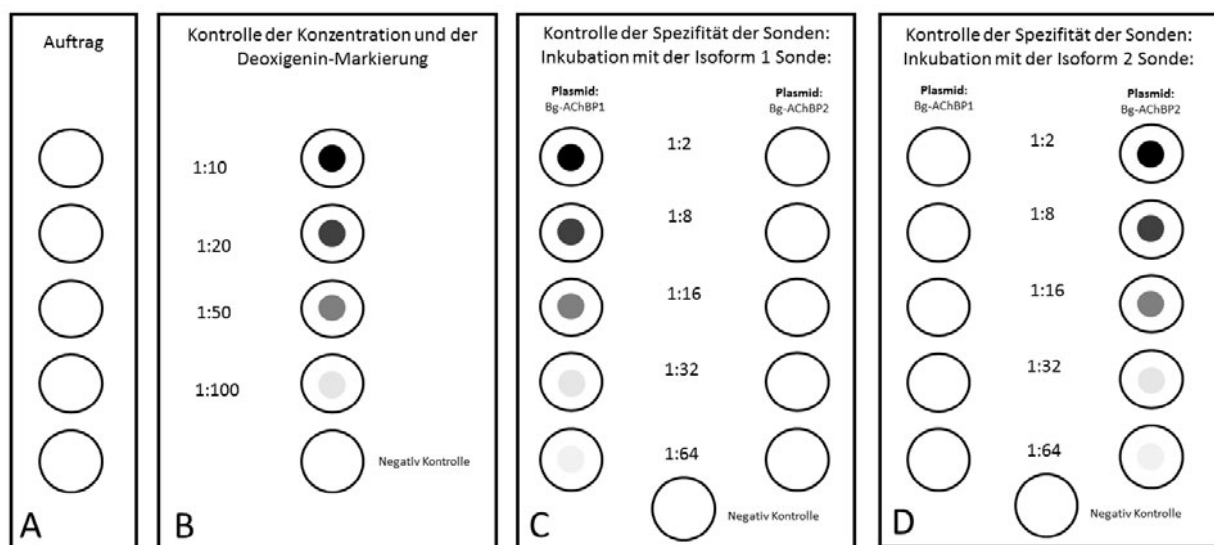


Abbildung 13: Schematische Darstellung der verschiedenen Punktdiagramme (Dot-Blots). Es wurde jeweils 1 µl der Sonde auf die Membran aufgetragen. Noch ist keine Reaktion zu erkennen (A). Nach der Durchführung des ersten Dot-Blots ist gut zu erkennen ob die Sonden mit DIG markiert wurden, und welche Konzentration am besten geeignet ist (B). Bei dem zweiten Dot-Blot wurden beide Plasmidproben aufgetragen, und diese anschließend mit den verschiedenen Sonden inkubiert. Bei der Inkubation mit der Sonde gegen *Bg-AChBP1* wurde auch nur die *Bg-AChBP1* Plasmidprobe erkannt (C), während bei der Inkubation mit der Sonde gegen *Bg-AChBP2* nur die *Bg-AChBP2* Plasmidprobe erkannt wurde (D). So konnte sichergestellt werden, dass die verwendeten Sonden keine Kreuzreaktion zeigten.

Material & Methoden

Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer für die *Dot-Blot* Tests (alphabetische Reihenfolge)

AP Puffer pH 9,5	100mM Tris 100mM NaCl 50mM MgCl ₂
Blockierungslösung 1	1% Blocking-Reagenz in Waschpuffer
Blockierungslösung 2	2% Blocking-Reagenz in MAB
Denaturierungspuffer	500 mM NaOH 150 mM NaCl
Färbelösung	250 µl NBT 187,5 µl BCIP 50 ml AP-Puffer
Hybridisierungslösung	0,02% SDS 1 % Blocking-Reagenz 0,1% N-Laurylsarcosin
Maleinsäure Puffer (MAB) pH 7,5	100 mM Maleinsäure Puffer 150 mM NaCl 0,1% Tween 20
Neutralisierungspuffer pH 8,0	500 mM Tris/ Cl 1500 mM NaCl
SSC (20xs)	3000 mM NaCl 300 mM NaCitrat
Waschlösung I (2x SSC)	75 mM NaCl 7,5 mM NaCitrat 0,1% SDS
Waschlösung II (0,5x SSC)	300 mM NaCl 30 mM NaCitrat 0,1% SDS
Waschpuffer pH 7,5	150 mM NaCl 100 mM Tris

3.2 Whole mount *In-situ*-Hybridisierung (nach Streit et al., 2005)

Alle Tiere wurden auf Eis betäubt und später für mindestens 15 min. in eine gekühlte *Relaxing Lösung* gegeben. Alle Schritte fanden in einer sogenannten Wellplatte statt. Danach wurden die Schnecken vorfixiert. Dabei wurde das Fixativ alle 5 Minuten erneuert. Jetzt konnten die Tiere in eine 1:1 Mischung aus Fixativ und Ethanol überführt werden. Die Ethanol-Konzentration wurde nach und nach bis auf 70% gesteigert, und dann wurde das Gehäuse vorsichtig abpräpariert. Es wurde bei 4 °C über Nacht fixiert. Am nächsten Tag wurden die Tiere für 1 Stunde in eine frisch zubereitete 0,5 % KOH / 3 % H₂O₂ Lösung überführt, um die Pigmente zu entfernen. Optional konnten die Tiere in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und bei -20 °C gelagert werden. Wurde dieser Schritt durchgeführt, mussten sie nach dem Auftauen in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert werden. Nach dem Waschen in Methanol wurde das Methanol nach und nach zuerst durch PBST und dann schließlich durch PPE ersetzt. Um das Eindringen der Sonde und der Antikörper zu erleichtern, wurden die Proben für 30 Minuten, bei 37 °C im Wärmeschrank mit 20 ng/ml Proteinase K behandelt. Die Aktivität der Proteinase K wurde durch viermaliges Waschen in eiskaltem PBST gestoppt. Dann wurden die Tiere in 4 % PFA in PBS inkubiert. Es erfolgten mehrere Waschschrte mit PBST. Um unspezifische Bindung der DNA zu verhindern, erfolgte eine dreistündige Prähybridisierung bei 48°C in der Hybridisierungslösung. Für die Hybridisierung wurde nun die Lösung auf 42 °C vorgewärmt. Die Sonde wurde bei 95 °C, für 10 min. denaturiert. Die Lösung wurde auf die Tiere gegeben und über Nacht bei 42 °C inkubiert. Um die unspezifisch gebundenen Sonden zu entfernen, erfolgten mehrere Waschschrte. Zuerst wurde 3-mal, für 10 Minuten, in 4x Waschpuffer (Tab. 8) gewaschen. Dann 2-mal 15 Minuten in 2x Waschpuffer, und schließlich 1-mal 15 Minuten in 1x Waschpuffer. Dabei wurden alle Waschpuffer auf ca. 50°C vorgewärmt. Danach wurden alle Tiere in 1x SSC mit 0,1 % Tween 20 behandelt. Vor der Inkubation mit dem anti-Dioxigenin Antikörper wurden die Tiere für 2-mal 10 Minuten in MAB-Lösung inkubiert und dann 1-mal 10 Minuten mit der Blockierungslösung gewaschen, bevor eine 3 Stündige Blockierung erfolgte. Nach der Blockierung erfolgte die Antikörper-Inkubation. Der Anti-Dioxigenin Antikörper (*anti-dioxigenin- AP Fab-fragment*, Roche, Mannheim) wurde 1: 2000 verdünnt und auf die Tiere aufgetragen. Die Antikörper-Inkubation erfolgte über Nacht, unter permanentem Schütteln, im Kühlraum. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und für 5 x 15 Minuten in MAB-Lösung gewaschen. Danach wurde 2-mal 15 Minuten in AP-Puffer gewaschen. Die Färbelösung wurde frisch angesetzt und die Farbreaktion erfolgte abgedunkelt in Kühlraum. Durch zweimaliges Waschen in MAB und PBST wurde die Reaktion abgestoppt. In einer 4 %igen PFA Lösung wurden die Tiere postfixiert. Die Negativkontrolle wurde genau gleichbehandelt. Allerdings wurde keine Sonde aufgetragen.

Material & Methoden

Tabelle 8: Verwendete Lösungen für die Whole-mount *In-situ*-Hybridisierung (alphabetische Reihenfolge).

AP Puffer pH 9,5	100 mM Tris 100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂
Blockierungslösung	2 % Blocking Reagenz in MAB
Ethanol in PBS	25%, 50%, 75%
Färbelösung	6,6 µl NBT 3,3 µl BCIP 0,05 MgCl ₂ 7,5 % Venylalkohol pro 1 ml AP Puffer
Fixativ	5 ml 8% PFA Lösung 3 ml H ₂ O dest. 2 ml 5x Salzlösung
Hybridisierungslösung	50% Formamid 5x SSC (Sodium citrat standard) 5 mM EDTA 1x Denhardtts Reagenz 100 ng/ ml Heparin 100 ng/ ml tRNA
MAB Lösung pH 7,5	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl 0,1% Tween 20
Methanol in PBS	25%, 50%, 75%
PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBST	PBS mit 0,1% Tween 20
PPE	PBS 4% PFA 0,05 M EGTA
Relaxing Lösung	7% MgCl ₂ in H ₂ O dest.
Salzlösung 5x	0,5 M MOPS 10 mM MgSO ₄ 5mM EGTA 2,5 M NaCl
SSC 20x (Sodium citrat standard)	3M NaCl 0,3 M NaCitrat
Waschpuffer 4x	4x SSC 50% Formamid 0,1% Tween 20
Waschpuffer 2x	2x SSC 50% Formamid 0,1% Tween 20
Waschpuffer 1x	1x SSC 50% Formamid 0,1% Tween 20

3.3 Fluoreszenzmarkierte Sonden

Um beide AChBP Isoformen gleichzeitig im Gewebe zu markieren, wurde eine Doppelfärbung mit unterschiedlichen Fluorophoren durchgeführt. Es wurden die zuvor beschriebenen Primer Sequenzen verwendet. Die Sonden wurden wie in Kapitel B 3.1.1 beschrieben hergestellt. Allerdings wurden die Sonden nicht mit Dioxigenin markiert, sondern mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren. Die fluoreszenzmarkierten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) bezogen. Der forward- und der reverse-Primer zur Markierung von *Bg*-AChBP1 im Gewebe wurden mit dem Farbstoff FITC versehen. Beide Primer zur Markierung von *Bg*-AChBP2 im Gewebe wurden mit dem Farbstoff Texas Red versehen (Abb. 14).

Forward Primer <i>Bg</i> -AChBP1	[FITC]GGCCGACCTGAAGCTTGA AAC (21)
Reverse Primer <i>Bg</i> -AChBP1	AGGTCAGCTCTTGAGTACT[FITC] (19)
Forward Primer <i>Bg</i> -AChBP2	[TxRed]TACACCATACGTTTCTCCTGCGCCT (25)
Reverse Primer <i>Bg</i> -AChBP2	CTGCTGGCTCTCGTCCA[TxRed] (25)

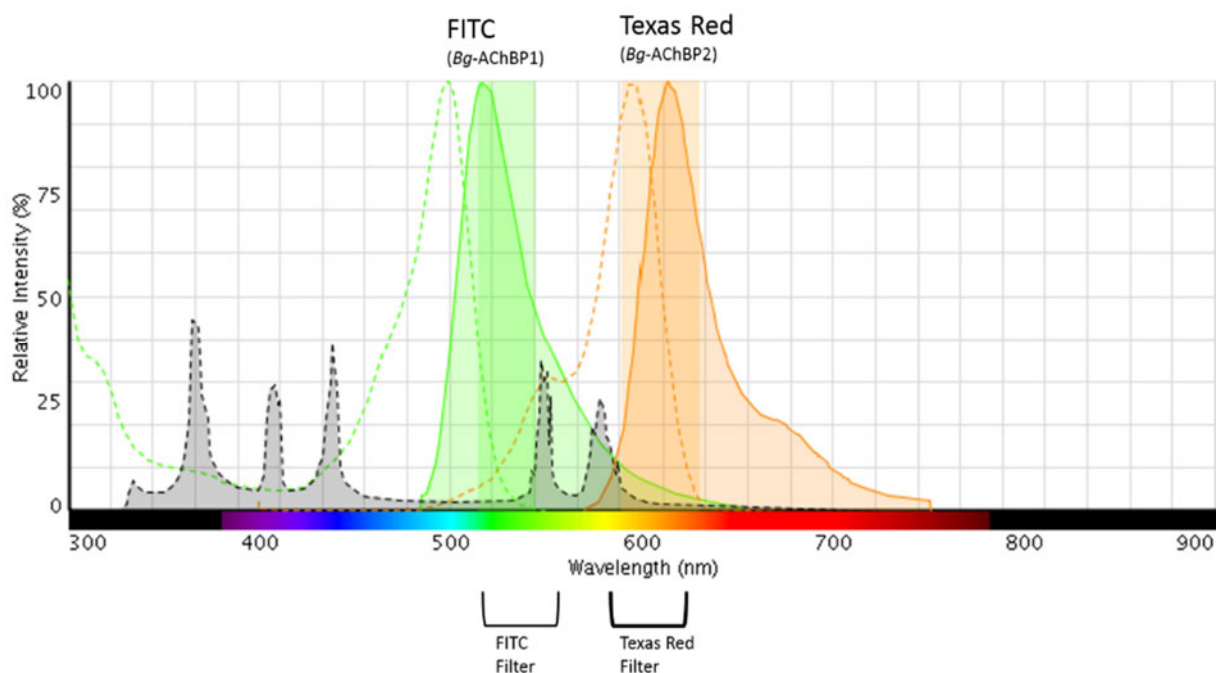


Abbildung 14: Übersicht über die Fluorophoren, die für die Doppelfärbung mit den isoform-spezifischen Sonden verwendet wurden. Die Sonde zur Lokalisation von *Bg*-AChBP1 im Gewebe wurde mit dem Farbstoff FITC markiert (grün), die Sonde um *Bg*-AChBP2 im Gewebe zu markieren, wurde mit dem Farbstoff Texas Red markiert. (Erstellt mit dem Fluorescence Spectra viewer der Firma Thermo Fischer Scientific).

4 Immunhistologische Methoden

4.1 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

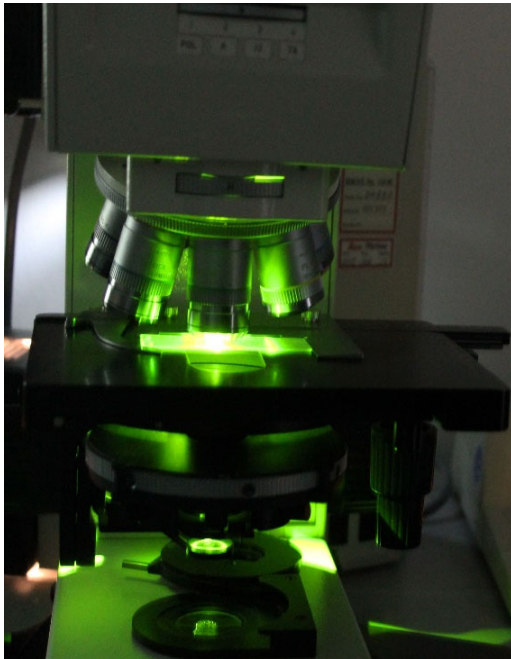


Abbildung 15 Leica DC 500 Fluoreszenzmikroskop am Institut für molekulare Physiologie (IMP), Mainz.

Die Methode der Immunhistologie macht es möglich, Proteine hochspezifisch nachzuweisen. Hierbei werden die Proteine oder andere Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können, sichtbar gemacht. Verwendet man für die Kennzeichnung fluoreszenzmarkierte Antikörper, spricht man von Immunfluoreszenz. Im Rahmen meiner Arbeit wurde zuerst die Methode der indirekten Immunfluoreszenz gewählt, hierbei erfolgt die Markierung des Gewebes über zwei Schritte. Ein nicht markierter, epitopspezifischer Antikörper bindet an sein Antigen (an das zu untersuchende Protein) und im zweiten Schritt bindet ein fluoreszenzmarkierter Sekundär-Antikörper spezifisch an das Fc-Fragment des Primär-Antikörpers. Diese Methode ist sehr flexibel, da eine Vielzahl von Primär-Antikörpern aus

derselben Spezies mit den gleichen markierten Sekundär-Antikörpern kombiniert werden können. Ein weiterer Vorteil ist, dass mehrere Zweit-Antikörper an einen Primär-Antikörper binden können. So kommt es zu einer Signalverstärkung und die Methode ist deutlich empfindlicher als die direkte Immunfluoreszenz. Da im Rahmen meiner Arbeit polyklonale Antiseren aus dem gleichen Tier (Kaninchen) verwendet wurden (Tab. 2), war die Methode der indirekten Immunfluoreszenz für eine Doppelfärbung, bei der die beiden Isoformen im Gewebe unterschiedlich markiert werden sollten nicht geeignet. Hierfür wurde die Methode der direkten Immunfluoreszenz gewählt, bei der die Antikörper direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff (siehe B.4.2) markiert wurden. Da bei diesem Schritt nur eine Antikörperinkubation notwendig ist, gibt es kaum unspezifische Bindungen und sie ist schnell durchführbar. Die verwendeten Fluorophoren wurden mit dem *Fluorescence Spectra viewer* der Firma Thermo Fischer Scientific auf ihre Absorptionsspektren hin überprüft.

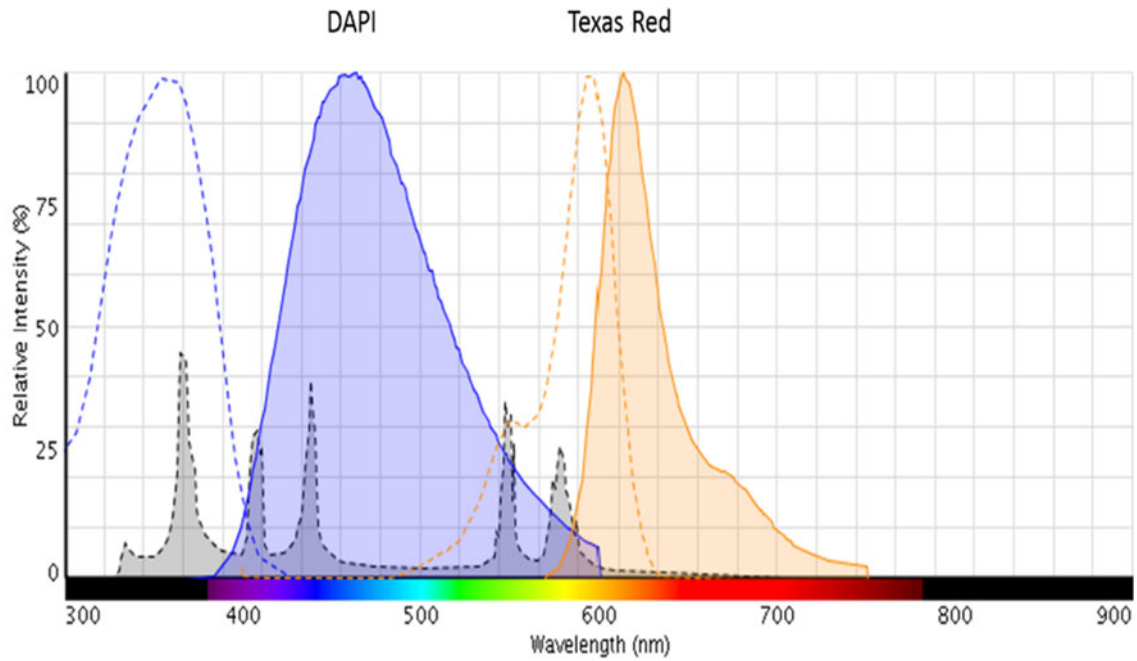


Abbildung 16: Übersicht über die Fluorophore, die für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet wurden. Die Fluoreszenzmarkierung mit dem DAPI Farbstoff diente hierbei der Lokalisation der Zellkerne (blau), während der Fluoreszenzfarbstoff Texas Red an den Sekundär-Antikörper gekoppelt war, und zur Lokalisation der jeweiligen Isoform des Proteins (*Bg*-AChBP) verwendet wurde. Das graue Spektrum zeigt die verwendete Quecksilber Lampe. (Erstellt mit dem Fluorescence Spectra viewer der Firma Thermo Fischer Scientific).

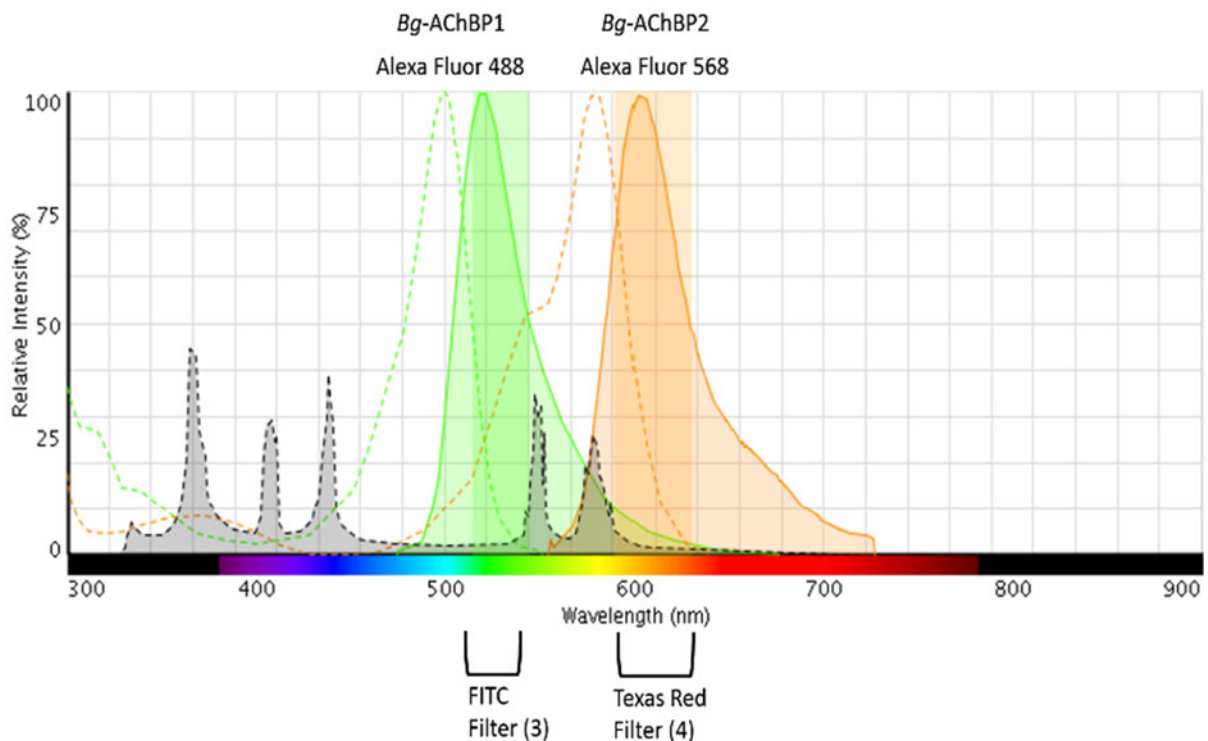


Abbildung 17: Übersicht über die verwendeten Fluorophore, für die Doppelfärbung, bei der direkten Immunfluoreszenz Mikroskopie. Der Antikörper gegen die Isoform *Bg*-AChBP1 wurde dabei mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 markiert (grün), und der Antikörper gegen die Isoform *Bg*-AChBP2 wurde mit Alexa Fluor 568 markiert. (Erstellt mit dem Fluorescence Spectra viewer der Firma Thermo Fischer Scientific).

4.2 Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie

Markierung der Antikörper mit dem Zenon® Rabbit IgG Labeling Kit (life technologies/ Thermo Fischer, Darmstadt)

Da es sich bei beiden *Bg-AChBP* Antikörpern um polyklonale Antiseren aus dem Kaninchen handelt, war die Methode der indirekten Immunfluoreszenz, für eine Doppelmarkierung beider Isoformen im selben Gewebe, nicht geeignet. Vielmehr mussten hier beide Antikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Für die direkte Markierung der Antikörper wurde das Zenon® Rabbit IgG-Labeling-Kit verwendet.

4.2.1 Bildung des Antikörper-Markierungs-Komplexes

Als erstes musste der Antikörper-Markierungs-Komplex gebildet werden. Da in den polyklonalen Antiseren nur die IgG-Antikörper markiert werden, wurde die maximale vom Hersteller empfohlene Menge des Markierungsreagenz verwendet. Es wurden dabei 5 µl Zenon IgG Markierungs-Reagenz pro 1 µl Antiserum verwendet. Der Fab-Antikörperkomplex (Abb. 18) ist in weniger als 5 min. gebildet und der Komplex ist gebrauchsfertig. Vor der Verwendung wird die mitgelieferte Zenon-Markierungslösung verwendet. Diese enthält unspezifische IgG-Antikörper, die nicht gebundene Fab-Fragmente binden. So können diese später durch Waschen entfernt werden (Abb. 18). Die spezifischen und fluoreszenzmarkierten Antikörper konnten nun verwendet werden. Für eine Doppelfärbung wurden zwei verschiedene Fluorophore verwendet.

4.2.2 Inkubation mit dem Zenon AK-Markierungs-Komplex

Es wurden 7 µm dicke Gefrierschnitte wie in B 2.4 beschrieben angefertigt und fixiert. Diese wurden nach dem Trocknen für 15 min. in PBS rehydriert. Um die Gewebeprobe für die Antikörper durchlässig zu machen, wurden sie für 20 min. bei Raumtemperatur, in PBST (0,2% Triton x-100 in PBS) inkubiert. Nicht spezifische Bindungsstellen wurden mit 0,2 % BSA und 5 % Ziegen Serum in PBST für 30 min. bei Raumtemperatur blockiert. Der fertige Antikörperkomplex konnte nun auf die Schnitte aufgetragen werden. Dies geschah lichtgeschützt in einer feuchten Kammer für 1- 2 h. Nach dieser Inkubation wurden die Schnitte 3-mal für 10 bis 15 min. in PBST gewaschen. Dann erfolgte ein weiterer Waschschriff für 5 min. bei Raumtemperatur in PBS. Nachfixiert wurden die Schnitte in 4 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min. bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen. Um die Salze zu entfernen wurden die Schnitte anschließend in H₂O dest. gespült. Zum dehydrieren wurden die Schnitte kurz in Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Gefrierschnitte wie in B 2.4.3 beschrieben in Mowiol eingebettet und mikroskopiert (B 2.4.4).

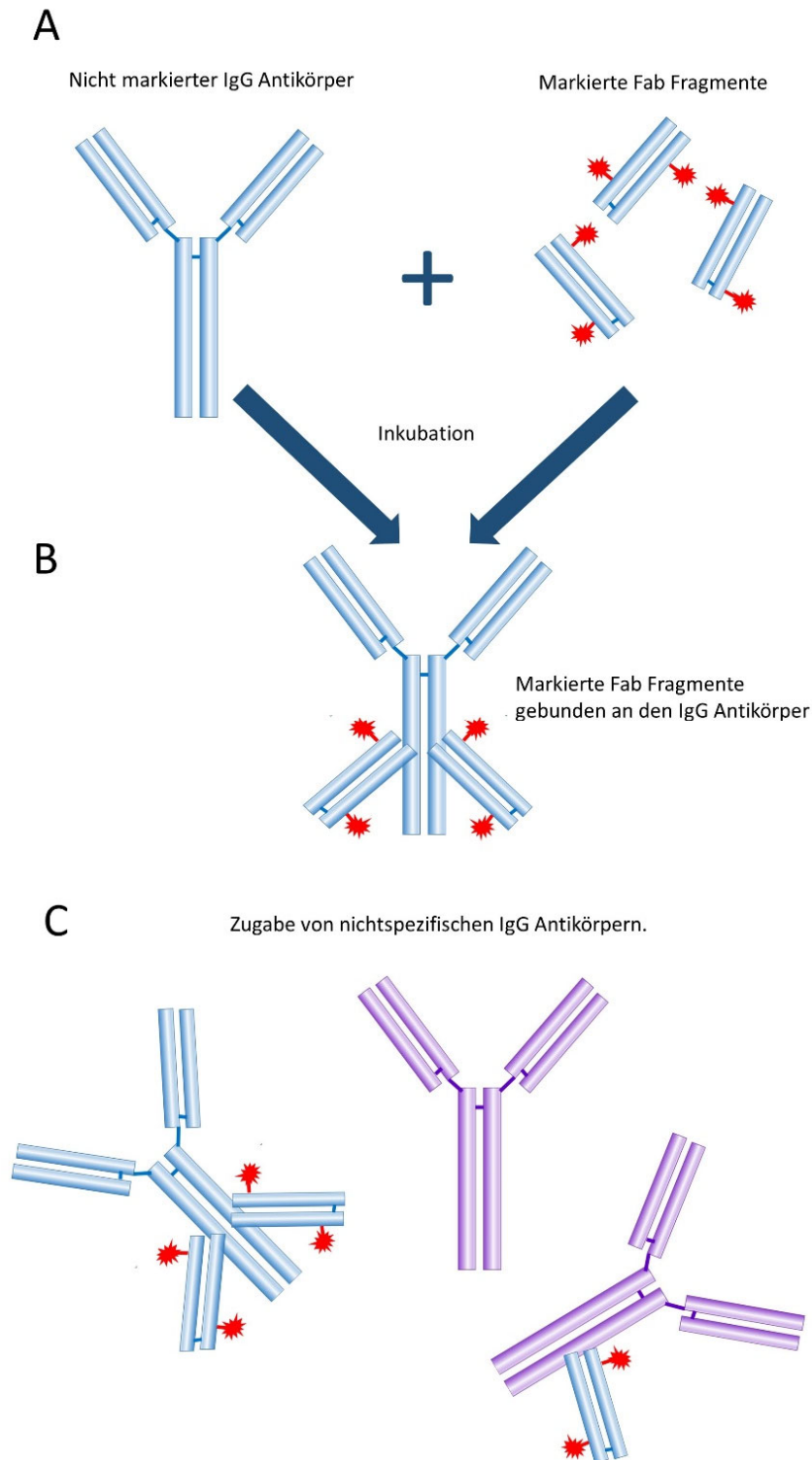


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Antikörpermarkierung, verändert nach der Bedienungsanleitung von Life Technologies/ Thermo Fischer, Darmstadt. Ein nicht markierter IgG Antikörper wird mit dem Zenon-Markierungs-Reagenz inkubiert. Dieses enthält ein Fab Fragment welches mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Dieses markierte Fab Fragment binden an den Fab Teil des IgG Antikörpers (B) und überschüssiges Fab Fragment wird durch die Zenon-Blockierungs-Lösung, welche nichtspezifische IgGs enthält gebunden. Der letzte Schritt ist besonders wichtig bei einer Doppelfärbung, wenn zwei Primärantikörper zur markierung verschiedener Proteine gleichzeitig verwendet werden sollen. Freie, nicht gebundene Fab Fragmente werden an unspezifische IgG Antikörper gebunden und später durch waschen entfernt, während die spezifischen, markierten Antikörper an die Gewebeprobe binden.

4.3 Die Whole mount-Immunfluoreszenzfärbung

Die Larven wurden wie in 1.3 beschrieben gehalten und Tiere mit einem definierten Alter gezüchtet. Die benötigten Gelege bzw. Larven wurden auf Eis betäubt und anschließend in eine Wellplatte überführt. Dort wurden sie dann in 4 % PFA in PBS-Puffer über Nacht auf einem Schüttler im Kältelabor, bei 4 °C fixiert. Zur Herstellung der PFA Lösung wurde je 4 % Paraformaldehyd in PBS-Puffer bei 60 °C gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die fixierten Gelege 3-mal je 5 min. in PBST gewaschen. Sollen die Gelege nicht sofort weiterverarbeitet werden, so besteht die Möglichkeit sie einzufrieren und so einige Zeit zu lagern. Hierbei werden sie durch einen Dehydratisierungsschritt haltbar gemacht. Hierbei wird die PFA Lösung so gut wie möglich abgezogen, und durch eine aufsteigende Methanol-Reihe (25%, 50%, 75%, 100%) ersetzt. Bei jedem einzelnen Schritt wurden die Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

4.3.1 Bleichen der Gelege

Wurden die Gelege eingefroren, so muss die Methanol Konzentration vor der Weiterverarbeitung wieder erniedrigt werden. Hierbei geht man in der umgekehrten Reihenfolge vor. Um alle Pigmente zu entfernen wurden die Gelege für mindestens 1 Stunde, bei Raumtemperatur, mit 3 % Wasserstoffperoxid und 5 % KOH in PBS gebleicht. Danach kann mit der Inkubation der gewünschten Antikörper begonnen werden. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden zuvor für 1 Stunde, bei RT in 200 µl Blockierungslösung in PBS-Puffer blockiert. Danach wurde der gewünschte Primärantikörper für zwei Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Nach mehreren Waschschritten in PBS-Puffer (4-mal 5 min. bei RT), wurde der Sekundärantikörper mit dem gewünschten Fluoreszenzfarbstoff inkubiert. Dieser wurde für zwei Stunden, bei Raumtemperatur, auf dem Schüttler binden gelassen. Nach mehreren abschließenden Waschschritten in PBS-Puffer (4-mal 5 min. bei RT), konnten die Gelege auf einen Objektträger überführt werden und wie die die Gefrierschnitte auch in Mowiol® eingebettet werden.

PBS-Puffer: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ bei pH 7,4.

PBST-Puffer: 0, 1 % (v/v) Tween 20

5 Rekombinante Expression von *Bg-AChBP1* und *Bg-AChBP2*

5.1 Klonierung

Durch die Methode der Klonierung, lassen sich identische DNA Abschnitte gewinnen und vervielfältigen. Hierbei wird das gewünschte DNA-Fragment (z.B. ein Gen, oder die für ein Protein codierende cDNA) in einen Vektor integriert (Ligation). Um das gewünschte DNA-Fragment zu vervielfältigen, wird es anschließend in eine Wirtszelle transformiert. Um spezifische DNA-Fragmente der beiden Isoformen, *Bg-AChBP1* und *Bg-AChBP2* zu erhalten, wurde die Methode der Gateway™ Klonierung verwendet. Hierbei handelt es sich um eine universelle Klonierungsmethode, welche auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ basiert (Landy 1989). Um das Protein später aufzureinigen zu können, wurde zusätzlich ein sogenannter Polyhistidin-Tag verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Folge von sechs Histidinen, welche N-Terminal nach dem Start-Codon Methionin, in das offene Leseraster einkloniert wurden. Um nach erfolgreicher Aufreinigung den Polyhistidin-Tag wieder zu entfernen, wurde zusätzlich eine Erkennungssequenz für die Tabakäzvirus-Protease (TEV-Protease) einkloniert. Beide Plasmide mit den jeweiligen Konstrukten für *Bg-AChBP1*-His-TEV und *Bg-AChBP2*-His-TEV stammten aus der Dissertation von Frau Dr. Vanessa Möller (2012), und wurden mir zur Verfügung gestellt.

5.2 Rekombinante Expression in Bakterienzellen

Durch die Methode der rekombinanten Expression ist es möglich, größere Mengen an aufgereinigtem Protein mit relativ begrenztem Zeit- und Kostenaufwand herzustellen. Größere Mengen an tierischen Gewebeproben werden bei dieser Methode nicht mehr benötigt. Bei der Rekombinanten Expression greift man meist auf das Kolibakterium *Escharichia coli* als Expressionsbakterium zurück. Hierbei handelt es sich um einen fakultativ anaeroben Organismus, welcher zu den bestuntersuchten Prokaryoten zählt. Als Wirtsorganismus hat er den Vorteil, dass er sich sehr schnell vermehrt. Unter den richtigen Bedingungen verdoppelt er sich alle 20 Minuten (Rosano und Ceccarelli 2014). Im Rahmen meiner Arbeit wurde ein Stamm dieses Darmbakteriums mit dem Namen BL21-AI verwendet. In diesem Bakterienstamm kann das Zielgen durch die T7 RNA-Polymerase abgelesen werden. Diese wird durch den T7-Promotor des Vektors pDest™ 14 kontrolliert. Die Bakterien besitzen einen arabinose-kontrollierten Locus, der das T7-RNA-Polymerase-Gen kontrolliert. Durch die Zugabe von L-Arabinose kann die Expression induziert werden (Lee et al. 1987).

Die Bakterien, welche den Vektor mit dem gewünschten Gen enthielten, wurden als Glycerin Kultur den Institutseigenen Gefriertruhen entnommen.

Ein Teil der Glycerin Kultur wurde entnommen und in einen Liter LB-Medium mit 0,5 % Ampicillin überführt. Die Bakterien wurden auf dem Schüttler bei 220 rpm wachsen gelassen, bis man eine optische Dichte (OD_{600}) zwischen 0,75 und 0,8 messen konnte. Dann wurde die Expression durch die Zugabe von 10 ml 20 %iger L- Arabinose induziert. Die Expression erfolgte dann über Nacht bei 25 °C.

5.3 Ernte und Aufbrechen der Bakterienzellen

Da sich die Bakterien in Einschlusskörperchen befanden, wurden sie um sie zu ernten bei 5000 rpm, bei 4 °C abzentrifugiert und vom Überstand getrennt. Nun mussten die Bakterienzellwände mechanisch aufgebrochen werden. Dazu wurden sie abwechselnd 5-mal in einem 42 °C warmen Wasserbad aufgetaut und danach wieder bei ca. -180 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zu den Zell-Präzipitaten wurden jeweils 100 ml Lysis Puffer (Tab. 9) mit 10 mg Lysozym hinzugegeben. Das Präzipitat wurde durch mehrmaliges mixen auf dem Wirbelmixgerät so lange vermischt, bis es vollständig gelöst war. Dann wurde die Suspension für eine Stunde auf Eis inkubiert.

5.4 DNA und RNA-Verdau

Nun musste die in der Suspension enthaltene bakterielle DNA und RNA abgebaut werden. Dies geschah durch die Zugabe einer gentechnisch hergestellten Endonuklease, der Benzonase® Nuclease. Es wurden 2500 *Units* (U) Benzonase® pro 100 ml Suspension eingesetzt, und für 15 min. bei 37 °C inkubiert. Durch eine anschließende halbstündige Inkubation auf Eis, wurden die Nukleinsäuren nun enzymatisch abgebaut. Danach wurden die Einschlusskörperchen durch 40-minütiges Zentrifugieren bei 5000 rpm und 4 °C palettiert.

5.5 Aufbrechen der Einschlusskörperchen

Zum Aufbrechen der Einschlusskörperchen wurden die Bakterienpellets in je 30 ml Bindungspuffer (Tab. 9) gelöst. Alle Proben wurden mindestens 12-mal, abwechselnd für 30 Sekunden sonifiziert und dann 30 Sekunden auf Eis inkubiert. Für die Sonifikation wurde der Ultraschallgenerator mit einer Titansonde (Labsonic 1510 von B. Braun, Mehlsungen) verwendet. Die Sonifikation erfolgte mittels hoher Schallwellen mit einer hohen Amplitude, bei einer Leistung von 200- 300 V. Durch die Schallwellen, welche von der Sonde auf die Flüssigkeit übertragen werden, entstehen kleine Bläschen. Diese zerplatzen infolge des Druckunterschiedes und reißen so die Membran auf. Durch diesen Vorgang wird Wärme freigesetzt, diese wurde durch die Inkubation auf Eis abgeführt. Alle entstandenen Membranfragmente wurden durch 15-minütiges Zentrifugieren, bei 4 °C und 2500 rpm, abzentrifugiert und konnten so entfernt werden.

5.6 Affinitäts-Chromatographie

(Nickel-Sepharose-Aufreinigung)

Als Säulenmaterial für die Aufreinigung wurde Ni-Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Eine stark vernetzte polymere Agarose, welche chelathaltige Nickelionen enthält. An diese können Histidine reversibel binden. Da das verwendete Konstrukt über einen N-terminalen Polyhistidin-Tag (His-Tag aus 6 aufeinander folgenden Histidinen) verfügt, welcher sich nach dem Start-Methionin-Codon befindet, kann so das exprimierte Protein vom Rest der Lösung getrennt werden.

5.7 Vorbereitung der Nickel-Sepharose:

Da die Nickel-Sepharose in 20 % Ethanol aufbewahrt wird, musste zuerst das Säulenmaterial für 5 min. bei 500 rpm abzentrifugiert werden. Das Ethanol wurde verworfen und das Säulenmaterial mit doppelt so viel H₂O dest. wie Säulenmaterial gewaschen. Danach wurde das Säulenmaterial wieder für 5 min. bei 500 rpm abzentrifugiert und das Wasser konnte verworfen werden. Es wurde doppelt so viel Bindungspuffer (Tab. 9) wie Nickel-Sepharose auf das Säulenmaterial gegeben und damit gewaschen. Das Säulenmaterial wurde nochmals abzentrifugiert und der Puffer verworfen. Nun wurde zu der Nickel-Sepharose die gleiche Menge Bindungspuffer gegeben. Das Säulenmaterial war nun gebrauchsfertig.

5.8 Aufreinigung:

Der Überstand (siehe: 5.7) wurde zu dem vorbereiteten Säulenmaterial gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 90 min. bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. So konnte das Histidin an die Nickel-Sepharose binden. Danach wurde die Lösung in das Säulenröhrchen gegeben und 10 min. gewartet, damit sich das Säulenmaterial setzen konnte. Dann wurde die Flüssigkeit abfließen gelassen, in einem Schraubdeckelglas aufgefangen und mit *Durchfluss* beschriftet. Da das Protein nun an die Säulenmatrix gebunden war, verblieb es in der Säule. Um Reste ungebundenen Proteins aus der Säule zu entfernen, wurde die fünffache Menge an Waschpuffer auf die Säule gegeben und kurz inkubiert. Nachdem sich das Säulenmaterial wieder gesetzt hatte, wurde die Flüssigkeit aus dem Röhrchen abfließen gelassen und in einem Schraubdeckelglas aufgefangen. Dieses wurde mit *Waschfraktion* beschriftet. Um nun das aufgereinigte Protein zu erhalten, musste es von der Trägermatrix gelöst werden. Dies geschah durch die Zugabe von 60 ml Elutions-Puffer. Die in diesem Puffer enthaltene Menge Imidazol verdrängt konzentrationsbedingt die Histidine von den Bindungsstellen.

5.9 Die Rückfaltung der Proteine

Nach der Elution liegen die Proteine linear und denaturiert vor. Um funktionsfähige Proteine in ihrer eigentlichen Quartärstruktur zu erhalten, müssen sie zurückgefaltet (renaturiert), und bei ihrer Faltung unterstützt werden. Denaturierende Agenzien müssen also entfernt werden, und Aggregationen müssen vermieden werden. Für die Rückfaltung wurde die Econopump (Bio-Rad, München) verwendet. Mittels dieser Pumpe wurde die Proteinlösung mit einer Geschwindigkeit von 0,2 ml/ min. in den Renaturierungs-Puffer (Tab.9) eingetropf. Die benötigte Menge an Renaturierungs-Puffer musste zuvor berechnet werden:

$$OD \div 20 \times \text{Flüssigkeitsmenge in ml} = \text{Benötigte Menge Renaturierungs-Puffer}$$

Der Puffer musste dabei ständig gerührt werden, damit sich keine Proteinaggregate bilden konnten. Es musste ebenso darauf geachtet werden, dass die Proteinlösung nicht am Rand des Kolbens herunterlief, sondern von oben in die Lösung eintropfte. Die Proteinendkonzentration betrug am Ende 30 µg/ ml.

5.10 Aufkonzentrierung der Proteinlösung

Druckfiltration

Für einige Experimente wurde eine höhere Proteinkonzentration benötigt. Daher wurde für diese Experimente die Proteinlösung aufkonzentriert. Für das Einengen der Proteinlösung, wurde eine Ultrafiltrationsrührzelle (Medell 8400, Merck, Millipore, Darmstadt) verwendet. Die verwendeten Filterscheiben hatten eine Porengröße von 10 kDa. Durch Druckfiltration, mit einem Gasüberdruck von 2-4 bar, wurde die Proteinprobe unter Stickstoffatmosphäre durch die Filtermembran gedrückt. Zurück blieb die aufkonzentrierte Probe. So war es möglich größere Mengen Probe (ca. 30 ml Gesamtvolumen) mit einer Konzentration um die 1 g/l zu erhalten.

Filtrationsröhrchen

Sollten kleinere Mengen an Proteinlösung aufkonzentriert werden, wie dies z.B. nach der Auftrennung durch eine Anionenaustauschchromatographie der Fall ist, so konnten kleinere Reaktionsgefäße verwendet werden (Amicon® Ultra 1,5 ml oder 0,5 ml; Porengröße 10-100 kDa). Bei diesem Verfahren wird die Proteinprobe auf eine Filtermembran in dem Zentrifugenröhrchen gegeben und anschließend zentrifugiert. Dadurch gelangen kleinere Partikel nach außen, während Partikel welche größer sind als die angegebene Porengröße im inneren verbleiben. Um die Filtermembran zu aktivieren, wurde sie 3-mal mit Tris-Puffer gewaschen. Der Tris Puffer wurde auf die Membran gegeben und es wurde je 5 min. bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert. Danach konnte die Proteinprobe auf die Membran gegeben

werden. Es wurde so lange zentrifugiert, bis die gewünschte Proteinkonzentration erreicht war. Die Proteinkonzentration wurde Photometrisch bestimmt (OD_{280}).

5.11 Dialyse

Um den Renaturierungs Puffer schonend gegen den Aufbewahrungspuffer (Tab. 9) auszutauschen, wurde eine Dialyse durchgeführt. Hierbei wurde ein Visking Dialyseschlauch (Rotz, Karlsruhe) mit einer Ausschlussgröße von 14 kDa verwendet. Dieser wurde vor der Verwendung kurz in H_2O dest. aufgekocht. Die Dialyse erfolgte im Kühlraum bei $10\text{ }^\circ\text{C}$. Der Dialysepuffer wurde mehrfach ausgetauscht.

5.12 Abspaltung des Polyhistidin-Tags

Da der für die Aufreinigung benötigte Polyhistidin-Tag die korrekte Faltung des Proteins und die Bildung der Dodkaederstruktur behindern könnte, wurde dieser vor den weiteren Experimenten entfernt. Dies war möglich, da sich vor dem Polyhistidin-Tag eine Erkennungssequenz für die TEV Protease befand (E-X-X-Y-X-Q-(G/S), welche zuvor einkloniert wurde. Diese aus dem Tabakätzvirus stammende Protease, ermöglicht eine spezifische Spaltung an dieser Sequenz. Pro $100\text{ }\mu\text{g}$ Protein wurden 100 U TEV Protease (Roboklon, Berlin) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens eine Stunde.

5.13 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Diese Wellenlänge ist typisch für Proteine und wird durch die aromatischen Reste der Aminosäuren Histidin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin hervorgerufen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet:

$$E = \log (I_0 / I) = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion

I_0 = Intensität vor der Probe

I = Intensität nach passieren der Probe

ε = der molare Extinktionskoeffizient [$M^{-1}\text{ cm}^{-1}$]

c = Proteinkonzentration [mol/l]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

Die Schichtdicke (d) der Küvette betrug 1 cm . Der theoretische molare Extinktionskoeffizient wurde anhand der aromatischen Reste, sowie der intermolekularen Disulfidbrücken mit dem ProtParam Tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) berechnet. Dieser beträgt für Bg-AChBP1

Material & Methoden

35325 M⁻¹ cm⁻¹ und für *Bg*-AChBP2 41160 M⁻¹ cm⁻¹. Das Molekulargewicht von *Bg*-AChBP1 beträgt 23427 Da und von *Bg*-AChBP2 23508 Da. Die Massenkonzentration liegt bei $c_m=0,66$ *E für *Bg*-AChBP1 und bei $c_m=0,57$ *E für *Bg*-AChBP2. Beide Isoformen bestehen aus 205 Aminosäuren.

Tabelle 9. Verwendete Puffer für die Expression

<p>Lysis Puffer: (Rezept für 1 l)</p>	<p>3,0 ml 1 M KH₂PO₄ 47 ml 1M K₂HPO₄ 23 g NaCl 7,5g KCl 100 ml Glycerin 5 ml Triton X 100 680 mg Imidazol</p> <p>Alles wurde mit H₂O dest. auf einen Liter aufgefüllt und der pH-Wert wurde auf 7,8 eingestellt.</p> <p>Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert.</p>
<p>Bindungspuffer (Rezept für 1 l)</p>	<p>3,5 g Na₂HPO₄ (20 mM) 29,22 g NaCl (0,5 M) 1,36 g Imidazol (20 MM)</p> <p>Alles wurde mit H₂O dest. auf ein Volumen von einem Liter aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf pH 7,4 eingestellt.</p> <p>Der Puffer wurde bei 4 °C gelagert. Kurz vor gebrauch wurden 8 M Urea und 1 mM β-Mercaptoethanol hinzugegeben.</p>
<p>Elutions Puffer (Rezept für 1 l)</p>	<p>3,56 g Na₂HPO₄ (20 mM) 29,22 g NaCl (0,5 M) 34 g Imidazol (500 mM)</p> <p>Der Puffer wurde mit H₂O dest. auf einen Liter aufgefüllt und der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und konnte bei 4 °C gelagert werden. Kurz vor gebrauch wurden 8 M Urea und 1 mM β-Mercaptoethanol hinzugegeben.</p>
<p>Renaturierungs Puffer (Rezept für 1 l)</p>	<p>24,18 g Tris (0,1 M) 174,2 g L-Arginin (0,5M) 1,1 g oxidiertes Gluthation (0,9 mM) 1,17 g EDTA (2 mM)</p> <p>Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt.</p>
<p>Dialysepuffer (Aufbewahrungspuffer) (Rezept für 1 l)</p>	<p>20 mM Tris</p> <p>Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt.</p>

6 Gewinnung nativer Proteine

6.1 Entnahme der Hämolymphe

Zur Untersuchung der nativen Proteine, wie man sie bei *Biomphalaria glabrata* findet, musste den Schnecken Hämolymphe entnommen werden. Zur Betäubung wurden die Schnecken vor der Entnahme auf Eis gelegt. Zur Hämolymphentnahme wurde anschließend der Fuß der Schnecke mit einer Kanüle penetriert. So konnte die austretende Hämolymphe mit einer Pipette aufgenommen werden. Die Probe konnte dann in einem Eppendorfgefäß auf Eis gesammelt werden. Die Probe wurde mit 1 mM Pefablock versetzt, um die Proteaseaktivität zu hemmen. Nach erfolgreicher Hämolymphentnahme, wurden die Schnecken durch schnelles mechanisches zerdrücken getötet. Um überschüssige Zellbestandteile zu entfernen, wurde die Hämolymphe vor der Aufreinigung bei 13 000 rpm für 5 Minuten, bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

6.2 Chromatographische Methoden

6.2.1 Anionenaustausch-Chromatographie

Mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie, können Stoffe anhand ihrer Ladung aufgetrennt werden. In eine Säule wird hierbei ein Gel mit einer polymeren Matrix gegeben. In dieser Matrix befinden sich funktionelle Gruppen, die in der Lage sind, reversibel Gegenionen (Anionen) zu binden. Als Säulenmaterial wurde die Q-Sepharose von GE Healthcare (Freiburg) verwendet. Die Aufreinigungsanlage wurde nach Herstellerangabe vorbereitet. Bei jeder Aufreinigung wurden ca. 1,5 ml Hämolymphe mit einer Spritze in die Probenschleife injiziert und von dort aus auf die Säule gespült (Abb. 19). Die Probe wurde nach und nach eluiert, indem man einen Puffergradienten mit steigendem Ionengehalt verwendete. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml / min. Die gesamte Laufzeit betrug 120 min. Das Eluat durchlief ein Photometer und wurde am Ende von einem Fraktionssammler aufgefangen. Ein Computer zeichnet das Chromatogramm während des gesamten Laufs auf (Abb. 19B). So können die einzelnen Fraktionen später ausgewertet werden. Für die Aufreinigung wurde die HPLC-Pumpe und ein Fraktionssammler der Firma Gilson (Limburg) verwendet. Als Laufpuffer (Puffer A) wurde ein Puffer mit 50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7,4 verwendet. Der Gradient wurde durch die schrittweise Zugabe immer größerer Mengen an Puffer B erreicht. Dieser bestand aus 50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 1M NaCl, pH 7,4. Alle Puffer wurden vor ihrer Verwendung steril Filtriert. Der Gradient der Pufferlösung B lief von 1 – 100%. Bei der Auftrennung der Hämolymphe von *Biomphalaria glabrata* wurde ein stetig ansteigender Gradient gewählt.

6.2.2 Größenausschluss- Chromatographie

Bei dieser chromatographischen Methode können Moleküle gelöster Stoffe aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt werden. Die Säulenmatrix ist dabei wie ein dreidimensionales Netzwerk mit einer fest definierten Porengröße aufgebaut. Als Säulenmaterial wurden die Bio-Gele®- 0,5M und 1,5M (BioRad, München) verwendet. Die Säule hatte eine Länge von 50 cm. Da sich kleinere Proteine öfter in den Poren verfangen können als größere Proteine, legen sie einen längeren Weg zurück. Größere Proteine können die Säulenmatrix weitgehend ungehindert passieren. Das Eluat durchlief ein Photometer. Das Chromatogramm wurde mit Hilfe des Flachbetschreibers (Kipp und Zonen, Delft) aufgezeichnet (Abb. 19D). Die Empfindlichkeit wurde auf 0,5, und die Zeitintervalle der Messung wurden auf eine Messung pro Sekunde eingestellt. Die einzelnen Fraktionen wurden mithilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen. Das Gerät wurde so eingestellt, dass es alle 6 Minuten zur nächsten Fraktion wechselte.

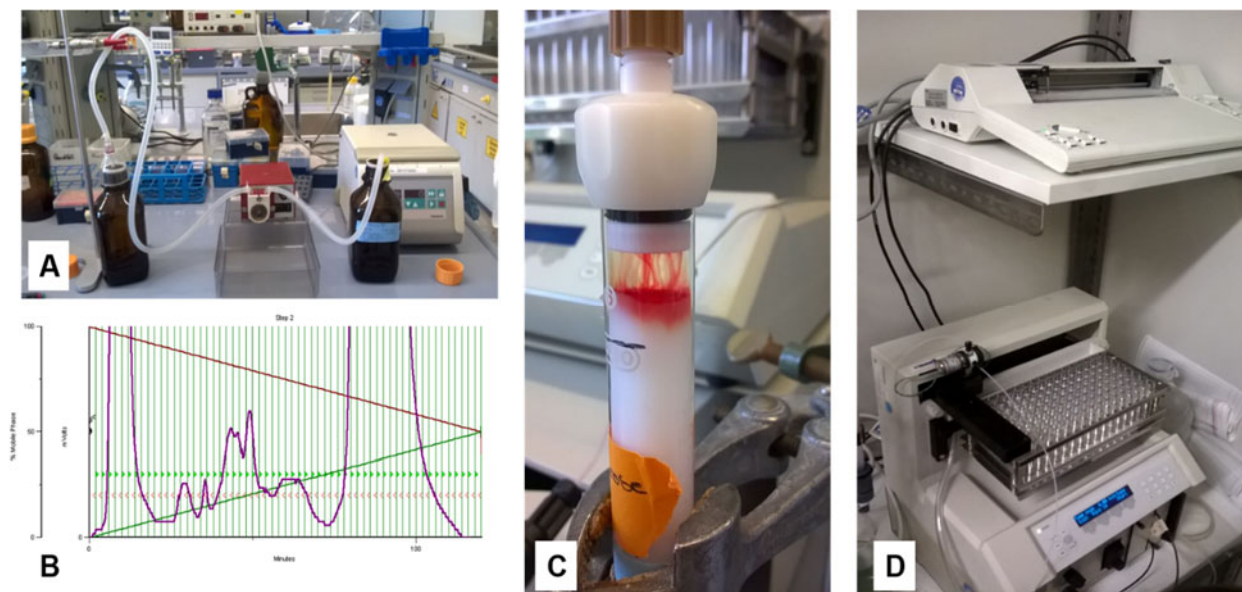


Abbildung 19: Übersicht über einige Schritte der chromatographischen Methoden: Vor der Verwendung wurden alle Puffer steril filtriert (A). Nach dem Auftrag der Probe auf die Probenschleife, konnte man dank des roten Hämoglobins genau erkennen, wann die Hämolymphe die Säule durchläuft (C). Die Auftrennung der Probe in einzelne Fraktionen konnte in Echtzeit am Monitor nachverfolgt werden (B). Bei dem Verfahren der Größenausschluss- Chromatographie wurde das Chromatogramm von einem Flachbrettschreiber aufgezeichnet und die einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen (D).

7 Proteinbiochemische Arbeiten

7.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bei dieser Methode macht man sich zu Nutze, dass sich Proteine entsprechend ihrer Ladung in einem elektrischen Feld auftrennen lassen. Die aufgetragenen Moleküle durchwandern dabei eine Gelmatrix. Dabei wandern die negativ geladenen Moleküle in Richtung Plus-Pol (Abb. 20). Diese Gelmatrix besteht aus Acrylamid, welches durch Bisacrylamid vernetzt wurde. Die Proteine wurden zuerst in einem niedrigprozentigen, großmaschigen Sammelgel fokussiert und danach in einem engmaschigeren Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Kürzere, leichtere Moleküle wandern schneller durch das Gel, als längere Moleküle. Um die einzelnen Proben in bestimmten Bereichen besser aufzutrennen, wurden die einzelnen Komponenten in einem anderen Verhältnis gemischt. So konnte für jeden Versuch ein optimales Mischverhältnis erzielt werden. Die Elektrophorese wurde sowohl unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE), als auch unter nicht denaturierenden Bedingungen (native PAGE) nach Laemli (1970) durchgeführt. Die Gelplatten hatten eine Größe von 80 x 82 mm und eine Dicke von 1 mm. Um eine optimale Fokussierung zu erreichen, lief das Gel zuerst für 15 min bei 15 mA, bis der Inhalt der letzten Proben tasche in das Trenngel übergegangen ist. Dann lief es für ca. 1 Stunde bei 25 mA. Es wurde die Elektrophorese Kammer der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen) verwendet. Zur Auswertung konnten die Gele anschließend mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue angefärbt werden.

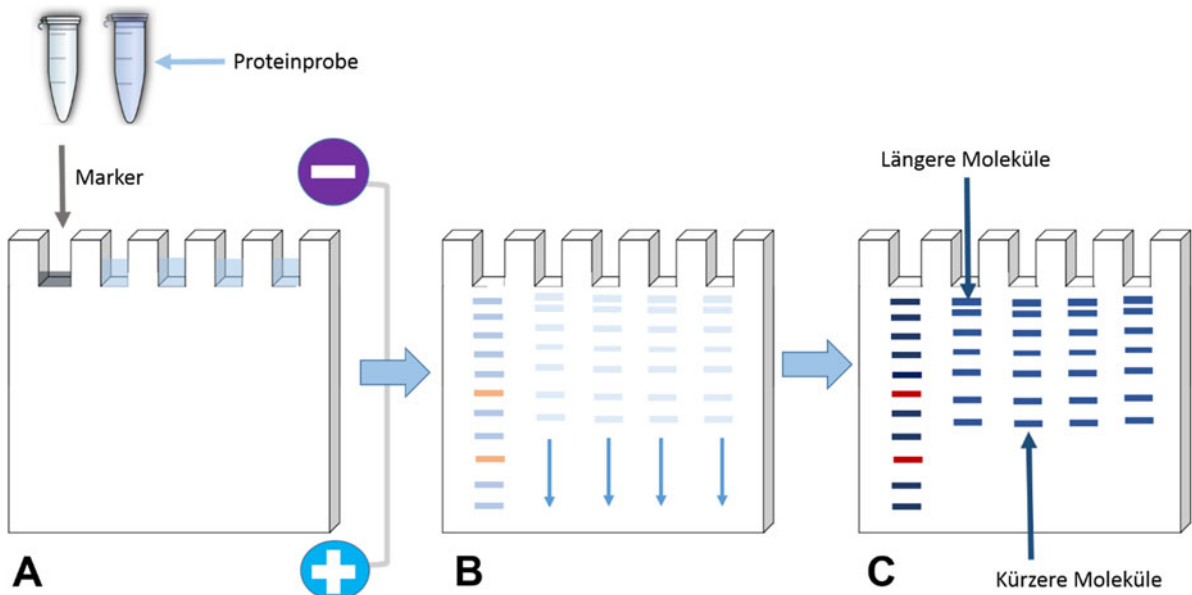


Abbildung 20 Schema der Polyacrylamid- Gelelektrophorese: Auf das Gel wird zuerst ein Protein Marker aufgetragen, welcher Moleküle mit einer definierten Größe enthält. In die übrigen Proben taschen werden die zu untersuchenden Proteinproben pipettiert (A). Durch Anlegen einer Stromquelle trennen sich die einzelnen Moleküle entsprechend ihres Molekulargewichts auf. Noch sind die Proteine im Gel nicht mit bloßem Auge zu sehen (B). Diese wurden anschließend mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue angefärbt, und so sichtbar gemacht.

7.2 SDS-PAGE

Die sogenannte SDS-PAGE ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Bei dieser Methode wird Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Bei SDS handelt es sich um ein anionisches Tensid, welches die Eigenladung von Proteinen überdeckt indem es an das Protein bindet. 1 g Protein binden dabei ca. 1,4 g SDS (Smith 1984). Zusätzlich werden durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücken zu freien Thiolen reduziert. Die Proben wurden nach der Zugabe von 2% β -Mercaptoethanol für 5 min. bei 95 °C denaturiert. Somit liegen die Proteine nur noch linear und nicht mehr in ihrer gefalteten Quartärstruktur vor. Es wurden jeweils ca. 5-10 μ g Protein mit 25 % Proben Puffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Auch hier wandern kleinere Moleküle schneller durch das Gel als größere Moleküle. Die Auftrennung erfolgte wie in B 7.1 beschrieben. Als Marker für die Größenabschätzung wurde der ProSieve™ QuadColor™ Marker von Lonza (Rockland, USA) für die Coomassiefärbung verwendet. Für das Western-Blot Verfahren, mit spezifischen Antikörpern, wurde der MagicMark XP Western Protein Standard (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

7.3 Nicht reduzierende SDS-PAGE

Bei der nicht reduzierenden SDS-PAGE wurde kein β -Mercaptoethanol verwendet. So blieben die Disulfidbrücken intakt. Die Größe wurde ebenfalls mittels verschiedener Proteinmarker abgeschätzt. Zwischen Marker und Proteinprobe wurde nach Möglichkeit zur Sicherheit eine Geltasche frei gelassen, um eine nachträgliche Reduktion der Proteine zu verhindern.

7.4 Native PAGE

Bei der nativen PAGE wurden keine Denaturierenden Detergenzien eingesetzt, welche einen Einfluss auf die Faltung der Proteine haben könnten. Die Proteine wurden so in Abhängigkeit ihrer Molekülmasse, ihrer Eigenladung und ihrer Tertiärstruktur aufgetrennt.

7.5 Coomassiefärbung von Proteinen

Um die Proteine im Gel sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff Coomassie verwendet. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass er sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert und so die Proteine unspezifisch, in ihrer Gesamtheit anfärbt. Es wurden zwei verschiedene Färbelösungen verwendet. Zum einen die Standard Coomassie Färbung, mit dem Farbstoff Coomassie Brillant Blau R 250 (Roth, Karlsruhe). Hierbei wurde das komplette Gel blau gefärbt, und der Hintergrund wurde anschließend durch eine geeignete Entfärbelösung entfärbt. So wurden die einzelnen Proteinbanden sichtbar. Zum anderen wurden die Proteine Hintergrundfrei mit dem Kolloidalen Coomassie angefärbt (Kang et al., 2002). Der Farbstoff Coomassie Brillant Blau G 250 bildet in Anwesenheit von Aluminiumsulfat und Phosphorsäure

Kolloide, welche als Farbspeicher dienen. Er lagert sich an die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren an und färbt diese ebenfalls unspezifisch an. Diese Methode ist um einiges sensitiver als die Standard Coomassie Färbung und erreicht in ihrer Sensitivität fast die einer Silberfärbung.

8 Elektronenmikroskopische Methoden

8.1 Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)



Abbildung 21: Tecnai G2 12Bio TWIN, TEM am Institut für Molekulare Physiologie in Mainz.

Die Methode der Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) macht es möglich, eine direkte Abbildung von kleinen, durchstrahlbaren Objekten, im Mikrometer- bis Nanometerbereich, mit Hilfe eines Elektronenstrahls zu erstellen. Hierbei sollte das Objekt dünn genug sein, damit es von den Elektronen durchdrungen werden kann. Als Elektronenquelle diente ein LaB_6 Filament, welches auf über 2700°C erhitzt wurde. Die Elektronen, welche von der Anode im unteren Teil des Mikroskops angezogen wurden, wanderten mit einer Geschwindigkeit von 100 000 km/s nach unten. Ein Vakuum im inneren des Mikroskops stellte hierbei sicher, dass die Elektronen

nicht kollidieren. Die Elektronen wurden durch einen Zylinder in einem Punkt gebündelt. Die Probe lenkte so die Elektronen von ihrem Weg ab, wobei Objekte mit hoher Dichte die Elektronen stärker ablenken. Der so entstandene Kontrast ermöglichte es die Strukturen bildlich darzustellen.

8.2 Verwendete Elektronenmikroskope

Tecnai G2 12BioTWIN (FEI, Eindhoven): Dieses Mikroskop wurde im Rahmen meiner Arbeit für alle chemisch fixierten und negativ kontrastierten Gewebeschnitte, sowie alle negativ kontrastierten Proteinproben zur Einzel-Partikel Analyse verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einer TVIPS TemCam-F416 4K-CCD Kamera (TVIPS, Gauting) aufgenommen und im .tiff Format gespeichert.

Tecnai G2 F20 FE-TEM (FEI, Eindhoven): Die Aufnahmen zur Erstellung der 3D-Tomographie wurden in Kooperation mit Dr. Maria Kokkinopoulou (AG Landfester), am Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPI), in Mainz angefertigt.

8.3 Einzelpartikelanalyse

8.3.1 Negativkontrastierung der Proteinproben

Für die Negativkontrastierung wurden kleine, mit einem Kohlenstofffilm beschichtete, Gitternetzchen verwendet. Da der Kohlenstofffilm überwiegend hydrophobe Eigenschaften aufweist, muss er zuvor hydrophilisiert werden. Dies geschah mittels einer diffusen Ladungswolke (*negative Glow Discharge*), bei 25 mV für 30 Sekunden (Aebi und Pollard 1987). Proteine können so besser an der Oberfläche adsorbieren. Zur Glimmentladung wurde der Emitech K100X Glimm Entlader der Firma Quorum Technologies aus Ontario, Kanada verwendet. Nun konnte die Proteinprobe auf das Gitternetz aufgetragen werden. Hierbei wurden 5 µl der Proteinlösung eingesetzt. Als Kontrastmittel werden bei der Negativkontrastierung Schwersalze verwendet. Diese erhöhen den Kontrast der Proteine und machen diese besser sichtbar. Sie legen sich über das Protein wie eine Glasur über einen Kuchen und hüllen so das Protein vollständig ein ohne auf dem Gitternetzchen Unebenheiten zu bilden. Im Rahmen meiner Arbeit wurde Uranylacetat als Kontrastmittel verwendet. Nach dem Auftrag der Proteinprobe wurde dann die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier (Whatman No.1) abgezogen und es wurden 3 µl der 1% Uranylacetatlösung aufgetragen. Nach ca. 4 Sekunden wurde die überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt. Dieser Kontrastierungsschritt wurde dreimal wiederholt. Der Elektronenstrahl kann die Bereiche mit den Schwermetallatomen nur sehr schwer durchdringen, also je dicker die Schicht aus Kontrastmittel, desto dunkler erscheint der Bereich.

8.4 Elektronenmikroskopie an Gewebeschnitten

8.4.1 Vorbereitung der Gitternetze für die chemische Fixierung

Es wurden 1,2% Formvar in Chloroform gelöst. Nun wurde ein zuvor gereinigter Objektträger, mit einer Pinzette in die Flüssigkeit getaucht. Die Formvar Lösung bildete so einen dünnen Film auf dem Objektträger. Nun konnte der getrocknete Film von allen Seiten kurz angeritzt werden damit er sich ohne zu reißen vom Objektträger lösen konnte. Um den Film vom Objektträger zu lösen, wurde er kurz in ein Wasserbad getaucht. Dadurch sank der Objektträger nach unten hin ab und der Film schwamm oben auf der Wasseroberfläche. Die kleinen Gitternetze konnten nun vorsichtig mit einer Pinzette auf dem Film platziert werden. Mit Parafilm M® wurden nun die Gitternetzchen vorsichtig bedeckt und konnten so aus dem Wasser gehoben werden. Die Gitternetzchen wurden bis zu ihrer Verwendung in einer Petrischale aufbewahrt (Abb. 22).

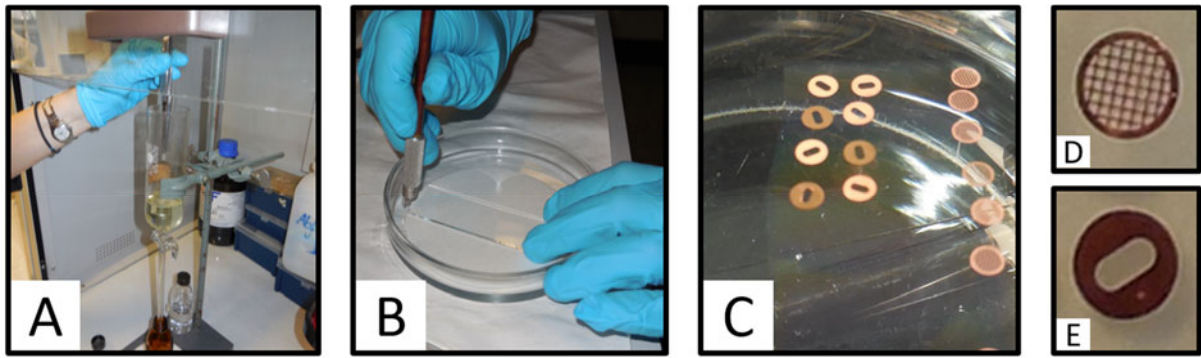


Abbildung 22: Vorbereitung der Gitternetzchen für die chemische Fixierung. Die gesäuberten Objektträger wurden mit 1,2 %iger Formvar-Chloroform Lösung bedeckt (A). Der getrocknete Film wurde kurz angeritzt (B), und zum Lösen vorsichtig in ein Wasserbad getaucht. Danach wurden die Gitternetzchen auf dem Film platziert (C). Es wurden zwei verschiedene Kupfernetzchen verwendet. (D) zeigt die Gitternetzchen wie sie für die zweidimensionalen Abbildungen des Gewebes verwendet wurden, und (E) zeigt die Gitternetzchen wie sie für die Tomographie oder Serienschritte verwendet wurden.

8.4.2 Chemische Fixierung von Süßwassertieren

(Sato 1968; Hanaichi et al. 1986)

Tabelle 10: Verwendete Lösungen für die chemische Fixierung.

Phosphatpuffer 0,2 M, pH 7,2	0,2 M Na ₂ HPO ₄ in H ₂ O dest. wurde mit KH ₂ PO ₄ auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.
Fixierlösung (Fixativ I)	5 ml 0,05 M Phosphatpuffer 400 µl 25% Gluteraldehyd 5 ml H ₂ O dest.
Postfixierlösung (Fixativ II)	500 µl 0,2 M Phosphatpuffer gemischt mit 500 µl 4% OSO ₄
Einbettmedium	39 g Renlam M-1 (Serva) 36 g Araldite Hardener Hy 964 (Serva) Wurden für 45 Minuten per Hand gerührt um eine Blasenbildung zu vermeiden. Danach wurden 1,5 g 2,4,6 – Tris dimethyl Aminomethylphenol dazu gegeben

Die chemische Fixierung ist eine der meist verbreiteten Methoden zur Fixierung von Gewebeproben für die Licht und Elektronenmikroskopie. Viele Moleküle werden in der Zelle durch Chemikalien so verfestigt, dass sie ihre natürliche Form im Schnittpräparat beibehalten. Dadurch bleiben viele zelluläre Komponenten sehr gut erhalten und strukturelle Details sind sehr gut zu erkennen. Ziel dieser Methode ist es das Gewebe möglichst so zu erhalten, dass es sich kaum vom lebenden Gewebe unterscheidet. Es wurden jeweils ausgewachsene Tiere mit einer Größe > 2cm ausgewählt. Die Schnecken wurden auf Eis in einer 7 %igen MgCl Lösung betäubt und konnten anschließend präpariert werden. Die präparierten Gewebestücke betragen eine Größe von 1–3 mm³ und wurden in Eppendorf Reaktionsgefäßen in 1%

Glutaraldehyd ($\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2$) in Phosphatpuffer (0,1M) für zwei Stunden fixiert (Abb. 23B). Glutaraldehyd hat die Eigenschaft vor allem an Aminogruppen zu binden, so erfolgt eine Quervernetzung von Proteinen. Lipide können allerdings nicht fixiert werden, diese werden in der sogenannten Postfixierung fixiert. Um nach der Fixierung das überschüssige Glutaraldehyd zu entfernen, wurden die Proben für 3-mal 20 min. in Phosphatpuffer (0,1 M) gewaschen. Danach konnte mit der Postfixierung begonnen werden. Hierbei wurden die Gewebeproben für 1 Stunde in Osmiumtetroxid (OsO_4) unter dem Abzug inkubiert, so wurden die Lipide gebunden und im Gewebe fixiert. Auch nach der Postfixierung erfolgte ein dreimaliges Waschen für jeweils 10 Minuten in Phosphatpuffer. Anschließend wurden die Proben in einer Alkoholreihe mit aufsteigender Ethanol Konzentration dehydratisiert. Es wurde für je 10 Minuten in 30%, 50%, 70%, 80% und 90% inkubiert. Danach noch je zweimal in 95% und 100% Ethanol. Jetzt konnten die Proben auf die Einbettung vorbereitet werden. In den kleinen Verschlusslosen Gefäßen wurden die Proben zuerst für zwei mal 10 Minuten in einem Ethanol-Propylenoxid Gemisch (1:2) inkubiert und anschließend für 24 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit wurde mehrmals das Gemisch ausgetauscht und schließlich durch reines Propylenoxid ersetzt. Darauf folgte eine weitere Inkubation mit reinem Propylenoxid erneut für 24 Stunden. Nach dieser Inkubation wurde die Lösung abermals erneuert. Die Gewebeproben wurden vorsichtig in kleine Silikonförmchen überführt (Abb. 23C), und für 48 Stunden bei 60°C im Ofen ausgehärtet und somit vollständig eingebettet. Anschließend wurden die Proben aus dem Ofen genommen und konnten in 2 ml Eppendorfgefäßen aufbewahrt werden.



Abbildung 23: Chemische Fixierung von Süßwassertieren. Es wurden ausgewachsene Tiere mit einem Durchmesser größer 1,5cm verwendet (A). Die Inkubation in Ethanol-Propylenoxid erfolgte für 24 Stunden in verschlossenen Glasgefäßen (B), das Aushärten erfolgte in Silikonförmchen, für 48 Stunden im Ofen (C).

8.4.3 Anfertigen von Gewebeschnitten

Alle Gewebeproben wurden unter einem Binokular, mit einer Rasierklinge so zurechtgeschnitten, dass eine kleine Pyramide entstand. So wurde das überschüssige Araldit entfernt und das Messer des Mikrotoms wurde nicht unnötig belastet (Abb. 24B). Alle Gewebeschnitte wurden mit dem Mikrotom Ultracut E von Reichert-Jung angefertigt

(Abb. 24 A). Um zu überprüfen, ob sich das Gewünschte Gewebe auch wirklich auf dem Schnitt befindet, wurden mitteldicke Schnitte mit einem Glasmesser angefertigt. Die Schnittdicke betrug hierbei 0,99 µm mit einer Schnittgeschwindigkeit von 3,0mm/s. Diese Schnitte wurden mit Methylenblau angefärbt und unter dem Lichtmikroskop (Leica DM LS, Leica Microsystems, Wetzlar) kontrolliert. Befand sich der Bereich von Interesse gut sichtbar in der Gewebeprobe, so wurden Ultradünne Schnitte für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Hierbei wurde eine Diamantklinge (45° von Diatome, Weinheim) verwendet (Abb. 24C). Die Schnittdicke betrug 80 nm und die Schnittgeschwindigkeit 0,5 mm/s. Nach dem Schneiden schwammen die Schnitte auf dem Wasserbad des Mikrotoms und konnten mit den bereits vorbereiteten Kupfernnetzchen vorsichtig herausgefischt werden. Sie wurden auf ein beschriftetes Filterpapier gelegt und bis zur Kontrastierung aufbewahrt.

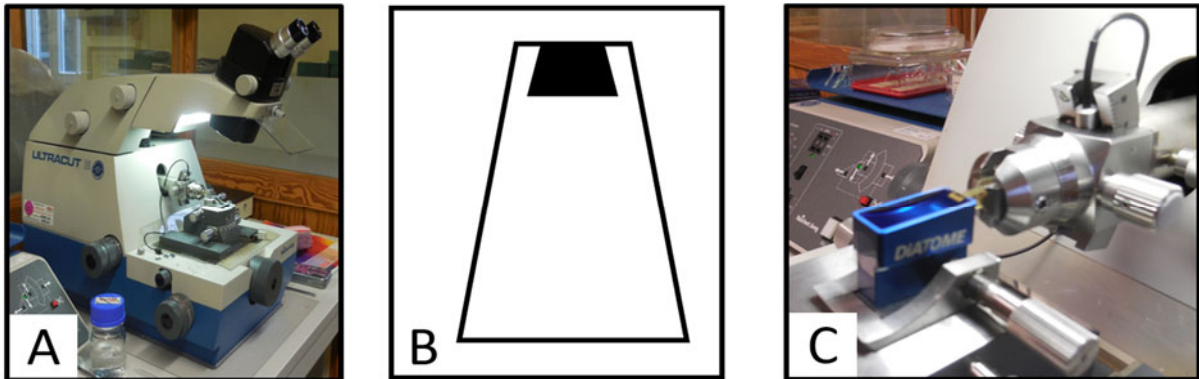


Abbildung 24: Anfertigen von Gewebeschnitten für die Elektronenmikroskopie mit dem Mikrotom Ultracut E. von Reichert-Jung (A). Vor dem Schneiden musste jeder Araldit-Block zurechtgeschnitten werden (B, schematische Darstellung). Für die Elektronen-mikroskopie wurden ultadünne Schnitte mit einer Diamantklinge (45° von Diatome) angefertigt.

8.4.4 Die Kontrastierung der Gewebeschnitte

Die Gitternetzchen mit den Gewebeschnitten wurden in einen kleinen Silikonhalter eingespannt und zuerst lichtgeschützt, für 10 Minuten in 2 % Uranylacetat in 50% Ethanol inkubiert. Danach wurden sie mit H₂O dest. gründlich gespült. Das überschüssige Wasser wurde vorsichtig mit einem Filterpapier abgenommen. Danach wurden die Schnitte für 2 Minuten in eine Bleicitratlösung (Tab. 11) getaucht. Danach konnten sie mit H₂O dest. gespült und in einer Petrischale, auf einem Filterpapier trocknen gelassen werden.

Tabelle 11: Bleicitratlösung für die Kontrastierung von Gewebeschnitten für die Elektronenmikroskopie.

Bleicitratlösung	0,2 g 0,15 g 0,15 g 1,0 g 41,0 ml 9 ml	Pb (C ₆ H ₅ O ₇) ₂ Pb (NO ₃) ₂ Pb (CH ₃ COO) ₂ x 3H ₂ O Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) x 2 H ₂ O H ₂ O dest. 1NNaOH
------------------	---	--

8.5 Erstellung eines 3D-Tomogramms

Die dreidimensionalen Tomogramme wurden mit dem Elektronenmikroskop, Tecnai G2 F20 FE-TEM (FEI, Eindhoven), angefertigt. Alle Aufnahmen zur Erstellung der 3D-Tomographie wurden in Kooperation mit Dr. Maria Kokkinopoulou, am Max-Planck-Institut für Polymerforschung (MPI), in Mainz angefertigt. Um die Kippserie der Bilder aufzunehmen, wurde die Ultrascan 1000 2k CCD Kamera, der Firma Gatan verwendet. Die Bilder wurden mit der *digital micrograph software* (Gatan) verarbeitet und gespeichert. Das Tecnai F20 (FEI) Mikroskop wurde bei 200 kv betrieben. Um die Kippserie von -60° bis $+60^\circ$ aufzunehmen, wurde die *Serial EM software* verwendet (Mastrorade 2005). Die Alignments und die Rückprojektionen wurden mit *eTomo* erstellt (IMOD software package, (Kremer et al. 1996)).

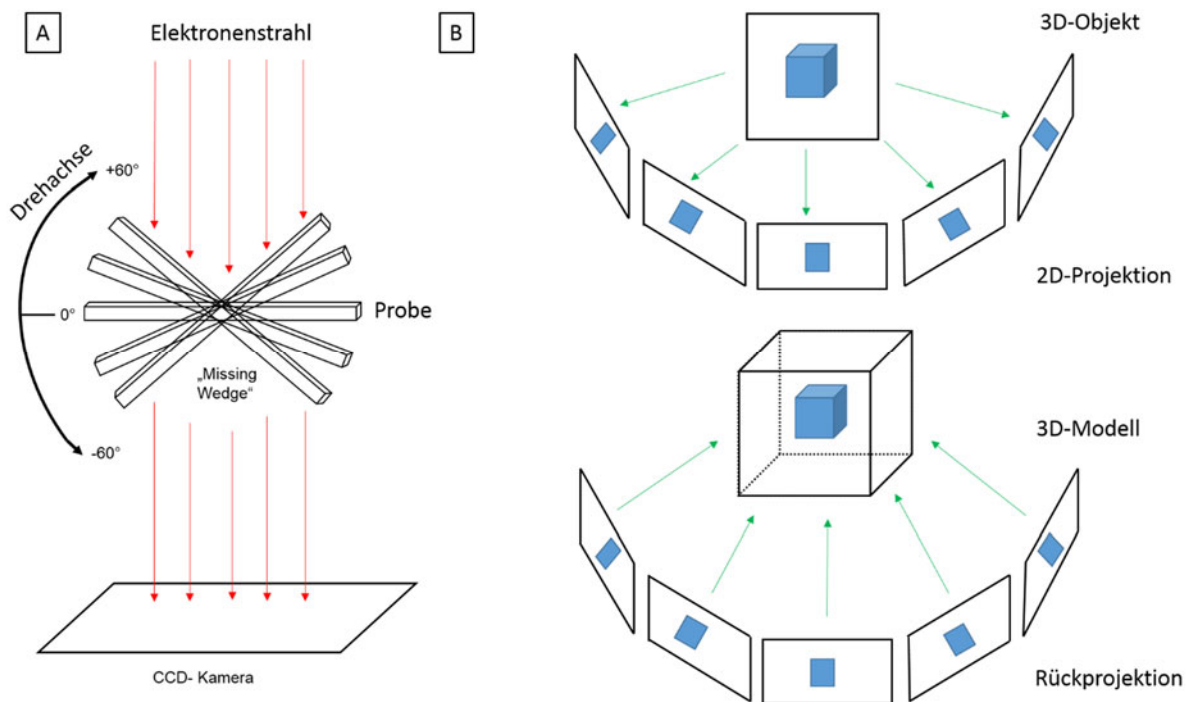


Abbildung 25: Schematische Darstellung der 3D-Tomographie: Zur Darstellung eines 3D-Modells wurden im Abstand von $1,5^\circ$ jeweils ein Bild aufgenommen. dabei wurde die Probe von $+60^\circ$ bis -60° gedreht. Dabei gibt es einen Bereich, von dem keine Bilder aufgenommen wurden. Dieser Bereich wird als „Missing Wedge“ (= fehlender Keil) bezeichnet (**A**). Diese Aufnahmen werden dann als „stack“ gespeichert. Aus diesen sogenannten 2D-Projektionen wird dann durch Rückprojektion ein 3D-Modell erstellt (nach Sali et al. 2003).

9 3D- Darstellung von Proteinstrukturen

Die dreidimensionalen Darstellungen von Proteinstrukturen, Proteinen oder dem aktiven Zentrum des *Bg*-AChBP1, wurden mit dem Computer-Programm UCSF Chimera, Produkt Version 1.11.2 (build 41376) erstellt. Die jeweiligen pdb-IDs sind in den jeweiligen Bildunterschriften angegeben.

10 Bindungsstudien mit amorphem Calciumcarbonat

Um den Einfluss von *Bg*-AChBP auf die Kristallisationseigenschaften von amorphem Calciumcarbonat zu testen, wurden Calciumcarbonat Kristallisations-Experimente, ausgehend von amorphem Calciumcarbonat, unter Zugabe von *Bg*-AChBP als Additiv, durchgeführt. Die Synthese der verschiedenen Calciumcarbonat-Polymorphe erfolgte durch Mirko Montigny und der Arbeitsgruppe von Professor Tremel. Desweiteren wurden alle Calciumcarbonat-Experimente in Kooperation mit Mirko Montigny (AK Tremel) an der Johannes Gutenberg-Universität, in Mainz durchgeführt. Die IR-Spektren wurden mit dem Nicolet™ iSTM10 FT-IR Spektrometer von Thermo scientific angefertigt. Die Auflösung betrug 1 cm^{-1} für 16 Iterationen. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde das konfokale Lichtmikroskop Keyence-8710 mit einem $633,318\text{ nm}$ He/Ne Laser verwendet. Zusätzlich wurde die Methode der Röntgenbeugung eingesetzt (*x-ray diffraction* = XRD). Bei dieser Methode wird die Beugung von Röntgenstrahlen an geordneten Strukturen wie Kristallen gemessen. Alle Immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Leitz DM RBD Fluoreszenz-Mikroskop (Leica, Wetzlar) erstellt. Alle photometrischen Bestimmungen erfolgten mit dem Ultraspec 2100 Pro von Amersham Bioscience (Freiburg) und wurden wie in B 5.13 beschrieben durchgeführt. Amorphes Calciumcarbonat wurde von Herrn Mirko Montigny nach der Faatz-Wegner Methode synthetisiert (Faatz et al. 2004). Es wurde die Klima Kammer ThermoTEC (ESPEC) von ThermoTEC, Weilburg verwendet. Diese wurde bei 40°C und einer Luftfeuchte von 40% betrieben. Die einzelnen Calciumcarbonat Modifikationen wurden von einzelnen Masterkandidaten der AG Tremel synthetisiert. Alle für die Titration oder für Kristallisations-Experimente verwendeten Reagenzien, wurden von der Firma Sigma Aldrich bezogen. Alle Verdünnungen wurden bei 7°C aufbewahrt. Elementanalysen wurden von Herrn Mirko Montigny mit der Methode der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX) durchgeführt. Bei dieser Methode werden die Atome in der Probe durch einen Elektronenstrahl angeregt. Diese Atome senden nun für das jeweilige Element spezifische Röntgenstrahlen aus. Diese charakteristische Röntgenstrahlung kann von einem Detektor gemessen werden und gibt somit Aufschluss auf die Elementzusammensetzung.

C Ergebnisse

1 Isolierung und Charakterisierung der nativen Hämolympheproteine

Tieren wurde Hämolymphe entnommen und die Hämolympheproteine wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt (siehe: B 6.2.1), den entsprechenden Experimenten von Lieb et al. (2006) und Saur et al. (2012) folgend. Um alle Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde immer dieselbe Menge Hämolymphe (ca. 1,6 ml) auf die Säule aufgetragen. Die einzelnen Gipfel wurden elektronenmikroskopisch untersucht. In den ersten untersuchten Fraktionen des Peaks I und II waren Partikel von unterschiedlicher Größe zu erkennen. In den Fraktionen des Peaks III waren deutlich die *Bg*-AChBP-Pentamere zu erkennen, aber auch einige rechteckige Partikel, bei denen es sich vermutlich um Dipentamere handelt. *Bg*-AChBP-Dodekaeder konnte man deutlich in den Fraktionen des Peaks IV erkennen, ebenso wie einige Hämocyanin-Dekamere. Diesen Hämocyanin-Molekülen scheint der innere Kragen zu fehlen. In Peak Nummer V fand sich als die größte Proteinfraktion das respiratorische Blutprotein Hämoglobin. Soweit konnte ich die Ergebnisse von Lieb et al (2006) und Saur et al. (2012) bestätigen.

Über die früheren Versuche hinaus habe ich die Hämolymphe von sehr großen Tieren (\emptyset des Gehäuses $>1,8$ cm) mit der Hämolymphe sehr kleiner Tiere (\emptyset des Gehäuses max. 8mm) verglichen. Ich erhielt vergleichbare Elutionsprofile und die einzelnen Peaks enthielten eine sehr ähnliche Zusammensetzung an Proteinen. Bei den voll ausgewachsenen Tieren war jedoch bei der Wellenlänge von 280 nm ein zusätzlicher, sehr prominenter Gipfel am Beginn der Elution zu sehen. Dieser Peak enthielt jedoch keine Proteine (Abb. 26).

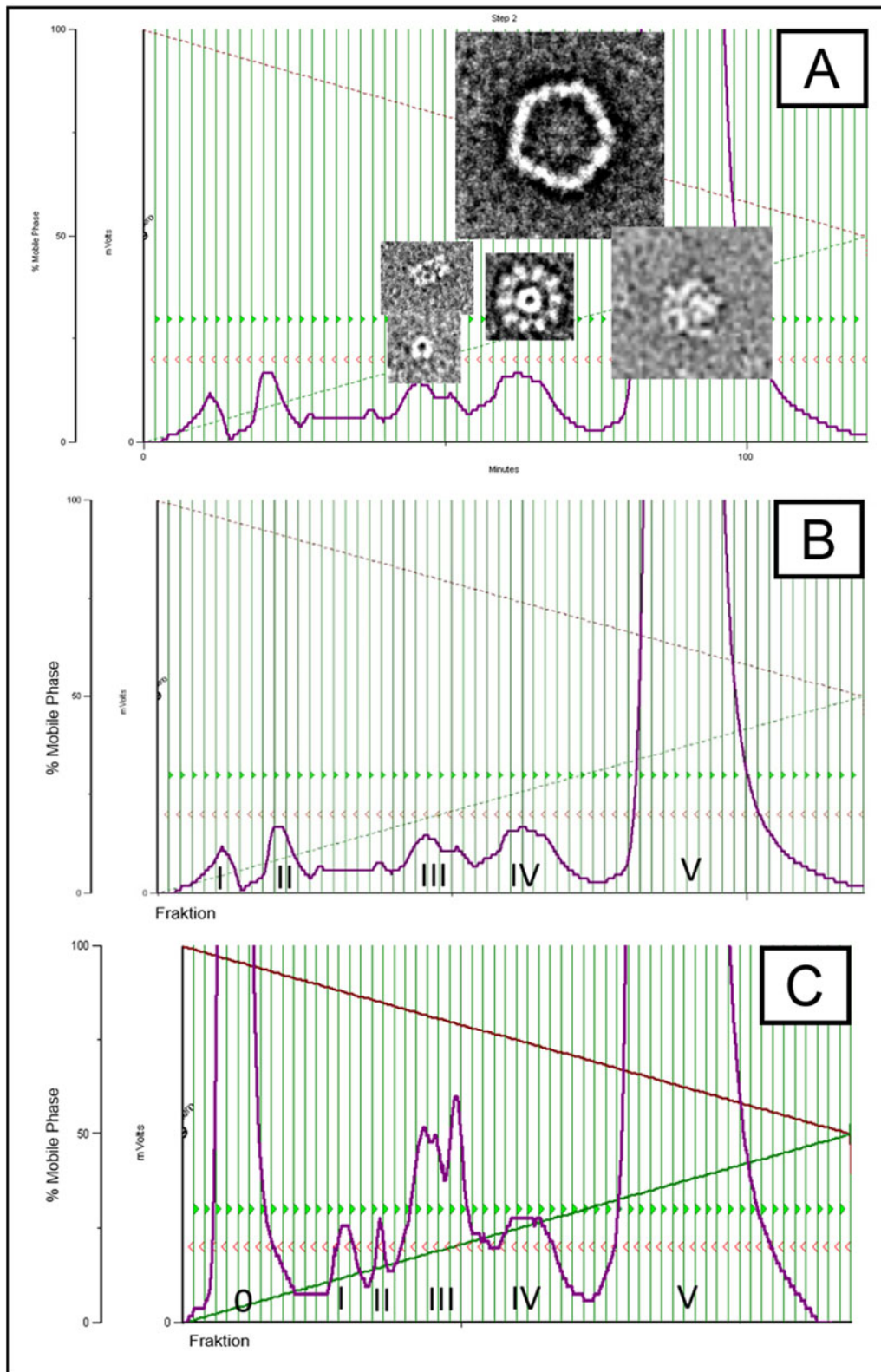


Abbildung 26: Übersicht über die Zusammensetzung der Hämolympheproteine von *B. glabrata*. Die Hämolymphe wurde mit Hilfe der Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. Es wurden bei jedem Versuch ca. 1,6 ml Hämolymphe aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten mit einer ansteigenden Salzkonzentration im Puffer (grüne Linie) bei 0,5 ml/ min über einen Zeitraum von zwei Stunden eluiert. **(A)** Die einzelnen Fraktionen wurden elektronenmikroskopisch untersucht. In den Fraktionen I und II konnte man noch unbestimmte Proteinpartikel erkennen. In der Fraktion III waren AChBP-Pentamere und eventuelle Dipentamere zu erkennen. In Fraktion IV befanden sich die AChBP-Dodekaeder und Hämocyanin-Dekamere. Der prominente Peak V bestand vollständig aus multimerem Hämoglobin. Vergleicht man das Chromatogramm der kleinen Tiere **(B)** mit dem der großen Tiere **(C)**, so sind deutliche Unterschiede zu erkennen.

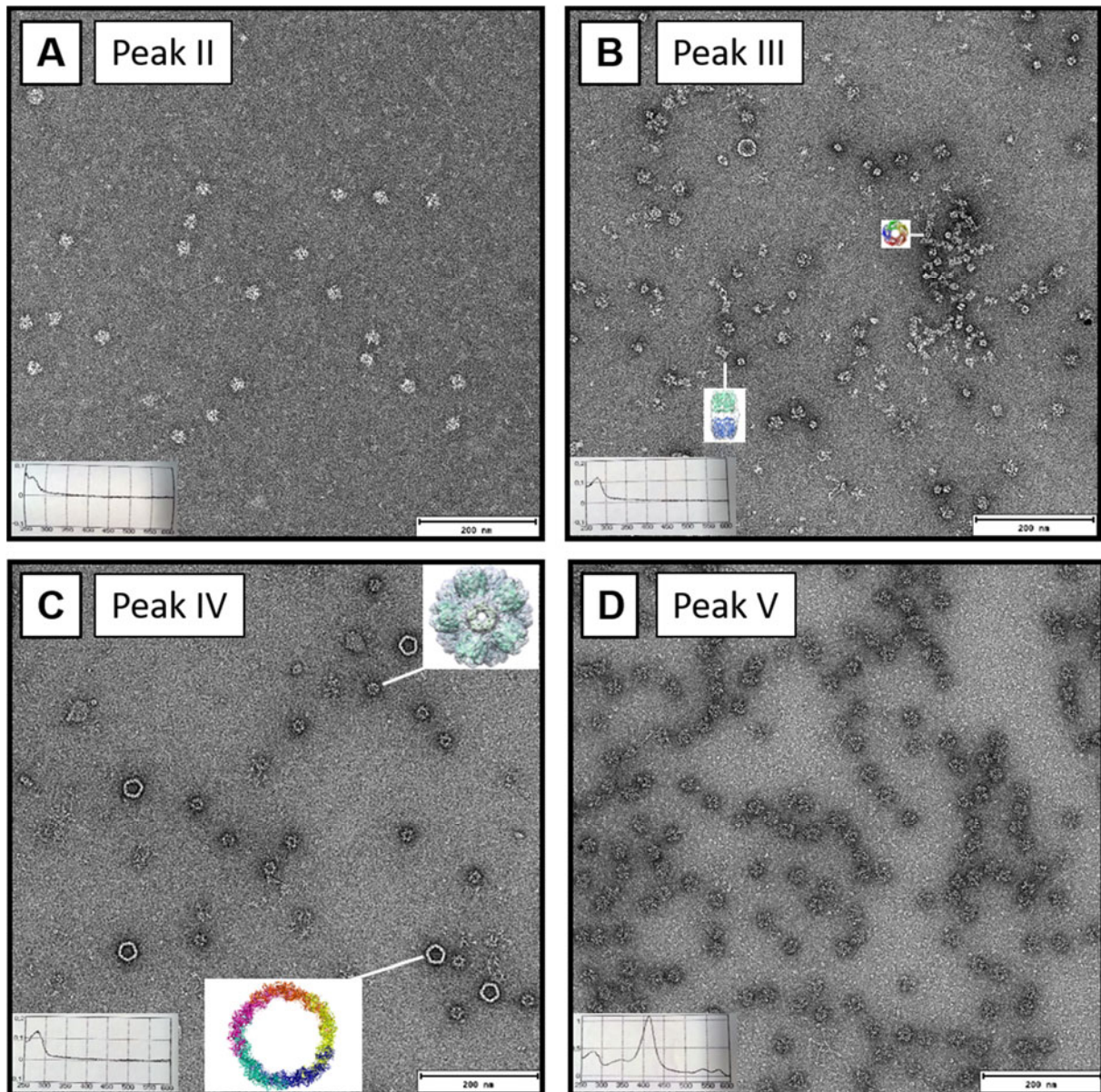


Abbildung 27: Übersicht über die in der Hämolymphe befindlichen Strukturen. Bezogen auf das in Abb. 26 dargestellten Chromatogramm (größere Tiere). (A) TEM-Aufnahme des Peaks II. Es sind noch nicht näher bestimmte Proteinpartikel zu erkennen. Auf eine Darstellung des Peaks Nr. I wurde verzichtet, dieser entspricht in seiner Zusammensetzung dem Peak Nr. II. (B) zeigt die Partikel, aus Peak III. Es waren deutlich Pentamere zu erkennen. Es konnten auch einige rechteckige Partikel beobachtet werden. Diese sind möglicherweise Dipentamere (3D-Darstellung des Pentamer nach (Saur et al. 2012)). Die Darstellung des Peaks IV zeigt deutlich *Bg*-AChBP Dodekaeder (3D-Darstellung nach (Saur et al. 2012)) und Hämocyanin-Moleküle. Es ist deutlich zu sehen, dass den Hämocyanin-Molekülen der innere Kragen fehlt (Markl, 2012). (D) zeigt die Moleküle in Peak Nr. V. Die einzelnen Hämoglobin-Moleküle sind gut zu erkennen. Auch das UV-Spektrum zeigt den für Hämoglobin typischen Verlauf.

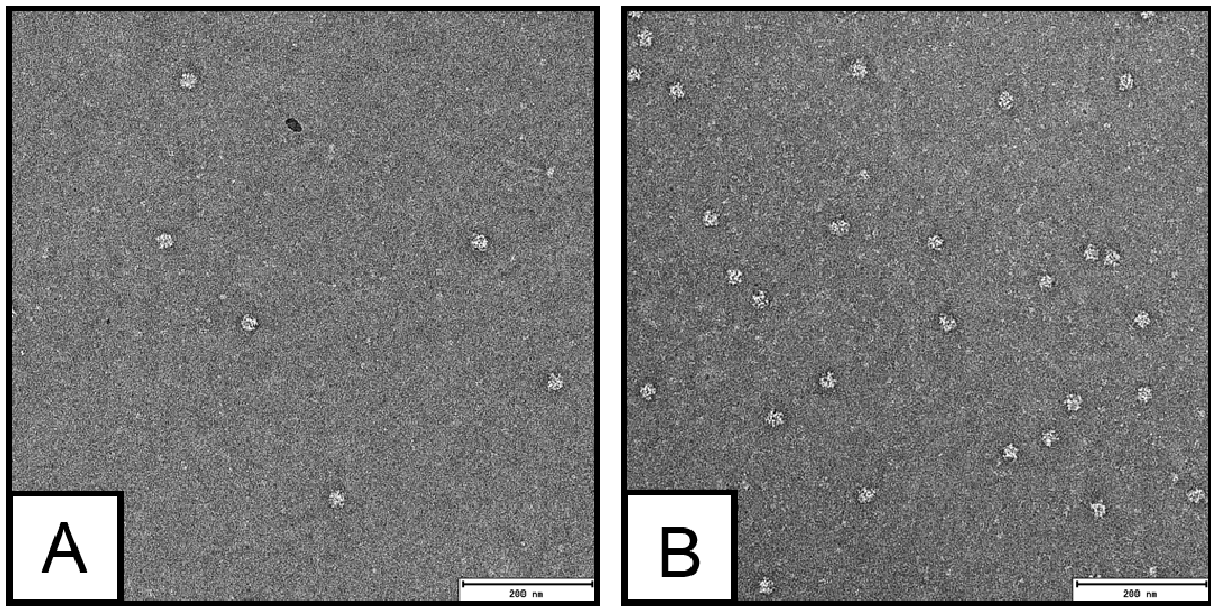


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der HPLC-Aufreinigung von Peak II: (A) zeigt die noch unbestimmten Partikel der kleinen Tiere, (B) die der großen Tiere. Es scheint, als hätten die größeren Tiere auch einen höheren Anteil dieser Partikel. Die stimmt auch mit dem größeren Peak II der Anionenaustausch-Chromatographie überein.

1.1 SDS-PAGE der Hämolympheproteine

Bei der Aufreinigung der Hämolympheproteine waren deutlich AChBP-Dodekaeder, Pentamere und eventuelle Dipentamere zu erkennen. Um zu untersuchen, ob diese Partikel einer AChBP Isoform zugeordnet werden können, wurden SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen *Bg*-AChBP1 und *Bg*-AChBP2 durchgeführt. Diese wurden zu Beginn meiner Arbeit in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Kristiane Rusitzka erstellt. Die SDS-PAGE wurde zum einen jeweils unter reduzierenden Bedingungen (mit β -Mercaptoethanol) und zum anderen unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne β -Mercaptoethanol) durchgeführt. Es wurden Gele mit 15 % Acrylamid angefertigt. Bei den verwendeten Proteinmarkern handelte es sich zum einen um den ProSieve™ Quad Color™ Marker (4,6 bis 300 kDa, von Lonza) und zum anderen um den MagicMark™ XP Protein Standard Marker von Thermo Fisher Scientific.

In Peak II war sowohl unter reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen eine sehr schwache Bande oberhalb 300 kDa zu erkennen (Abb.29). Im Peak III zeigten sich die gleichen Banden in deutlich höherer Konzentration. Unter reduzierenden Bedingungen befand sich die untere Bande zwischen 170- und 300 kDa. Wobei sich diese Bande unter nicht reduzierenden Bedingungen etwa bei ca. 100 kDa befand. Unter nicht reduzierenden Bedingungen ist in Peak III vor allem eine Bande im Bereich 240 kDa zu sehen. Unter nicht reduzierten Bedingungen wanderte dieses Proteindeutlich über 300 kDa, was auf ein S-S-verbrücktes Dimer schließen ließ. Ähnlich wanderte die Hauptmasse des Hämoglobins in Peak V reduziert bei ca. 180 kDa und nicht reduziert etwa bei der doppelten Molekülmasse, was

Ergebnisse

den Ergebnissen von Lieb et al. (2006) entspricht. Die Proteinbanden in Peak III und IV bei 30 kDa (reduziert) und 60 kDa (nicht reduziert) wurden gemäß Saur et al. (2012) dem AChBP zugeordnet und die schwache Bande bei 300 kDa in Peak IV dem Hämocyanin (siehe Lieb et al., 2006).

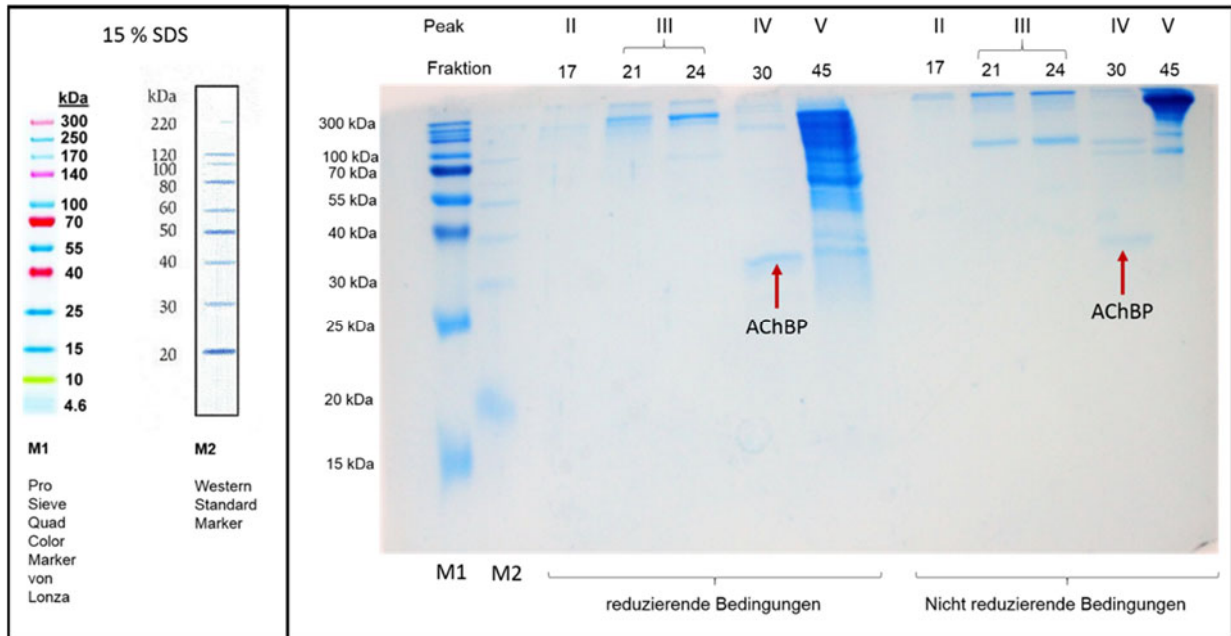


Abbildung 29: 15%ige SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen der aufgereinigten Hämolympheproteine von *B. glabrata*. Es wurden einzelne Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie aufgetragen. In Peak IV ist die typische *Bg*-AChBP-Bande bei 30 kDa zu erkennen und eine schwache Bande bei 300 kDa, welche dem Hämocyanin zuzuordnen ist. Peak V enthielt das Hämoglobin, dass sich als Schmier mit mehreren Banden zeigte. In Peak II und vor allem in Peak III zeigten sich Banden weit oben im Gel. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen, reduzierte sich die 30 kDa-Bande zugunsten der 150 kDa-Bande; diese tauchte jetzt in Peak III plötzlich verstärkt auf, während die 240 kDa-Bande nun in die größere Bande (480 kDa?) übergegangen zu sein schien.

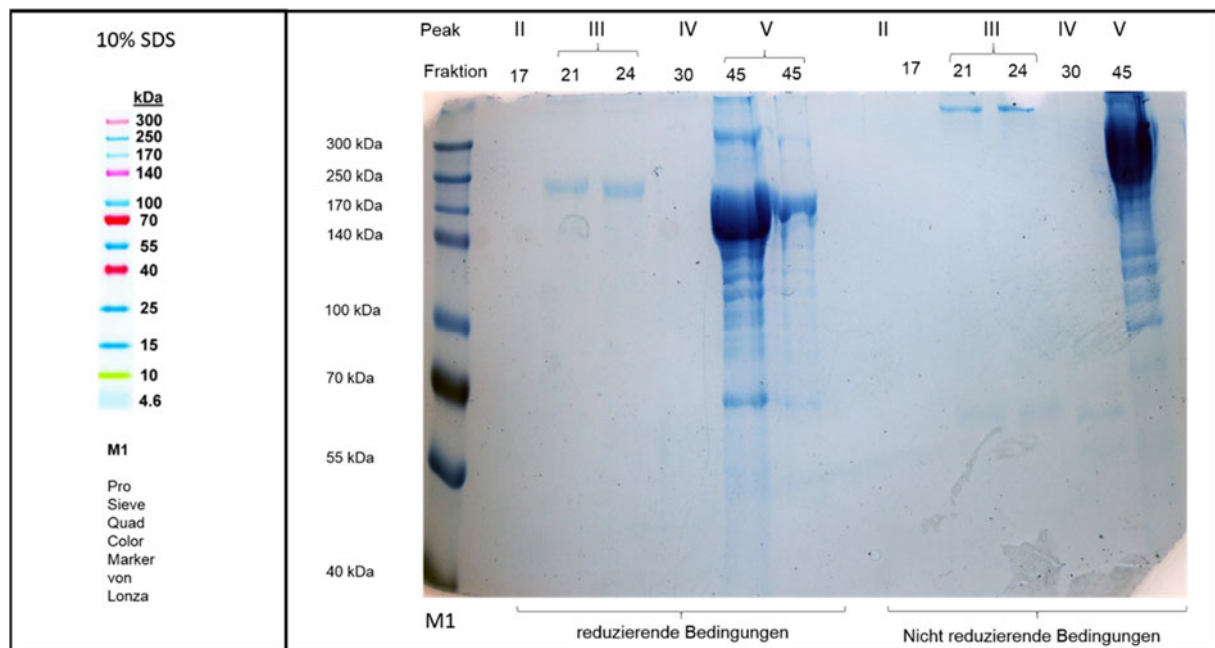


Abbildung 30: SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen der aufgereinigten Hämolympheproteine von *B. glabrata*. Es wurden einzelne Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie aufgetragen. Der Bandschmier in Peak V konnte durch Auftragen einer geringeren Konzentration etwas besser aufgetrennt werden. Die charakteristische Hämoglobinbande im SDS-Gel bei 180 kDa sticht hier eindeutig hervor. In Peak III ist durch die bessere Auftrennung zu erkennen, dass sich die Bande bei ca. 240 kDa befindet. (Das gleich wandernde Protein in Peak II war hier nicht zu sehen, ebenso nicht die Proteine von Peak IV) Unter nicht reduzierenden Bedingungen liegen die Proteine in Peak III und V offenbar dimerisiert vor.

Neben den bereits von Lieb et al (2006) und Saur et al. (2012) bekannten Hämolympheproteinen Hämoglobin, Hämocyanin und AChBP hatten meine Analysen bis zu diesem Punkt folgendes Neues ergeben:

- Eine weitgehende Abtrennung der *Bg*-AChBP-Dodekaeder (Peak IV) von *Bg*-AChBP-Pentameren (Peak III).
- Eine zuvor noch nicht beschriebene Proteinbande von 240 kDa, die im nicht reduzierenden Gel dimerisiert vorliegt (480 kDa?).
- Das Vorliegen einer 150-kDa-Komponente im SDS-Gel von Peak III und IV, bei der es sich wohl um *Bg*-AChBP-Pentamere handelt, die in SDS stabil sind.

Um die Proteine in den vier Peaks näher zu charakterisieren, wurden Westernblot-Analysen mit den Antikörpern gegen *Bg*-AChBP1 und *Bg*-AChBP2 durchgeführt.

2 Western-Blot-Analysen von 15%igen SDS-Gelen

Isoform-spezifische polyklonale Antikörper wurden von mir dazu verwendet, die Banden im SDS-Gel den beiden *Bg*-AChBP-Isoformen zuzuordnen. Die Antikörper waren in Kaninchen gegen die rekombinanten Proteine hergestellt worden und ihre Spezifität wurde mit den

Ergebnisse

rekombinanten Proteinen getestet (Rusitzka, 2016). Mit dem Antikörper gegen *Bg*-AChBP1 wurde in allen Fraktionen eine Bande weit oben im Gel markiert. Im Peak IV wurde zudem eine Bande auf Höhe des *Bg*-AChBP-Monomers (ca. 30 kDa) markiert (Abb. 31A). Mit dem Antikörper gegen *Bg*-AChBP2 wurde in Peak IV eine Bande bei 25-30 kDa, eine Bande bei 60 kDa und eine Bande bei 100 kDa markiert. In Peak III konnte eine sehr schwache Bande bei ca. 30 kDa beobachtet werden (Abb. 31 B).

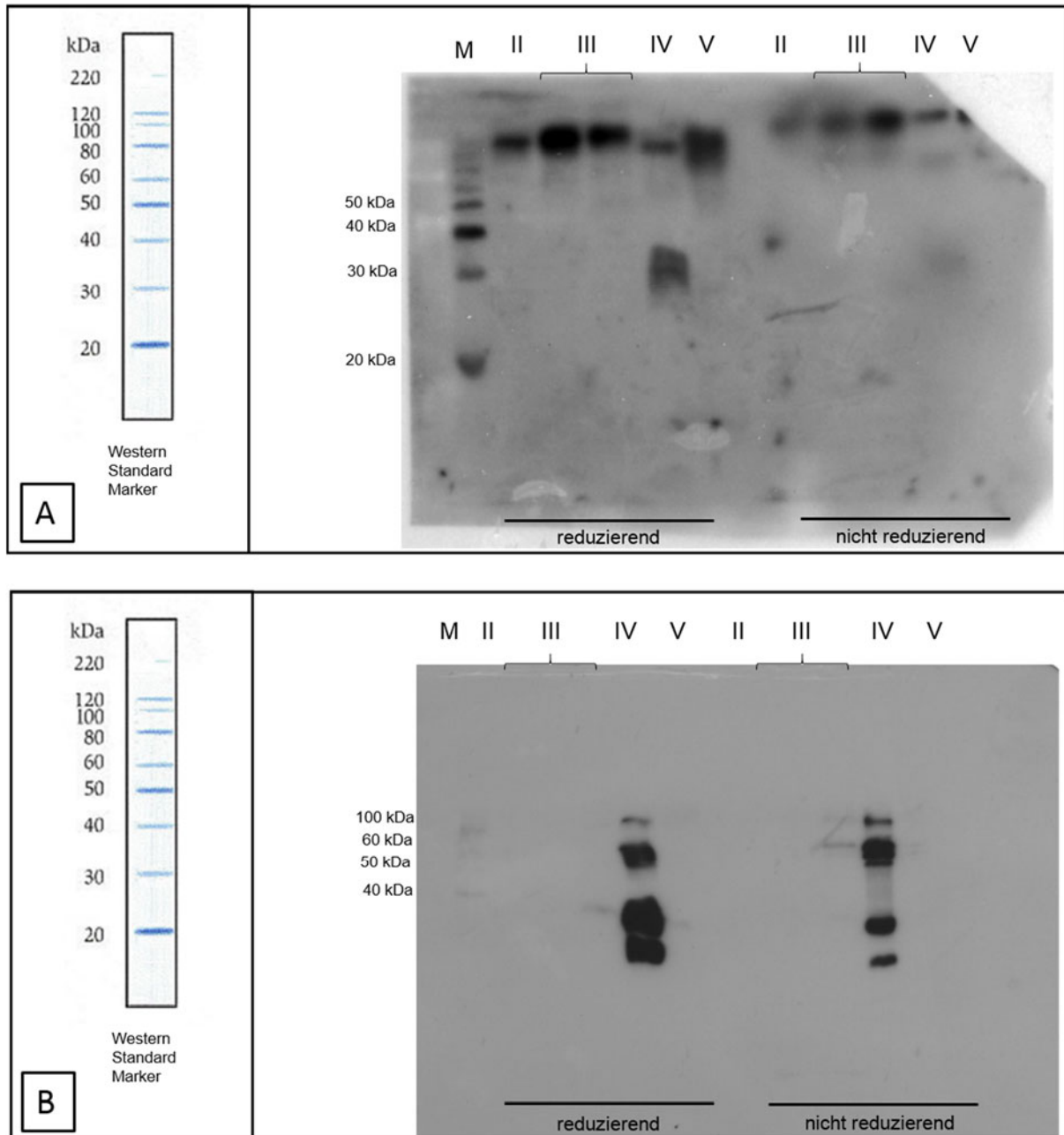


Abbildung 31: Western-Blot Analysen der aufgereinigten Hämolympheproteine von *B. glabrata*. (A) Inkubation mit dem Antikörper gegen *Bg*-AChBP1. Die typische Monomer-Bande des *Bg*-AChBP1 bei 30 kDa ist hier markiert, aber nur in Peak IV vorhanden. Zusätzlich ist in allen Fraktionen eine Bande weit oben im Gel markiert, bei ca. 150 kDa. Bei dieser Bande könnte es sich also um *Bg*-AChBP1-Pentamere handeln. Im nicht-reduzierenden Gel war die 30 kDa-Bande praktisch verschwunden; nahezu das gesamte Material lag als 150 kDa-Bande vor, die mit dem Antikörper reagierte. (B) Die anti-*Bg*-AChBP2-Antikörper reagieren hier fast ausschließlich mit Proteinen in Peak IV (in Spuren auch in Peak III), wobei die Hauptkomponenten bei 30 kDa und 60 kDa wandern. Merkwürdigerweise war das Muster in Peak IV im reduzierenden und im nicht-reduzierenden Gel gleich, außer dass es sich etwas zur 60 kDa-Bande hin verlagerte.

3 Rekombinante Expression von *Bg*-AChBP1

Die Proteinexpression wurde wie in 5.2 beschrieben durchgeführt (siehe auch (Saur et al. 2012)). Ob die Expression erfolgreich war, wurde mittels SDS-Gel überprüft. Zeigte sich die charakteristische AChBP-Bande bei 25 kDa, konnte man davon ausgehen, dass die Expression erfolgreich war. Diese Bande zeigte sich im Bakterienpellet (P) und nicht im Überstand (Üb). Daher kann man davon ausgehen, dass sich das Protein in Einschlusskörperchen befindet (Abb. 32). Diese charakteristische Bande fehlte in der nicht induzierten Kontrolle. So konnte sichergestellt werden, dass es sich nicht um ein bakterientypisches Protein handelte.

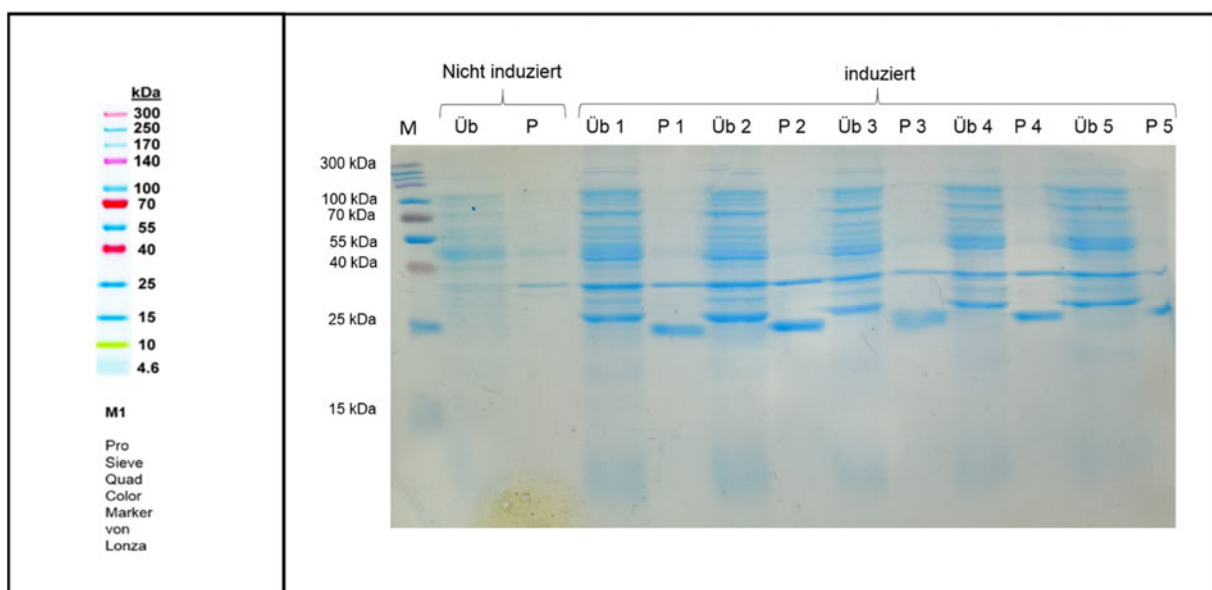


Abbildung 32: Überprüfung der *Bg*-AChBP1 Expression mittels SDS-PAGE: Es wurde der Pro Sieve Quad Color Proteinmarker der Firma Lonza (Rockland, USA) zur Größenabschätzung der einzelnen Banden verwendet (M). Es wurde von allen Proben jeweils der Überstand (Üb) und das Proteinpellet (P) aufgetragen. In den induzierten Präzipitaten ist jeweils eine für AChBP charakteristische Bande bei 25 kDa zu erkennen. Das exprimierte Protein befindet sich also in Einschlusskörperchen der zuvor induzierten Bakterien. In der Kontrolle (nicht induzierte Bakterien) fehlt diese Bande. Somit handelt es sich nicht um ein bakterientypisches Protein.

Da sich das exprimierte Protein in den Einschlusskörperchen im Präzipitat befand, mussten diese durch Sonifizieren aufgebrochen werden. Danach lag das *Bg*-AChBP1 in Lösung vor. Das Protein wurde wie in 5.6 beschrieben über eine Nickel-Sepharosesäule aufgereinigt. Dies geschah mit Hilfe des zuvor anklonierten N-terminalen 6x Polyhistidin-Tags. Dieser konnte reversibel an die chelatierten Nickelionen binden. Durch den Elutions Puffer konnte die Bindung gelöst werden und das rekombinante Protein befand sich im Eluat (siehe: 5.8). Das Eluat wurde renaturiert und gegen 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) dialysiert. Im letzten Schritt wurde dann der Polyhistidin-Tag mit Hilfe der TEV-Protease, welche an der TEV Schnittstelle schneidet (siehe 5.1), entfernt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass erst nach abspalten des Polyhistidin-Tags Dodekaeder gebildet werden konnten.

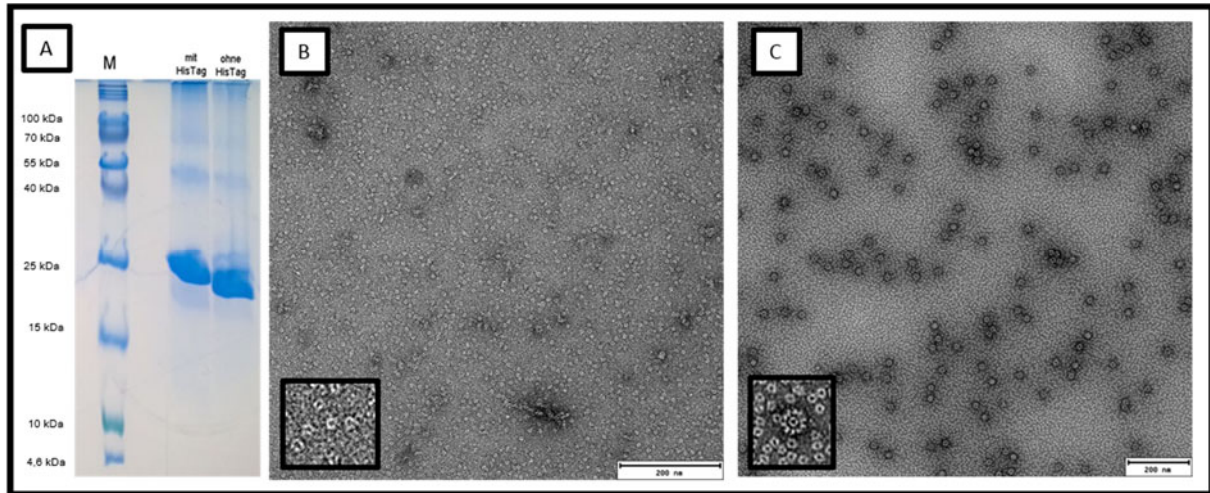


Abbildung 33: TEM-Aufnahmen nach erfolgreicher *Bg*-AChBP1 Expression. Rekombinantes Protein in 20 mM Tris-Puffer, pH 7,5. Im SDS-Gel war deutlich zu erkennen, ob die Abspaltung des Polyhistidin-Tags erfolgreich war. Die Bande ohne His-Tag war etwas kleiner und wanderte daher etwas weiter unten im Gel (A). Nach der Rückfaltung mit His-Tag lag das rekombinante Protein zuerst nur in Form von Pentameren vor (B). Erst nach Abspaltung des Polyhistidin-Tags lagen sowohl Pentamere als auch Dodekaeder vor (C).

Im nächsten Schritt wurden nun die Dodekaeder von den Pentameren getrennt. Dies geschah mit Hilfe der Größenausschluss-Chromatographie. Hier wurden die Proteine aufgrund ihrer Größe aufgetrennt. Große Moleküle befinden sich in den früheren Fraktionen des Eluats, während kleinere Moleküle später eluieren. Nach der Aufreinigung waren im Elutionsprofil drei Gipfel zu erkennen (Abb. 34). Alle Fraktionen dieser Gipfel wurden vereint, aufkonzentriert und mit dem Elektronenmikroskop untersucht. War die Auftrennung erfolgreich, lagen Pentamere und Dodekaeder getrennt voneinander vor. Die Dodekaeder befanden sich in Peak 1, während die Pentamere in Peak 2 zu finden waren. Peak 3 enthielt neben vereinzelt Pentameren vor allem irreguläre Proteinpartikel, offenbar unvollständige Pentamere. Deren erfolgreiche Abtrennung war für die Aufreinigung wichtig (Abb. 34).

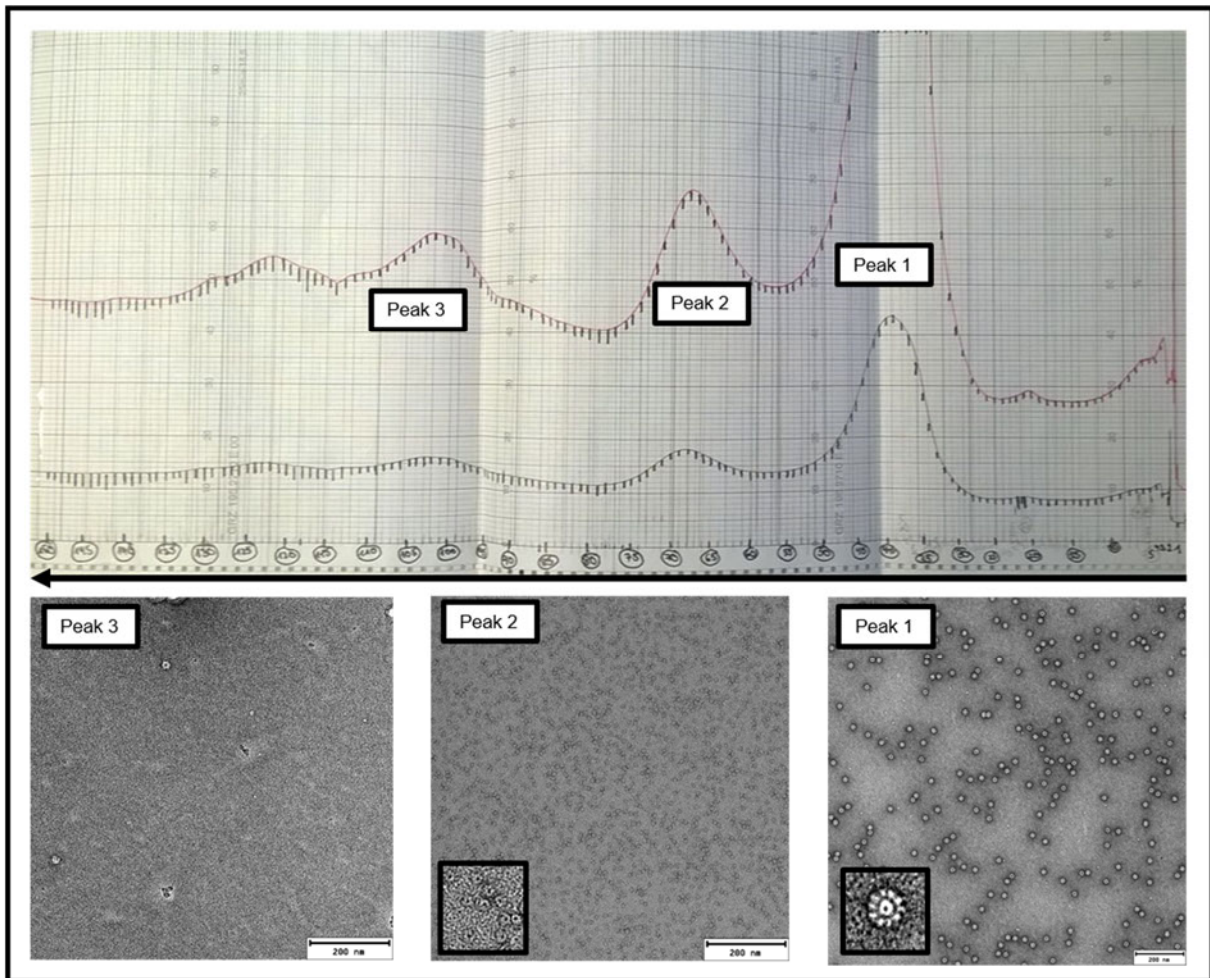


Abbildung 34: Größenausschluss-Chromatographie zur Trennung von *Bg-AChBP1* Dodekaedern und Pentameren nach rekombinanter Expression. Im oberen Teil der Abbildung ist das Elutionsprofil der Größenausschluss-Chromatographie zu sehen. Der eingezeichnete Pfeil gibt die Richtung an, in der die Elution verlief. Die drei eingezeichneten Peaks wurden aufkonzentriert, und nach einer Negativkontrastierung am Elektronenmikroskop untersucht. In Peak 1 befanden sich die Dodekaeder und Peak 2 enthielt die Pentamere. Der dritte Gipfel enthielt neben vereinzelt Pentameren vor allem Proteinfragmente.

4 Rekombinante Expression von *Bg-AChBP2*

Zur Expression von *Bg-AChBP2* wurde dasselbe Expressions-Protokoll verwendet, wie für *Bg-AChBP1*. Die Expression wurde ebenso kontrolliert. Auch hier befanden sich die Proteine in den Bakterienpellets und somit in Einschlusskörperchen. Genau wie bei der *Bg-AChBP1* Expression wurden die Einschlusskörperchen durch sonifizieren aufgebrochen, durch eine Nickel-Affinitätschromatographie isoliert und Rückgefaltet. Nachdem das Protein aufkonzentriert war, wurde es in 20 mM Tris-Puffer mit pH 7,5 dialysiert. Im Gegensatz zu *Bg-AChBP1* konnte bei *Bg-AChBP2* keine Bildung von Dodekaedern beobachtet werden (Abb. 35A).

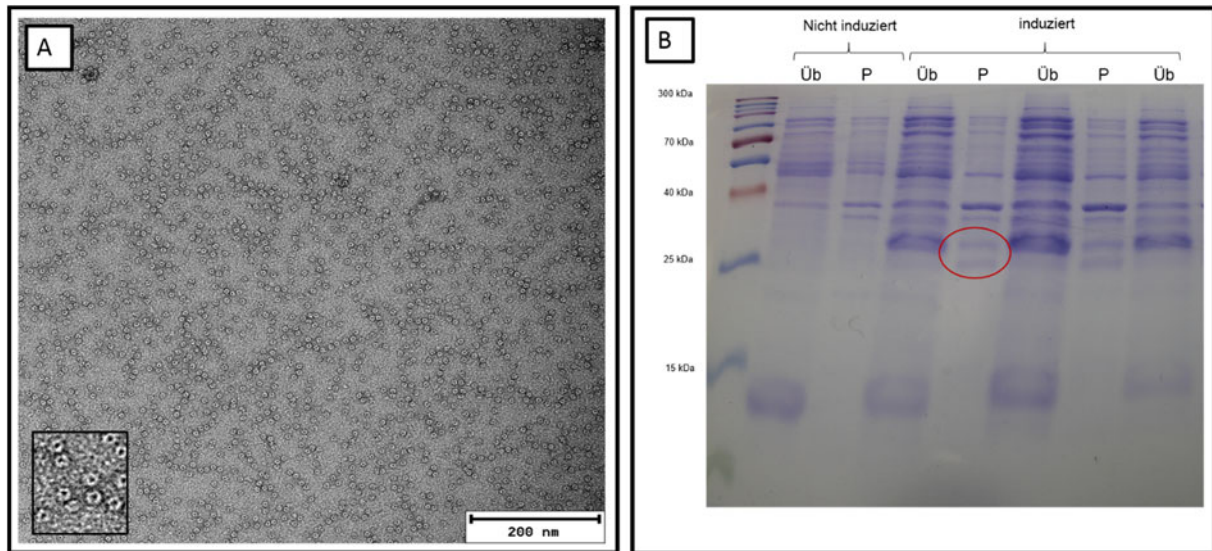


Abbildung 35: Expression von *Bg-AChBP2*. (A) In den Elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind nach erfolgreicher Expression nur Pentamere zu erkennen. An einigen Stellen liegen diese auch scheinbar paarweise vor. Es könnte sich möglicherweise um Dipentamere handeln. Trotz entfernen des Polyhistidin-Tags konnten keine Dodekaeder beobachtet werden. (B) Kontrolle der Proteinexpression. In der nicht induzierten Kontrolle ist keine Bande bei 25 kDa zu erkennen. Im Gegensatz zur Expression von *Bg-AChBP1* konnte hier im Bakterienpellet eine Doppelbande beobachtet werden (rote Markierung)

5 Gewebespezifische Expression von *Bg-AChBP1* und *Bg-AChBP2*

Aus den früheren Arbeiten war klar, dass die beiden AChBP-Isoformen in *B. glabrata* in der Hämolymphe vorkommen, aber ihr Vorkommen in Zellen und insbesondere ihre Expressionsorte waren noch unbekannt. Die folgenden Versuche sollten hierzu Hinweise auf liefern, um so auf mögliche biologische Funktionen beider Proteine schließen zu können.

5.1 *Bg-AChBP1* und *Bg-AChBP2* in larvalen Entwicklungsstadien

Bis zu einem Alter von ca. 60 Stunden konnte ich in den Gelegen mit Whole-Mount-Immunfluoreszenzmikroskopie kein *Bg-AChBP* nachweisen. Ab dann zeigte sich die erste positive Reaktion. Zu diesem Zeitpunkt beginnt auch die Mineralisation der Schale von *B. glabrata*. Die Anwesenheit von CaCO_3 -Polymorphen in diesen Stadien wurde bereits nachgewiesen (Hasse et al. 2000). Es fiel bei meinen Ergebnissen allerdings auf, dass in den Larven in allen Stadien nur *Bg-AChBP1* zu finden war (Abb. 36).

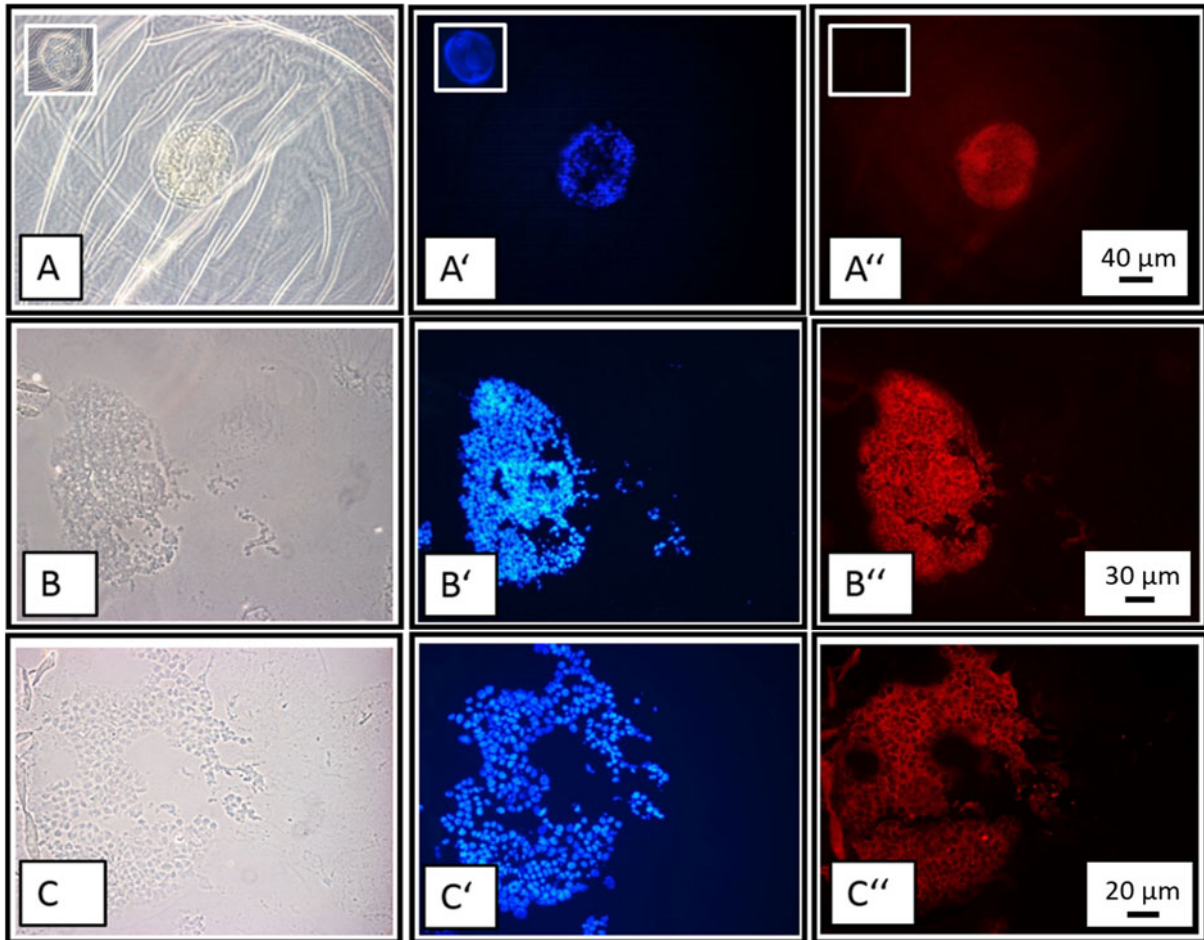


Abbildung 36: Whole-Mount-Immunfluoreszenzmikroskopie eines 60 Stunden alten Geleges von *B. glabrata*: (A) Die Phasenkontrastaufnahme zeigt ein Ei in einer 10-fachen Vergrößerung. Das Ei ist noch von der schützenden Eihülle umgeben. (A') zeigt die Färbung der Zellkerne mit dem DAPI-Farbstoff und (A'') zeigt die dazugehörige Immunfluoreszenz mit anti-*Bg*-AChBP1 Antiserum. Eine deutliche Reaktion ist hier zu erkennen. Um die Reaktion deutlicher zu sehen, wurden 7 µm dicke Querschnitte durch eine 70h alte Larve angefertigt und ebenfalls mit beiden AChBP Antikörpern inkubiert. (B) zeigt die Phasenkontrastaufnahme des Querschnitts in einer 25-fachen Vergrößerung und (B') die dazugehörige DAPI Färbung. In (B'') ist eine deutliche positive Reaktion der anti-*Bg*-AChBP1-Antikörper zu erkennen. Die Abbildung (C) zeigt eine weitere Phasenkontrastaufnahme von einem Querschnitt durch das mehrzellige Larvenstadium, diesmal 40-fach vergrößert. (C') zeigt die dazugehörige DAPI Färbung der Zellkerne. In (C'') ist die positive Reaktion des *Bg*-AChBP1 Antiserums zu sehen. Inkubationen mit dem anti-*Bg*-AChBP2 Antiserum hingegen fielen alle negativ aus (siehe *Inlay* in A'').

5.2 *Bg*-AChBP1 und *Bg*-AChBP2 in Jungschnecken

Junge Schnecken kurz nach der Metamorphose wurden für die Whole-Mount-Immunfluoreszenzfärbung fixiert und mit beiden *Bg*-AChBP Antikörpern inkubiert. Das bereits in diesem Stadium angelegte Gehäuse wurde vor der Immunfluoreszenzfärbung entfernt. Auch bei den Jungschnecken war eine positive Reaktion auf das anti-*Bg*-AChBP1 Antiserum zu beobachten (Abb. 37A“). Diese Reaktion erstreckte sich über den gesamten Körper der Schnecke. Im Bereich des Kopfes und am Übergang zum Mantelkragen schien die Reaktion besonders kräftig auszufallen. Der Antikörper gegen *Bg*-AChBP2 zeigte auch bei den Jungschnecken keine Reaktion (nicht abgebildet). In einer höheren Vergrößerung kann man die Reaktion in den oberen Hautschichten der Schnecke genau beobachten (Abb. 38). Diese Reaktion wurde ähnlich auch bei größeren Schnecken beobachtet. Sie erstreckt sich über den gesamten Körper. Es sollte nun geklärt werden, ob sich die Anwesenheit von *Bg*-AChBP1 nur auf die äußeren Zellschichten beschränkt oder zusätzlich auch in anderen Geweben zu finden ist. Dies geschah mit Hilfe von Querschnitten durch die verschiedenen Gewebe der adulten Schnecken, mit einer Körpergröße über 2 cm. Diese wurden angefertigt mikroskopisch untersucht.

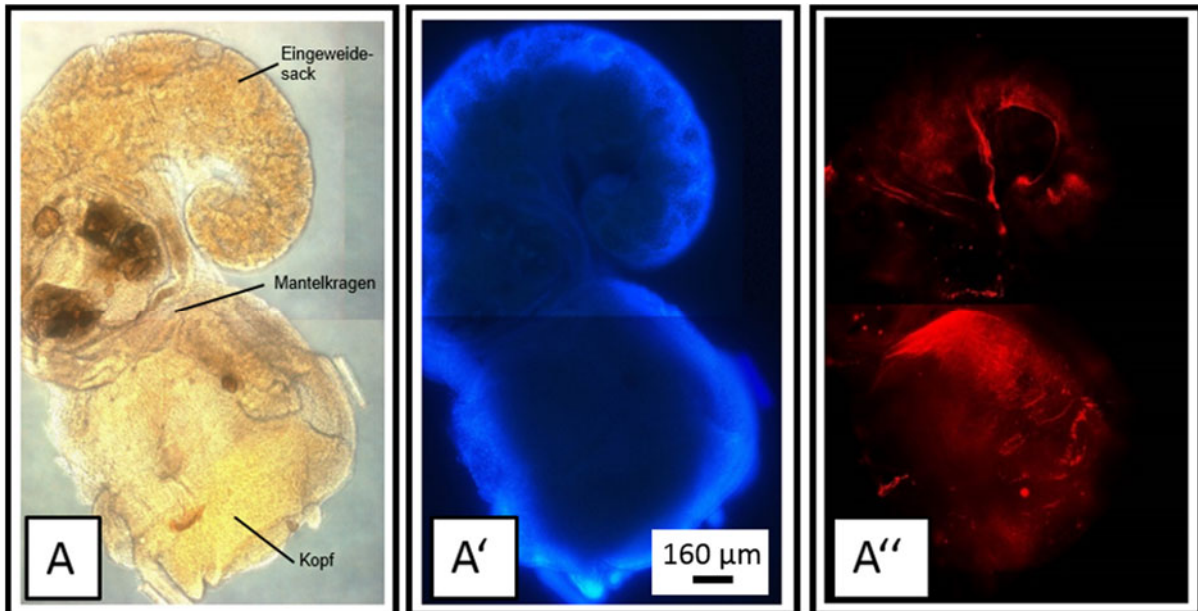


Abbildung 37: Whole mount Immunfluoreszenzmikroskopie einer ca. 2 Tage alten Jungschnecke. Das Gehäuse wurde entfernt. (A) zeigt eine Phasenkontrastaufnahme in 10 x Vergrößerung. Mehrere Bilder wurden zu einer Ansicht zusammengefügt, um ein möglichst komplettes Übersichts-Bild der Schnecke zu erhalten. Unten rechts ist der Kopf zu erkennen. Kurz hinter dem Kopf befindet sich der Mantelkragen. Der Eingeweidesack erstreckt sich dann nach oben rechts. In (A') ist die dazugehörige DAPI Färbung der Zellkerne zu erkennen und (A'') zeigt die positive Reaktion auf den *Bg*-AChBP1 Antikörper.

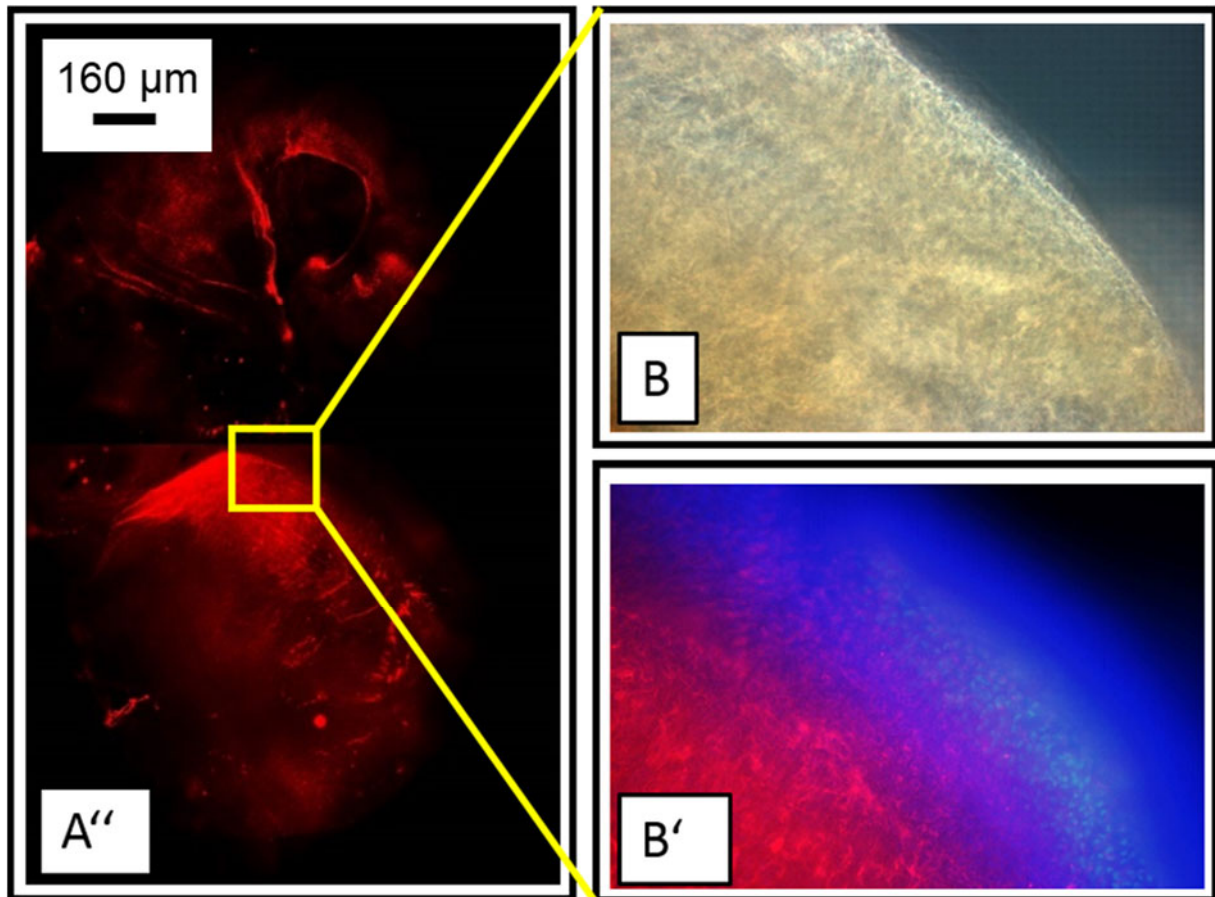


Abbildung 38: Immunfluoreszenzmikroskopie einer ca. 2 Tage alten Jungschnecke. (A'') zeigt das Bild aus Abb. 37, die positive Reaktion auf den *Bg*-AChBP1 Antikörper angefärbt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texas Red. Der markierte Ausschnitt wurde in einer 40-fachen Vergrößerung dargestellt. Hierbei zeigt (B) den markierten Ausschnitt als Phasenkontrastaufnahme und (B') zeigt die Überlagerung der DAPI-Färbung der Zellkerne und die positive Reaktion auf den *Bg*-AChBP1 Antikörper. Die positive Reaktion in der äußeren Zellschicht ist hier deutlich zu erkennen.

5.3 *Bg*-AChBP1-Nachweis im Mantelepithel

Um den Bereich des Mantelgewebes genauer zu untersuchen, wurden 7 μm dicke Querschnitte angefertigt. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzmarkierung mit den spezifischen Antikörpern gegen *Bg*-AChBP1 und *Bg*-AChBP2, markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texas Red. Hierbei konnte eine starke positive Reaktion im Bereich des Mantelepithels beobachtet werden. Allerdings zeigte auch hier nur der Antikörper gegen *Bg*-AChBP1 eine positive Reaktion (Abb. 39 B, D). Aufgrund der starken Färbung kann man von einer hohen Konzentration von *Bg*-AChBP1 im Mantelepithel ausgehen. *Bg*-AChBP2 konnte in keinem Bereich des Mantelgewebes nachgewiesen werden (Abb. 39G).

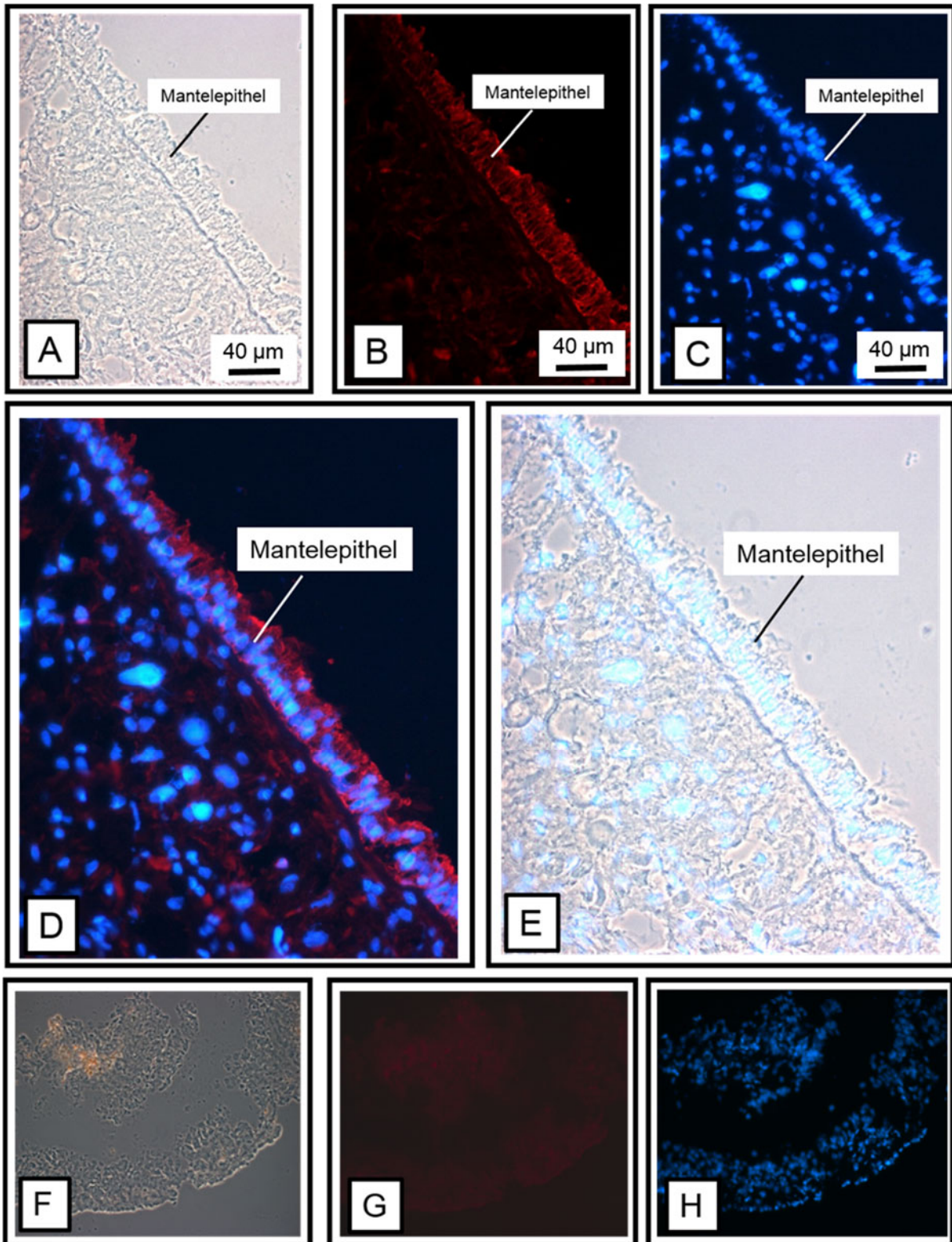


Abbildung 39: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an 7 µm dicken Gefrierschnitten durch das Mantelgewebe von *B. glabrata*. (A) zeigt eine Phasenkontrastaufnahme des Mantelgewebes. Auf der rechten Seite ist das Mantelepithel zu erkennen. (B) Nach Inkubation mit dem Antikörper gegen *Bg*-AChBP1, ist eine deutliche positive Reaktion im Bereich des Mantelepithels zu sehen (markiert mit Texas Red). (C) zeigt die dazugehörige Anfärbung der Zellkerne mit dem DAPI Farbstoff. Zur Verdeutlichung wurden in (D) die Immunfluoreszenzfärbung und die DAPI-Färbung übereinandergelegt. (E) zeigt eine Überlagerung der Phasenkontrastaufnahme und der DAPI-Färbung. Die Inkubation mit dem Antikörper gegen *Bg*-AChBP2 zeigte hingegen keine Reaktion (G). Um das Gewebe zu erkennen, wurde der Schnitt doppelt belichtet. (F) zeigt die dazugehörige Phasenkontrastaufnahme und (H) die dazugehörige Anfärbung der Zellkerne mit dem DAPI-Farbstoff.

5.4 *Bg*-AChBP1-Nachweis im Fußgewebe

Um zu überprüfen, wo genau im Fußbereich *Bg*-AChBP1 zu finden ist, wurden ebenfalls 7 µm dicke Cryoschnitte angefertigt und mit der Methode der indirekten Immunfluoreszenzfärbung, mit dem Farbstoff Texas Red markiert. Auch im Bereich des Fußgewebes konnte nur *Bg*-AChBP1 nachgewiesen werden, diese Reaktion ist sehr deutlich zu erkennen (Abb. 40 A') und beschränkt sich auf den Bereich der Epidermis. *Bg*-AChBP2 konnte im ganzen Fußbereich nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Es scheint so, als würde *Bg*-AChBP1 in der kompletten Epidermis der Schnecke exprimiert.

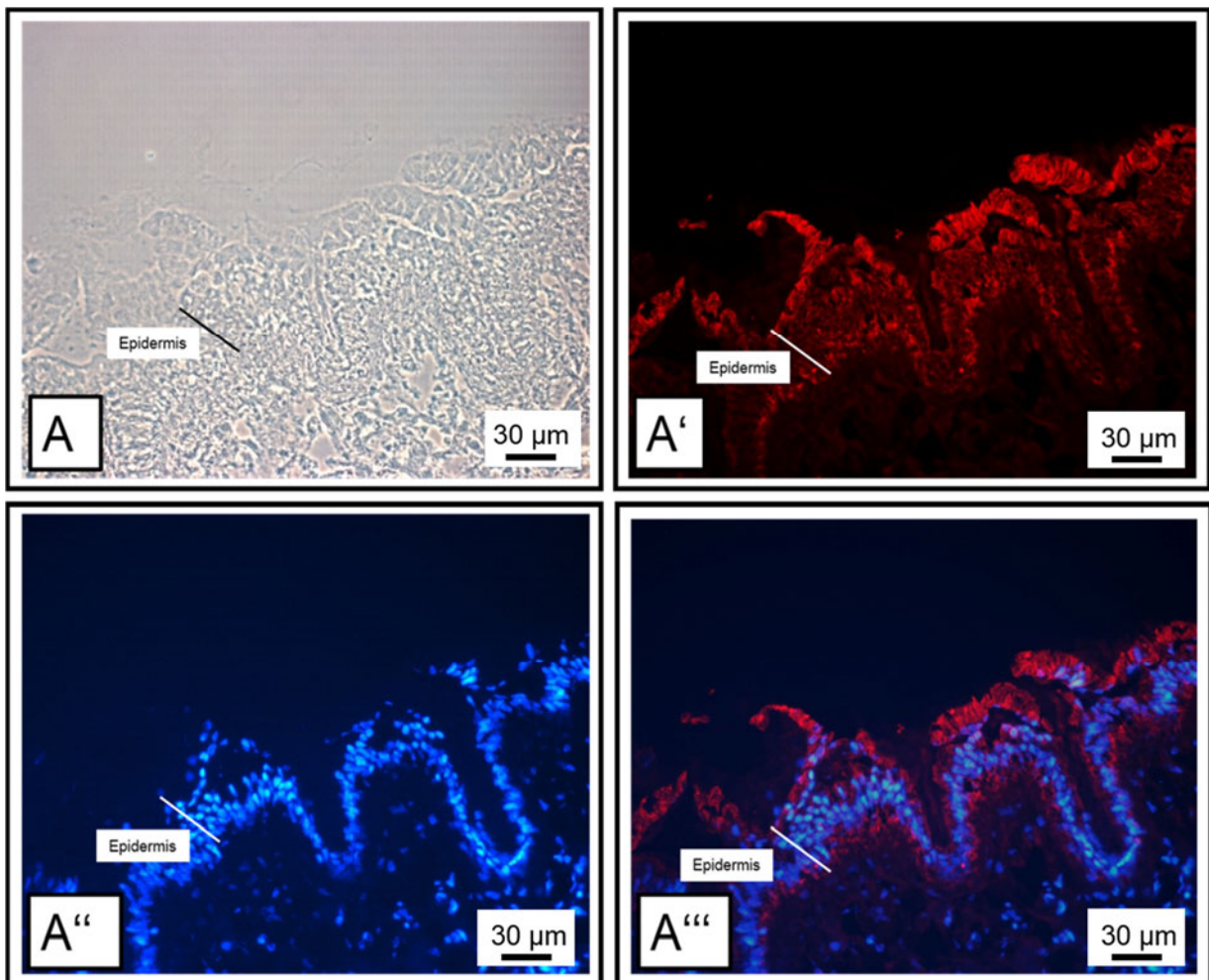


Abbildung 40: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an 7 µm dicken Gefrierschnitten durch das Fußgewebe von *B. glabrata*. (A) zeigt eine Phasenkontrastaufnahme des Fußgewebes. Die Epidermis begrenzt das Gewebe nach außen. Auch im Fußbereich beschränkt sich die Expression von *Bg*-AChBP1 auf die Epidermis. (A') zeigt die dazugehörige Anfarbung der Zellkerne mit der DAPI-Färbung. Zur weiteren Verdeutlichung wurden in (A''') beide Bilder (A' und A'') übereinandergelegt. So sind die angefärbten Bereiche um die Zellkerne noch deutlicher zu erkennen.

5.5 *Bg*-AChBP1-Nachweis im Eingeweidesack

Auch im Gewebe des Eingeweidesacks konnte bei der Whole Mount-Immunfluoreszenzmikroskopie der Jungschnecken eine positive Reaktion in der Epidermis beobachtet werden. Es wurde auch in diesem Gewebereich 7 μm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Nach durchgeführter Immunfluoreszenzmikroskopie, konnte die Reaktion in den Bereichen der Epidermis bestätigt werden (Abb. 41A',A'''). Im Gewebe des Eingeweidesacks waren allerdings noch weitere positive Reaktionen zu erkennen. Der Antikörper gegen *Bg*-AChBP1 zeigt eine deutliche Reaktion im Gewebe des Eingeweidesacks. *Bg*-AChBP1 scheint sich in den einschichtigen Epithelien, welche die inneren Organe umgeben, zu befinden (Abb. 42).

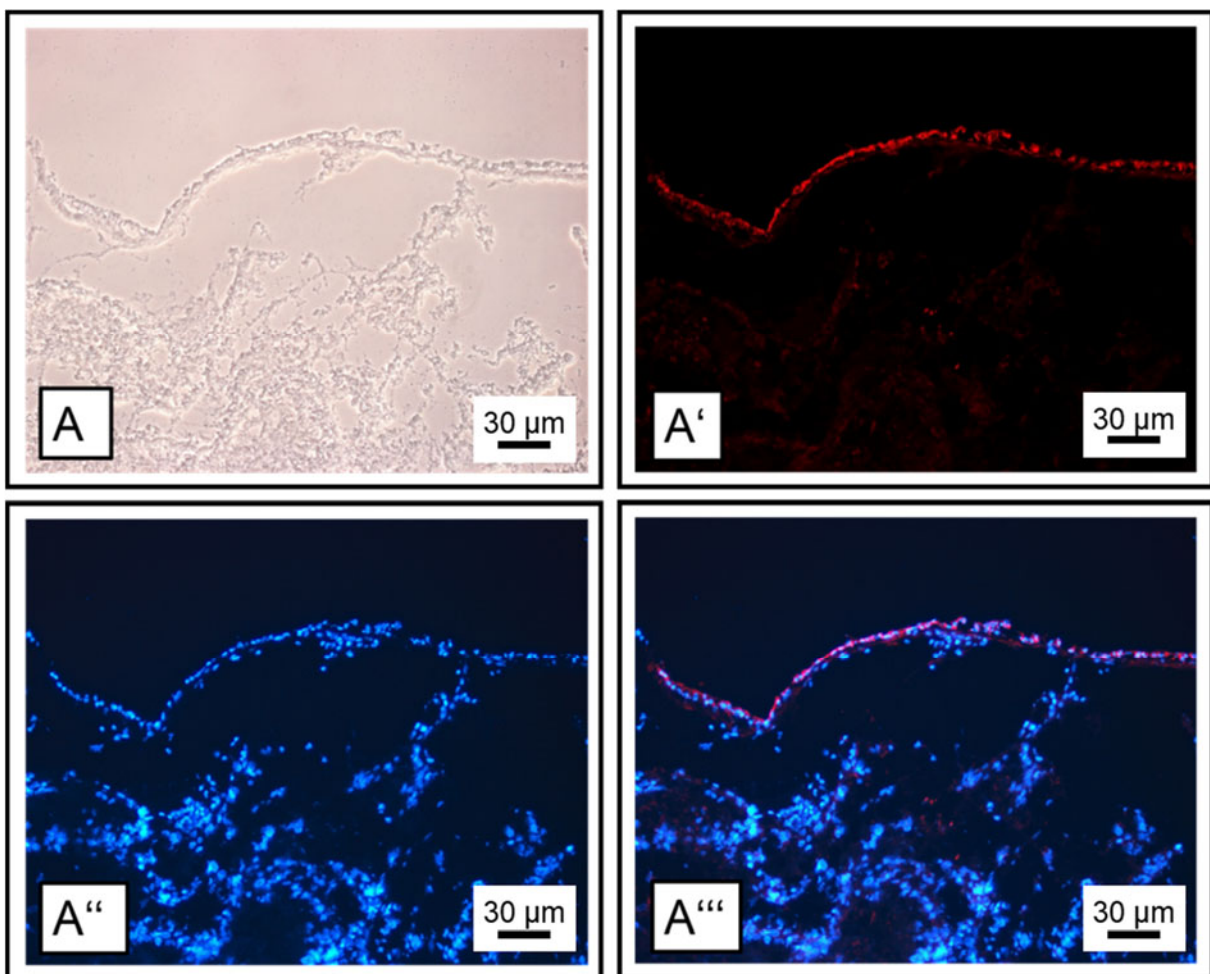


Abbildung 41: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an 7 μm dicken Gefrierschnitten durch das Gewebe des Eingeweidesacks von *B. glabrata*. (A) zeigt eine Phasenkontrastaufnahme 10-fach vergrößert. Die Epidermis begrenzt das Gewebe nach außen. Auch hier ist eine positive Reaktion gegen den *Bg*-AChBP1 Antikörper in der Epidermis zu beobachten (A'). (A'') zeigt die dazugehörige Anfärbung der Zellkerne mit der DAPI-Färbung. Zur weiteren Verdeutlichung wurden in (A''') beide Bilder (A' und A'') übereinandergelegt. So sind die angefärbten Bereiche im Bereich der Epidermis deutlich zu erkennen.

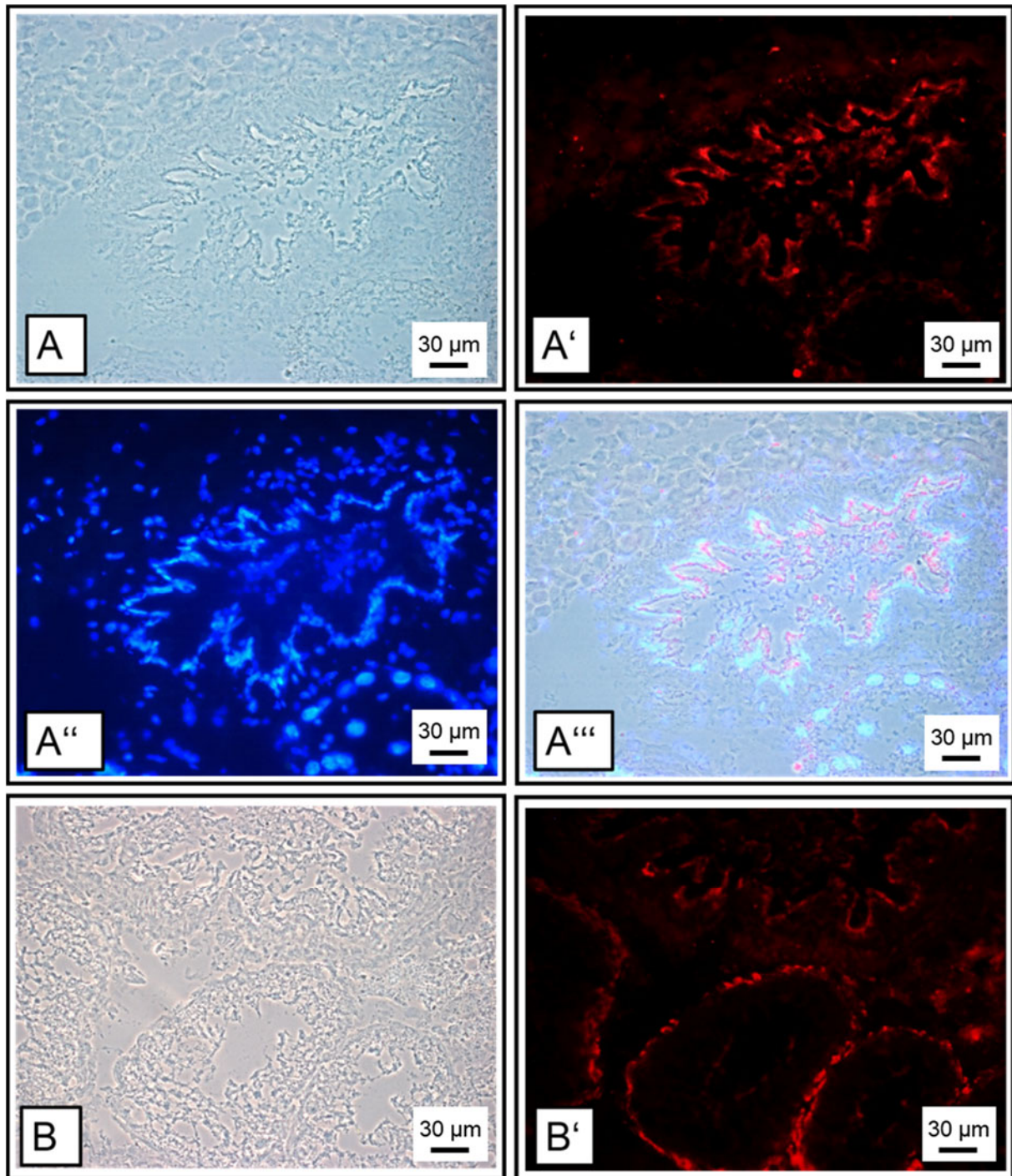


Abbildung 42: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an 7 µm dicken Gefrierschnitten durch das Gewebe des Eingeweidessack von *B. glabrata*. (A) und (B) zeigen jeweils eine Phasenkontrastaufnahme und (A') und (B') die dazugehörige Immunfluoreszenz. Die einschichtigen Epithelien, welche die inneren Organe umgeben, zeigen eine positive Reaktion der Bg-AChBP1 Antikörper.

5.6 *Bg-AChBP1* und *Bg-AChBP2* im Kopfgewebe

5.6.1 Immunfluoreszenz-Markierung

Als nächstes wurden auch im Bereich des Cerebralganglions 7 µm dicke Querschnitte, mit dem Cryomikrotom, durch das Kopfgewebe angefertigt. Während im Bereich des übrigen Körpers intrazellulär nur die Isoform *Bg-AChBP1* nachweisbar war, konnte im Bereich des Kopfgewebes eine positive Reaktion mit beiden Antikörpern beobachtet werden (Abb. 43). Vergleicht man diese beiden Reaktionen miteinander, so können einige Unterschiede beobachtet werden. Die positive Reaktion mit dem *Bg-AChBP2* Antikörper beschränkte sich auf größere verzweigte Zellen, welche sich mehr im inneren Kopfbereich der Schnecke befinden (Abb. 43B'). Bei diesen Zellen handelt es sich vermutlich um größere Gliazellen. In allen anderen Bereichen reagierte der Antikörper gegen *Bg-AChBP2* negativ. Die positive Reaktion mit dem *Bg-AChBP1* Antikörper hingegen wurde nicht nur in den großen verzweigten Zellen im Kopfinneren beobachtet, sondern zusätzlich auch in kleineren verzweigten Zellen. Auch bei diesen Zellen handelt es sich vermutlich um Gliazellen, welche allerdings etwas kleiner und noch verzweigter aufgebaut sind. Zudem konnte im Kopfbereich eine Reaktion von anti-*Bg-AChBP1* mit der Epidermis beobachtet werden (Abb. 43A'). Durch Übereinanderlegen des Phasenkontrastbildes, der DAPI-Färbung und der Immunfluoreszenzfärbung, wird die spezifische Färbung in den einzelnen Bereichen noch deutlicher. Die fluoreszierenden Bereiche können so den einzelnen Zellen im Gewebe noch besser zugeordnet werden. In Abb. 43A'' und Abb. 43B'' sind die Reaktionen mit beiden isoformspezifischen Antikörper im Kopfbereich, im direkten Vergleich nebeneinander gezeigt. Es wurde deutlich, dass es Bereiche im Gewebe gibt, in welchem exklusiv *Bg-AChBP1* vorkommt. Allerdings scheinen beide *Bg-AChBP* Isoformen in den größeren verzweigten Gehirnzellen koexprimiert zu werden.

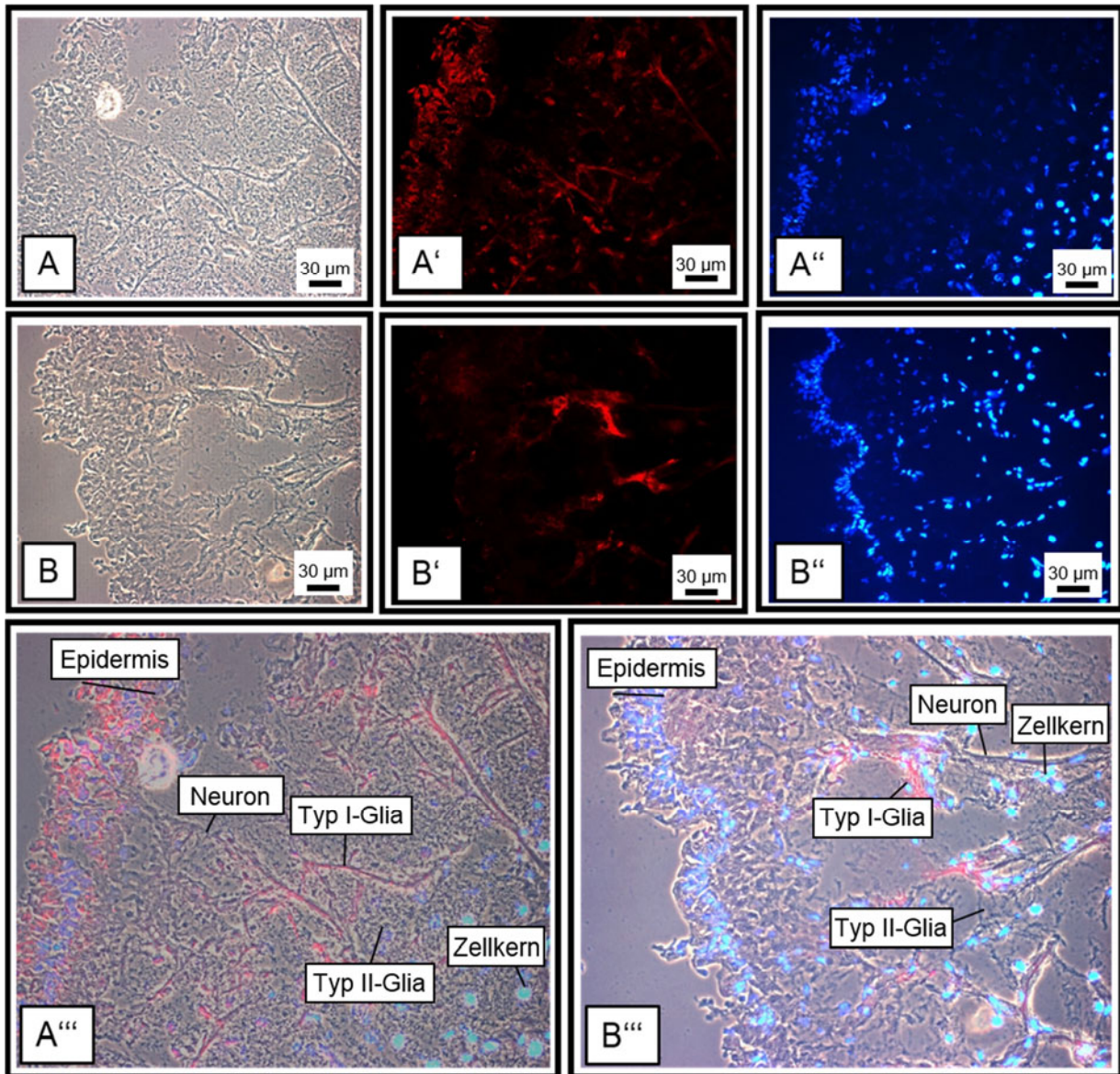


Abbildung 43: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an 7 µm dicken Gefrierschnitten durch das Kopfgewebe von *B. glabrata*. Die Abbildungen (A) und (B) zeigen jeweils ein Phasenkontrastbild des Kopfbereiches. Die Epidermis begrenzt das Gewebe nach außen hin. Weiter im inneren sind die einzelnen Zellen des Cerebralganglion zu erkennen. Das Bild (A') zeigt die Expression von *Bg-AChBP1*. Eine deutliche positive Reaktion auf den Antikörper gegen *Bg-AChBP1* ist im Bereich der Epidermis, sowie in Zellen des Cerebralganglion zu erkennen. In (A'') ist die korrespondierende DAPI-Färbung der Zellkerne zu sehen. In dem Bild (B') kann man die Expression von *Bg-AChBP2* beobachten. Im Gegensatz zu *Bg-AChBP1*, wird dies nicht in der Epidermis exprimiert. Allerdings kann man eine positive Reaktion im Bereich der Cerebralganglienzellen erkennen. Um die Ergebnisse zu verdeutlichen, und um die beiden Expressionsergebnisse besser miteinander vergleichen zu können, wurden zwei Überlagerungsbilder angefertigt. In (A''') ist eine Überlagerung der Phasenkontrastaufnahme (A), der DAPI-Färbung (A''), sowie der Immunfluoreszenz (A') zu sehen. In (A''') kann man so die genaue Expression von *Bg-AChBP1* deutlich den einzelnen Geweben zuordnen. In (B''') wurden jeweils die Aufnahmen (B), (B') und (B'') übereinandergelegt. Hier ist die Expression von *Bg-AChBP2* zu erkennen, die sich exklusiv auf Zellen, vermutlich Gliazellen, des Cerebralganglion beschränkt.

5.6.2 Doppel-Immunfluoreszenzmarkierung im Gehirn

Um zu klären, ob wirklich beide *Bg*-AChBP Isoformen in denselben neuronalen Zellen präsent sind, wurde eine Doppelmarkierung mittels direkter Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Zuerst wurden Sagittalschnitte durch den kompletten Kopfbereich durchgeführt. Diese wurden zum einen mit der DAPI-Färbung der Zellkerne markiert. So ließen sich die wichtigsten Bereiche des Kopfes gut identifizieren (Abb. 44). Die Übersichten wurden aus mehreren mikroskopischen Einzelbildern in einer 10-fachen Vergrößerung erstellt.

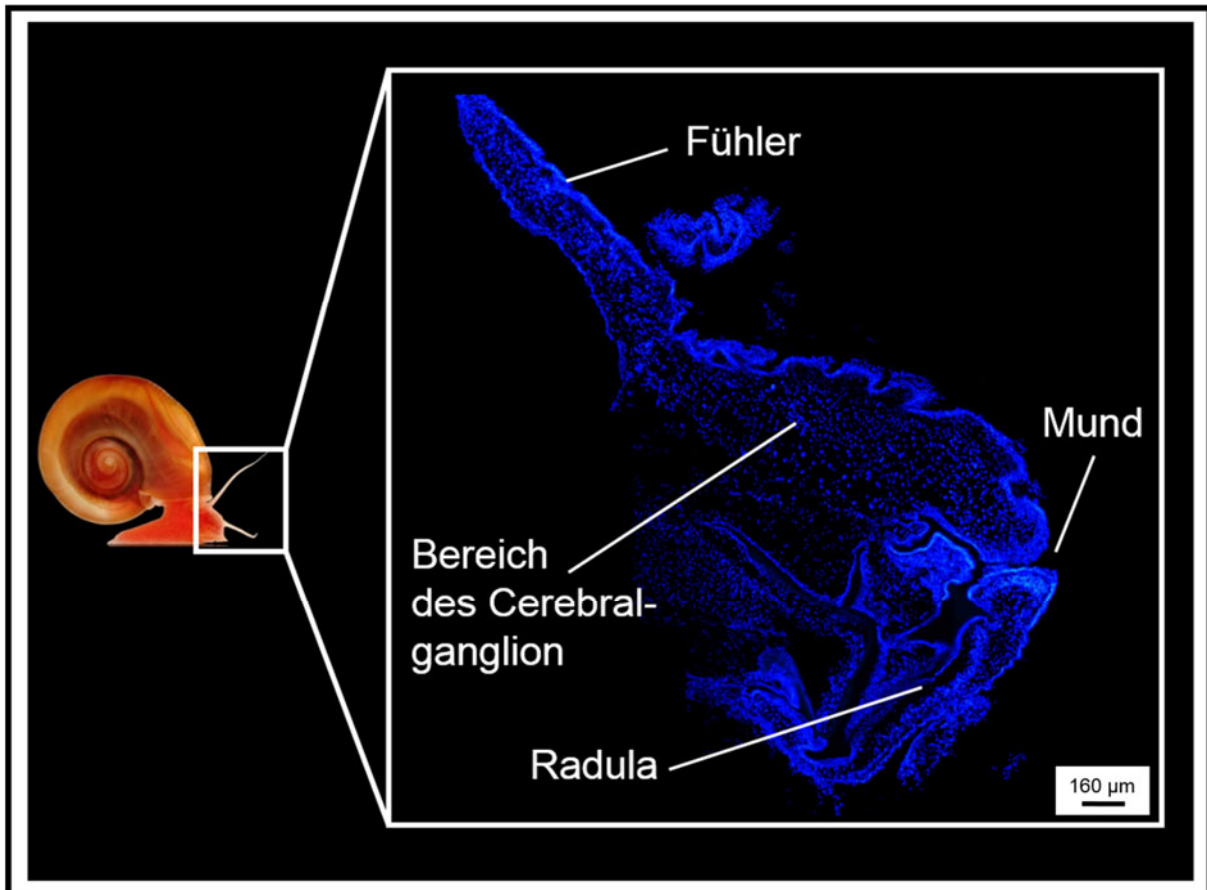


Abbildung 44: Übersicht: 7 µm dicke Sagittalschnitte durch den Kopfbereich von *B. glabrata* in einer 10-fachen Vergrößerung. Die Zellkerne wurden mit der DAPI-Färbung markiert. Die einzelnen Bereiche des Kopfes sind gut zu erkennen. Im oberen Bildbereich sind die beiden Fühler zu sehen. Auf der rechten Seite ist der Mund der Schnecke zu erkennen, die Radula sieht man im unteren Bereich des Bildes. Im oberen Kopfbereich ist das Cerebralganglion lokalisiert. Dieser Bereich ist für die Doppel-Immunfluoreszenzmarkierung von besonderem Interesse.

Zum anderen wurden die Schnitte gleichzeitig mit beiden primären Antikörpern inkubiert. Diese wurden zuvor mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert (siehe: B 4.2). So konnte der Bereich von Interesse im selben Schnitt mit beiden Antikörpern gleichzeitig markiert werden und vergleichend betrachtet werden (Abb. 45 und Abb. 46). Der Antikörper gegen *Bg*-AChBP1 wurde dabei mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 markiert (grün) und der Antikörper gegen die Isoform *Bg*-AChBP2 wurde mit Alexa Fluor 568 markiert (rot).

Eine Inkubation mit dem Antikörper gegen *Bg*-AChBP1 zeigt eine positive Reaktion im Bereich der Epidermis, des Cerebralganglions sowie im inneren der Fühler (Abb. 45).

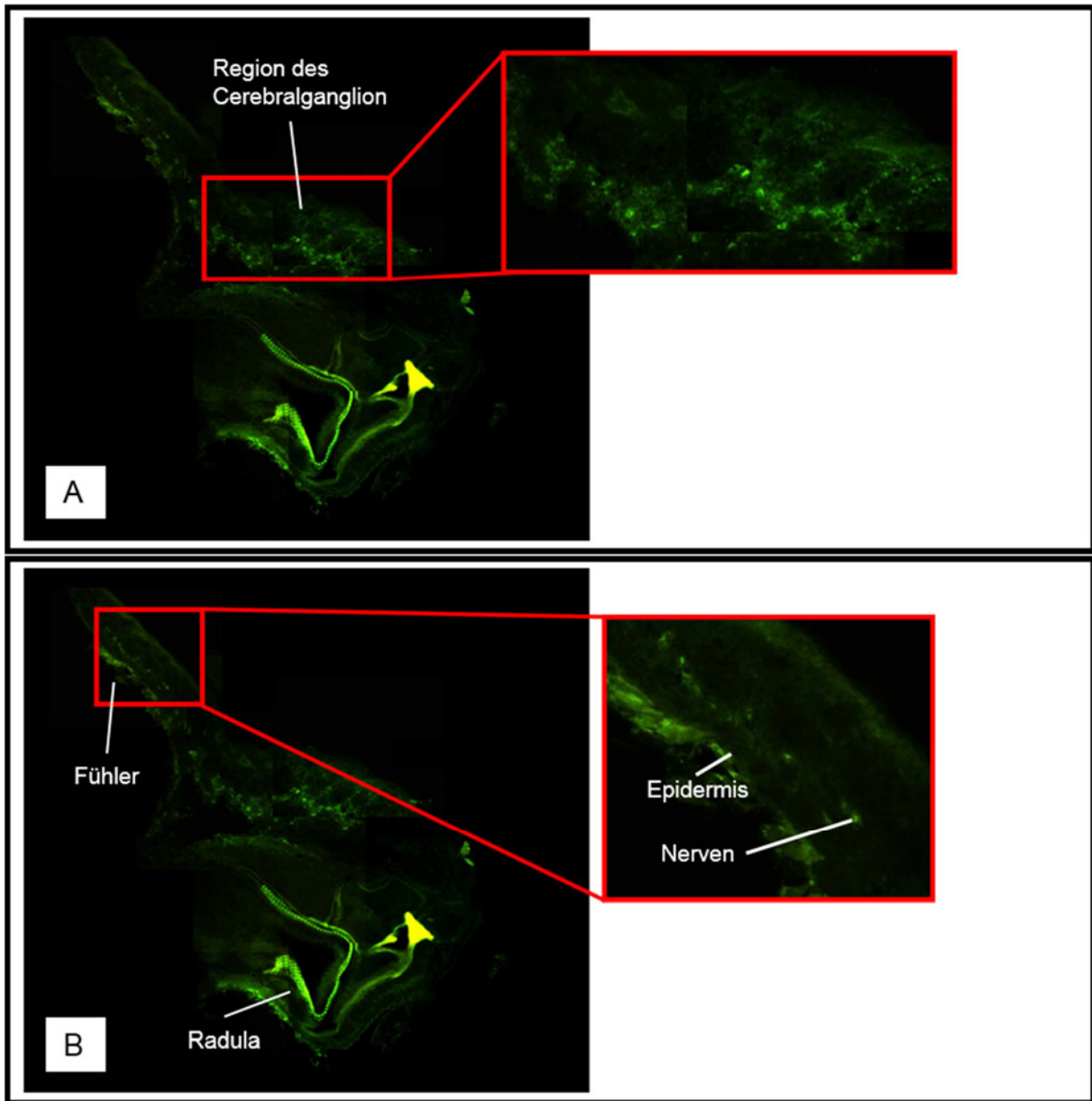


Abbildung 45: Übersicht: Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie an 7 µm dicken Sagittalschnitten durch den Kopfbereich von *B. glabrata*, markiert mit dem Antikörper gegen *Bg*-AChBP1. Dieser war an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 (grün) gekoppelt. Es ist deutlich eine positive Reaktion im dem Kopfbereich zu erkennen, in dem sich das Cerebralganglion befindet (A). Es könnte sich hierbei um Gliazellen handeln. Auch im Bereich der Fühler ist eine positive Reaktion zu erkennen. Diese befindet sich zum einen in Bereichen der Epidermis, aber ist auch im inneren der Fühler zu beobachten. Hier handelt es sich vermutlich um Nervenzellen, welche von Cerebralganglion in die Fühler führen.

Hierbei könnte es sich um Nerven handeln, welche vom Cerebralganglion aus in die Fühler verlaufen. Betrachtet man vergleichend denselben Schnitt, inkubiert mit dem *Bg*-AChBP2 Antikörper, so sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Die Reaktion von *Bg*-AChBP2 beschränkt sich exklusiv auf Zellen im Bereich des Cerebralganglion und die Nerven, die in

Ergebnisse

den Fühlern verlaufen (Abb. 46). Bei der auffälligen Reaktion im Bereich der Radula handelt es sich um eine Eigenfluoreszenz der Raspelzunge. Diese war auch in allen Negativkontrollen zu sehen (nicht gezeigt). Nur im Bereich des Cerebralganglions und der weiterführenden Nerven konnten beide *Bg*-AChBP Isoformen gleichzeitig beobachtet werden, was die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigte. Daher wurde dieser Bereich des Cerebralganglion genauer untersucht.

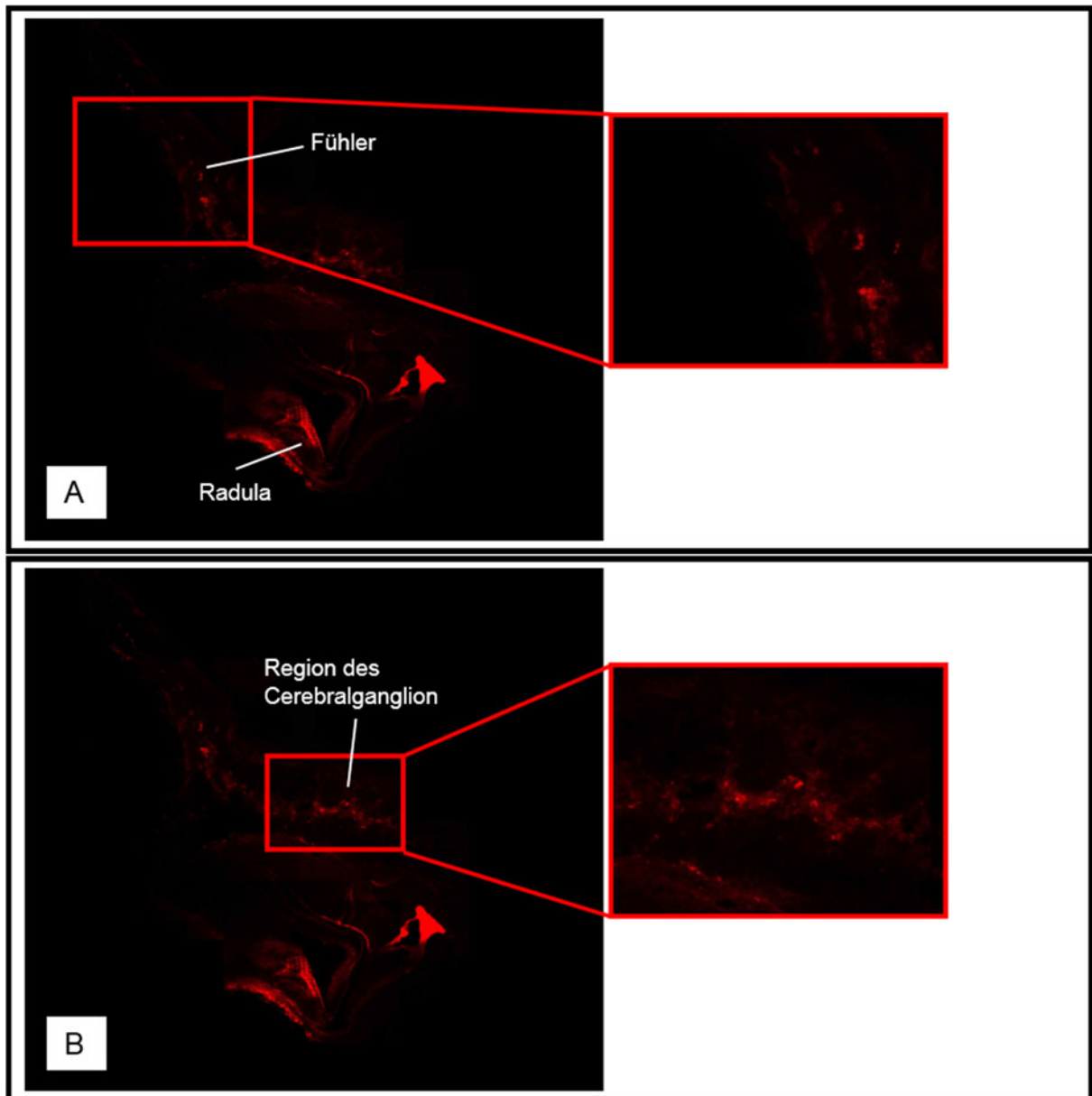


Abbildung 46: Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie an 7 µm dicken Sagitalschnitten durch den Kopfbereich von *B. glabrata*. Markiert mit dem Antikörper gegen *Bg*-AChBP2, welcher mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 568 (rot) war. Im oberen Bild ist die positive Reaktion im inneren Bereich der Fühler zu sehen (A). Die Nerven, welche vom Cerebralganglion aus verlaufen wurden hier markiert. Im unteren Bild ist die Reaktion gegen den *Bg*-AChBP2 Antikörper im Bereich des Cerebralganglion zu erkennen (B).

Von dem Bereich des Cerebralganglion wurden weitere Schnitte angefertigt, mit beiden Antikörpern inkubiert und in einer höheren Auflösung mikroskopiert. Die einzelnen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen desselben Schnittes wurden übereinandergelegt, um die Aufenthaltsorte beider Isoformen besser differenzieren zu können (Abb. 47).

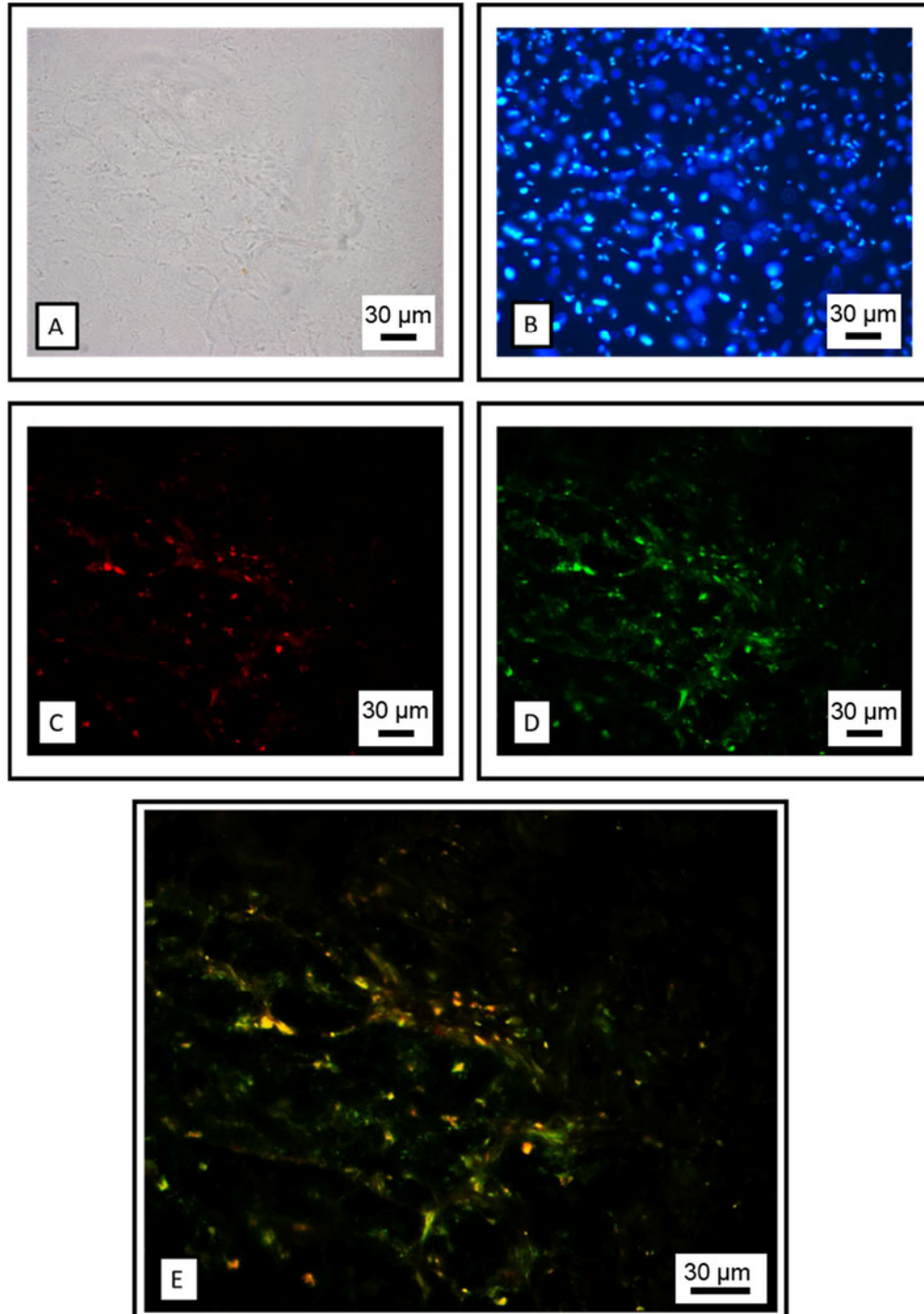


Abbildung 47: Immunfluoreszenzmikroskopie an 7 µm dicken Gefrierschnitten des Kopfgewebes von *B. glabrata* in einer 40-fachen Vergrößerung. (A) zeigt die Phasenkontrastaufnahme des Kopfgewebes und (B) die korrespondierende Anfärbung der Zellkerne mit dem DAPI-Farbstoff. In (C) ist die positive Reaktion mit dem Bg-AChBP2 Antikörper zu sehen (rot). (D) zeigt die Reaktion mit dem markierten Bg-AChBP1 Antikörper (grün). In der Doppelfluoreszenz (E) ist zu erkennen, dass es Bereiche gibt in denen beide Bg-AChBP Isoformen gleichzeitig auftreten (gelb/orange). Es sind ebenfalls exklusiv grüne Bereiche zu beobachten, in denen nur die Isoform 1 exprimiert wird. Rein rote Bereiche gab es dagegen nicht. Bg-AChBP2 scheint in keinen dieser Zellen alleine vorzukommen.

6 Die Syntheseorte von *Bg-AChBP1* und *Bg-AChBP2*

Als nächstes sollte mit *In-situ*-Hybridisierung geklärt werden, ob die beiden Proteine in den Geweben, in denen sie vorkommen, auch gebildet werden, oder ob die Biosynthese in anderen Zellen erfolgt und dann ein Massentransport über die Hämolymphe zu Zielzellen erfolgt. Zum histologischen Nachweis der betreffenden mRNA stellte ich isoformspezifische DNA-Sonden her. Die Spezifität der Sonden wurde auf Kreuzreaktionen hin getestet (Abb. 48C).

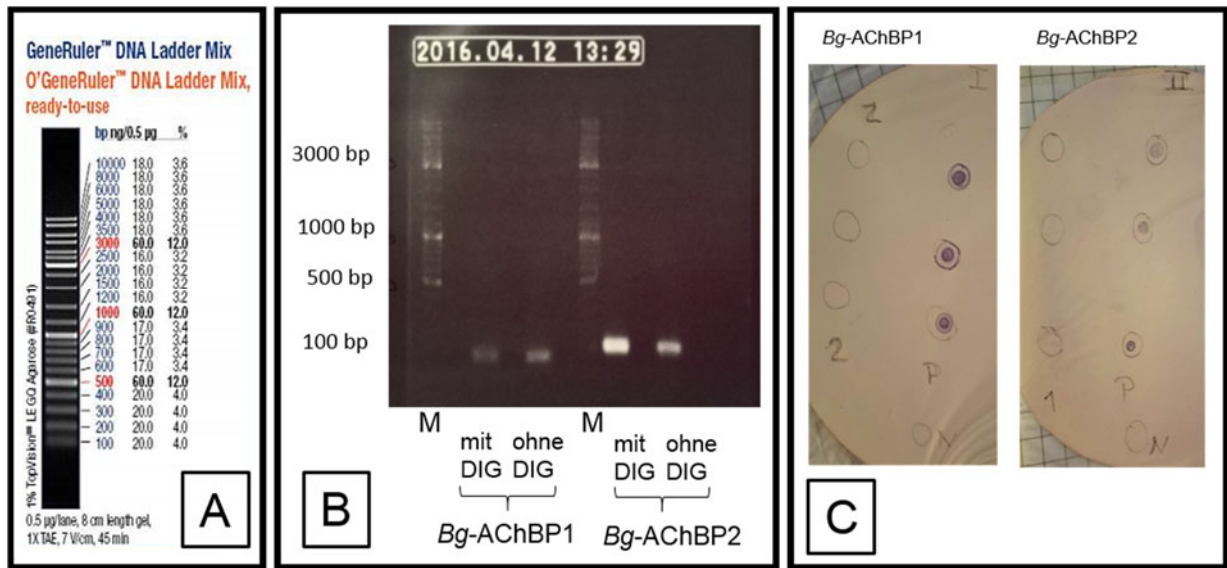


Abbildung 48: Übersicht über einige Vorversuche zur *In-situ*-Hybridisierung. In (A) ist der zur Größenbestimmung verwendete Marker abgebildet. (B) zeigt die Überprüfung beider Sonden im Gel. Links im Gel ist die *Bg-AChBP1* Sonde aufgetragen. Die theoretische Größe von 80 bp konnte hier bestätigt werden. Es ist außerdem zu erkennen, dass die mit Dioxigenin (DIG) markierten Sonden immer ein kleines bisschen höher im Gel liegen als die Sonden ohne Dioxigenin-Markierung. Auf der rechten Seite im Gel ist die *Bg-AChBP2* Sonde zu sehen. Der theoretische Wert von 123 bp stimmt mit dem Gel überein. Auch hier wurde einmal eine Sonde mit – und eine ohne Dioxigenin-Markierung aufgetragen. Um die Sonden auf ihre Spezifität hin zu überprüfen, wurde die *Dot-Blot* Analyse durchgeführt (C). Auf zwei Nylon-Cellulose-Membranen wurden die für die beiden *Bg-AChBP* Isoformen codierenden DNA-Plasmide aufgetragen. Die eine Membran wurde mit der *Bg-AChBP1*-Sonde inkubiert, die andere Membran mit der *Bg-AChBP2*-Sonde. Als Negativkontrolle wurde ein Marker aufgetragen. Bei der Inkubation mit der *Bg-AChBP1*-Sonde (links im Bild) ist zu erkennen, dass nur das für *Bg-AChBP1* codierende Plasmid (P) erkannt wird, nicht aber die Negativkontrolle (N) oder das für *Bg-AChBP2* codierende Plasmid (2). Rechts im Bild ist zu erkennen, dass bei der Inkubation mit der *Bg-AChBP2*-Sonde nur das für *Bg-AChBP2* codierende Plasmid (P) erkannt wird, nicht aber das Plasmid für *Bg-AChBP2* codierende (1). Auch bei der Negativkontrolle kam es zu keiner Reaktion.

6.1 *In-situ*-Hybridisierung von Whole Mounts

Mit der Methode der Whole mount *In-situ*-Hybridisierung sollte untersucht werden, in welchen Geweben von *B. glabrata* *Bg-AChBP1* bzw. *Bg-AChBP2* synthetisiert wird. Hierzu wurden Isoform-spezifische DNA-Sonden hergestellt. Eine positive Reaktion nach der Inkubation mit der *Bg-AChBP1*-Sonde konnte in der gesamten Epidermis beobachtet werden; im Bereich des Mantelkragens war sie besonders stark (Abb. 49A). Eine Inkubation mit der Sonde gegen *Bg-AChBP2* ergab hingegen keine Reaktion (Abb. 49B).

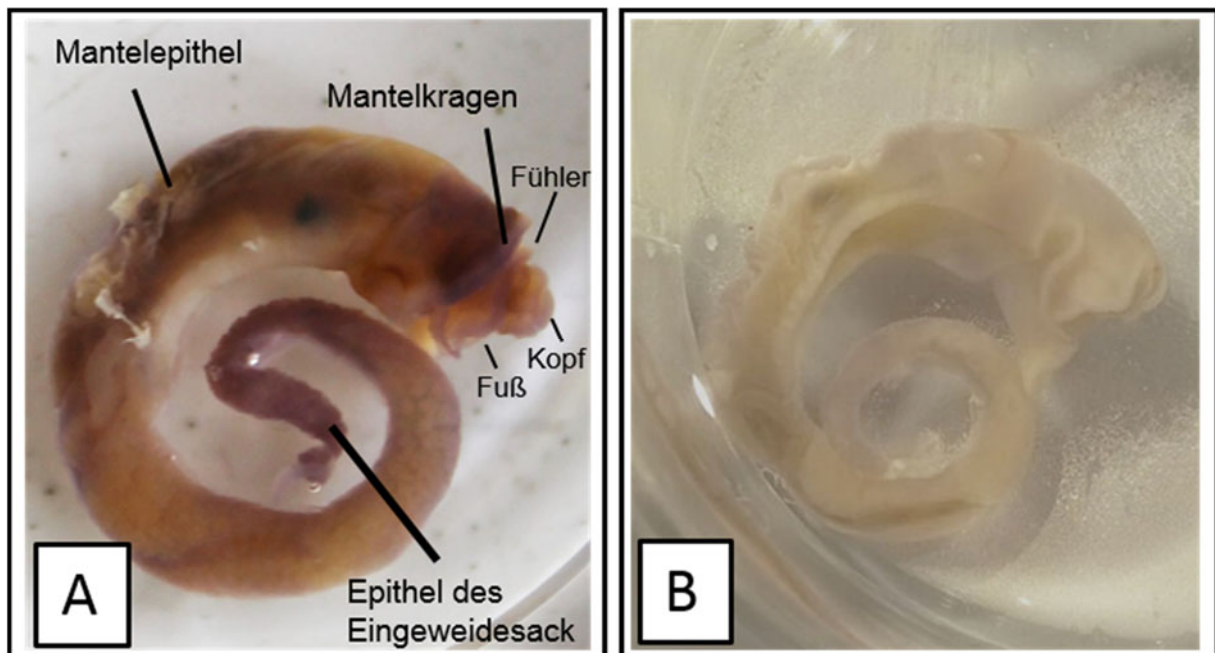


Abbildung 49: Whole mount *In-situ*-Hybridisierungen mit isoformspezifischen *Bg-AChBP*-Sonden. Seitenansicht der aus dem Haus entfernten Tiere nach der Dioxigenin-Markierung. (A) zeigt die Inkubation mit der *Bg-AChBP1* Sonde. Eine positive Reaktion im Mantelkragen, sowie der kompletten Epidermis, besonders des Mantelepithels und des Eingeweidesack sind zu erkennen. Die Inkubation mit der *Bg-AChBP2* Sonde fiel hingegen negativ aus (B).

Ob die Expression des Proteins nur in der Epidermis erfolgt oder auch im Körperinneren, wurde nachfolgend durch *In-situ*-Hybridisierungen an Querschnitten einzelner Körperteile untersucht.

Dabei waren aufgrund der Immunfluoreszenzdaten (siehe oben) das Cerebralganglion und das Mantelepithel von besonderem Interesse.

6.2 *Bg*-AChBP-Synthese im Kopf von *B. glabrata*

Nach der Inkubation von Querschnitten des Kopfes mit der *Bg*-AChBP1-Sonde war eine positive Reaktion in der Epidermis zu erkennen und auch Zellen des Cerebralganglions waren angefärbt (Abb. 50A). Dabei ist zu erkennen, dass die kleineren (Glia?)Zellen, die etwas Verzweigten wirken, dunkler angefärbt waren als die größeren, weniger verzweigten (Glia?)Zellen. Außerdem erstreckte sich die *Bg*-AChBP1-Expression vom inneren des Cerebralganglions bis hin zur Epidermis. Inkubation mit der *Bg*-AChBP2-Sonde ließ keine Reaktion in der Epidermis zu erkennen, doch wurden auch hier Cerebralganglion beide Typen möglicher Gliazellen angefärbt. Die Reaktion der *Bg*-AChBP2-Sonde beschränkte sich exklusiv auf diesen Bereich (Abb. 50B).

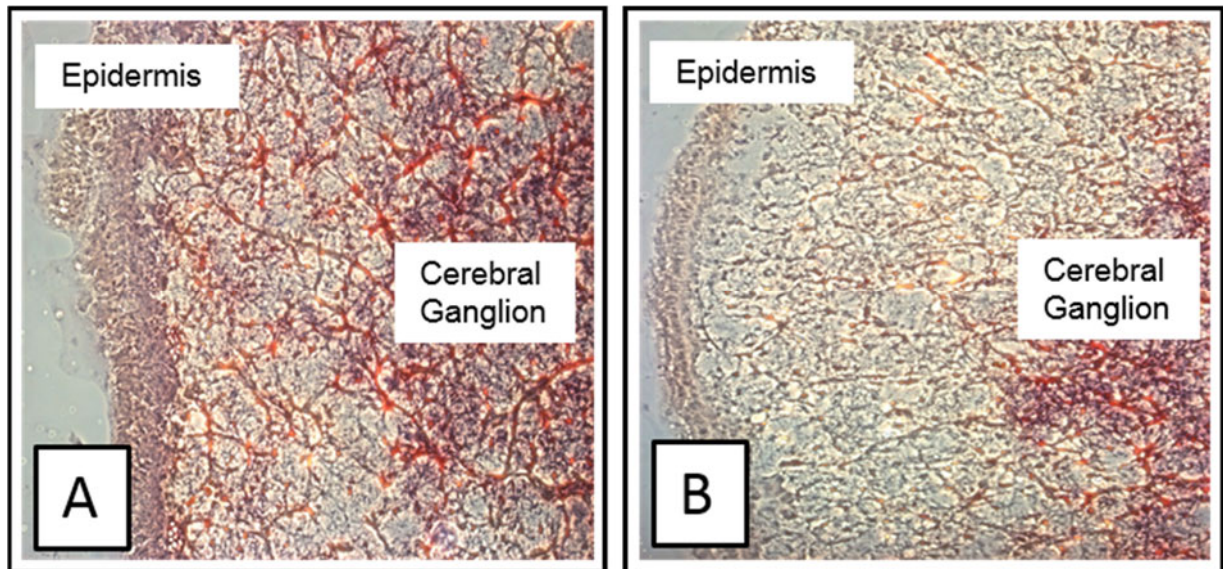


Abbildung 50: *In-situ*-Hybridisierung an 7 μm dicken Gefrierschnitten durch den Kopfbereich von *B. glabrata*. Die Epidermis und das Nervengewebe des Cerebralganglion sind gut zu erkennen. Nach der Inkubation mit der *Bg*-AChBP1-Sonde ist eine positive Reaktion in der Epidermis sowie von zwei verschiedenen Typen von Gliazellen zu beobachten. Bei diesen handelt es sich vermutlich um Gliazellen. (A). Nach Inkubation mit der *Bg*-AChBP2-Sonde (B) ist eine positive Reaktion zu beobachten, welche sich ausschließlich auf den inneren Teil des Cerebralganglions beschränkt.

6.3 Doppel-Fluoreszenzmarkierung des Kopfgewebes

mit isoformspezifischen DNA-Sonden

Um zu klären, ob beide *Bg-AChBP* Isoformen in denselben Zellen exprimiert werden, wurden Isoform-spezifische DNA-Sonden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen verwendet (siehe: B 3.3). Dadurch konnte die mRNA beider Isoformen getrennt in demselben Schnitt markiert werden. Hierbei wurde die *Bg-AChBP1*-Sonde mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff FITC markiert und die *Bg-AChBP2*-Sonde mit dem roten Farbstoff Texas Red. Die Ergebnisse entsprachen jenen der Immunfluoreszenzmikroskopie, nur dass diesmal nicht nur der Aufenthaltsort, sondern der Expressionsort der Proteine nachgewiesen wurde (Abb. 51). Es gab im Cerebralganglion zahlreiche meist eher periphere Zellen, in denen ausschließlich für *Bg-AChBP1* codierende mRNA nachweisbar war (grün), und andere Zellen, in denen die mRNAs beider Isoformen vorhanden waren (durch rot/grün-Überlagerung gelblich-orange). Diese Zellen, die beide AChBP-Isoformen koexprimieren, waren vor allem im Zentrum des Cerebralganglions konzentriert. Dieses Mal wurden einige wenige Zellen beobachtet, die offenbar exklusiv rot markiert waren (Abb. 54A'). Es scheint also im Zentralbereich des Cerebralganglions einige Zellen zu geben, die ausschließlich *Bg-AChBP2* exprimieren, aber viele Zellen, die beide Isoformen exprimieren. Zur Peripherie hin gibt es dann ganz überwiegend Zellen, die ausschließlich *Bg-AChBP1* exprimieren. Somit bestätigen und verfeinern die Ergebnisse der *In-situ*-Hybridisierung die Befunde der Immunfluoreszenzmikroskopie.

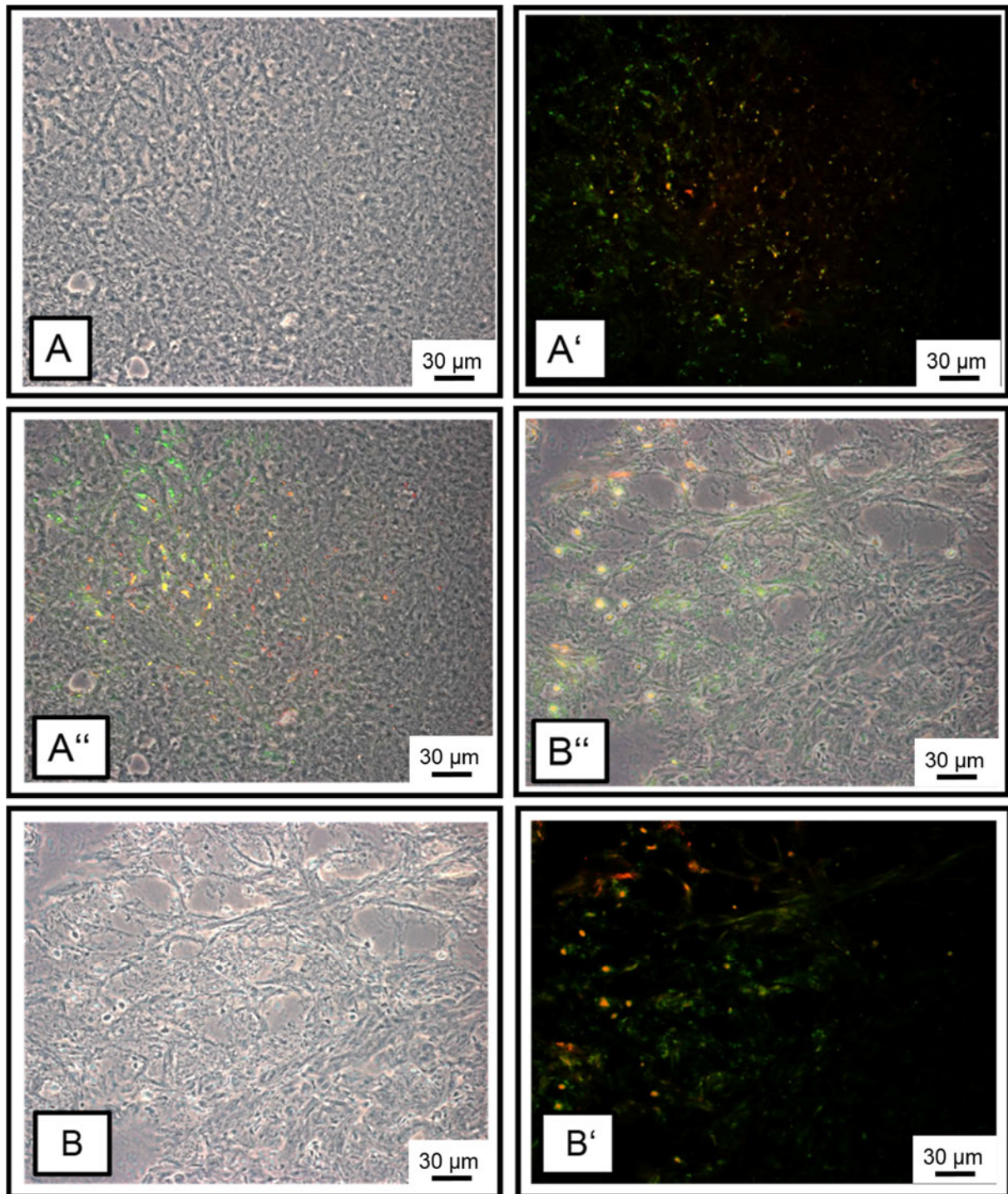


Abbildung 51: 7 µm dicke Gefrierschnitte aus dem Bereich des Cerebralganglion. In den Bildern (A) und (B) ist jeweils ein Phasenkontrastbild zu sehen. (A) zeigt eine 25-fache Vergrößerung, (B) eine 40-fache Vergrößerung mit Immersionsöl. (A') und (B') zeigen beide die positive Reaktion mit den isoform spezifischen Sonden. Die *Bg*-AChBP1-Sonde ist in grün markiert und die *Bg*-AChBP2-Sonde ist rot markiert. Es ist zu erkennen, dass es rein grüne Bereiche gibt, in denen nur *Bg*-AChBP1 synthetisiert wird. Außerdem sind noch rötlich-, orange Bereiche zu erkennen, in denen beide Isoformen gleichzeitig synthetisiert werden. Exklusiv rote Bereich gibt es nicht. Zur Verdeutlichung wurden in (A'') und (B'') die Fluoreszenz -Bilder und die Phasenkontrastbilder übereinandergelegt. So wird genau deutlich um welche Zellen es sich handelt. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzmikroskopie.

6.4 *Bg*-AChBP1 Synthese im Mantelepithel von *B. glabrata*

Auch von Mantelgewebe wurden 7 µm dicke Gefrierschnitte mit dem Gefrier-Mikrotom angefertigt, um die Reaktionen der Whole-mount *In-situ*-Hybridisierungen genauer zu untersuchen. Die *In-situ*-Hybridisierungen ergaben eine positive Reaktion der *Bg*-AChBP1-Sonde im Bereich des Mantelepithels (Abb. 52A), sowie eine negative Reaktion der *Bg*-AChBP2-Sonde (Abb. 52B).

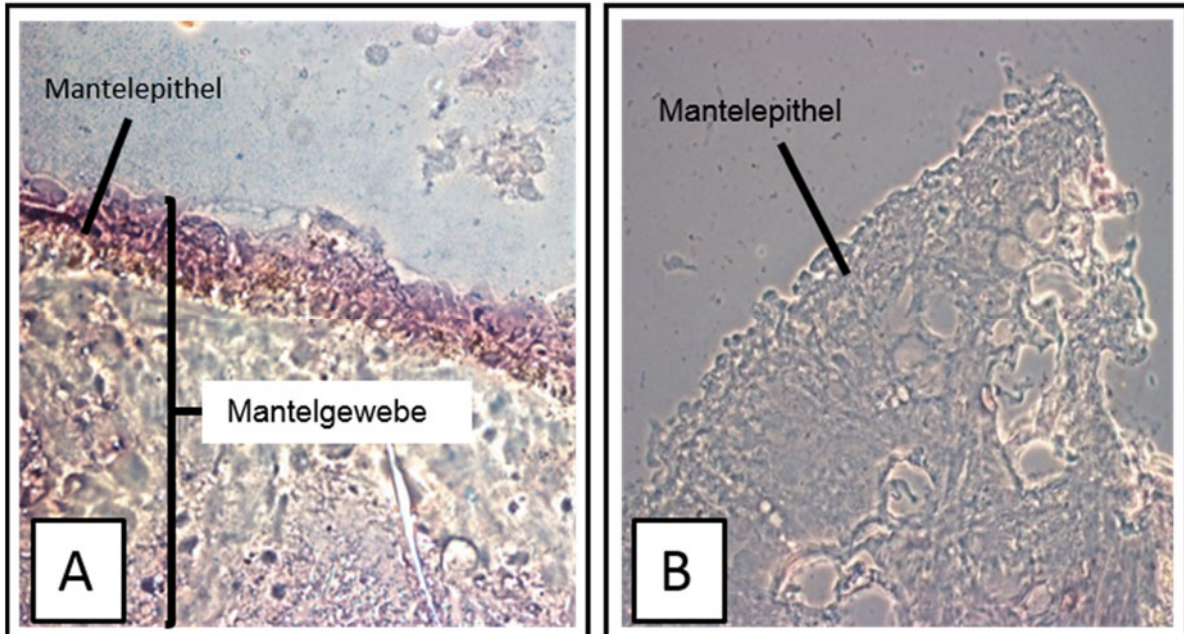


Abbildung 52: *In-situ*-Hybridisierung an 7 µm dicken Gefrierschnitten, durch das Mantelgewebe von *B. glabrata*. Die Epidermis schließt das Gewebe nach außen hin ab. Nach der Inkubation mit der *Bg*-AChBP1-Sonde ist eine deutlich positive Reaktion in der Epidermis zu erkennen (A). Nach Inkubation mit der *Bg*-AChBP2-Sonde (B) konnte hingegen keine Reaktion beobachtet werden. Das Gewebe ist völlig farblos.

7 Elektronenmikroskopische Untersuchung des Mantelepithels

Durch *In-situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenzmikroskopie war nur nachgewiesen, dass *Bg*-AChBP1 unter anderem im Mantelepithel gebildet wird und vorkommt und zwar in viel höherer Konzentration, als in der Hämolymphe (weil die Hämolymphräume aufgrund zu niedriger Proteinkonzentration mit den spezifischen Antikörpern negativ reagierten). Da das Mantelepithel das Material für die Schalenbildung absondert und manche AChBP-Abkömmlinge in die Schalenbildung involviert sind (Huang et al. 2009; Ma et al. 2007; Su et al. 2013), habe ich Mantelepithelzellen mit dem Transmissionmikroskop näher untersucht. Für einen besseren Überblick habe ich als erstes Übersichtsbilder in einer niedrigen Vergrößerung angefertigt. Hierin sind die einzelnen Bereiche des Mantelgewebes, wie das Mantelepithel und das darunter liegende Bindegewebe zu erkennen. Die äußere Oberfläche der Epithelzellen ist mit Cilien besetzt. Diese dienen vermutlich der Bewegung der Flüssigkeit im Spalt zwischen Mantelgewebe und Schale. Im Bindegewebe unter dem Epithel sind

Fettkörperchen und Muskelzellen gut zu erkennen, ebenso Calciumcarbonat-Zellen. Letztere wurden bereits 1976 bei *Lymnaea stagnalis* beschrieben (WITH et al. 1976). Sie bestehen zum einen aus organischem Material, welches vom Golgi-Apparat gebildet wird und zum anderen aus kristallinem Calciumcarbonat. Dieses kristalline Material macht einen großen Teil der Zellen aus. Sie haben nur eine sehr dünne Schicht Zytoplasma und die Plasmamembran enthält zahlreiche Poren. Außerdem enthalten sie viele freie Ribosomen, Mitochondrien und einige Vesikel. Vor allem kommen sie in Bereichen des Bindegewebes vor. Aufgrund ihrer harten Beschaffenheit, brechen die Calciumcarbonat-Zellen beim Schneiden meist aus den Gewebeproben heraus (Abb. 53) und erscheinen als kreisrunde Löcher im Gewebe (WITH et al. 1976). Gut zu erkennen sind auch Amöbozyten. Diese sind vor allem als Zellen des Immunsystems bekannt. Dort werden sie auch Amöboblasten genannt (Jeong et al. 1983). Im Gewebe können sie sich amöbenartig fortbewegen und sind durch ihre pseudopodienartigen Ausstülpungen gekennzeichnet. Sie dienen auch dem Transport von Partikeln innerhalb des Gewebes. Es können mehrere Typen von Amöbozyten unterschieden werden, wobei die von Joky et al. als Typ 3 Zellen beschriebenen Amöbozyten dem von mir beobachteten Typ ähneln. Diese enthalten elektronendichte Partikel und Glykogen- α -Rosetten (Joky et al. 1983).

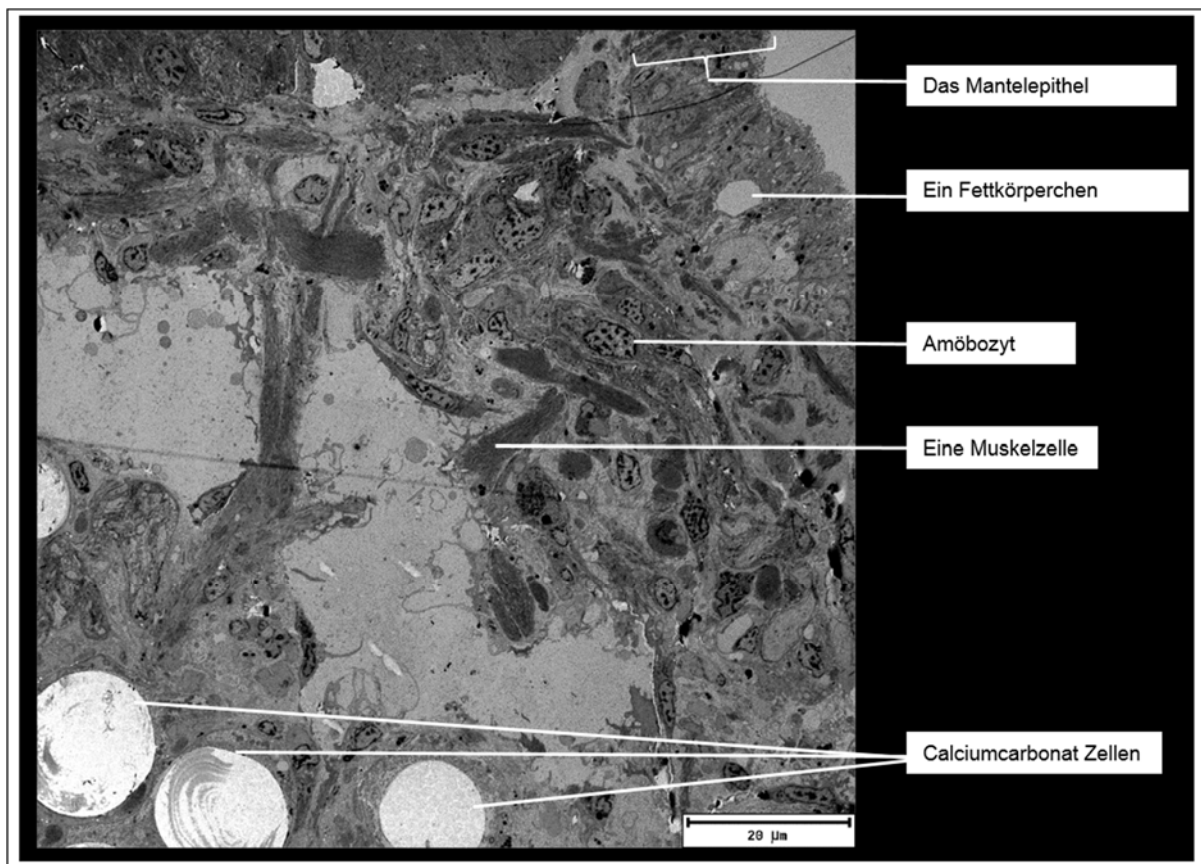


Abbildung 53: Transmissions-elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme Mantelgewebes von *B. glabrata*. Die Mantelepithelzellen tragen Cilien. Im Mantelgewebe sind Fettkörperchen, Amöbozyten, Muskelzellen und Calciumcarbonat-Zellen gut zu erkennen. In Araldit® eingebettete und chemisch fixierte Ultradünnschnitte (70 nm dick).

In der höheren Vergrößerung sind diese Zilien besser zu erkennen. Auffällig sind hier auch kleinere Vesikel, die Stoffe in- bzw. aus den Zellen transportieren (Abb. 54).

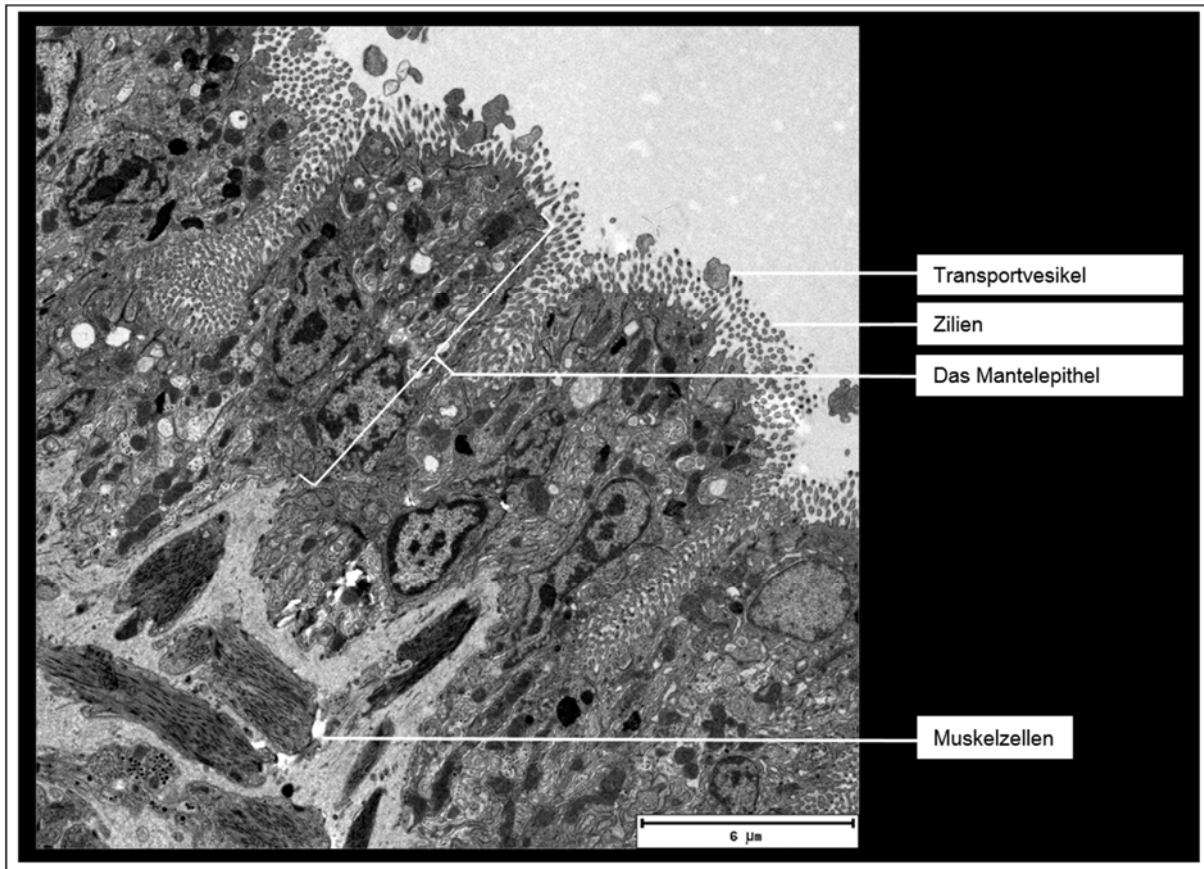


Abbildung 54: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des Mantelepithels bei stärkerer Vergrößerung. Die Cilien, welche das Mantelepithel nach außen hin begrenzen sind hier deutlich zu erkennen. Außerhalb des Mantelepithels sind vesikelartige Objekte zu erkennen. eines 70 nm dicken, in Araldit © eingebetteten und chemisch fixierten Schnittes.

Aufgrund der immunhistologischen Ergebnisse ist anzunehmen, dass sich eine relativ große Menge *Bg*-AChBP1-Moleküle, höchstwahrscheinlich als Dodekaeder, in den Zellen des Mantelepithels befinden muss. Eine genauere Inspektion einzelner Mantelepithelzellen lässt in großen ER-Lakunen eine riesige Zahl dunkler Partikel erkennen, deren Größe (ca. 25 nm) zur Größe der Dodekaeder passt (Abb. 55A). Diese Partikel liegen teils solitär vor, teils sind ähnlich große Partikel zu runden bis sternförmigen Strukturen von 70 bis 100 nm Durchmesser aggregiert (Abb. 55B). Sullivan et al. (1974) bezeichneten die größeren Strukturen als Glykogen- α -Rosetten (Sullivan et al. 1974). Da bei solchen Rosetten die an das Glykogenzentrum gebundenen Glukoseketten in ihrer Länge variieren können, wäre es nicht verwunderlich, wenn solche Rosetten etwas amorph wirken und in ihrer Größe variieren. Es scheint hier also eine Mischung aus Glykogen- α -Rosetten und AChBP1-Dodekaedern vorzuliegen, aber das ist nicht eindeutig zu sagen. Andererseits gibt es außer diesen Partikeln keine Kandidaten für das zweifellos in diesen Zellen zahlreich vorhandene *Bg*-AChBP1.

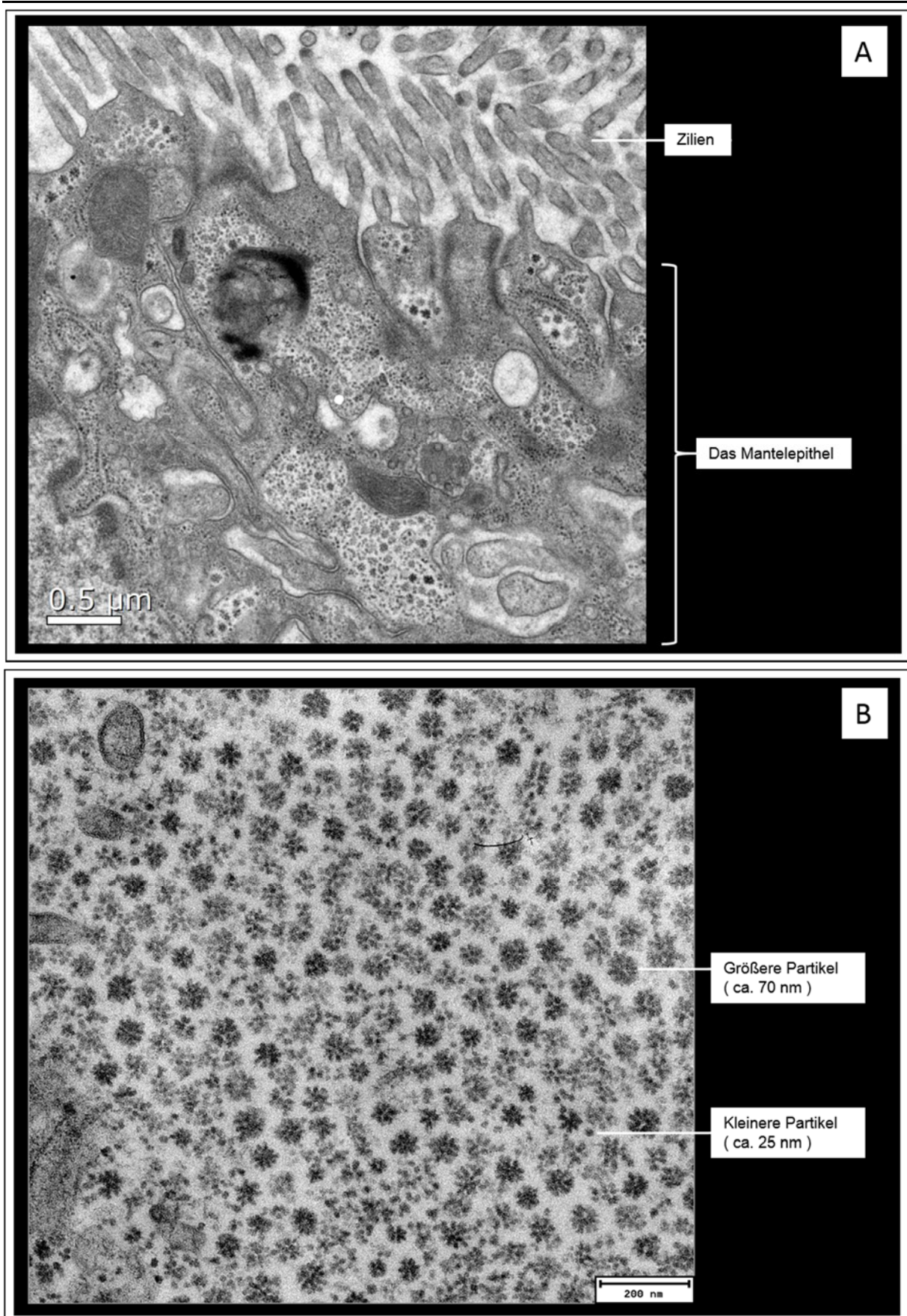


Abbildung 55: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Zellen des Mantelepithels. In großen ER-Lakunen sind einzelne Partikel zu erkennen, welche sich über das gesamte Mantelepithel hin verteilen. An 70 nm dicken, in Araldit ® eingebetteten und chemisch fixierten Schnitten.

Aber nicht nur im Mantelepithel, auch in und um Amöbozyten im Bindegewebe treten sowohl die größeren, als auch einige der kleineren Partikel auf (Abb. 56). Obwohl sie sich in und um Amöbozyten konzentrieren, kommen sie hier im Bindegewebe in deutlich geringerer Menge vor, als in den Epithelzellen des Mantelgewebes. In einer höheren Vergrößerung können Partikel in zwei verschiedenen Größen gut beobachtet werden (Abb. 57A). Vergleicht man hier die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie, so können auch im Bindegewebe einzelne Bereiche identifiziert werden, die positiv auf den Antikörper gegen *Bg*-AChBP1 reagierten (Abb. 57B). Innerhalb der Schleimzellen konnte keine positive Reaktion beobachtet werden.

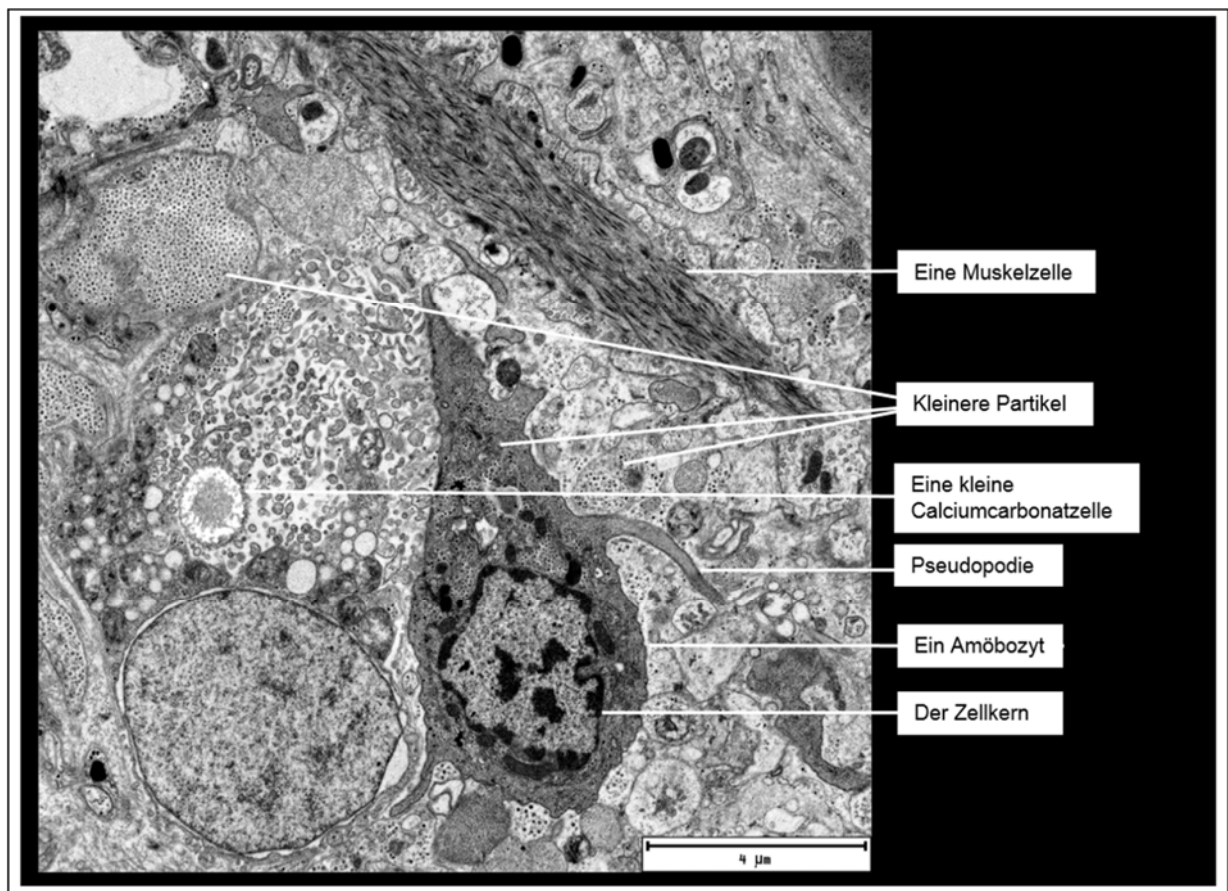


Abbildung 56: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines 70 nm dicken, in Araldit® eingebetteten und chemisch fixierten Schnittes. (A) In der Mitte ist ein Amöbozyt zu sehen. Diesen kann man gut an seinen Pseudopodien erkennen. Durch diese kann er sich frei im Gewebe bewegen und so Stoffe transportieren. Im Bild sind noch weitere Zellen, wie eine Muskelzelle oder eine kleine Calciumcarbonat-Zelle zu sehen. Kleinere Partikel finden sich in der Zelle und um die Zelle herum. Entweder frei im Gewebe oder in Vesikeln verpackt.

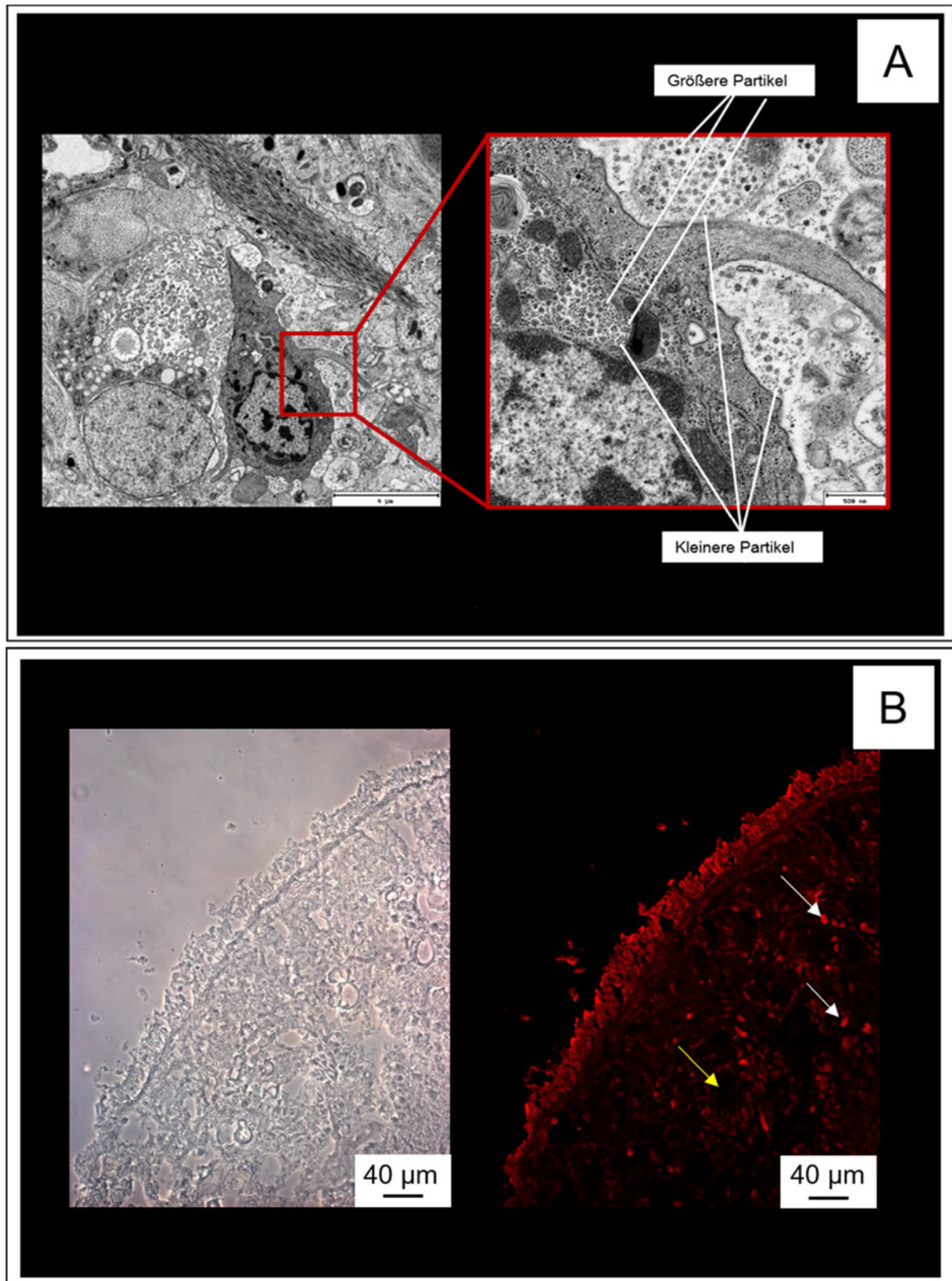


Abbildung 57: (A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines 70 nm dicken, in Araldit® eingebetteten und chemisch fixierten Schnittes. In der Vergrößerung sind die kleineren und größeren Partikel innerhalb des Amöbozyten gut zu erkennen. Auch außerhalb, in unmittelbarer Nähe befinden sich beide Partikel. **(B) Immunfluoreszenzmikroskopie an 7 µm dicken Gefrierschnitten Mantelgewebes von *B. glabrata* in einer 25-fachen Vergrößerung.** Die starke positive Reaktion im Mantelgewebe ist zu erkennen. Vereinzelt sind aber auch im Bindegewebe Bereiche zu erkennen, die positiv auf den Antikörper gegen *Bg*-AchBP1 reagierten (weiße Pfeile). In den Schleimzellen (gelber Pfeil) konnte keine Reaktion beobachtet werden.

8 PAS Färbung zum Nachweis von Glykogen im Mantelepithel

Da die größeren Partikel im Gewebe von *B. glabrata* als Glykogen- α -Rosetten beschrieben wurden (Sullivan et al. 1974; Jong-Brink et al. 1976; Rogers und Reeder 1987), wurde zur Bestätigung der Anwesenheit von Glykogen im Mantelepithel ein Glykogen-Nachweis durchgeführt. Dies geschah mit Hilfe der PAS-Färbemethode. Bei dieser Färbetechnik kommt es zur Anfärbung von polymerisierten Kohlenhydraten wie Glykogen, Cellulose, neutralen Mukopolysacchariden, stark glykosylierten Glykoproteinen und Glycolipiden. In Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Universitätsmedizin in Mainz wurden Paraffinschnitte von Schnecken angefertigt und vermittels der PAS-Färbung auf Glykogen untersucht. Zur besseren Orientierung im Gewebe wurden einige Schnitte mit Movat-Pentachrom angefärbt. Bei dieser Färbemethode sind einzelne Zellbereiche unterschiedlich angefärbt. Elastische Fasern sind dunkel dargestellt. Collagenfasern erscheinen gelb bis hellrot. Fibrin ist ebenfalls rot angefärbt. Muskelzellen erscheinen in dunklem Rot. Mucinhaltige Zellen sind blau gefärbt. Besonders die mucinhaltigen Schleimzellen des Mantelgewebes sind gut zu erkennen (Abb. 58A, die Schleimzellen sind mit m markiert). Die starke dunkelviolette Farbe bei der PAS Färbung weist auf eine hohe Konzentration polymerisierter Kohlenhydrate hin (Abb. 58B).

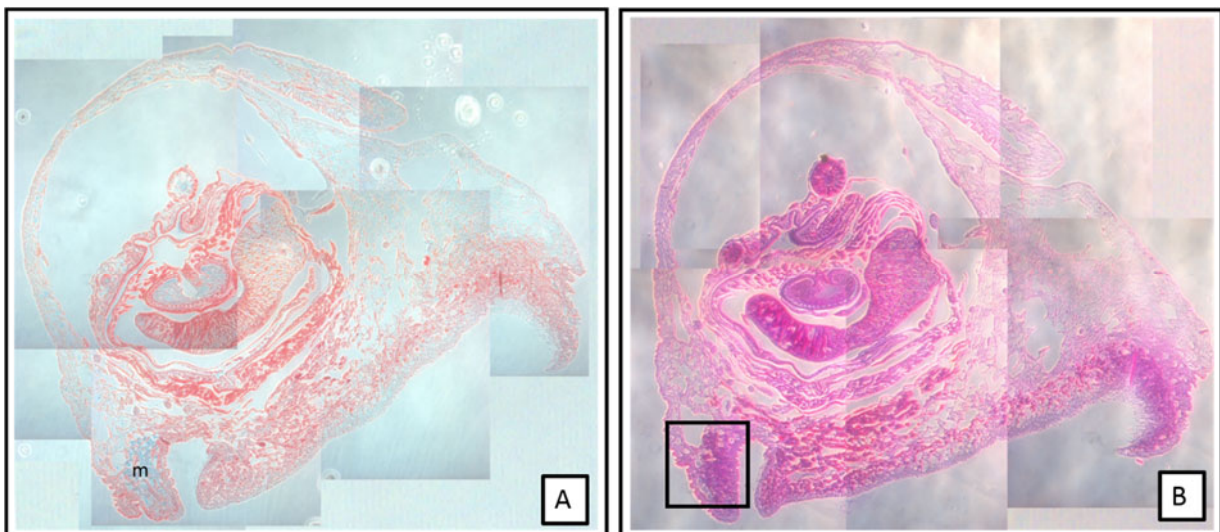


Abbildung 58: Paraffin-Querschnitte durch das Gewebe von *Biomphalaria glabrata*. (A) Übersicht über den kompletten Schnitt in einer 10x Vergrößerung in einer Movat-Pentachromfärbung (Die Übersicht wurde aus mehreren mikroskopischen Aufnahmen in einer 10-fachen Vergrößerung erstellt). Bei dieser Färbemethode ist das Bindegewebe gelb bis hellrot angefärbt. Fibrin ist ebenfalls in hellem rot markiert. Alle Muskelzellen sind dunkelrot dargestellt. Das Mucin, in den Schleimzellen des Mantelgewebes, ist blau angefärbt (m). (B) Der darauffolgende Schnitt wurde mit der PAS-Färbung behandelt. Stark dunkelviolette Bereiche enthalten hohe Konzentrationen polymerisierter Kohlenhydrate. Der Bereich des Mantelgewebes zeigt eine starke Reaktion (siehe Kasten).

Ergebnisse

In einer höheren Vergrößerung wird deutlich, dass sich das positiv reagierende Material vor allem in den Schleimzellen und den Mantelepithelzellen konzentriert. Dort konnte eine große Menge an Glykogen haltigem Material nachgewiesen werden (Abb. 59B' und Abb. 59B''). Als Positivkontrolle dienten Schnitte durch das Lebergewebe der Maus (Abb. 59C und Abb. 59C').

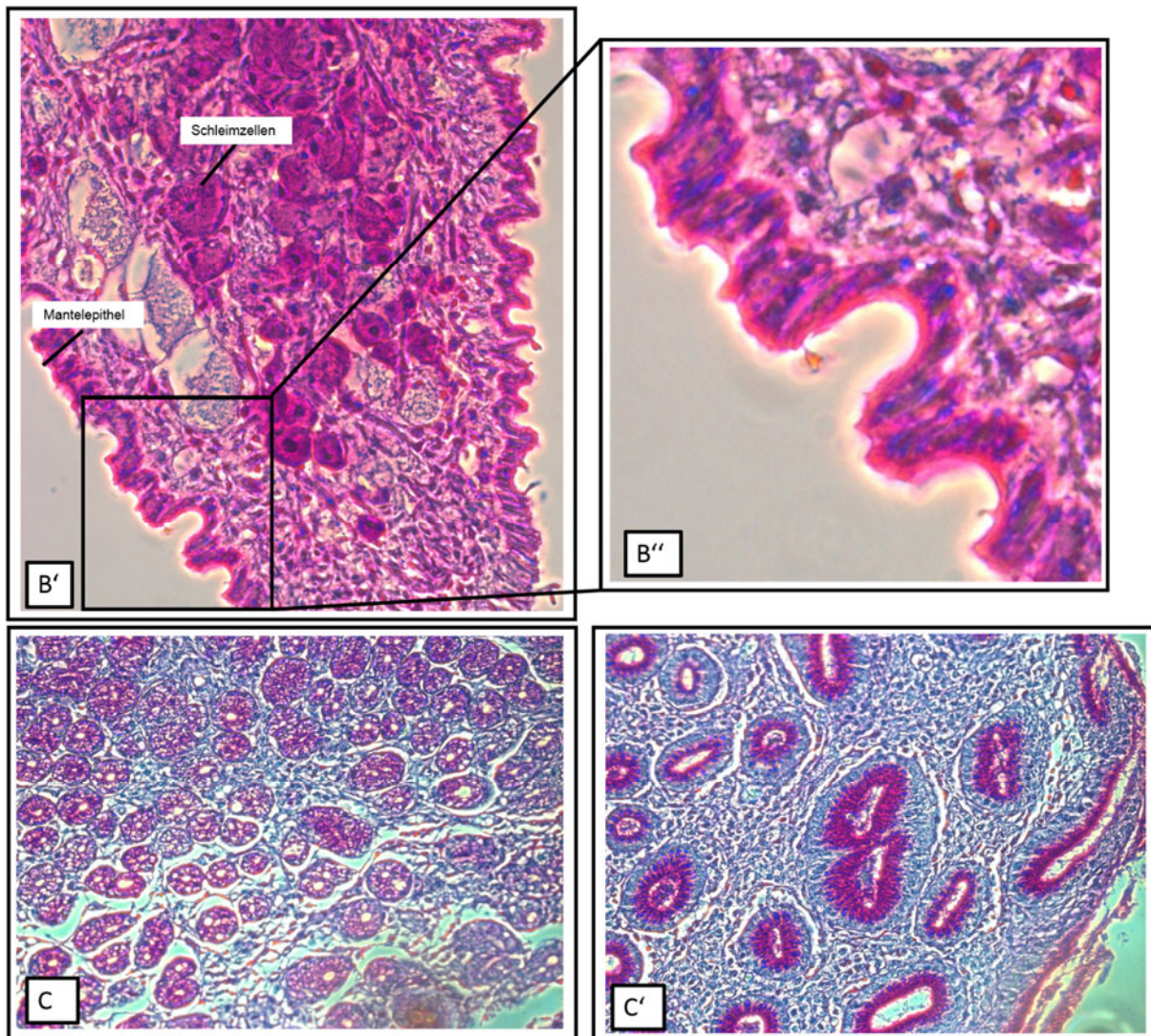


Abbildung 59: (B') Vergrößerung des markierten Bereiches aus Abb. 58, B. Betrachtet man diesen Bereich etwas genauer (B''), scheint es als würde das komplette Mantelgewebe Glykogen enthalten. Besonders stark sind das Mantelepithel und die Schleimzellen angefärbt. (B'') zeigt die Reaktion im Mantelepithel zu Verdeutlichung in einer höheren Vergrößerung. In (C) und (C') ist die Positivkontrolle dargestellt, es handelt sich hierbei um Hepatozyten im Lebergewebe der Maus.

Die stark positive Reaktion der Schleimzellen beruht zweifellos auf den Mucopolysacchariden des Schleims. In den Mantelepithelzellen ist jedoch kein Schleim zu erkennen, sondern sie sind mit den rosettenartigen Partikeln gefüllt, bei denen es sich nach diesen Befunden definitiv um Glykogen- α -Rosetten handeln sollte. Die solitären 25-nm-Partikel müssten demnach in der Tat die Bg-AChBP1-Dodekaeder sein.

9 Vergleich des Mantelgewebes von *B. glabrata* und *L. stagnalis*

Um weitere Indizien zu sammeln, wurde das Mantelgewebe von *Biomphalaria glabrata* mit dem Mantelgewebe von *Lymnaea stagnalis* verglichen. Da bei *Lymnaea stagnalis* das AChBP nicht als Dodekaeder, sondern als Pentamer vorliegt, sollte sich ein etwas anderes Bild ergeben. Vergleicht man nun die elektronenmikroskopischen Aufnahmen beider Mantelepithelien miteinander, so sind bei *L. stagnalis* tatsächlich nur die großen, sternförmigen 100-nm-Partikel zu beobachten und nicht die solitären 25-nm-Partikel. Das Cytoplasma sieht bei *L. stagnalis* also wesentlich „aufgeräumter“ aus (Abb. 60).

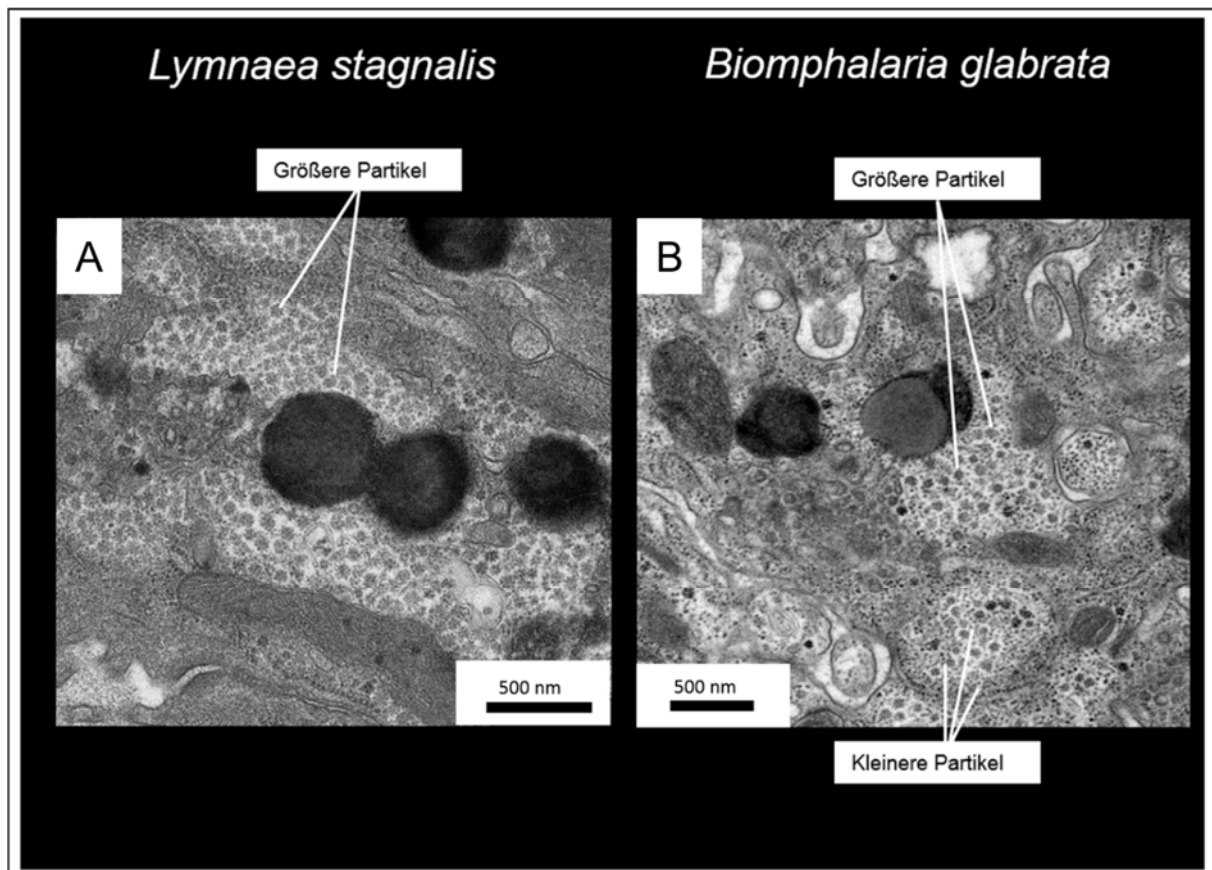


Abbildung 60: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des Mantelepithels von *L. stagnalis* und *B. glabrata* im Vergleich. (A) Im Mantelepithel von *L. stagnalis* konnten nur größere Partikel mit einem Durchmesser bis zu 100 nm beobachtet werden. Diese sternförmigen Partikel ähneln den Partikeln welche bereits bei *B. glabrata* als Glykogen- α -Rosetten beschrieben wurden. **(B)** Bei *B. glabrata* konnten zusätzlich zu den größeren Partikeln auch die kleineren 20 nm Partikel beobachtet werden. Es könnte sich hierbei um *Bg*-AChBP1 Dodekaeder handeln.

10 Verteilung der potentiellen *Bg*-AChBP1-Dodekaeder im Mantelepithel

Es stellte sich jetzt die Frage, wo genau sich die vermutlichen Dodekaeder im Mantelepithel konzentrieren. Hierzu wurde eine 3D-Tomographie am Transmissionselektronenmikroskop durchgeführt. Der Schnitt wurde bei den Aufnahmen unter dem Elektronenmikroskop von -60° bis $+60^\circ$ gekippt. Alle $1,5^\circ$ wurde ein Bild aufgenommen (Abb. 61A). In jedem dieser Bilder wurden dieselben Strukturen farblich markiert (Abb. 61B) und im Computer zu einem 3D-Modell zusammengesetzt (Abb. 62C). So entstanden ein dreidimensionaler Eindruck der Strukturen und eine gute Übersicht über die Verteilung der zu untersuchenden Partikel. Betrachtet man die Ergebnisse der Tomographie, so ist deutlich zu erkennen, dass sich beide Partikel in größerer Menge innerhalb der Epithelzellen des Mantels befinden (Abb. 62C). An einigen Stellen sind extrazellulär vesikelartige Strukturen zu erkennen. Diese sind sowohl mit den 100-nm- als auch mit den 25-nm-Partikeln gefüllt. Ob hier ein Vesikeltransport vorliegt oder ein Scheideartefakt kann an dieser Stelle nicht entschieden werden. Andererseits ist klar, dass Material für die Schalenbildung irgendwie in den extrapallialen Flüssigkeitsspalt abgegeben werden muss. Auch die Amöbocyten könnten hierbei eine Rolle spielen.

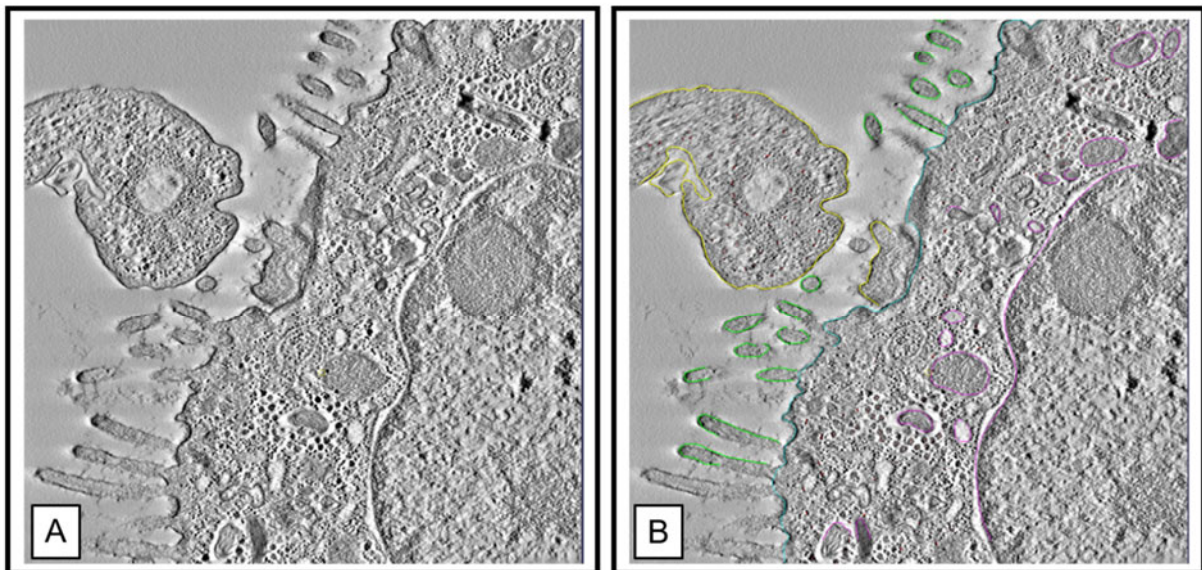


Abbildung 61: 3D –Tomographie an 70 nm dicken Schnitten des Mantelgewebes von *Biomphalaria glabrata*. Im Abstand von je $1,5^\circ$ wurde jeweils eine Aufnahme gemacht (A). Die verschiedenen Zellkompartimente wurden in verschiedenen Farben markiert (B).

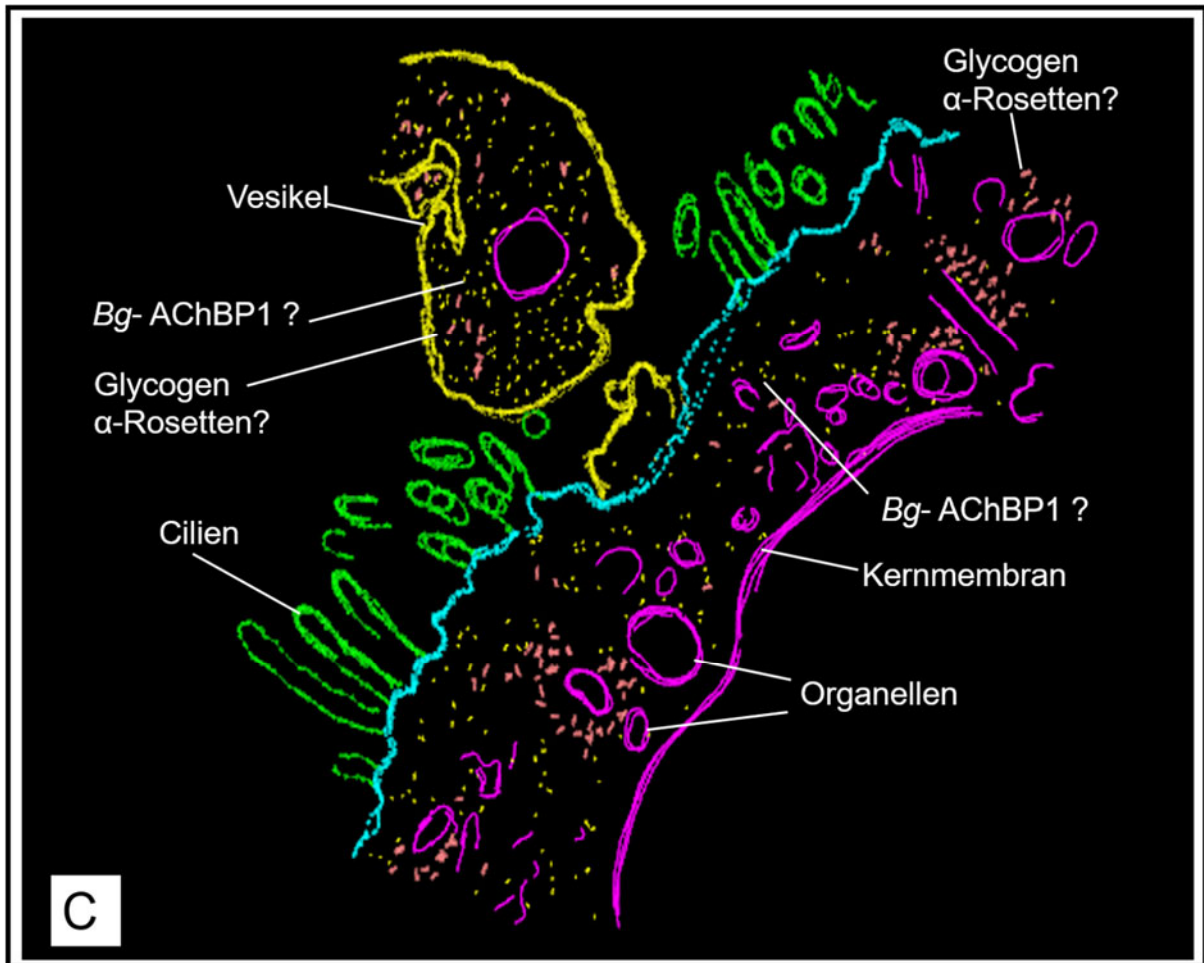


Abbildung 62: 3D-Tomographie an 70 nm dicken Schnitten des Mantelgewebes von *Biomphalaria glabrata*. Die Einzelbilder wurden übereinandergelegt und eine 3D-Darstellung wurde erstellt, um einen besseren Eindruck der Partikelverteilung zu erhalten. Die potentiellen *Bg-AChBP1* Partikel befinden sich im gesamten Mantelepithel, sowie in vesikelartigen Strukturen, welche scheinbar nach außen hin abgegeben werden. In diesem „Vesikel“ befinden sich auch die potentiellen Glykogen- α -Rosetten (C).

11 *Bg-AChBP* und die Schalenbildung der Schnecke

11.1 Der Einfluss auf die Kristallisation von Calciumcarbonat

Sollte *Bg-AChBP* eine Rolle bei der Schalenbildung der Schnecke spielen, so müsste es in irgendeiner Weise einen Einfluss auf die Kristallisationsvorgänge von Calciumcarbonat haben. Es könnte wie die strukturell verwandten ACCBP-Proteine bei *Haliothis* und *Pinctada fucata* an amorphes Calciumcarbonat binden und/oder die Form der Kristallisation zu Aragonit und/oder Calcit beeinflussen (Ma et al. 2007; Cölfen und Antonietti 2005; Huang et al. 2009; Cölfen und Antonietti 2005). In der Tat haben Vorversuche ergeben, dass eine Komponente der *Bg-AChBP*-Hämolympheproteinfraktion an amorphes Calciumcarbonat bindet (Saur et al., 2012). Im Folgenden sollte daher die Wirkung vor allem von *Bg-AChBP1* und *Bg-AChBP* auf die Kristallisation von amorphem Calciumcarbonat bis hin zum Calcit untersucht werden und *Bg-AChBP2*, dass aufgrund seines Expressionsmusters wohl nichts mit der Schalenbildung

zu tun hat, diente als eine Art Kontrolle. Als erstes wurde daher amorphes Calciumcarbonat synthetisiert (Faatz et al. 2004). Zu einer 10 μM Lösung von rekombinantem *Bg*-AChBP1 oder *Bg*-AChBP2 (in 20 mM Tris Puffer) wurde amorphes CaCO_3 gegeben und für 72 Stunden inkubiert. Die gebildeten Kristalle wurden lichtmikroskopisch untersucht. (Ma et al. 2007; Cölfen und Antonietti 2005). Bei der Kristallbildung konnten im direkten Vergleich deutliche Unterschiede beobachtet werden. Die Kontrolle (CaCO_3 ohne Zugabe von Protein) zeigte Calcite mit einer schönen, glatten Oberfläche. Für deren Bildung sind sogenannte polare Facetten verantwortlich. Polare Moleküle lagern sich diagonal an der Oberfläche an und bilden schöne glatte Strukturen aus (Abb. 63A). Werden diese durch ein Additiv inhibiert, so erscheinen die Kristalle eckiger und die Kanten sind etwas abgerundet. Diese abgerundeten Kanten sind immer ein Hinweis, dass ein Additiv in den Kristallisationsprozess eingreift. Dieser Effekt konnte bei der Kristallisation bei Anwesenheit beider Isoformen beobachtet werden (Abb. 63C und Abb. 63D). Bei Anwesenheit von *Bg*-AChBP1-Dodekaeder wurden nicht nur die polaren Facetten, sondern auch das Wachstum der Kristalle gehemmt. Sie erscheinen deutlich kleiner (Abb. 63C). Unter dem Einfluss von *Bg*-AChBP2-Pentameren schienen die Kristalle sogar noch etwas größer als in der Referenz zu sein. Aber auch hier waren die polaren Facetten inhibiert (Abb. 63C). Bei den Kristallen, welche in Gegenwart von *Bg*-AChBP2 wuchsen, waren an einigen Stellen „Fäden“ zu erkennen, die an den Kristallen zu hängen schienen. Diese „Fäden“ wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz-mikroskopie genauer untersucht (Abb. 64). Nach Inkubation mit beiden Antikörpern wurde deutlich, dass die komplette Oberfläche der Kristalle angefärbt wird. Die fadenartigen Strukturen bestehen offenbar aus dem Protein, welche außen an dem Kristall angelagert ist und konnte bei beiden Isoformen beobachtet werden. Wie das Protein sich an die Oberfläche anlagert, machen hierbei Aufnahmen mit dem Rastersondenmikroskop deutlich. Proteinaggregate beider *Bg*-AChBP Isoformen lagern sich auf den Flächen an. Die Stufenkanten werden durch eine dünne Schicht von Protein terminiert (Abb. 65).

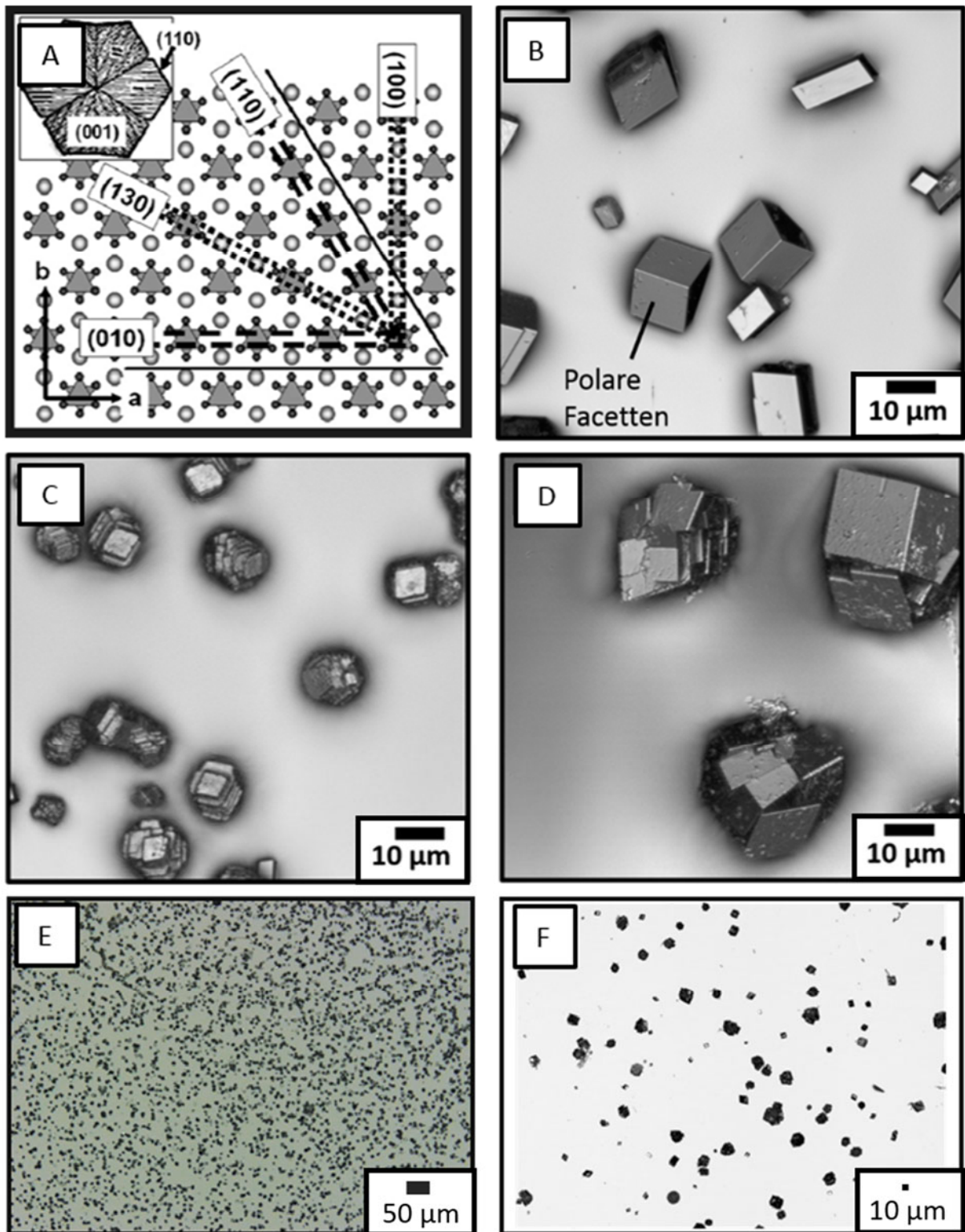


Abbildung 63: CaCO_3 Kristallisation in Anwesenheit von *Bg*-AChBP. Polare und nicht polare Moleküle lagern sich nebeneinander im Kristall an und bilden spezifische Facetten an der Kristalloberfläche aus. Hier am Beispiel des Aragonit (A) Grafik entnommen aus: Hitoshi Shindo & Musun Kwak, (2005) PCCP, 7(4):691-6). Die im Calcit befindlichen polaren Facetten bilden eine glatte Oberfläche aus. Dies ist gut in der Referenz zu erkennen. Hier wurde amorphes Calciumcarbonat zu Calcit kristallisiert. Es sind schöne Calcite mit großen polaren Facetten zu sehen (B). Bei der Zugabe von $10 \mu\text{M}$ *Bg*-AChBP1, wird die Bildung der polaren Facetten inhibiert. Dies ist deutlich an den abgerundeten Flächen der Kristalle zu erkennen. Aber auch das Kristallwachstum ist eingeschränkt (C). Bei der Zugabe von $10 \mu\text{M}$ *Bg*-AChBP2, ist ebenfalls eine leichte Inhibierung der polaren Facetten zu erkennen. Das Kristallwachstum ist nicht eingeschränkt. Die Kristalle erscheinen sogar etwas größer (D). Betrachtet man die Belegungsdichte, so sind unter dem Einfluss von *Bg*-AChBP1 deutlich mehr, aber kleinere Kristalle sichtbar (E), unter dem Einfluss von *Bg*-AChBP2 sind weniger, aber größere Kristalle sichtbar. Faserähnliche ausgefallene Substanzen sind zu erkennen (F).

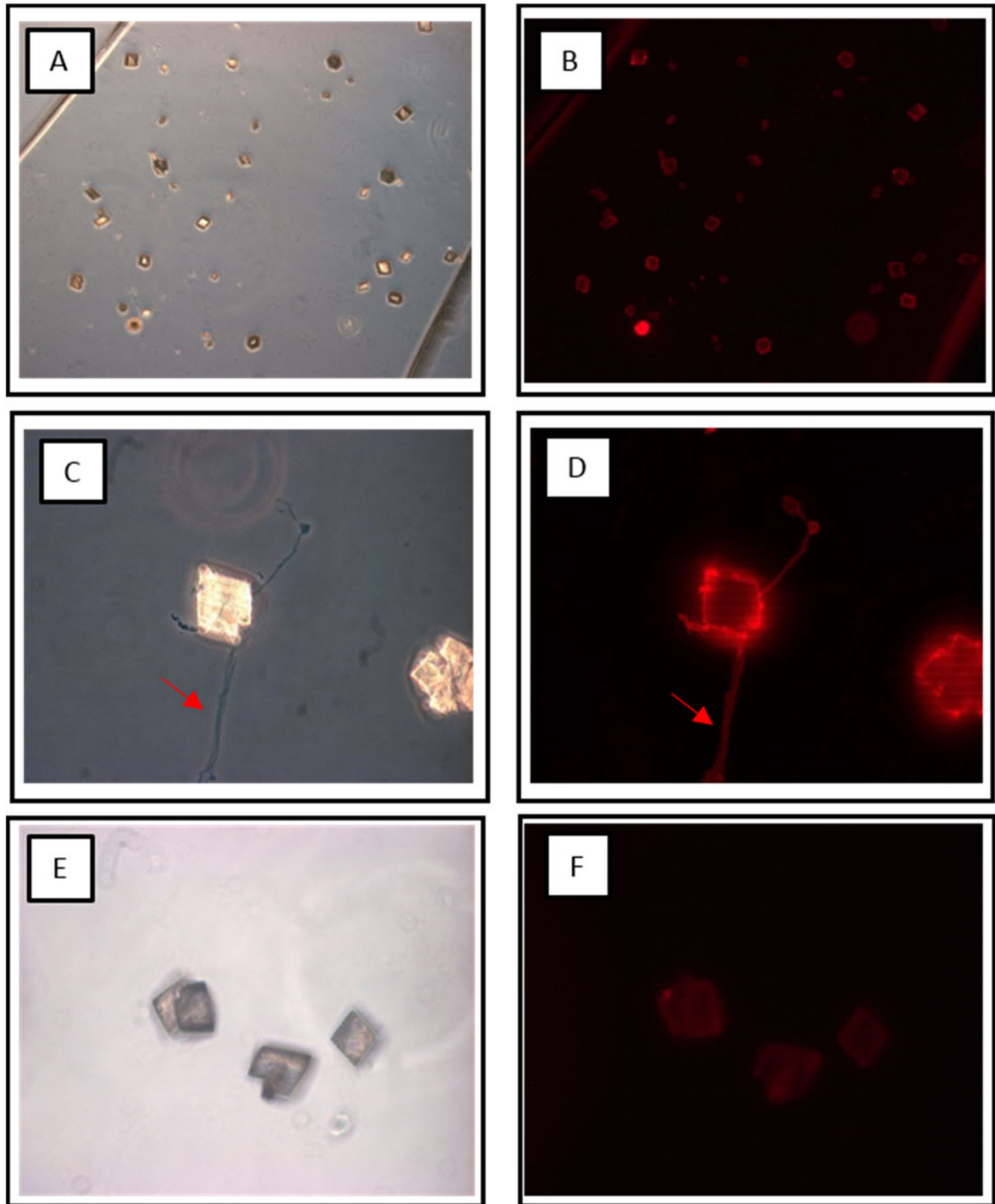


Abbildung 64: Immunfluoreszenzmikroskopie von in Anwesenheit von *Bg-AChBP1* gebildeten Calciumcarbonat-Kristallen (A, B). In der Übersicht ist mit dem Antikörper gegen *Bg-AChBP1* eine positive Reaktion an der Kristalloberfläche zu sehen. Das Protein scheint sich also an der Oberfläche der Kristalle anzulagern. **(C,D)** Bei stärkerer Vergrößerung werden „Fäden“ sichtbar, die von den Kristallen ausgehen (roter Pfeil) und ebenfalls mit dem Antikörper reagieren. **(E,F)** In der Negativkontrolle wurden CaCO_3 -Kristalle ohne das jeweilige Protein angefärbt. So konnte eine Eigenfluoreszenz der Kristalle ausgeschlossen werden. **(A,C,E) Phasenkontrastoptik, (B,D,E) Epifluoreszenzoptik.**

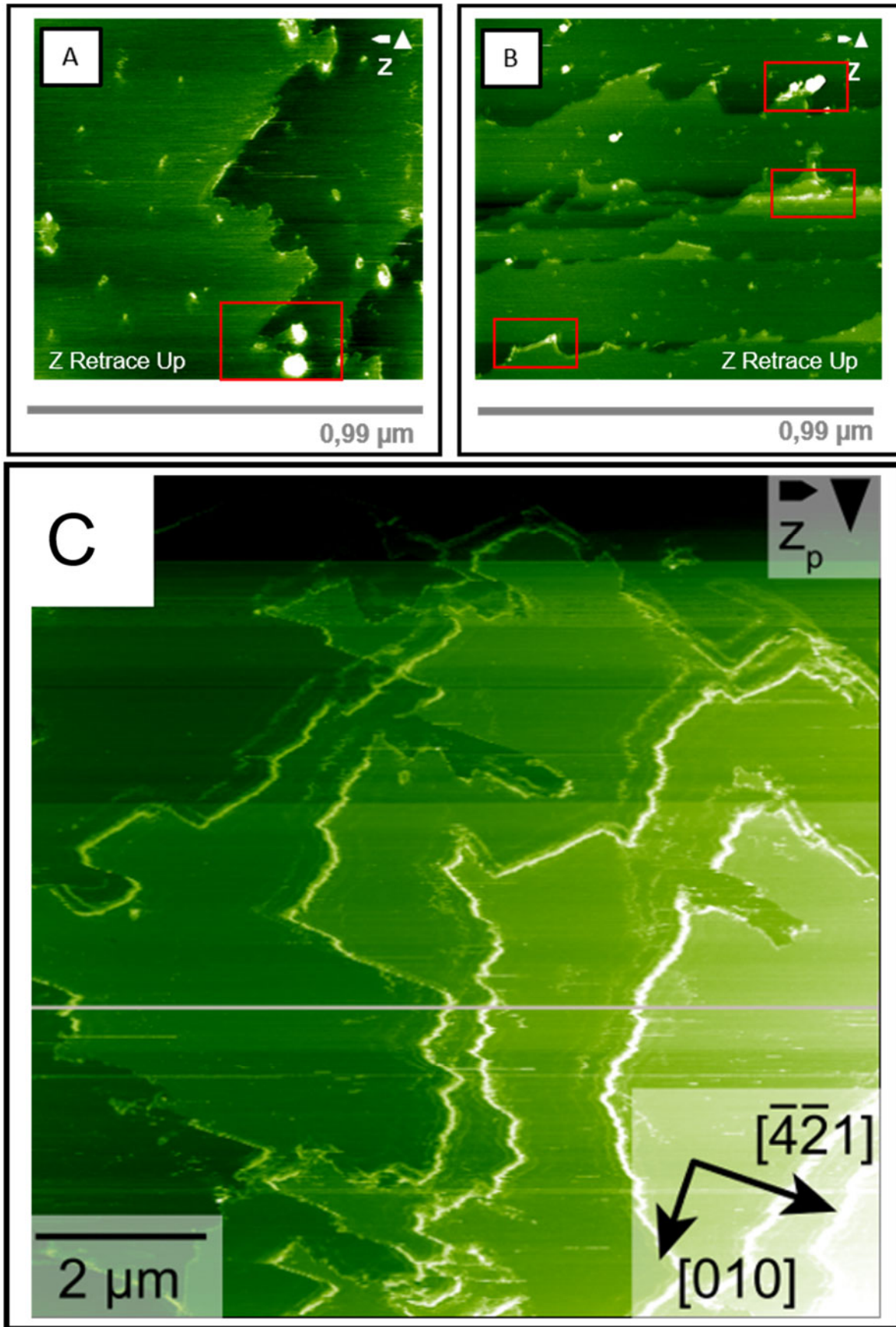


Abbildung 65: Topographie unter dem Einfluss von *Bg*-AChBP gewachsener CaCO_3 -Kristalle (Rastersonden-Elektronenmikroskopie). Es ist zu erkennen, dass die Stufenkanten durch dünne Schichten weißen Materials (Protein) terminiert werden (rote Kästen) und zwar sowohl in Gegenwart von *Bg*-AChBP1-Dodekaedern (A), (B), als auch von *Bg*-AChBP2-Pentameren (C). *Bg*-AChBP2 lagert sich komplett auf der Oberfläche der Kristalle an.

11.2 Bindung von *Bg*-AChBP1 und *Bg*-AChBP2 an verschiedene CaCO₃-Polymorphe

Im Folgenden wurde die Bindung von rekombinanten *Bg*-AChBP1-Dodekaedern und *Bg*-AChBP2-Pentameren, die sich in Abb. 65 andeutete, genauer untersucht. Dies geschah mit Hilfe der Pull-Down-Methode. Hierbei wurden die vier verschiedenen Calciumcarbonat-Modifikationen (die Polymorphe amorphes CaCO₃, Vaterit, Aragonit und Calcit) einzeln untersucht, um bei einer möglichen Bindung zu ermitteln, welche Modifikation bevorzugt wird. Es wurden 5 mg des jeweiligen CaCO₃-Polymorphs in ein Glasgefäß gegeben und mit 1 ml *Bg*-AChBP1 oder *Bg*-AChBP2 (jeweils 0,5 mg/ml) in Tris-Puffer inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Präzipitat dreimal in 200 µl MilliQ Wasser gewaschen. Danach wurde mit 1M Natriumchlorid-Lösung ungebundenes Protein entfernt. Dann wurde das Präzipitat in 600 µl 0,1M Essigsäure gelöst. Das an Calciumcarbonat gebundene Protein befand sich also in der Essigsäurefraktion. Wie in Tab. 12 zu sehen, waren sowohl *Bg*-AChBP1-Dodekaeder, als auch *Bg*-AChBP2-Pentamere in der Lage, an alle vier CaCO₃-Polymorphe zu binden. Allerdings wurde an die beiden weniger stabilen CaCO₃-Polymorphen ACC und Vaterit wesentlich mehr Protein gebunden. Diese erhöhte Bindungskapazität könnte entweder an einer höheren Zahl verfügbarer Bindungsstellen oder an einer höheren Bindungsaffinität liegen. In beiden Fällen könnte es bedeuten, dass *Bg*-AChBP in der Lage ist, ACC und Vaterit vorübergehend zu stabilisieren und so eine zu schnelle, ungerichtete Bildung von Aragonit und Calcit zu verhindern.

Tabelle 12: Bindung von *Bg*-AChBP1 und *Bg*-AChBP2 an CaCO₃-Polymorphe: Die Konzentration von *Bg*-AChBP1-Dodekaedern und *Bg*-AChBP2-Pentameren wurde photometrisch (UV/VIS) bestimmt und ist in mg/ml angegeben. Es ist zu erkennen, dass an ACC und Vaterit deutlich mehr Protein gebunden wurde als an Aragonit und Calcit.

Polymorph	ACC		Vaterit		Aragonit		Calcit	
	<i>Bg</i> -AChBP1	<i>Bg</i> -AChBP2	<i>Bg</i> -AChBP1	<i>Bg</i> -AChBP2	<i>Bg</i> -AChBP1	<i>Bg</i> -AChBP2	<i>Bg</i> -AChBP1	<i>Bg</i> -AChBP2
Überstand	0.08	0.26	0.21	0.12	0.62	0.73	0.30	0.53
MQ-Wasser	0	0.07	0.10	0.05	0.30	0.17	0.60	0.24
NaCl-Lösung	0	0	0	0	0	0.04	0	0
Essigsäure	1.10	1.10	0.76	1.10	0.40	0.14	0.13	0.19

11.3 Untersuchungen der Schalenmatrix

Wie in A 6. beschrieben, besteht die Schale von *B. glabrata* im Wesentlichen aus Calciumcarbonat-Modifikationen und einer wasserunlöslichen Matrix, welche die an der Schalenbildung beteiligten Proteine zu enthalten scheint. Bei den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob sich auch *Bg*-AChBP in der wasserunlöslichen Schicht dieser Proteinmatrix befindet und welche Calciumcarbonat-Modifikation in der Schale nahe der Mantelregion zu finden ist. Der untere Rand der Schale, welcher sich in der nächsten Nähe der Mantelregion befindet, wurde daher untersucht. Hierbei wurde das Stück zuerst im Rasterelektronenmikroskop betrachtet. Die parallel verlaufenden Aragonit-Nadeln waren sehr gut zu erkennen. Auf dieser Aragonitschicht ist eine etwas hellere Schicht zu sehen, die wasserunlösliche Matrix (Abb. 66C).

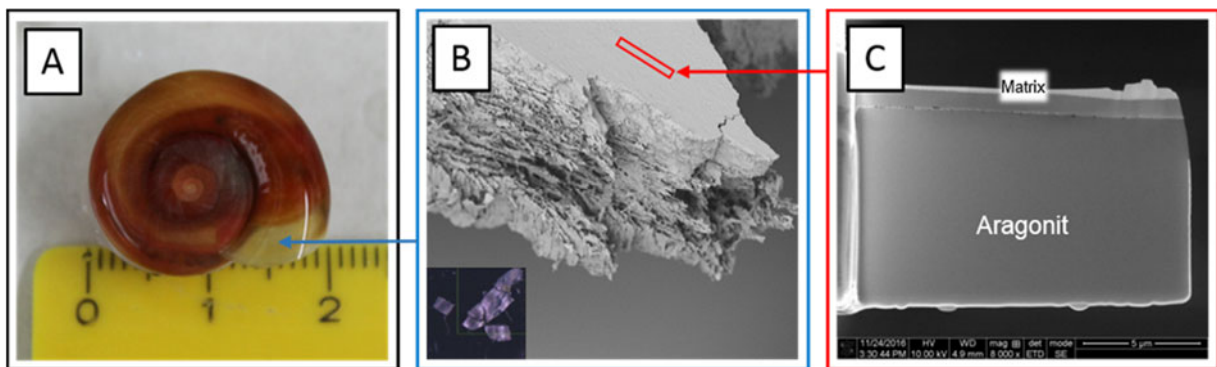


Abbildung 66: Untersuchungen der Schale von *B. glabrata*. (A) Photographie der Schnecke mit Maßstab. Die Schnecke ist ganz in ihr Haus zurückgezogen. (B) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Ausschnitts der Schale nahe der Mantelregion. Die Dicke der gesamten Schale betrug 100 µm. In der Quersicht sind aufeinander gestapelte Aragonit-Nadeln zu erkennen, welche von der wasserunlöslichen Matrix bedeckt sind. (C) Rasterelektronenmikroskopie mit fokussiertem Ionenstrahl (FIB-SEM) eines Querschnitts durch die in (B) rot markierte Region. Die graue Aragonit-Phase und die darauf liegende Schicht, die wasserunlösliche Matrix, sind gut zu erkennen. Die Gesamtdicke der Matrix betrug 1,7 µm.

Mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) war eine Elementanalyse von Schalenschnitten wie dem in Abb. 66C gezeigten in den verschiedenen Bereichen möglich. Bei dieser Methode werden die Atome in der Probe durch einen Elektronenstrahl angeregt. Diese Atome senden nun für das jeweilige Element spezifische Röntgenstrahlen aus. Diese charakteristische Röntgenstrahlung kann von einem Detektor gemessen werden und gibt somit Aufschluss auf die Elementzusammensetzung. Bei der Analyse der Schalenschnitte konnte beobachtet werden, dass sowohl in der Aragonitschicht als auch in der wasserunlöslichen Matrix Stickstoff und Schwefel vorhanden sind. Dies bestätigt die Annahme, dass sich in der Schale Proteine befinden, welche vermutlich die Kristallisation von Calciumcarbonat und damit die Schalenbildung beeinflussen. Auch Magnesium-Ionen konnten nachgewiesen werden. Diese sind dafür bekannt, dass sie einen starken Einfluss auf die

Ergebnisse

Kristallisationsprozesse von CaCO_3 haben und selektiv die Bildung von Aragonit in Biomineralisationsprozessen beeinflussen können (Jiao et al. 2006).

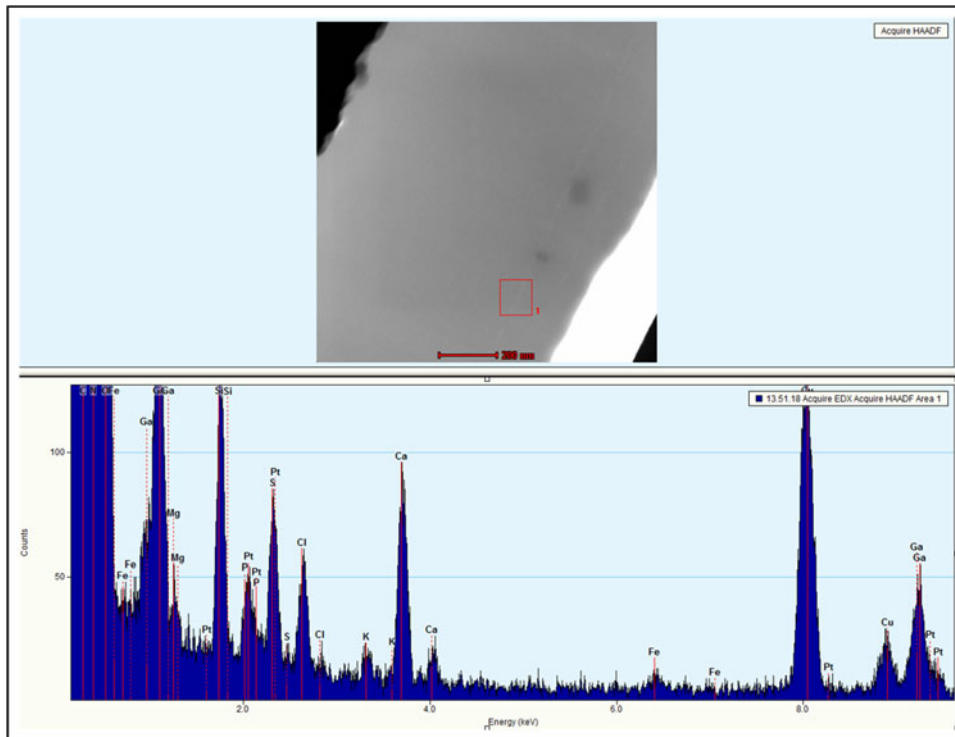


Abbildung 67: Elementanalyse der Schale von *Biomphalaria glabrata*: Von dem rot markierten Bereich in der elektronenmikroskopischen Aufnahme wurde ein EDX-Spektrum gemessen. Im Bereich der Schale sind auch Anteile von Magnesium und Eisen zu erkennen sowie Stickstoff und Schwefel. Diese beiden Elemente weisen auf die Anwesenheit von Proteinen hin.

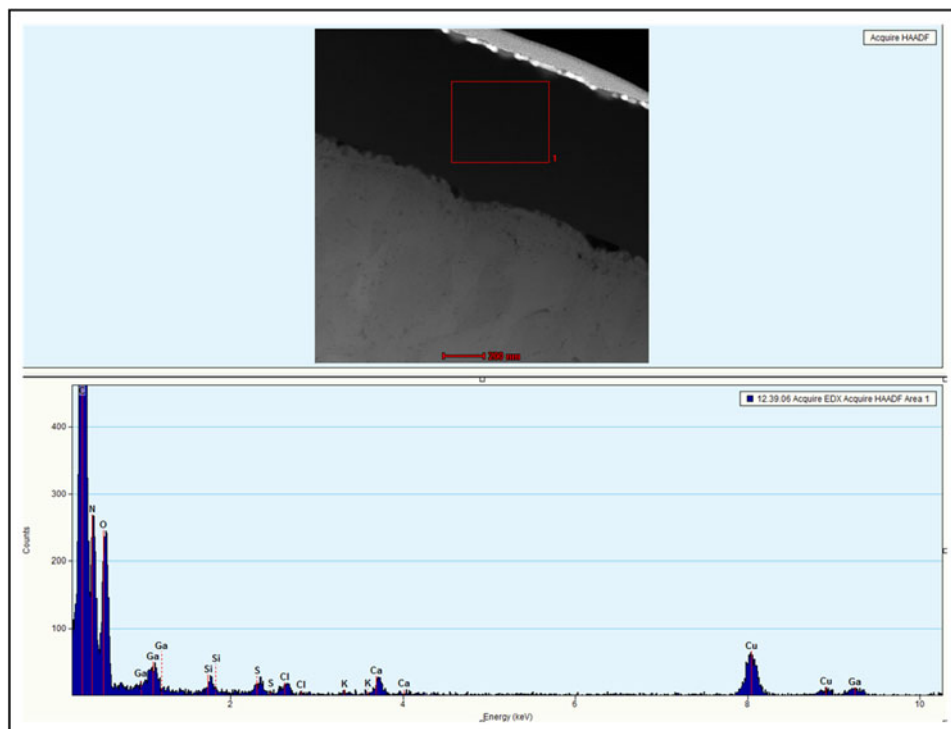


Abbildung 68: Elementanalyse der wasserunlöslichen Matrix von *B. glabrata*: Von dem rot markierten Bereich in der elektronenmikroskopischen Aufnahme wurde ein EDX-Spektrum gemessen. Es waren sowohl Stickstoff als auch Schwefel vorhanden. So konnte bestätigt werden, dass sich auch in diesem Bereich Proteine befinden.

Im weiteren Verlauf der Experimente sollte nun geklärt werden, ob es sich bei einem der Proteine in der wasserunlöslichen Matrix um *Bg-AChBP1* handelt. Dies würde weitere Hinweise auf die Einflüsse von *Bg-AChBP1* auf die Bildung der Schale und auf die Organisation des Schalenbaus liefern. Daher wurde das CaCO_3 der Schale mit Hilfe von Essigsäure gelöst und es blieb nur die wasserunlösliche Matrix als fädige Struktur übrig. Diese konnte dann genauer untersucht werden. Als erstes wurde mit Hilfe der Infrarotspektroskopie eine vergleichende Untersuchung der Matrix mit CaCO_3 , der Matrix ohne CaCO_3 und des rekombinanten Proteins *Bg-AChBP1* durchgeführt. Bei dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass sich die Spektren der Matrix ohne Calciumcarbonat und des *Bg-AChBP1* sehr ähneln (Abb. 69A). Das ist ein erneuter deutlicher Hinweis auf Protein in der Matrix, wenn auch noch kein Beleg, dass es sich dabei tatsächlich um *Bg-AChBP1* handelt. Um diese Annahme weiter zu untersuchen, wurde die aus der Schale herausgelöste Matrix mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Mit dem Antikörper gegen *Bg-AChBP1* konnte eine starke Reaktion in der kompletten Matrix beobachtet werden (Abb. 69C). Kontrollexperimente mit dem Antikörper gegen *Bg-AChBP2* fielen durchweg negativ aus (nicht gezeigt). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass sich nur *Bg-AChBP1* in der Schalenmatrix befindet und zwar in größerer Menge und dass *Bg-AChBP2* hier fehlt. Unter dem Einfluss von *Bg-AChBP1*, ist die Bildung von Aragonit als Modifikation, wie sie in der Schale vorkommt mikroskopisch zu beobachten (Abb. 69B).

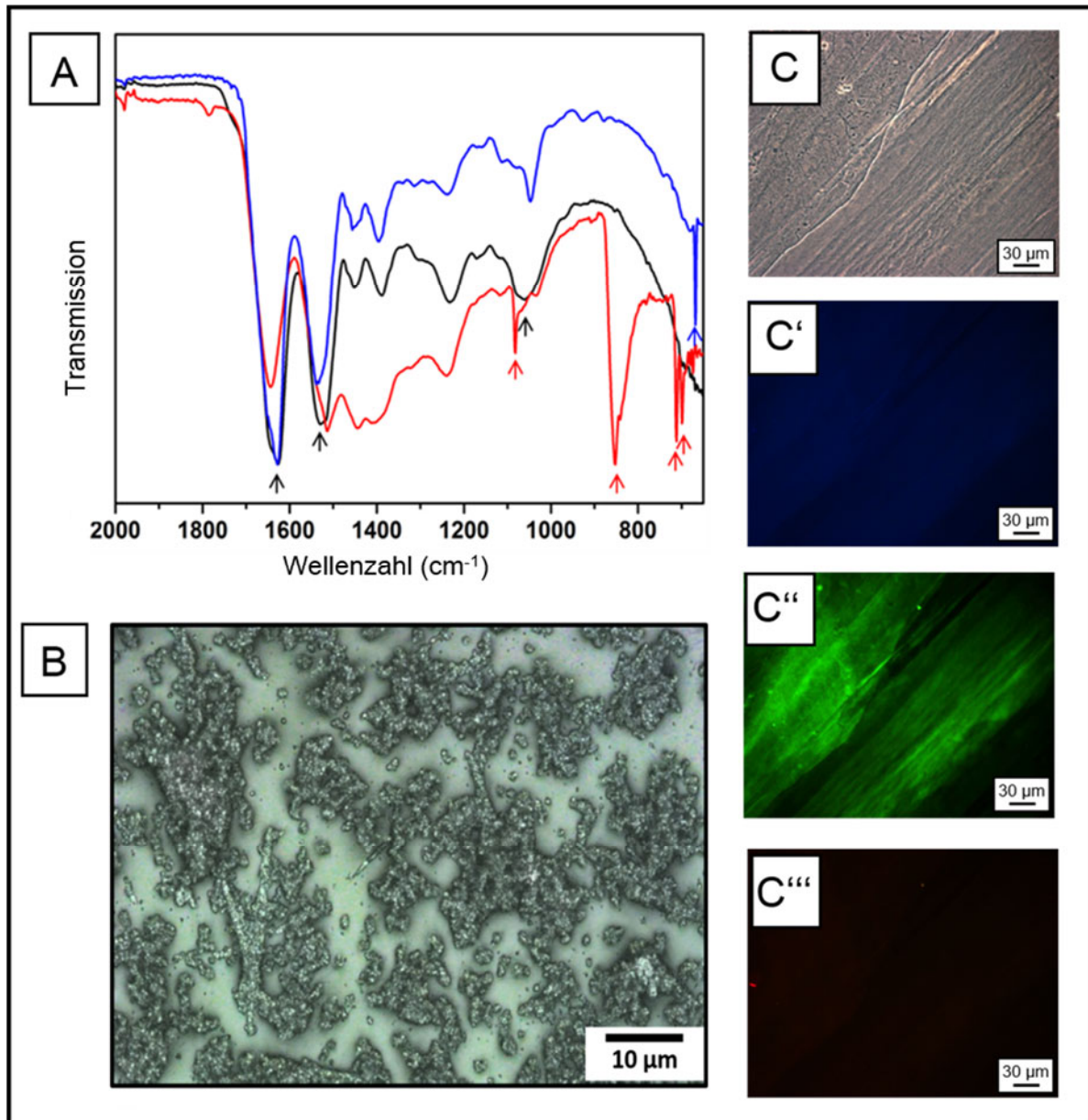


Abbildung 69: Untersuchungen der wasserunlöslichen Matrix der Schale von *B. glabrata* auf *Bg-AChBP1*. (A) zeigt das IR-Spektrum der Proteinmatrix ohne CaCO_3 (schwarz), der Proteinmatrix mit CaCO_3 (rot), sowie das Spektrum des rekombinanten Proteins *Bg-AChBP1* (blau). Das Spektrum zeigt die für Aragonit typischen Wellenzahlen (Pfeile) und weist so auf Aragonit als Calciumcarbonat-Modifikation hin. Da sich die Kurve der Schalenmatrix und des rekombinanten *Bg-AChBP1* sehr ähneln, ist anzunehmen, dass sich *Bg-AChBP1* auch in der Matrix der Schale befindet. In (B) ist die Bildung von Aragonit unter Zugabe von *Bg-AChBP1* zu beobachten. (C) Phasenkontrastaufnahme der wasserunlöslichen Matrix mit der korrespondierenden DAPI-Färbung der Zellkerne (C') zeigt eine negative Reaktion. In der wasserunlöslichen Matrix scheinen sich keine Zellen zu befinden. (C'') zeigt die positive Reaktion gegen den *Bg-AChBP1* Antikörper und weist auf die Anwesenheit von *Bg-AChBP1* in der Matrix der Schale hin. Die Immunfluoreszenz mit *Bg-AChBP2* zeigte eine negative Reaktion (C''').

11.4 Der Einfluss von *Bg-AChBP* und Mg^{2+} -Ionen und auf die Bildung von Calciumcarbonat-Polymorphen

Letztendlich sollte mittels IR-Spektroskopie die Wirkung von *Bg-AChBP* in Verbindung mit Magnesium-Ionen bei der Schalenbildung untersucht werden. Hierfür wurden Calciumcarbonat-Kristallisationen durchgeführt und zwar zum einen ohne Additive und zum anderen in Anwesenheit von *Bg-AChBP*1 bzw. *Bg-AChBP*2. Zusätzlich wurden Ansätze mit *Bg-AChBP* plus Magnesium (Mg^{2+}) untersucht (Abb. 70B). Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Referenz (ohne Additive) zu Calcit kristallisierte, während die Ansätze mit *Bg-AChBP*1 oder *Bg-AChBP*2 als Additiv selektiv Aragonit bildeten. Um nun die Ansätze mit und ohne Magnesium-Ionen miteinander vergleichen zu können, wurde die Röntgenbeugung (XRD, X-ray diffraction) eingesetzt. Betrachtet man das resultierende Spektrum ist auch hier zu erkennen, dass die Ansätze mit *Bg-AChBP* im Vergleich zur Referenz selektiv Aragonit bilden. Ein deutlicher Unterschied ist zu den Ansätzen zu erkennen, welche zusätzlich Magnesium enthalten. Auch diese bildeten selektiv Aragonit aus, mit viel höherer Intensität (Abb.70A). Als weitere Kontrolle wurde ein Ansatz vergleichend untersucht, der nur Magnesium als Additiv enthält. Auch hier konnte eine Bildung von Aragonit im Gegensatz Calcit beobachtet werden. An einer Stelle konnte sogar eine sehr hohe Intensität gemessen werden. An den anderen Stellen, hatten allerdings die Proben die Zusätzlich das Protein enthielten eine höhere Intensität. Bei den kombinierten Aditiven Protein + Mg^{2+} war die Aragonitbildung aber am intensivsten.

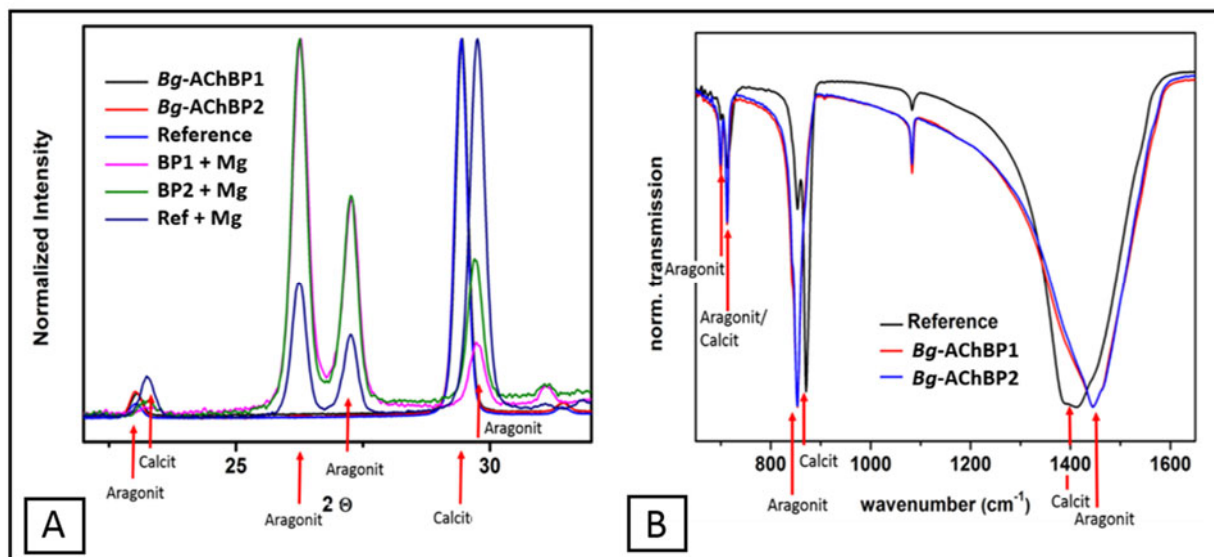


Abbildung 70: Der Einfluss von *Bg-AChBP*1, *Bg-AChBP*2 und Magnesium-Ionen auf die Bildung von $CaCO_3$ -Modifikationen. (A) Im XRD-Spektrum ist zu erkennen, dass der Ansatz ohne Additiv (Referenz, dunkelblau) zu Calcit kristallisiert. Enthielt dieser Ansatz Mg^{2+} , wurde selektiv Aragonit statt Calcit gebildet (dunkelblau). Gab man zur Referenz *Bg-AChBP*1 oder *Bg-AChBP*2, wurde ebenfalls die Bildung von Aragonit gefördert. Die gemessene Intensität war hier allerdings geringer. Bei der Kombination von *Bg-AChBP*1 oder *Bg-AChBP*2 mit Mg^{2+} wurde die höchste Intensität gemessen werden (rosa/grün). (B) Auch das IR-Spektrum zeigte eine selektive Bildung von Aragonit bei Zugabe von *Bg-AChBP*1 oder *Bg-AChBP*2 an.

D Diskussion

1 Natives und rekombinantes *Bg*-AChBP

Vermittels Anionenaustausch-Chromatographie der Hämolympheproteine von *B. glabrata* (Abb. 34) erhielt ich, wie schon die Autoren früherer Arbeiten (Lieb et al., 2006; Saur et al., 2012), eine Fraktion deutlich aufgereinigter *Bg*-AChBP-Dodekaeder (als Peak IV), die offenbar lediglich noch mit etwas Hämocyanin verunreinigt waren (300 kDa-Bande im SDS-Gel und vereinzelt 35 nm-Ringe im TEM). AChBP-Pentamere waren in Peak IV im TEM nicht zu sehen. Da die in Peak IV vorhandenen 30 kDa-Proteinbanden (entsprechen glykosylierten *Bg*-AChBP-Untereinheiten) im Western-Blot sowohl mit anti-*Bg*-AChBP1-Antikörpern, als auch mit anti-*Bg*-AChBP2-Antikörpern reagierten (Abb. 31), liegt der Verdacht sehr nahe, dass in der Hämolymphe nicht nur *Bg*-AChBP1, sondern auch *Bg*-AChBP2 in Form von Dodekaedern vorhanden ist. Dieser Verdacht wurde bestärkt, indem in nicht-reduzierenden SDS-Gelen nur die anti-*Bg*-AChBP2-Antikörper auch eine Bande im 60 kDa-Bereich erkannten (und somit ein S-S-verbrücktes Dimer glykosylierter AChBP-Untereinheiten). Nur das *Bg*-AChBP2-Polypeptid, nicht aber das *Bg*-AChBP1 Polypeptid, verfügt über ein freies Cystein (Cys-71) für die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei benachbarten Untereinheiten. Warum dieses Dimer im Western-Blot auch im reduzierenden SDS-Gel deutlich zu sehen war, ist nicht ganz klar. Es war jedoch mit Coomassie Blue kaum zu sehen (Abb. 29) und ist somit eine Spurenkomponente, die mit den anti-*Bg*-AChBP2-Antikörpern lediglich überbetont wurde.

Die anti-*Bg*-AChBP2-Antikörper, nicht aber die anti-*Bg*-AChBP1-Antikörper, erkannten im nicht-reduzierenden SDS-Gel zusätzlich auch 30 kDa-Proteine. Die verwendeten Antikörper sind jedoch nicht nur in der Immunfluoreszenzmikroskopie (siehe Abschnitt 5), sondern auch im Western-Blot isoformspezifisch (getestet von Rusitzka, 2016). Also könnte es sein, dass das in der Hämolymphe vorhandene *Bg*-AChBP2-Material nicht durchgehend als S-S-verbrücktes Untereinheitendimer vorliegt, sondern zum Teil auch als Monomer. Die jeweiligen Mengen bleiben hier aber unklar. Es ist aber schon rein rechnerisch klar, dass sich Pentamere bei der Biosynthese nicht ausschließlich aus Dimeren assemblieren können. Bemerkenswert ist auch, dass das *Bg*-AChBP2-Material anders als das *Bg*-AChBP1-Material unter nicht-reduzierenden Bedingungen nicht als SDS-stabile Pentamere (150 kDa) vorlag. Das Assoziationsverhalten der beiden *Bg*-AChBP-Isoformen ist also unterschiedlich.

In Peak III zeigte sich im TEM ein Gemisch aus AChBP-Pentameren und weiteren proteinartigen Strukturen, von denen eine in Peak II angereichert werden konnte (Abb. 27). Bei den AChBP-Pentameren in Peak III dürfte es sich ganz überwiegend um SDS-stabile *Bg*-AChBP1-Pentamere handeln, wie die positive Reaktion der 150 kDa-Bande in Western-

Blots anzeigte. Die in Peak II angereicherte Komponente hat einen Durchmesser von 40 nm und laut SDS-Gel eine Molekülmasse von 240 kDa, was der tatsächlichen Molekülmasse des Hämoglobins von *B. glabrata* entspricht. Auch die offensichtliche Dimerisierung dieser Bande unter nicht-reduzierten Bedingungen spricht für diese Annahme. Wie unsere Arbeitsgruppe zeigen konnte (Lieb et al., 2006), zeigen die multimeren Hämoglobinuntereinheiten von *B. glabrata* im SDS-Gel zwar eine apparente Molekülmasse von 180 kDa, doch aus der Aminosäuresequenz ergeben sich 240 kDa. Es könnte also sein, dass es sich hier um eine Hämoglobinfraktion handelt, die die irreguläre Wanderung im SDS-Gel nicht zeigt. Das Erscheinungsbild im TEM ist bei diesem Protein ebenfalls anders als beim Hämoglobin der Hauptfraktion (Peak V). Da es bei der Hämoglobin-Polypeptidkette ebenfalls mindestens zwei Isoformen gibt, würde es sich lohnen, das Protein von Peak II/III näher zu untersuchen.

Neben solitären AChBP-Pentameren waren in Peak III im Elektronenmikroskop auch vereinzelt rechteckige Partikel aus zwei Pentameren zu beobachten. Ob es sich dabei um native Dipentamere oder um zufällig dicht nebeneinander liegende Pentamere handelt, bleibt weiterhin ungeklärt. Da das AChBP in der Hämolymphe von *B. glabrata* nur einen sehr geringen Anteil an den Hämolympheproteinen ausmacht (Lieb et al. 2006), und davon die „Dipentamere“ wiederum nur einen sehr kleinen Anteil, waren die gewonnenen Probenmengen für eine Isolierung dieser Komponente zu gering.

Es wurden im Verlauf meiner Arbeit größere Mengen von reinem *Bg*-AChBP1 und *Bg*-AChBP2 rekombinant hergestellt. Das Protokoll zur rekombinanten Expression und Aufreinigung der Proteine wurde bereits von Dr. V. Möller etabliert (Dissertation: V. Möller, 2012), und von Dr. K. Rustitzka etwas modifiziert (Dissertation: K. Rusitzka, 2016). Da hier gezeigt werden konnte, dass sich eine Dodekaederstruktur bei *Bg*-AChBP1 erst nach Abspaltung des His-Tags bildet, verwendete ich auch in meiner Arbeit ein N-Terminaler *Polyhistidin-Tag*. Dieser konnte anschließend mit Hilfe der TEV-Protease abgespalten werden. So konnte sichergestellt werden, dass alle weiteren Experimente nicht durch einen *His-Tag* beeinflusst wurden. Außerdem konnte so auch mit reinen Pentamer- oder Dodekaederproben gearbeitet werden. Die Expressionen wurde bei beiden *Bg*-AChBP-Isoformen nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Die Ausbeute der beiden *Bg*-AChBP-Expressionen war dabei sehr ähnlich. Bei der Expression von *Bg*-AChBP2 waren allerdings neben den Pentameren deutlich mehr unstrukturierte Proteinaggregate zu beobachten. Wie schon bei meinen Vorgängerinnen (Dissertation Möller, 2012 und Dissertation Rusitzka, 2016) bestehen aber bezüglich der rekombinanten Expression weiterhin mindestens vier Probleme, die es in Zukunft noch zu lösen gilt:

- Bei Konzentrationen über 1 mg/ml besteht die Gefahr, dass das rekombinante *Bg*-AChBP ausfällt.
- Es ist nicht klar, ob sich beim Renaturieren alle notwendigen Disulfidbrücken ausbilden, insbesondere diejenige zwischen jeweils zwei Untereinheiten des *Bg*-AChBP2.
- Da in *E. coli* exprimiert wurde, sind die rekombinanten Proteine nicht glykosyliert. Das einzelne N-Glykan könnte aber funktionell eine Rolle spielen. Die Expression in einem eukaryotischen System wäre also angezeigt.
- Rekombinantes *Bg*-AChBP2 liegt nur als Pentamer vor, aber meine Versuche ergaben den begründeten Hinweis, dass es in der Hämolymphe als Dodekaeder vorhanden ist. Die Reanrierungsbedingungen sind also entsprechend zu optimieren.

2 Zur Funktion von *Bg*-AChBP im Nervensystem

Die Funktion von AChBP im synaptischen Spalt wurde bereits bei der Spitzschlammschnecke *Lymnaea stagnalis* untersucht (Smit et al. 2003). Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich permanent eine gewisse Menge AChBP im synaptischen Spalt befindet. Wird bei der Erregungsübertragung Acetylcholin abgegeben, werden zum einen die Rezeptoren an der Postsynapse aktiviert und zum anderen nicotinische Acetylcholinrezeptoren an den Gliazellen. Daraufhin wird mehr AChBP gebildet und in den synaptischen Spalt abgegeben. Dies führt zu einer Unterdrückung der Erregungsübertragung. Die Acetylcholinesterase kann nur freies Acetylcholin spalten. Das AChBP wirkt also wie ein Puffer, der gebundenes Acetylcholin langsam wieder in den synaptischen Spalt entlässt, wenn die ACh-Menge unter eine bestimmte Konzentration absinkt. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Gliazellen von *L. stragnalis* in der gesamten Region des Cerebralganglions zu finden sind. Sie unterscheiden sich lediglich regional in ihrer Dichte und die Art der Subtypen (Smit et al. 2003).

Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich bei *B. glabrata* die Anwesenheit sowie die Synthese beider *Bg*-AChBP-Isoformen im Cerebralganglion nachweisen. Mit Immunfluoreszenzmikroskopie und *In-situ*-Hybridisierung waren dabei Zellen (wahrscheinlich Gliazellen) zu erkennen, die beide Isoformen exprimieren, diese erschienen durch die Überlagerung beider Fluorophoren Orange. Zusätzlich gab es noch Zellen, die ausschließlich *Bg*-AChBP1 exprimierten (grün). Zellen die nur *Bg*-AChBP2 exprimierten, also exklusiv rote Zellen, gab es nicht.

Histologischen Untersuchungen der Nervengewebe der Weinbergschnecke *Helix pomatia* (Reinecke 1976) ergaben im Cerebralganglion zwei Haupttypen von Gliazellen, die in weitere Subtypen eingeteilt werden können. Die Gliazellen liegen hier im Cerebralganglion um die

Neurone herum. Dabei verlaufen pro Abschnitt meist 10 bis 20 Gliafortsätze zwischen zwei benachbarten Neuronen (Reinecke 1976). Bei *B. glabrata* fand ich im Cerebralganglion zwei morphologisch vergleichbare Zelltypen, einen kleineren stark verzweigten, der vielleicht menschlicher Mikroglia entspricht, und einen größeren weniger verzweigten, entsprechend menschlicher Astroglia (Abb. 71). Der dritte Typ beim Menschen die Oligodendrocyten, kommen bei Schnecken mangels myelinisierter Nervenfasern nicht vor. Die beiden genannten Zelltypen von *B. glabrata* und ähneln strukturell Astrocyten bzw. Mikroglia des Menschen. Sie lassen sich offenbar anhand der Expressionsmuster von *Bg-AChBP1* und *Bg-AChBP2* unterscheiden. Diese sind in der Abbildung aufgrund der unterschiedlichen Konzentration von *Bg-AChBP1* unterschiedlich stark rot bzw. violett angefärbt. Die Neurone, die offensichtlich kein AChBP enthalten, blieben farblos. Es sieht so aus als würden die etwas größeren, hier rötlichen Gliazellen, die wie Astrocyten wirken, die Neurone umschließen. Betrachtet man hier die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie, so sind die kleineren verzweigten Zellen (Typ II-Glia) grün angefärbt. Sie enthalten also nur *Bg-AChBP1*. Während die größeren Zellen (Typ I-Glia) sowohl *Bg-AChBP1* als auch *Bg-AChBP2* exprimieren und daher in den Fluoreszenzbildern, durch die Überlagerung, Orange erscheinen.

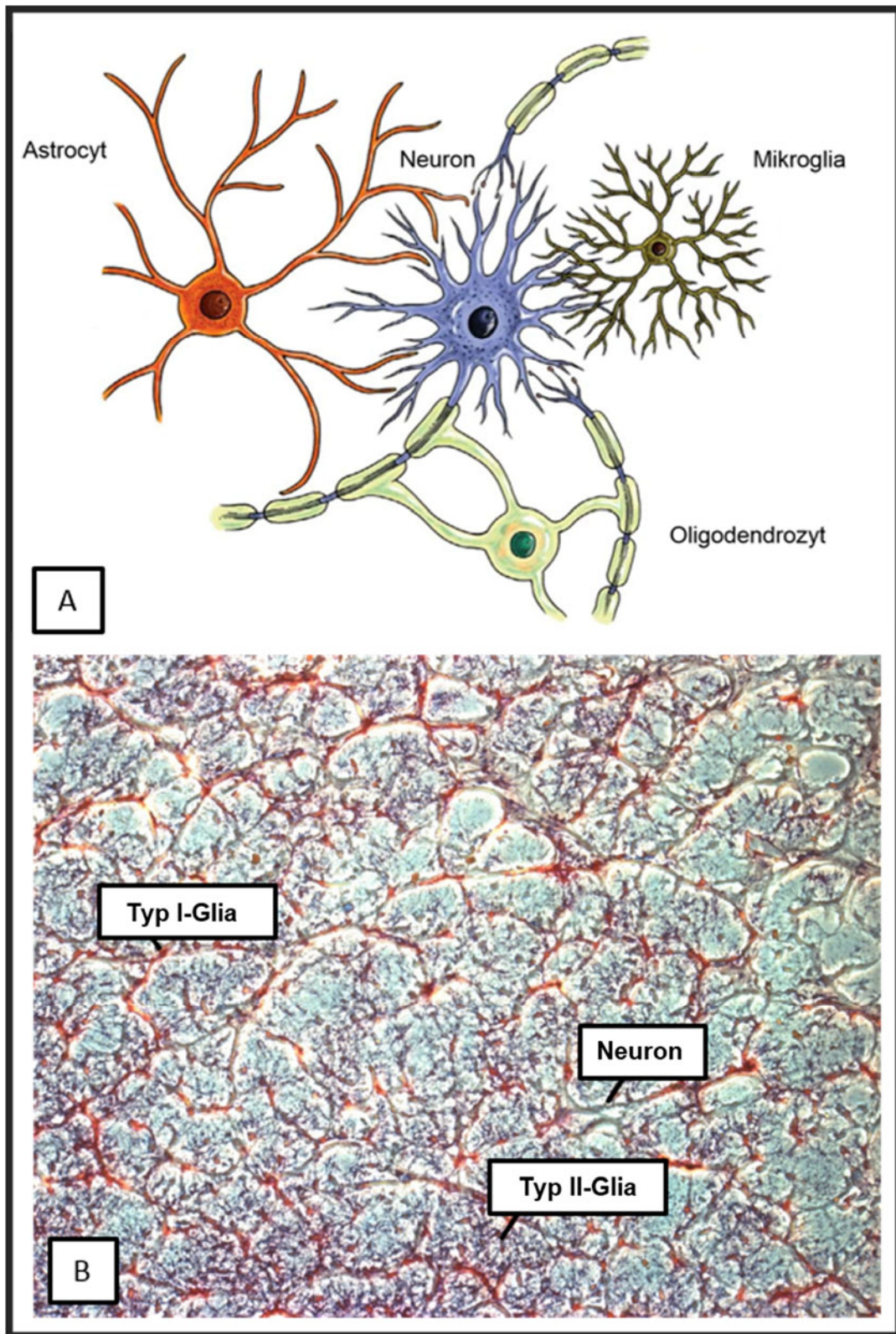


Abbildung 71: Zellen des menschlichen Gehirns und des Cerebralganglion von *B. glabrata*. (A) zeigt eine schematische Darstellung einiger menschlicher Gliazellen, die sich um ein Neuron befinden (Abbildung entnommen aus (Souza et al. 2016)). Die unterschiedlichen Arten von Gliazellen unterscheiden sich dabei in Aufbau und Größe. (B) zeigt einen Gefrierschnitt durch das Cerebralganglion von *B. glabrata*, nach Anfärbung mit der DNA-Sonde gegen mRNA, die für *Bg-AChBP1* codiert. Zwei verschiedene Zelltypen, vermutlich Gliazellen, wurden unterschiedlich markiert: Zum einen etwas größere, rötlich angefarbte Zellen, strukturell ähnlich Astroglia (beschriftet mit Typ I-Glia) und zum anderen kleinere, verzweigte Zellen, strukturell ähnlich Mikroglia (beschriftet mit Typ II-Glia).

3 Zur Funktion von *Bg-AChBP1* bei der Schalenbildung

Tiere sind in der Lage, bioanorganische Materialien mit besonderen Verbundeigenschaften unter milden Bedingungen zu synthetisieren. Dabei ist Calciumcarbonat im Tierreich das mit Abstand am weitesten verbreitete Material für den Aufbau fester Strukturen. Hierbei dient amorphes Calciumcarbonat (ACC) als Vorstufe für kristallines Calciumcarbonat (Calcit, Vaterit, Aragonit). CaCO_3 in seiner amorphen Form ist allerdings sehr instabil. Daher stellt sich die Frage, wie die ACC-Phase vorübergehend oder permanent stabilisiert werden kann (Cartwright et al. 2012). Für schalenbildende Organismen sind Mechanismen besonders wichtig, die zum einen amorphes Calciumcarbonat stabilisieren, um eine Kristallisation mitten im Gewebe zu verhindern und zum anderen die Bildung spezifischer Calciumcarbonat-Modifikationen zu geeigneter Zeit und am richtigen Ort einleiten. Die Schale dient der Schnecke zum Schutz vor Fressfeinden und Verletzungen. Neueren Erkenntnissen zu Folge, kann die Schale sogar als eine Art primitives Immunsystem wirken, und parasitische Nematoden ummanteln und abtöten (Rae 2017).

3.1 Die Rolle des Mantelepithels bei der Schalenbildung

An der Bildung der Schale von Mollusken sind vor allem zwei verschiedene Bereiche beteiligt. Zum einen eine dünne Schicht, welche aus dicht gepackten, quervernetzten Proteinen besteht, das Periostracum und zum anderen die Zellen des Mantelepithels. Diese beiden Gewebe geben verschiedene Makromoleküle nach außen hin ab (Addadi et al. 2006). Wie in frühen Untersuchungen verschiedener Muscheln gezeigt wurde, erfolgt die Kristallbildung mit Hilfe der Extrapallialflüssigkeit, der Flüssigkeit also, die sich in dem schmalen Spalt zwischen der Schale und dem Mantel der Schnecke befindet. Hierbei kommt es zu einer Art Polymerisation eines Teils der Extrapallialflüssigkeit. Parallel zur Oberfläche des Epithels werden Lamellen gebildet. Zwischen diesen Lamellen befindet sich anfangs noch eine modifizierte Extrapallialflüssigkeit. Durch den Kontakt zwischen den Lamellen mit benachbarten Kristallen wird eine weitere Kristallisation angeregt. Die organische Matrix, welche sich zu Beginn noch zwischen den Lamellen befindet, wird nach und nach durch weitere Kristalle ersetzt. Ist das Kristallwachstum beendet, befindet sich die organische Matrix wie eine dünne Hülle an der Oberfläche des Kristalls (Bevelander und Nakahara 1969). Diese Matrix konnte ich im Rahmen meiner mikroskopischen Untersuchungen an der Oberfläche der Schale über den Aragonitnadeln ebenfalls beobachten (Abb. 66B und Abb. 66C).

3.2 Die amorphen Calciumcarbonat-Bindeproteine (ACCBP)

Bei einigen Mollusken wurden Proteine beschrieben, welche sich in der Extrapallialflüssigkeit befinden und aktiv an amorphes Calciumcarbonat (ACC) binden. Diese Proteine haben einen Einfluss auf die Kristallbildung und spielen eine wesentliche Rolle bei der Schalenbildung. Ein solches Amorphes-Calciumcarbonat-Bindeprotein (ACCBP) wurde in der Perlmuschel *Pinctada fucata* beschrieben. In Experimenten wurde gezeigt, dass dieses Protein in der Lage ist, ACC zu stabilisieren und so die Kristallisation zu Calcit zu verhindern. Außerdem kann es die Größe der gebildeten Kristalle terminieren. Diese ACCBPs sind mit den Acetylcholin-Bindeproteinen nah verwandt, aber nicht alle AChBPs sind an der Schalenbildung beteiligt. So kommen in *Haliotis discus hannai* beide Typen vor, aber nur eines arbeitet als ACCBP, während das andere offenbar im Gehirn eine Rolle spielt (Huang et al. 2009).

Einen Einfluss auf die Calciumcarbonatkristallisation könnte möglicherweise der N-Terminus von ACCBP bzw. AChBP haben, wie Bindungsexperimente an rekombinantem ACCN (eine Polypeptidkette welche die N-Terminale Region des Haliotis ACCBP enthält) zeigten (Amos et al. 2009).

Bei der Bindung von Calciumcarbonat spielt möglicherweise das aktive Zentrum eine Rolle. Dies wurde durch Bindungsstudien von fluoreszenzmarkiertem α -Bungarotoxin, an das aktive Zentrum des ACCBP von *Pinctada fucata* untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass keine Fluoreszenz zu beobachten war, wenn das Protein zuvor mit einer Calcit- oder Aragonitlösung inkubiert wurde (Ma et al. 2007). Betrachtet man die CaCO_3 Kristallisations-Experimente in Anwesenheit von entweder Bg-AChBP1-Dodekaedern oder Bg-AChBP2-Pentameren, so hatten beide Isoformen einen Einfluss auf die gebildeten Kristalle (Abb. 63). Allerdings werden unter Anwesenheit von Bg-AChBP1 etwas kleinere, aber deutlich mehr Kristalle gebildet. Die Kristalle unter der Zugabe von Bg-AChBP2 als Additiv sind größer. Es war zu beobachten, dass beide Isoformen die Kantenbildung terminieren und die Bildung der sogenannten polaren Facetten stark beeinflussen.

Die Calciumcarbonat-Bindeexperimente zeigten, dass beide Isoformen in der Lage sind, an Calciumcarbonat zu binden. Allerdings werden die beiden weniger stabilen Modifikationen, Vaterit und ACC von beiden Isoformen besser gebunden als Aragonit und Calcit. Dies würde dafür sprechen, dass es eine Aufgabe von Bg-AChBP im Tier ist, die weniger stabilen Formen Vaterit und ACC reversibel zu binden und möglicherweise so zu stabilisieren (Tab. 12). Bei der Messung eines Infrarotspektrums (Abb. 70) wurde deutlich, dass unter Zugabe beider Bg-AChBP Isoformen selektiv Aragonit statt Calcit entsteht. Aragonit ist die Calciumcarbonat-Modifikation, welche sich auch in der Schale von *Biomphalaria glabrata* befindet. Dies konnte

auch im Rahmen meiner Arbeit bestätigt werden: Die Aragonit Nadeln der Schale waren in den Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen gut zu erkennen (Abb. 66B).

So könnte man den Eindruck erhalten, dass beide *Bg*-AChBP-Isoformen in gleichem Maße eine Rolle bei den schalenbildenden Prozessen in der Schnecke spielen. Allerdings konnte *Bg*-AChBP2 nur in den Gliazellen des Cerebralganglions nachgewiesen werden. In der Epidermis sowie im Mantelepithel der Schnecke wurde exklusiv nur *Bg*-AChBP1 beobachtet. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie mit isoformspezifischen Antikörpern und die Ergebnisse der *In-situ*-Hybridisierung mit isoformspezifischen DNA-Sonden (siehe: Ergebnisse, Abschnitt 5) stimmen hier völlig überein. Betrachtet man die Ergebnisse der *Bg*-AChBP1-Expression im Mantelepithel, so ist die positive Reaktion hier besonders stark. Es sollte sich also eine vergleichsweise große Menge *Bg*-AChBP1-Dodekaeder in diesen Zellen befinden. Demgegenüber muss die Konzentration von *Bg*-AChBP in der Hämolymphe sehr viel geringer sein, denn bei den verwendeten Antikörperkonzentrationen wurde in der Immunfluoreszenzmikroskopie keinerlei positive Reaktion der Hämolymphe beobachtet. Eine solche Reaktion ist mit der hier verwendeten Methodik bei höher konzentrierten Hämolympheproteinen ohne weiteres sichtbar zu machen (Paul et al. 1991).

In der Tat zeigten sich im Elektronenmikroskop in ER-Lakunen massive Ansammlungen von Partikeln passender Größe. Diese waren mit deutlich größeren Partikeln vergesellschaftet, bei denen es sich laut Literatur und gemäß meiner eigenen histochemischen Daten um Glykogen- α -Rosetten handeln dürfte. Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen, konnten nur zwei verschiedene Partikel beobachtet werden, die in großer Menge, gleichmäßig über das gesamte Epithel verteilt waren. Der kleinere der beiden Partikel, mit einer Größe von 25nm, könnte auf den *Bg*-AChBP1 Dodekaeder hinweisen (Abb. 55). Betrachtet man dagegen das Mantelepithel von *Lymnaea stagnalis* im Vergleich, so ist zu sehen, dass hier die Massen an solitären 25nm Partikeln fehlen. Dodekaederbildung ist beim AChBP von *L. stagnalis* unbekannt (Abb. 60). Es konnte außerdem beobachtet werden, dass sich die 25nm Partikel direkt in Amöbocyten und in deren unmittelbarer Nähe befinden. Meist wurden auch CaCO₃-Zellen in der Nähe beobachtet (Abb. 56 und Abb. 57). So wäre es von der Verfügbarkeit vor Ort zweifellos möglich, dass der *Bg*-AChBP1 Dodekaeder direkt am Aufbau der Schale der Schnecke beteiligt sind, während *Bg*-AChBP2 hier höchstens über die Hämolymphe in Spuren verfügbar wäre.

3.3 Der Einfluss Calciumionen und Calciumcarbonat auf den *Bg-AChBP1*-Dodekaeder

Der Einfluss von Calciumionen und Calciumcarbonat auf den *Bg-AChBP1*-Dodekaeder wurde auch mit oberflächenspezifischer Schwingungsspektroskopie untersucht (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Bonn). Bei dieser Methode wird die Probe an der Grenzfläche zwischen Umgebungsluft und Wasseroberfläche mit einem Hochleistungs-Laser und einem gepulsten Laser im Infrarotbereich bestrahlt. Beide Laserpulse durchdringen die Probe und überlagern sich räumlich und zeitlich an der Probenoberfläche. So entsteht ein Summenfrequenzsignal (SFG), welches von einem Detektor aufgezeichnet wird. Die Probe wird bei dieser Methode in schwerem Wasser (D_2O) gemessen. Es wurde eine Probe rekombinanter *Bg-AChBP1*-Dodekaeder in Tris-Puffer mit der zwanzigfachen Menge D_2O verdünnt. Es wurde das Deuteriumwasser verwendet, weil H_2O ein Signal bei einer Wellenzahl von 1650 cm^{-1} zeigt, das zu nahe an dem Signal für die Peptidbindung liegt (1620 cm^{-1}). Dies könnte die Messung verfälschen. Rusitzka hatte bereits nachgewiesen, dass *Bg-AChBP1*-Dodekaeder in der verwendeten Konzentration in destilliertem Wasser stabil sind (Rusitzka 2012). Um dies bei der hier verwendeten Probe zu überprüfen, wurde sie im Elektronenmikroskop untersucht (Abb. 72A). Es waren ausschließlich Dodekaeder zu sehen. Dabei wurde die Ausgangs-Probe (*Bg-AChBP1*-Dodekaeder) mit der zwanzigfachen Menge an D_2O verdünnt und zweimal gemessen (schwarze und graue Kurve). Nach 90 Minuten wurde Calcium (Ca^{2+}) zur Probe hinzugegeben und gemessen (rote Kurve). Nach 113 Minuten wurde erneut Calcium zur Probe gegeben und gemessen (gelbe Kurve). Anschließend wurde Calciumcarbonat (ACC) zur Probe gegeben und gemessen (blaue Kurve). Dabei ist zu erkennen, dass die gemessene SFG-Intensität (Summenfrequenzgenerierungs-Intensität) steigt und es zu Ausschlägen kommt, welche darauf hinweisen, dass das Protein eine Konformationsänderung durchmacht. Der typische Ausschlag für die Peptidbindung bei einer Wellenzahl von 1620 cm^{-1} ist bei den Experimenten eindeutig vorhanden, nicht aber in der schwarzen und grauen Kurve des Ausgangsmaterials. Dies könnte daran liegen, dass bei der Ausgangsprobe der Dodekaeder nur an der Grenzfläche zur Luft gemessen wird. Also kann nur ein kleiner Teil der großen Proteinstruktur durch die Messung erfasst werden. Bei Zugabe von Calcium oder Calciumcarbonat macht der Dodekaeder eine Konformationsänderung durch. Möglicherweise dissoziiert er in seine einzelnen Pentamere. Diese bedingen dann die Signaländerung, da mehr gefaltete Strukturen an der Grenzfläche zur Umgebung gemessen werden können. Um eine genaue Aussage treffen zu können, sind hier noch weitere vergleichende Versuche mit *Bg-AChBP1* Pentameren, sowie *Bg-AChBP2* Pentameren nötig.

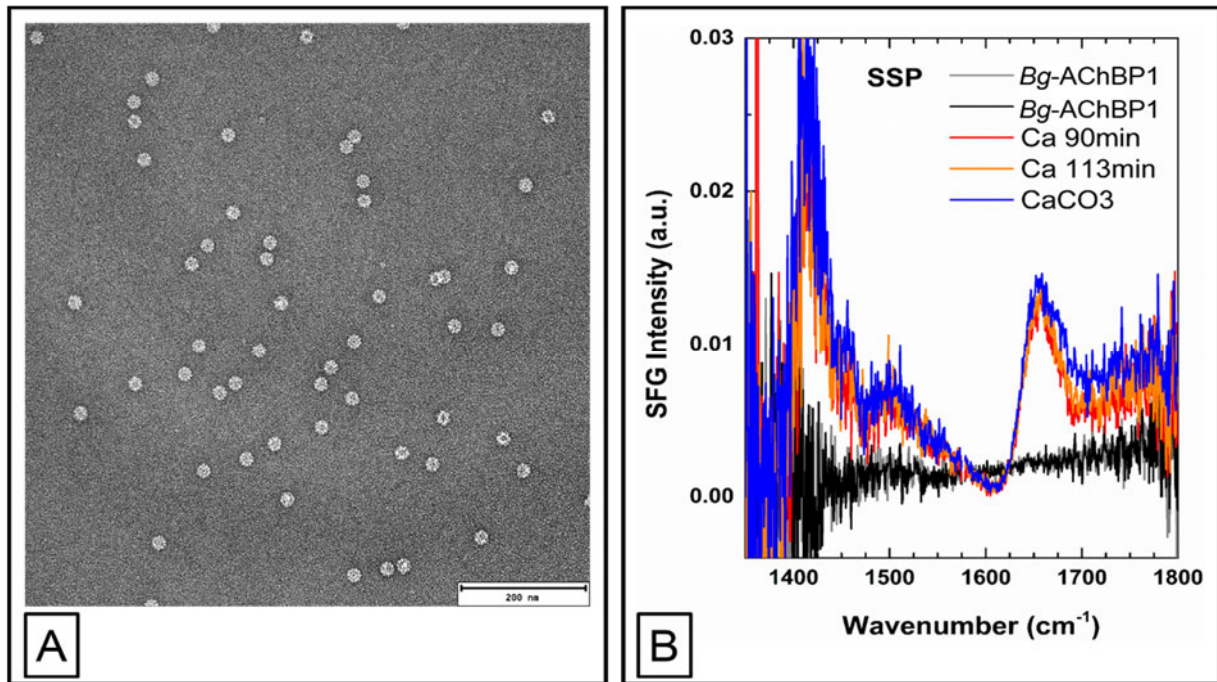


Abbildung 72: Einfluss von Calciumionen und Calciumcarbonat auf den *Bg-AchBP1*-Dodekaeder. Da alle Messungen in destilliertem Wasser durchgeführt wurden (H_2O oder D_2O), musste zuerst untersucht werden, inwieweit das Protein in reinem Wasser noch stabil war. **(A)** zeigt die gereinigten Dodekaeder in H_2O dest. Das Protein wurde durch das reine Wasser nicht denaturiert. **(B)** zeigt oberflächenspezifische Schwingungsspektren im Infrarotbereich. Bei der Zugabe von Ca^{2+} und Calciumcarbonat (ACC) ist eine Änderung in den Kurven zu beobachten. Diese Änderung weist auf eine Konformationsänderung des Proteins hin. Die Wellenzahl 1620 cm^{-1} ist dabei typisch für die Peptidbindung. SFG = *sum frequency generation*

3.4 Die organische Matrix der Schale von *B. glabrata*

Die Schale der Mollusken wird von Calciumcarbonat (in drei verschiedenen Modifikationen), Conchiolin (bestehend aus stark Glycin-, Alanin- und Serin-haltigen Faserproteinen, Glycoproteinen und Chitin), sowie einer organischen Matrix gebildet. Die erforderlichen Stoffe werden alle vom Mantel nach außen hin abgegeben. Bei *B. glabrata* besteht die Schale fast nur aus Aragonit (Marxen und Becker 2000). Dies konnten wir mit raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen und IR-Messungen bestätigen (siehe: C 11). Die organische Matrix besteht aus Polysacchariden, Proteinen, Glykoproteinen und Proteoglykanen. Sie kann in zwei Bereiche eingeteilt werden. Zum einen in die äußere Schutzschicht der Schale, dem Periostracum, und zum anderen dem Bereich der mit der kristallinen Phase in Verbindung steht. Letztere kann wiederum in eine wasserlösliche und eine wasserunlösliche Fraktion eingeteilt werden. Es wird angenommen, dass einige der Proteine der organischen Matrix über Carboxylgruppen, Sulfatgruppen und Phosphatgruppen mit dem amorphen Calciumcarbonat in Wechselwirkung treten können und somit einen direkten Einfluss auf die Calciumcarbonat-Kristallisation haben (Marxen und Becker 1997). Dabei spielt letztendlich auch der pH-Wert eine entscheidende Rolle. Obwohl die Komponenten der organischen Matrix sehr wichtig für die Schalenbildung sind, wurden erst einige dieser Bestandteile identifiziert (Marxen und Becker 2000). Ein bereits identifiziertes

Matrix-Protein von *B. glabrata* ist Dermatopontin. Dieses Protein scheint allerdings keinen Einfluss auf Calciumcarbonat zu haben (Marxen et al. 2003). Es ist bei Vertebraten einschließlich des Menschen an der Oberfläche der Kollagenfasern zu finden. Das Dermatopontin der Mammalia enthält allerdings zusätzliche Cysteine (Marxen et al. 2003).

Durch unsere Ergebnisse der Röntgenspektroskopie konnte die Anwesenheit von Proteinen in der Schalenmatrix bestätigt werden (Abb. 68). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sich *Bg-AChBP1* in der Matrix der Schale befindet (Abb. 69). Es handelt sich hierbei also eindeutig ein Protein der Schalenmatrix. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass *Bg-AChBP1* einen Einfluss auf die Bildung der Calciumcarbonat-Modifikationen sowie der gebildeten Kristalle selbst hat. Im Bindungstest band es besser an die weniger stabilen Polymorphe ACC und Vaterit. Daher kann angenommen werden, dass *Bg-AChBP1* in der Lage ist, diese Formen durch reversible Bindung zu stabilisieren. So könnte das für den Schalenaufbau benötigte ACC in den benachbarten Calciumcarbonat-Zellen angereichert werden, indem diese Zellen von den Mantelepithelzellen (eventuell über die Amöbocyten) laufend AChBP1 erhalten. Dadurch kristallisiert das Calciumcarbonat nicht bereits im Gewebe aus. Erst nach der Abgabe in die Extrapallialflüssigkeit erfolgt die Kristallisation und zwar unter der Kontrolle von *Bg-AChBP1*, selektiv bis zum Aragonit (siehe: IR-Spektren in Abb. 70). Beim Prozess der Schalenbildung verbleibt dann das Protein in der Schalenmatrix und das Aragonit wird schichtweise darunter aufgebaut (möglicher Prozess der Schalenbildung siehe: Abb. 73).

In unseren Ergebnissen ist deutlich zu erkennen, dass *Bg-AChBP1* die Kristallbildung beeinflusst, indem es die Kantenbildung terminiert. Die Kristalle unter dem Einfluss von *Bg-AChBP1* waren dabei deutlich kleiner als mit *Bg-AChBP2*, wurden aber in größerer Menge gebildet (Abb. 63). Dabei war zu beobachten, dass sich das Protein an die Oberfläche der Kristalle anlagerte (siehe Immunfluoreszenz Abb. 64 und die Rastersonden-Elektronenmikroskopische Aufnahmen in Abb. 65). Gerade bei den Ergebnissen der Rastersonden-Elektronenmikroskopie sieht es so aus, als würde *Bg-AChBP2* besser an die Kristalle binden. Da *Bg-AChBP2* allerdings nicht im Mantelepithel vorkommt scheint es auf den Prozess der Schalenbildung keinen Einfluss zu haben. Der unterschiedliche Einfluss beider Isoformen könnte natürlich an den unterschiedlichen Aminosäuresequenzen liegen, möglicherweise aber auch daran, dass hier *Bg-AChBP1*-Dodekaeder mit *Bg-AChBP2*-Pentameren verglichen wurden. Vielleicht bieten die Dodekaeder viel mehr Bindungsstellen auf engstem Raum, also im Nanometerbereich, was für die Bildung kleinerer Kristalle förderlich sein könnte. Dies wäre ein erster experimenteller Hinweis auf einen Vorteil, oder Spezialeffekt, der Dodekaederstruktur bei der Schalenbildung. Auf ähnliche Weise könnte ein Dodekaeder auf engstem Raum wesentlich mehr Bindungsstellen für Mg^{2+} -Ionen zu Verfügung stellen, die ja ebenfalls zur Schalenbildung beitragen.

Eine schematische Darstellung, wie dieser Prozess ablaufen könnte ist in Abb. 73 dargestellt.

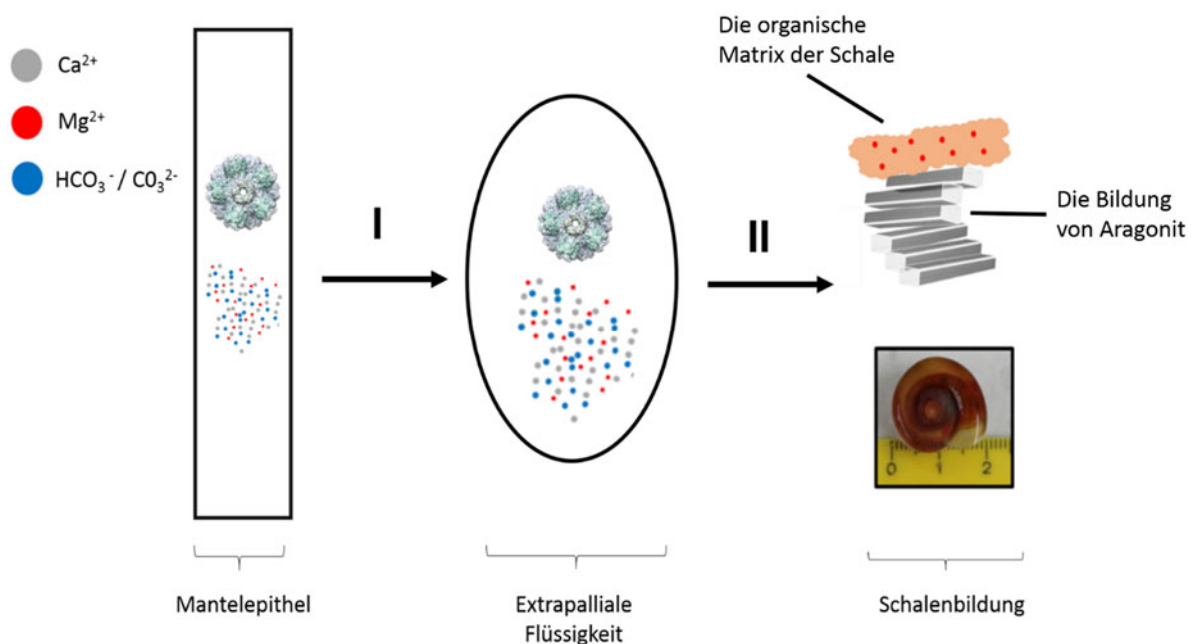


Abbildung 73: Mögliche Beteiligung von *Bg-AChBP1* am Prozess der Schalenbildung von *B. glabrata*: Magnesium, Calcium und Carbonat sowie *Bg-AChBP1* kommen im Mantelepithel vor (hier schematisch durch den *Bg-AChBP1* Dodekaeder dargestellt) und werden in Vesikeln nach außen hin in die Extrapalliale Flüssigkeit abgegeben (I). Dort werden diese Partikel freigesetzt. *Bg-AChBP1* beeinflusst dann als einer der Bestandteile der organischen Matrix die Kristallisation von Calciumcarbonat. Es bilden sich Stapel aus Aragonit Nadeln, an deren Oberfläche sich am Ende der Wachstumsphase die wasserunlösliche Matrix der Schale befindet (siehe dazu Abb. 66B und Abb. 66C). Es liegt ein Kalk-Kohlensäure-Gleichgewicht vor.

4 Eine weitere Perspektive: Manche AChBPs können Phytotoxine binden

Ein von uns noch nicht untersuchter, ganz anderer funktioneller Aspekt von AChBP soll hier nicht unerwähnt bleiben: Viele Pflanzen, darunter auch zahlreiche Algen, bilden Gifte (Phytotoxine) als Schutz vor Fraßfeinden. Bei Gymnodimin-A und 13- Desmethyl Spirolid C z.B. handelt es sich um marine Phytotoxine, welche zur Gruppe der zyklischen Imine gehören. Beide werden von Dinoflagellaten gebildet, also einzelligen Algen, welche den Hauptteil des Phytoplanktons ausmachen. Sie lagern sich zu dichten Zellansammlungen zusammen und kommen an der nordamerikanischen und europäischen Küste vor und können z.B. aus dem Verdauungstrakt bestimmter Muschelarten isoliert werden. Werden diese Cephalopoden oder Fischen gefressen, können sie die kompletten Nahrungsnetze bis hin zum Menschen belasten. Ihre toxische Wirkung entfalten sie, indem sie sehr fest an neuronale Acetylcholin-Rezeptoren binden und deren aktive Zentren dauerhaft zu inhibieren. Aufgrund seiner Homologie zur

Ligandenbindedomäne des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors ist auch AChBP prinzipiell in der Lage, Phytotoxine irreversibel zu binden (Abb. 74). Die Bindung der beiden Phytotoxine Gymnodimin A und 13-Desmethyl Spirolid C an AChBP des Seehasen *Aplysia californica*- (Ac-AChBP) wurde im Detail untersucht. (Bourne et al. 2010). Es wird angenommen, dass das AChBP in der Lage ist, Mollusken vor einer Vergiftung zu schützen, indem es mit der Nahrung aufgenommene und dann in der Hämolymphe auftretende Phytotoxine irreversibel bindet. Es wäre möglich, dass die Konzentration von AChBP in der Hämolymphe mit zunehmender Phytotoxinkonzentration ebenfalls steigt. Dies alles wirft interessante Fragen auf, gerade in Hinblick auf die AChBP-Dodekaeder mit ihren 60 potenziellen Bindungsstellen pro Moleküle, denen man ebenfalls nachgehen sollte.

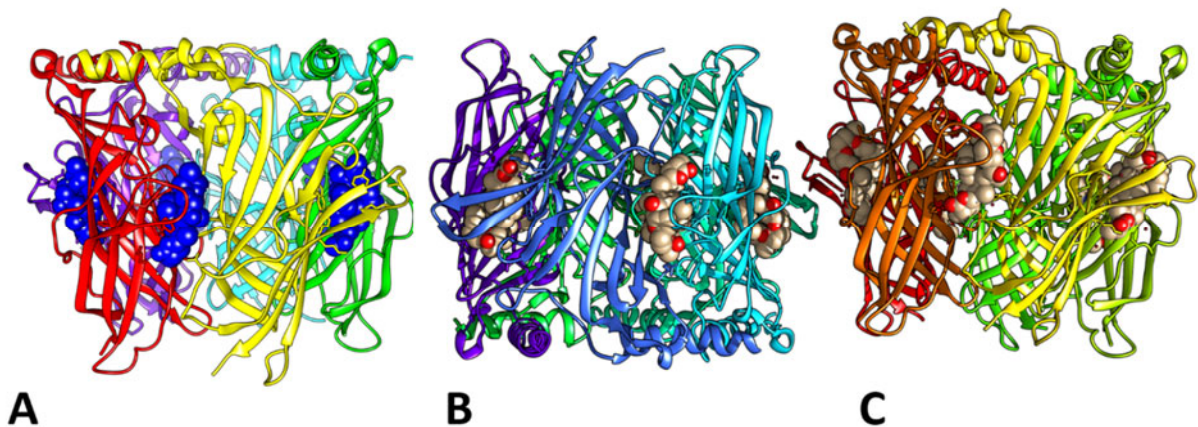


Abbildung 74: An Ac-AChBP gebundene Phytotoxine. (A) zeigt an Ac-AChBP gebundenes Gymnodimin A (pdb-ID: 2X00). (B) und (C) zeigen zwei Ac-AChBP-Moleküle welche 13-Desmethyl Spirolid C in ihrem aktiven Zentrum gebunden haben (pdb-ID 2wzy).

E Zusammenfassung

Nicotinische Acetylcholinrezeptoren (nAChR) sind Membranproteine und spielen eine wichtige neurophysiologische Rolle bei Tieren. Die Acetylcholin-Bindeproteine (AChBPs) sind pentamere Hämolympheproteine, die bei Mollusken vorkommen. Sie sind strukturelle und funktionelle Homologe der Ligandenbindedomäne (LBD) von nAChR und werden wegen ihrer Wasserlöslichkeit stellvertretend für Ligandenbindungs-Experimente verwendet. Über biologischen Funktionen dieser Proteine bei Mollusken sind weniger Details bekannt. In unserer Arbeitsgruppe wurde bei der planorbiden Schnecke *Biomphalaria glabrata* (Zwischenwirt des Bilharziose-Erregers) ein AChBP entdeckt, welches aus zwölf Pentameren einem regulären Dodekaeder mit 25 nm Durchmesser bildet. Diese Symmetrie und Größe erlauben elektronenmikroskopische 3D-Rekonstruktionen in hoher Auflösung. Bei *B. glabrata* gibt es zwei AChBP-Isoformen (*Bg-AChBP1* und *Bg-AChBP2*). Sie wurden rekombinant als Dodekaeder (*Bg-AChBP1*) und Pentamere (*Bg-AChBP2*) exprimiert.

Im Rahmen meiner Arbeit galt es, Hinweise für mögliche biologische Funktionen von *Bg-AChBP1* und *Bg-AChBP2* zu sammeln. Die Expressionsorte im adulten Tier ermittelte ich durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit isoform-spezifischen Antikörpern sowie durch *In-situ*-Hybridisierung mit spezifischen cDNA-Sonden. *Bg-AChBP1* wird in Glia-ähnlichen Zellen des Cerebralganglions sowie sehr kräftig in den Mantelepithelzellen exprimiert. *Bg-AChBP2* wird nur im Cerebralganglion gebildet, wobei nur in manchen Zellen eine Co-Expression mit *Bg-AChBP1* erfolgt. Ähnliche Versuche mit Larvalstadien zeigten, dass diese lediglich *Bg-AChBP1* exprimieren, das aber von Beginn an. Durch umfangreiche Experimente zur Schalenbildung konnte ich in Kooperation mit Gruppen aus den Mainzer Materialwissenschaften zeigen, dass beide Isoformen amorphes Calciumcarbonat binden und die Bildung von Aragonit gegenüber Calcit fördern, insbesondere in Kombination mit Magnesiumionen. Aufgrund seiner Expression im Mantelepithelium ist jedoch nur *Bg-AChBP1* in der Lage, sich in der extrapallialen Flüssigkeit anzureichern und so die Schalenbildung zu beeinflussen. Zudem konnte ich die Anwesenheit von *Bg-AChBP1* und die Abwesenheit von *Bg-AChBP2* in der organischen unlöslichen Matrix der Schale mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachweisen. Das alles macht eine Rolle von *Bg-AChBP1* bei der Schalenbildung sehr wahrscheinlich und von *Bg-AChBP2* sehr unwahrscheinlich. Aus der differenziellen Expression beider Isoformen im Gehirn kann man schließen, dass sie eine etwas unterschiedliche Rolle bei der Regulation der synaptischen Transmission spielen.

F Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
Abb.	Abbildung
AChBP	Acetylcholin Bindeprotein
AChR	Acetylcholin Rezeptor
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate
Bg	<i>Biomphalaria glabrata</i>
Bg-AChBP	<i>Biomphalaria glabrata</i> - Acetylcholin Bindeprotein
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	Charged coupled device (Ladungstransport-Speicher)
cDNA	complementary DNA
Da	Dalton
DIG	Dioxigenin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat bzw. Ethylendiamintetraessigsäure.
g	Gramm
h	Stunde
H ₂ O dest.	Destilliertes Wasser
H ₂ O dd.	Doppelt Destilliertes Wasser
IgG	Immunglobulin G
K	Keratin
kDa	Kilodalton
LaB ₆	Lanthanhexaborid
M	Molarität
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mAK	Monoklonaler Antikörper
min.	Minute
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
pAK	Polyklonaler Antikörper
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat; Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TE	Tris/ EDTA
Temed	(N,N, N',N'- Tetramethylenethylendiamin)
Tris	Tris- (hydroxymethyl)- aminomethan
UA	Uranylacetat
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
w/v	waight/volume
v/v	volume/volume
°C	Grad Celsius
∅	Durchmesser

G Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Membrangebundener nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor und ein aktives Zentrum der Liganden-bindedomäne..	2
Abbildung 2: nAChR-Pentamer, AChBP-Pentamer und AChBP-Dodekaeder.....	4
Abbildung 3: Die Ligandenbindestelle von AChBP.....	5
Abbildung 4: Die zwei Isoformen des <i>Bg</i> -9AChBP.....	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung: Drei mögliche Funktionen der Acetylcholin Binde-Proteine.....	7
Abbildung 6: Regulation der Erregungs-übertragung im synaptischen Spalt durch das AChBP.....	8
Abbildung 7: Körperbauplan von <i>Biomphalaria glabrata</i>	10
Abbildung 8: Schematische Darstellung der grundlegenden Schichten der Schneckenhausschale.....	13
Abbildung 9: Die stufenweise Kristallisation von Calciumcarbonat.....	15
Abbildung 10: Die Posthornschnecke <i>Biomphalaria glabrata</i>	16
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) zur Herstellung der DIG markierten Sonden.....	23
Abbildung 12: Verwendete Primersequenzen zur Herstellung sequenzspezifischer Sonden.....	24
Abbildung 13: Schematische Darstellung der verschiedenen Punktdiagramme (<i>Dot-Blots</i>).....	26
Abbildung 14: Übersicht über die Fluorophoren, die für die Doppelfärbung mit den isoform-spezifischen Sonden.....	30
Abbildung 15 Leica DC 500 Fluoreszenzmikroskop.....	31
Abbildung 16: Übersicht über die Fluorophoren, die für die (indirekte Immunfluoreszenz).....	32
Abbildung 17: Übersicht über die verwendeten Fluorophoren, für die Doppelfärbung (direkten Immunfluoreszenz).....	32
Abbildung 18: Schematische Darstellung der Antikörpermarkierung,.....	34
Abbildung 19: Übersicht über einige Schritte der chromatographischen Methoden.....	43
Abbildung 20 Schema der Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
Abbildung 21: Tecnai G2 12Bio TWIN,.....	46
Abbildung 22: Vorbereitung der Gitternetzchen für die chemische Fixierung.....	48
Abbildung 23: Chemische Fixierung von Süßwassertieren.....	49
Abbildung 24: Anfertigen von Gewebeschnitten für die Elektronenmikroskopie.....	50
Abbildung 25: Schematische Darstellung der 3D-Tomographie.....	51
Abbildung 26: Übersicht über die Zusammensetzung der Hämolympheproteine von <i>B. glabrata</i>	54
Abbildung 27: Übersicht über die in der Hämolymphe befindlichen Strukturen.....	55
Abbildung 28: TEM Aufnahmen der HPLC-Aufreinigung von Peak II.....	56
Abbildung 29: 15%ige SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen der aufgereinigten Hämolympheproteine von <i>B. glabrata</i>	57
Abbildung 30: SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen der aufgereinigten Hämolympheproteine von <i>B. glabrata</i>	58
Abbildung 31: Western-Blot Analysen der aufgereinigten Hämolympheproteine von <i>B. glabrata</i>	59
Abbildung 32: Überprüfung der <i>Bg</i> -AChBP1 Expression mittels SDS-PAGE:.....	60
Abbildung 33: TEM-Aufnahmen nach erfolgreicher <i>Bg</i> -AChBP1 Expression.....	61
Abbildung 34: Größenausschluss-Chromatographie zur Trennung von <i>Bg</i> -AChBP1 Dodekaedern und Pentameren nach rekombinanter Expression.....	62
Abbildung 35: Expression von <i>Bg</i> -AChBP2.....	63
Abbildung 36: Whole-Mount-Immunfluoreszenzmikroskopie eines 60 Stunden alten Geleges von <i>B. glabrata</i> :.....	64
Abbildung 37: Whole mount Immunfluoreszenzmikroskopie einer ca. 2 Tage alten Jungschnecke.....	65
Abbildung 38: Immunfluoreszenzmikroskopie einer ca. 2 Tage alten Jungschnecke.....	66
Abbildung 39: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an Gefrierschnitten durch das Mantelgewebe.....	67
Abbildung 40: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an Gefrierschnitten durch das Fußgewebe.....	68
Abbildung 41: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an Gefrierschnitten durch das Gewebe des Eingeweidessack.....	69
Abbildung 42: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an Gefrierschnitten durch das Gewebe des Eingeweidessack.....	70
Abbildung 43: Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie an Gefrierschnitten durch das Kopfgewebe von <i>B. glabrata</i>	72
Abbildung 44: Übersicht: 7 µm dicke Sagitalschnitte durch den Kopfbereich von <i>B. glabrata</i>	73
Abbildung 45: Übersicht: Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie an Sagitalschnitten durch den Kopfbereich von <i>B. glabrata</i> , ...	74
Abbildung 46: Direkte Immunfluoreszenzmikroskopie an Sagitalschnitten durch den Kopfbereich von <i>B. glabrata</i>	75

Verzeichnisse

Abbildung 47: Immunfluoreszenzmikroskopie an Gefrierschnitten des Kopfgewebes von <i>B. glabrata</i>	76
Abbildung 48: Übersicht über einige Vorversuche zur <i>In-situ</i> -Hybridisierung. I	77
Abbildung 49: Whole mount <i>In-situ</i> -Hybridisierung mit isoformspezifischen <i>Bg</i> -AChBP-Sonden.....	78
Abbildung 50: <i>In-situ</i> -Hybridisierung an 7 µm dicken Gefrierschnitten durch den Kopfbereich von <i>B. glabrata</i>	79
Abbildung 51: 7 µm dicke Gefrierschnitte aus dem Bereich des Cerebralganglion.	81
Abbildung 52: <i>In-situ</i> -Hybridisierung an 7 µm dicken Gefrierschnitten, durch das Mantelgewebe von <i>B. glabrata</i>	82
Abbildung 53: TEM Übersichtsaufnahme Mantelgewebes von <i>B. glabrata</i>	83
Abbildung 54: TEM Aufnahme des Mantelepithels bei stärkerer Vergrößerung.	84
Abbildung 55: TEM Aufnahme von Zellen des Mantelepithels.....	85
Abbildung 56: TEM Aufnahme eines 70 nm dicken, in Araldit ® eingebetteten und chemisch Fixierten Schnittes.	86
Abbildung 57: TEM Aufnahme eines 70 nm dicken, in Araldit ® eingebetteten und chemisch Fixierten Schnittes.	87
Abbildung 58: Paraffin-Querschnitte durch das Gewebe von <i>Biomphalaria glabrata</i>	88
Abbildung 59: (B') Vergrößerung des markierten Bereiches aus Abb. 58, B.	89
Abbildung 60: TEM Aufnahmen des Mantelepithels von <i>L. stagnalis</i> und <i>B. glabrata</i> im Vergleich.	90
Abbildung 61: 3D–Tomographie an 70 nm dicken Schnitten des Mantelgewebes von <i>B. glabrata</i>	91
Abbildung 62: 3D–Tomographie an 70 nm dicken Schnitten des Mantelgewebes von <i>B. glabrata</i>	92
Abbildung 63: CaCO ₃ Kristallisation in Anwesenheit von <i>Bg</i> -AChBP.	94
Abbildung 64: Immunfluoreszenzmikroskopie von in Anwesenheit von <i>Bg</i> -AChBP1 gebildeten Calciumcarbonat-Kristallen.....	95
Abbildung 65: Topographie unter dem Einfluss von <i>Bg</i> -AChBP gewachsener CaCO ₃ -Kristalle	96
Abbildung 66: Untersuchungen der Schale von <i>B. glabrata</i>	98
Abbildung 67: Elementanalyse der Schale von <i>Biomphalaria glabrata</i>	99
Abbildung 68: Elementanalyse der wasserunlöslichen Matrix von <i>B. glabrata</i>	99
Abbildung 69: Untersuchungen der wasserunlöslichen Matrix der Schale von <i>B. glabrata</i> auf <i>Bg</i> -AChBP1.....	101
Abbildung 70: Der Einfluss von <i>Bg</i> -AChBP1, <i>Bg</i> -AChBP2 und Magnesium-Ionen auf die Bildung von CaCO ₃ -Modifikationen.	102
Abbildung 71: Zellen des menschlichen Gehirns und das Cerebralganglion von <i>B. glabrata</i>	107
Abbildung 72: Einfluss von Calciumionen und Calciumcarbonat auf den <i>Bg</i> -AChBP1-Dodekaeder.....	112
Abbildung 73: Mögliche Beteiligung von <i>Bg</i> -AChBP1 am Prozess der Schalenbildung	114
Abbildung 74: An <i>Ac</i> -AChBP gebundene Phytotoxine.	115

H Anhang

***Bg*-AChBP Sequenzen:**

***Bg*-AChBP1**

Komplettes Gen

5'UTR

AACTCTTTGCTTTGTTATTCTTCCAATTGG

Exon 1

ACCGAGTCAGGAAATAAACACAAAATGGATTCGTTTCTAGTGGTTCTGATTCTTTGTTTT
CTGACACAA

Intron 1 (Phase 1)

GGTAATTTTTATAATATCATTGTTTGTGTTTTTCAATGAAATAATTTGAAATAATTTATAGA
AAGAATGTTTTCAACTAGTAACAAAACAATCGAAATATTTGTTTTAAAATACTAAAAAAC
AAAAACGACGCATGCATATTGGAAAGAATACTGCAGGAATAAGCTCCTTTTTTTTTATAG
AAAACAAAAATTAATTAATATCATTAACTAATTGCTTATTTTATTACTATTATTATTATT
AATGTCATGTAGTGGTATTGACTTTGAATAATTATGCAAATTTTAACTTCACATATATATT
TATTTACCAGCTGAATATGTTACGACCCGCGCCCTACGACCTTAGTTTGGGTATTGATAA
TCTACTGGATTGAATTTAGATCTATGTCAAACCTTTGACAATGTTCACTTTATATTTTTTTA
TTTTGCCACGAAAATATTCATATCCAATATAAAATACTGTGAAAACGGGTTTACCCGATTT
GTTTAAAGGAGTTTCGTTCTTTAATAGAGATACAGTTAGACACTTTTTGTCTATTTTTGGG
GCCCTCCGGTTGTGGGAGGGGCATTAACATGCATTACGGTCTCCGCCACGATCTGAG
GAACTTGCATCCCCCTGAAAATATTAATATATATATATTTATTAATTGTATCTCTTTGAAC
AGGA

Exon 2

TCCTACGGCTCCAGAAGAAGCAGAAGTGAGATTCTTCAAGATGTCCTCAGCAGGTGTAG
CCCTTTAAACATCCCCATTGAAGATGACCAGCCAGTCAAAGTGTCATTTGAATATTCCCT
GCAGAAAATTTCCGAGCAGACGTGGAAAACGATGAGGTTGACATTGGTTTGTGGACGA
CCTTGGTCTGGAAGGACAGATGTCTCAACTGGTTTAAATGAATTCACCTTCCTTCAAAGAGG
TTAATCACATAGACTAGTTTTACTATTTGAGAATTGTTTCGATGCATGTTGTGATAAGTATC
TTTATGTGTCTGAACGAATGGTTTGTCTTTTCACATAGAATAATAGCTTAAAATGTTGTAG
TTTTTTTAAATCTATCCCCCTTTCAATTTAAAATCCATTTCTCAATTTCTTTATTTCTTGTG
TTGCTTCCACTATTGCAAGGAGACTTCCCGTTGAGCTTTGCACCATCAAGCACTCCTATT
GTCAGTTCATCTAATGATTTCTATACAATTTGTGCGCAAAGGTTACACGGGTCTTGTA
TTAATTCAACCCGATGTTGAATACAAAGAAACATTCAAAGTGAGAAACATTGGAGTTGAG
GGATGAAATTCCCGCGTTTTAAAATAATTAGACGAAAGCCAAATTTCAATTCTAAGATTTTA
CATTTTGAAACATTACAACCTAGTCGTGGTGGCCGAGTGGTAAAACGCTTGGCTGCCGA
ACCGGGTTCGAATCCTGGTGAAGATTTTGATTTTACTTTGGGGATCTTAAGGGCGCCTC
TGAGTCCAACCAGCTCTAACGGGTACCTGACAATAGTTGGGGAAAGTAAAGGTGGTTG
GTCGTTGTGCTTGCCACATGACACCCTCGTTAACCTTGGGCCACAGAAACAGATGAACT
TTACATCATCTGCCCAAAGATCACAAGGTTTGAAGGAGAACTTTACTTAATCTAACGG
TCAAACCACAGTTTTTACTGTGGCTAATTAGGTAGTTATTTTTTAGGTATTTTTTTTAGATA
TACATAAATAAATAGGATGACCATTAGAGCCGTTTTCGAAATCCCTGTGCATTGCCACTC
TCTAATTAAACCCACGAAGAGTGTGCAAGCGAATCTGCTTTAAATACAAAATATAATATT
TTCAAGTACAATGTATAATCTTTGATGAATACTGGATACAATTTTAGCCTTTGTCTTATCTT
TGCTATAATCTTTTTTTAATGTCATTATAAAAGCTTTGTTTCATGTTTTTTTAAAATCATTCT
TCATATTATAAATAAATAAAGTTAATTACTTGTAAAATATATATTTCTAAACAATACAGTAT
ACTTAATTATTTTTCTTTTTTTTTTCATCAG

Exon 3

TTGACTGTGCCAATTGCAGAAATCTGGACACCAGACATATTCATTTTTGATTCAGTTGGC
GCCCCGGAAATATTTTCAGATAAACTAGCTAGGGTCAGCCAAGATGGTACAGTAACTTA
CGTACCCCAGCTTAAAGTTCGCCTCTCGTGTCCCCTGGCCGACCTGAAGCTTGAAACG
GGCGTCACTTGCAGCCTTAAGTCCGGATCCTGGACGCACAGTACTCAAGAGCTGACCT
TGGAGGTTAACGCGAAGGTAGATCTGGGAGACTACGCCTCGGATACAAGATTTTCAGCT
GCTGAATGCTACCCAGCAGGTCAACAGGAAACAGTACCCCTGCTGCCAGAGACGTAT
GAAGATGCAACGCTTTCTTTTACGTTTAGAAAACCA

3ÚTR

TAAAAAAAAAAAA

GATTAAATAAATAAAATATCACAAATATCAGAATCGAATTCGTTGTATATTATGATGAACG
TTGTAAAACGTATCAAATAAAAGTTAACCCCTTAAATGAAACCATGATCTAAGAGTCACGA
CTTCTCACTTTTTATTTAAAGAACTTCACAATAAAATCTTAAGACTAAACATACTTGTATAA
TACATCTAGAGCTCAGCTCCCATTGGATAGAATCTATGTCTATAGACCAGCATTGATTGC
AATTCCTATGGAC

Codierender Bereich *Bg-AChBP1*

TCCAGAAGAAGCAGAAGTGAGATTCTTCAAGATGTCCTCAGCAGGTGTAGCCCTTTAAA
CATCCCCATTGAAGATGACCAGCCAGTCAAAGTGTCAATTTGAATATTCCTGCAGAAAAT
TTTCCGAGCAGACGTGGAAAACGATGAGGTTGACATTGGTTTGTGGACGACCTTGGTCT
GGAAGGACAGATGTCTCAACTGGTTTAATGAATTCACCTTCCTTCAAAGAGTTGACTGTGC
CAATTGCAGAAATCTGGACACCAGACATATTCATTTTTGATTCAGTTGGCGCCCCGGAAA
TATTTTCAGATAAACTAGCTAGGGTCAGCCAAGATGGTACAGTAACTTACGTACCCCAG
CTTAAAGTTCGCCTCTCGTGTCCCCTGGCCGACCTGAAGCTTGAAACGGGCGTCACTTG
CAGCCTTAAGTCCGGATCCTGGACGCACAGTACTCAAGAGCTGACCTTGGAGGTTAAC
GCCAAGGTAGATCTGGGAGACTACGCCTCGGATACAAGATTTTCAGCTGCTGAATGCTAC
CCAGCAGGTCAACAGGAAACAGTACCCCTGCTGCCAGAGACGTATGAAGATGCAACG
CTTTCCTTTACGTTTAGAAAACCA

Aminosäure Sequenz AChBP_1

SRRSRSEILQDVLSRCSPLNIPIEDDQPVKVSFEYSLQKIFRADVENDEVDIGLWTTLVWKDR
CLNWFNEFTSFKELTVPIAEIWTPDIFIDSVGAPEIFSDKLARVSQDGTVTYVYPQLKVRLSCP
LADLKLETGVTCSLKSWSWTHSTQELTLEVNAKVLDLDYASDTRFQLLNATQQVNRKQYPC
CPETYEDATLSFTFRKP

Bg-AChBP2

Komplettes Gen

Exon 1

ATGGATTCACTCAAAGTAGTTCTCATTGTTTGTGGTTAATATAC

Intron 1 (Phase 1)

GGTAAAAAAAAACATTTTCCATTTTATCAAAGTGTTTCTTAATTCTCACCAATGAAATGT
GAACCACCAACATATTGTTGTAACTCCGCTCCCTCGCCACACTGATAGTGCGCATGAGA
GCACCATTGAACACATGAGAAGACATGTTGATATAAGACAGGAAGAAGGACTGTTGTGG
ATCCGGCTAAAGTGATGGAAGTCTCGAGAGAACGTCCTTTGTGCTATCTATGAACTGTG
GACCTGGAGCGGCACTGGGAAGTGTGTCGGTTGTCTGTATTGGTAGTTAGGTAGGAAA
GGACTGGTTTCACTTGAGATAGGAAATTCTGGGACTTGATGGCTGAAGTCCATGCCTGT
TTGTAGTGTAATAAATACCTAGCTTATTCATTGTTACCTACTGCCTTTAGTTGAGTGCCTA
CCTTAGAGTTACAACAATTGAATGACAGGTCTGGGAAACCACAAATCTCGACCTGTATTC
TGACATGTATGCACTACGCAAGACAGCAGGGTTTCTGTCCAGGGCTTTTGCAAGAGAGG
ATTTGAACTTCTCAAGTCCTCACTCTAATTGACTTTAAATAATGATGATGATGATCCGGAC
TGGTCGTGCCATTTACATAGCGTTGTTTACTGTCCAAATGTTTTAGCCCATGCTAAAAAG
ACTCTTCTTTTACA GGC

Exon 2

TCCCATGGCACCAAAAAGAGCAGGGAGGAAATAGTGAAAGAGATTCTAGGCAGAGCTA
ACCCTAACAAACATTCCCATTGTTGACGAGCAGCCTGTCAAAGTGAGTTTCAAGTATTCCC
TGCAAGACATTTACACAGCAGATGTGGGAACTGATCAAAGTCGAGCTTGGCCTGTGGTTG
GTCATTAGCTGGAAGGACAGGTCTCTAAGCTGGTCCAACGAGTGCACCACCTTCAATGA
G

Intron 2 (Phase 0)

GTTAGTTGATATAGAGAACACTAGATTACACTCAACTTTAACTTAGTTGCTTTACGTACG
AAGACAAAGATTGAGAAAATTGAAGCCTCCATTTGGAGCTACTAGATATGGGAAAAATAT
TAAATGACAGTATATGTTACTGATATCCTGCATTATATATAATGTCTAGGCATACTGTCTT
ACTCAGGCGAATCGGGCAATAACATTTTTGTCTATGTTCTATTATAAAATTATGGCGCTC
AGTAGTTGAGTGATTAAGCGCATGGCTTCCGAACCTGGGTCCTGGGTTCTGAATCTCGGT
GAAGACTGGGATTTTGAATTTGGGATTTTTAAGGCGCCCCTGAGCCCACCTAACTCTA
ATGGGTACCTGACTTTAGTTGGGAAAGTAAAAGGGGTTGGTCGTTGTGGTGGGCACA
TGACACGCTGCTCGTTCACCGTTGGCTTTAAAACAGATGACCTTAACATCAAGGTCTG
AAAGGGGAAACTTTACTTTAACTCTATTTGAACAAGACAGAGTGCACACTCGAAATAAAG
ACAGAAAAGTTCAGACTCTTTATTAAGTGATGGCCAATCTATAGCCTCCTCAAACACTGG
CCATGTAATTTCCATAGAGTTAAGTCTCTTTACCGATGTGAATCCTTACAAAATAATCCC
TTGTTGTCACAATAATAAAGAAAAATGCAATAGCAGTTTCAGCAGTGTATACACTCATGG
GCGTAGCCAGGGGGGGGGGGGGGATCCCCCTCCCCAAAACCCTCCCCGAAAA
AAAATCCTGGCTACGCCTATGTATACACTACTCGATTTGTGCCTCGTAGTCTATTATTCT
AATCTTTTTCTCAAGTTTTACCCCTAAATTTTTGCTATTTTAGCGACTAAAAAACATAGA
ATTTTAGTTTTCTCACTAACTTAGAGGCAGAGTATAGCTAAGTAAATGCCATGATTTAGTC
GCATTTAAAAATCAAATACAATAAAATTAACGTATTTATCTTTATTAATAGACTTGTCATT
ATATTTTTCAAAGCTCATATTAACCTCGCTCTGTCTGTCAGTAGGTTAAAAGTTTGAACAT
GTTTTTTCTCCATTTTCCATTTTTAATCAAGCTAGAAGTTTGTACAATTATTCATTGAA
CATGACAAGACATTAATAAAATTAATGTAACAATTAGAGGTTAAGTTTATTAATTGCTTG
TGATTTGTTTGACATCGAAATAAGGAGAATAAATGCTACTTAATGATAGATGTGTAATGT
GTATATATATATATATTATATGGATTTTGTCCCCCTATAACGTTTTGACACGTTTTTTCTCC
CTCTTCCATTCTCGGATCAATTTCAAATTTGCATAATTATTCATAGTCGATAATAATGC
ACAAATCAATCCAATTATTAACCAGTTTTTTAAAAAATCATTTAGTACAAATTAATTAATT
TTGTTTTACATAAGAAAAAGGGAGCTAAACCCTGTAATTTTCAGATAAATGGCAGTAGTG
GTTATTTCCCCTTAAATAAGCTTTGGTTTAAATAAGTATTCATTTTTTTCTATTGCTTGTTT
TTTTCTTTGGTATACTTGACTGATACAGTTTCATCTTTTTTTTTGTTTAAG

Exon3

TTGACTTTGCCATCAAATACATCTGGTTACCCACATTGAGGTCTACAACCTCTATTGGC
AAACCGGGGATCCACTCCGACCAACTCGTCAGAGTTTACAAAGATGGCACTGTCACCTT
CGTCCCGCAGTACACCATACGTTTCTCCTGCGCCTTAGAAAATGTCACCACAGAACAGG
GCGCCGCTTGACCTTAAAGTTTGGACCTTGGACGTACGACGTTCTGACTTGGTCCTG
GACGAGAGCCAGCAGGTGCACTTGACCACCTATGCTGGCGGGGAAAGTTTTCAGCTGA
TAGAAGCCAAGCAGAAAGTCAACAAGAAGACCTATCCATGCTGCCCGCAGTCTTTTCGAG
GATATAGAGCTTCGTGTCACCTTCAAAAAATA

3'ÚTR

TAAGTGTAACTTTAGATAAAAACGAAACCCCTGGATAAAAACGAAACCCCTGGATAAAAACGA
ACCCTGGATAAAAACGAAACCTGGATAAAAACGAACCCCTGGATAAAAACGAAACCCCTGGATAA
AACGAGCACTATCTATTTTGTGTTATAGTGGTGGATCATGTTTGAGGATTCTACAACC
AAGCTGTGAAAACAGTTGCTTCAAACCTAACAATGTAATCAGCAAAAATGTGTAATCAATG
TAATACACACTTGTAAGCAATACAATCAACTGAAGCACAGCATAAAVAAAATGTTTGCAA
AATTATTTTATACT

Codierender Bereich *Bg-AChBP2*

ACCAAAAAGAGCAGGGAGGAAATAGTGAAAGAGATTCTAGGCAGAGCTAACCCCTAACAA
CATTCCCATTGTTGACGAGCAGCCTGTCAAAGTGAGTTTCAAGTATTCCCTGCAAGACAT
TTACACAGCAGATGTGGGAACTGATCAAGTCGAGCTTGGCCTGTGGTTGGTCATTAGCT
GGAAGGACAGGTCTCTAAGCTGGTCCAACGAGTGCACCACCTTCAATGAGTTGACTTTG
CCATCAAATAACATCTGGTTACCCACATTGAGGTCTACAACCTCTATTGGCAAACCGGG
GATCCACTCCGACCAACTCGTCAGAGTTTACAAAGATGGCACTGTCACCTTCGTCCCGC
AGTACACCATACGTTTCTCCTGCGCCTTAGAAAATGTCACCACAGAACAGGGCGCCGCT
TGCACCTTAAAGTTTGGACCTTGGACGTACGACGTTTCGTGACTTGGTCCTGGACGAGAG
CCAGCAGGTCGACTTGACCACCTATGCTGGCGGGGAAAGGTTTCAGCTGATAGAAGCC
AAGCAGAAAGTCAACAAGAAGACCTATCCATGCTGCCCGCAGTCTTTCGAGGATATAGA
GCTTCGTGTCACCTTCAAAAAAATA

Aminosäure Sequenz *Bg-AChBP2*:

TKKSREEIVKEILGRANPNNIPIVDEQPVKVSFKYSLQDIYTADV
GTDQVELGLWLVISWKDRSLSWSNECTTFNELTLPSKYIWLPHI
EVYNSIGKPGIHSDQLVRVYKDGTVTFVPQYTIRFSCALENVTTE
QGAACKLKFPGPTYDVRDLVLDESQQVDLTTYAGGERFQLIEA
KQKVNKKTYPCCPQSFEDIELRVTFKKI

Literaturverzeichnis

Addadi, Lia; Joester, Derk; Nudelman, Fabio; Weiner, Steve (2006): Mollusk shell formation. A source of new concepts for understanding biomineralization processes. In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 12 (4), S. 980–987. DOI: 10.1002/chem.200500980.

Aebi, U.; Pollard, T. D. (1987): A glow discharge unit to render electron microscope grids and other surfaces hydrophilic. In: *Journal of electron microscopy technique* 7 (1), S. 29–33. DOI: 10.1002/jemt.1060070104.

Amos, Fairland F.; Ndao, Moise; Evans, John Spencer (2009): Evidence of mineralization activity and supramolecular assembly by the N-terminal sequence of ACCBP, a biomineralization protein that is homologous to the acetylcholine binding protein family. In: *Biomacromolecules* 10 (12), S. 3298–3305. DOI: 10.1021/bm900893f.

Arakaki, Atsushi; Shimizu, Katsuhiko; Oda, Mayumi; Sakamoto, Takeshi; Nishimura, Tatsuya; Kato, Takashi (2015): Biomineralization-inspired synthesis of functional organic/inorganic hybrid materials: organic molecular control of self-organization of hybrids. In: *Organic & biomolecular chemistry* 13 (4), S. 974–989. DOI: 10.1039/c4ob01796j.

Bevelander, Gerrit; Nakahara, Hiroshi (1969): An electron microscope study of the formation of the nacreous layer in the shell of certain bivalve molluscs. In: *Calc. Tis Res.* 3 (1), S. 84–92. DOI: 10.1007/BF02058648.

Bielefeld, U.; Becker, W. (1991): Embryonic development of the shell in *biomphalaria glabrata* (Say). In: *The International journal of developmental biology* 35 (2), S. 121–131.

Billen, Bert; Spurny, Radovan; Brams, Marijke; van Elk, René; Valera-Kummer, Soledad; Yakel, Jerrel L. et al. (2012): Molecular actions of smoking cessation drugs at $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (23), S. 9173–9178. DOI: 10.1073/pnas.1116397109.

Boßelmann, F.; Romano, P.; Fabritius, H.; Raabe, D.; Epple, M. (2007): The composition of the exoskeleton of two crustacea: The American lobster *Homarus americanus* and the edible crab *Cancer pagurus*. In: *Thermochimica Acta* 463 (1-2), S. 65–68. DOI: 10.1016/j.tca.2007.07.018.

Bourne, Yves; Radic, Zoran; Aráoz, Rómulo; Talley, Todd T.; Benoit, Evelyne; Servent, Denis et al. (2010): Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (13), S. 6076–6081. DOI: 10.1073/pnas.0912372107.

Brejč, Katju&Sbreve; a; van Dijk, Willem J.; Klaassen, Remco V.; Schuurmans, Mascha; van der Oost, John et al. (2001): Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. In: *Nature <London>* 411 (6835), S. 269–276. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/35077011>.

Brejč, Katjusa; van Dijk, Willem J.; Smit, August B.; Sixma, Titia K. (2002): The 2.7 Å structure of AChBP, homologue of the ligand-binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor. In: *Novartis Foundation symposium* 245, 22-9; discussion 29-32, 165-8.

Cartwright, Julyan H. E.; Checa, Antonio G.; Gale, Julian D.; Gebauer, Denis; Sainz-Díaz, C. Ignacio (2012): Die Polyamorphie von Calciumcarbonat und ihre Bedeutung für die Biomineralisation. Wie viele amorphe Calciumcarbonat-Phasen gibt es? In: *Angew. Chem.* 124 (48), S. 12126–12137. DOI: 10.1002/ange.201203125.

Celie, Patrick H. N.; Klaassen, Remco V.; van Rossum-Fikkert, Sarah E.; van Elk, René; van Nierop, Pim; Smit, August B.; Sixma, Titia K. (2005): Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (28), S. 26457–26466. DOI: 10.1074/jbc.M414476200.

Celie, Patrick H. N.; van Rossum-Fikkert, Sarah E.; van Dijk, Willem J.; Brejč, Katjusa; Smit, August B.; Sixma, Titia K. (2004): Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. In: *Neuron* 41 (6), S. 907–914.

Cölfen, Helmut; Antonietti, Markus (2005): Mesokristalle: anorganische Überstrukturen durch hochparallele Kristallisation und kontrollierte Ausrichtung. In: *Angew. Chem.* 117 (35), S. 5714–5730. DOI: 10.1002/ange.200500496.

Dauphin, Y.; Denis, A. (2000): Structure and composition of the aragonitic crossed lamellar layers in six species of Bivalvia and Gastropoda. In: *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 126 (3), S. 367–377.

Donnay, G.; Pawson, D. L. (1969): X-ray Diffraction Studies of Echinoderm Plates. In: *Science (New York, N.Y.)* 166 (3909), S. 1147–1150. DOI: 10.1126/science.166.3909.1147.

Faatz, M.; Gröhn, F.; Wegner, G. (2004): Amorphous Calcium Carbonate. Synthesis and Potential Intermediate in Biomineralization. In: *Adv. Mater.* 16 (12), S. 996–1000. DOI: 10.1002/adma.200306565.

Gayathri, Subramanyam; Lakshminarayanan, Rajamani; Weaver, James C.; Morse, Daniel E.; Kini, R. Manjunatha; Valiyaveetil, Suresh (2007): In vitro study of magnesium-calcite biomineralization in the skeletal materials of the seastar *Pisaster giganteus*. In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 13 (11), S. 3262–3268. DOI: 10.1002/chem.200600825.

Hanaichi, T.; Sato, T.; Iwamoto, T.; Malavasi-Yamashiro, J.; Hoshino, M.; Mizuno, N. (1986): A stable lead by modification of Sato's method. In: *Journal of electron microscopy* 35 (3), S. 304–306.

Hansen, Scott B.; Sulzenbacher, Gerlind; Huxford, Tom; Marchot, Pascale; Taylor, Palmer; Bourne, Yves (2005): Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. In: *The EMBO journal* 24 (20), S. 3635–3646. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600828.

Hasse, B.; Ehrenberg, H.; Marxen, J. C.; Becker, W.; Eppe, M. (2000): Calcium carbonate modifications in the mineralized shell of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. In: *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 6 (20), S. 3679–3685.

Henriksen, K.; Stipp, S.L.S.; Young, J. R.; Marsh, M. E. (2004): Biological control on calcite crystallization: AFM investigation of coccolith polysaccharide function. In: *American Mineralogist* 89 (11-12), S. 1709–1716. DOI: 10.2138/am-2004-11-1217.

Huang, Jing; Wang, Hongzhong; Cui, Yu; Zhang, Guiyou; Zheng, Guilan; Liu, Shiting et al. (2009): Identification and Comparison of Amorphous Calcium Carbonate-Binding Protein and Acetylcholine-Binding Protein in the Abalone, *Haliotis discus hannai*. In: *Marine Biotechnology* 11 (5), S. 596–607. DOI: 10.1007/s10126-008-9176-8.

Jeong, K. H.; Lie, K. J.; Heyneman, D. (1983): The ultrastructure of the amebocyte-producing organ in *Biomphalaria glabrata*. In: *Developmental and comparative immunology* 7 (2), S. 217–228.

Jiao, Yunfeng; Feng, Qingling; Li, Xiaoming (2006): The co-effect of collagen and magnesium ions on calcium carbonate biomineralization. In: *Materials Science and Engineering: C* 26 (4), S. 648–652. DOI: 10.1016/j.msec.2005.08.038.

Joky, Alexandre; Matricon-Gondran, Michelle; Benex, Jacqueline (1983): Fine structural differences in the amoebocytes of *Biomphalaria glabrata*. In: *Developmental and comparative immunology* 7 (4), S. 669–672. DOI: 10.1016/0145-305X(83)90090-3.

Jong-Brink, Marijke; Wit, Ankie; Kraal, G.; Boer, H. H. (1976): A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. In: *Cell and tissue research* 171 (2), S. 195–219. DOI: 10.1007/BF00219406.

Karlin, Arthur (2002): Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. In: *Nature reviews. Neuroscience* 3 (2), S. 102–114. DOI: 10.1038/nrn731.

Kearse et al. (2012): Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Sequence analysis. Sequence analysis. In: *Bioinformatics* 2012 (Vol. 28 no. 12 2012), S. 1647–1649. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts199.

Kremer, J. R.; Mastrorade, D. N.; McIntosh, J. R. (1996): Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. In: *Journal of structural biology* 116 (1), S. 71–76. DOI: 10.1006/jsbi.1996.0013.

Landy, A. (1989): Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. In: *Annual review of biochemistry* 58, S. 913–949. DOI: 10.1146/annurev.bi.58.070189.004405.

Lee, N.; Francklyn, C.; Hamilton, E. P. (1987): Arabinose-induced binding of AraC protein to *ara2* activates the *araBAD* operon promoter. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (24), S. 8814–8818.

Leonard, S.; Bertrand, D. (2001): Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. In: *Nicotine & tobacco research: official journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco* 3 (3), S. 203–223. DOI: 10.1080/14622200110050213.

Lieb, Bernhard; Dimitrova, Konstantina; Kang, Hio-Sun; Braun, Sabrina; Gebauer, Wolfgang; Martin, Andreas et al. (2006): Red blood with blue-blood ancestry: intriguing structure of a snail hemoglobin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (32), S. 12011–12016. DOI: 10.1073/pnas.0601861103.

Lowenstam, Heinz Adolf; Weiner, Stephen (1989): On biomineralization. New York: Oxford University Press. Online verfügbar unter <http://lib.myilibrary.com/detail.asp?id=44000>.

Ma, Zhuojun; Huang, Jing; Sun, Juan; Wang, Guannan; Li, Changzhong; Xie, Liping; Zhang, Rongqing (2007): A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (32), S. 23253–23263. DOI: 10.1074/jbc.M700001200.

Marxen, J. C.; Becker, W. (2000): Calcium binding constituents of the organic shell matrix from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 127 (2), S. 235–242.

Marxen, J. C.; Hammer, M.; Gehrke, T.; Becker, W. (1998): Carbohydrates of the Organic Shell Matrix and the Shell-Forming Tissue of the Snail *Biomphalaria glabrata* (Say). In: *The Biological bulletin* 194 (2), S. 231–240. DOI: 10.2307/1543052.

Marxen, Julia C.; Becker, Wilhelm (1997): The Organic Shell Matrix of the Freshwater Snail *Biomphalaria glabrata*. In: *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 118 (1), S. 23–33. DOI: 10.1016/S0305-0491(97)00010-2.

Marxen, Julia C.; Nimtz, Manfred; Becker, Wilhelm; Mann, Karlheinz (2003): The major soluble 19.6 kDa protein of the organic shell matrix of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* is an N-glycosylated dermatopontin. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1650 (1-2), S. 92–98. DOI: 10.1016/S1570-9639(03)00203-6.

Mastrorarde, David N. (2005): Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. In: *Journal of structural biology* 152 (1), S. 36–51. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.07.007.

McCormack, Thomas; Petrovich, Robert M.; Mercier, Kelly A.; DeRose, Eugene F.; Cuneo, Matthew J.; Williams, Jason et al. (2010): Identification and functional characterization of a novel acetylcholine-binding protein from the marine annelid *Capitella teleta*. In: *Biochemistry* 49 (10), S. 2279–2287. DOI: 10.1021/bi902023y.

Paul, R. J.; Zahler, S.; Werner, R.; Markl, J. (1991): Adaptation of an open circulatory system to the oxidative capacity of different muscle cell types. In: *Naturwissenschaften* 78 (3), S. 134–135. DOI: 10.1007/BF01131492.

Politi, Yael; Arad, Talmon; Klein, Eugenia; Weiner, Steve; Addadi, Lia (2004): Sea urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase. In: *Science (New York, N.Y.)* 306 (5699), S. 1161–1164. DOI: 10.1126/science.1102289.

Rae, R. (2017): The gastropod shell has been co-opted to kill parasitic nematodes. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 4745. DOI: 10.1038/s41598-017-04695-5.

Rehm, Peter; Pick, Christian; Borner, Janus; Markl, Jürgen. (2012) The diversity and evolution of chelicerate hemocyanins *BMC Evolutionary Biology* 1219 DOI:10.1186/1471-2148-12-19

Reinecke, Manfred (1976): The glial cells of the cerebral ganglia of *Helix pomatia* L. (Gastropoda, Pulmonata). In: *Cell and tissue research* 169 (3), S. 361–382. DOI: 10.1007/BF00219608.

Reyes-Grajeda, Juan Pablo; Moreno, Abel; Romero, Antonio (2004): Crystal structure of ovocleidin-17, a major protein of the calcified *Gallus gallus* eggshell: implications in the calcite mineral growth pattern. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (39), S. 40876–40881. DOI: 10.1074/jbc.M406033200.

Rogers, S. H.; Reeder, R. L. (1987): Structure and function of the spermatheca in a snail host of schistosomiasis, *Biomphalaria glabrata*. In: *Journal of morphology* 191 (3), S. 295–308. DOI: 10.1002/jmor.1051910309.

Rosano, Germán L.; Ceccarelli, Eduardo A. (2014): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. In: *Frontiers in microbiology* 5, S. 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172.

Sali, Andrej; Glaeser, Robert; Earnest, Thomas; Baumeister, Wolfgang (2003): From words to literature in structural proteomics. In: *Nature* 422 (6928), S. 216–225. DOI: 10.1038/nature01513.

Sato, T. (1968): A modified method for lead staining of thin sections. In: *Journal of electron microscopy* 17 (2), S. 158–159.

Saur, Michael; Moeller, Vanessa; Kapetanopoulos, Katharina; Braukmann, Sandra; Gebauer, Wolfgang; Tenzer, Stefan; Markl, Jürgen (2012): Acetylcholine-binding protein in the hemolymph of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* is a pentagonal dodecahedron (60 subunits). In: *PloS one* 7 (8), e43685. DOI: 10.1371/journal.pone.0043685.

Schaffeld, Michael; Markl, Jürgen (2004): Fish keratins. In: *Methods in cell biology* 78, S. 627–671.

Smit, A. B.; Syed, N. I.; Schaap, D.; van Minnen, J.; Klumperman, J.; Kits, K. S. et al. (2001): A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. In: *Nature* 411 (6835), S. 261–268. DOI: 10.1038/35077000.

Smit, August B.; Brejc, Katjusa; Syed, Naweel; Sixma, Titia K. (2003): Structure and function of AChBP, homologue of the ligand-binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 998, S. 81–92.

Smith, B. J. (1984): SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1, S. 41–55. DOI: 10.1385/0-89603-062-8:41.

Souza, Paulo Victor Sgobbi de; Pinto, Wladimir Bocca Vieira de Rezende; Rezende, Flávio Moura; Oliveira, Acary Souza Bulle (2016): Far beyond the motor neuron. The role of glial cells in amyotrophic lateral sclerosis. In: *Arquivos de neuro-psiquiatria* 74 (10), S. 849–854. DOI: 10.1590/0004-282X20160117.

Su, Jingtian; Liang, Xiao; Zhou, Qiang; Zhang, Guiyou; Wang, Hongzhong; Xie, Liping; Zhang, Rongqing (2013): Structural characterization of amorphous calcium carbonate-binding protein. An insight into the mechanism of amorphous calcium carbonate formation. In: *The Biochemical journal* 453 (2), S. 179–186. DOI: 10.1042/BJ20130285.

Sullivan, J. T.; Rodrick, G. E.; Cheng, T. C. (1974): A transmission and scanning electron microscopical study of the rectal ridge of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Pulmonata). In: *Cell and tissue research* 154 (1), S. 29–38.

Thompson, Andrew J.; Lester, Henry A.; Lummis, Sarah C. R. (2010): The structural basis of function in Cys-loop receptors. In: *Quarterly reviews of biophysics* 43 (4), S. 449–499. DOI: 10.1017/S0033583510000168.

Torkkeli, Päivi H.; Liu, Hongxia; French, Andrew S. (2015): Transcriptome Analysis of the Central and Peripheral Nervous Systems of the Spider *Cupiennius salei* Reveals Multiple Putative Cys-Loop Ligand Gated Ion Channel Subunits and an Acetylcholine Binding Protein. In: *PloS one* 10 (9). DOI: 10.1371/journal.pone.0138068.

Unwin, Nigel (2005): Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. In: *Journal of molecular biology* 346 (4), S. 967–989. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.12.031.

Wang, Xiaohong; Schröder, Heinz C.; Müller, Werner E. G. (2014): Enzyme-based biosilica and biocalcite. Biomaterials for the future in regenerative medicine. In: *Trends in biotechnology* 32 (9), S. 441–447. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.05.004.

Weiss, Ingrid Maria; Tuross, Noreen; Addadi, Lia; Weiner, Steve (2002): Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. In: *The Journal of experimental zoology* 293 (5), S. 478–491. DOI: 10.1002/jez.90004.

WITH, N. D. de; van NIEUWMEGEN, M. E.; Sminia, T.; Bos, J. L.; Witter, M. P.; Wondergem, J. (1976): Structure and Function of the Calcium Cells of the Freshwater Pulmonate Snail *Lymnaea stagnalis*. In: *Netherlands Journal of Zoology* 27 (2), S. 195–208. DOI: 10.1163/002829677X00036.

Wood, E. J.; Mosby, L. J. (1975): Physicochemical properties of *Planorbis corneus* erythrocrucorin. In: *The Biochemical journal* 149 (2), S. 437–445.

Xie, Jun; Liang, Jian; Sun, Juan; Gao, Jing; Zhang, Sirui; Liu, Yangjia et al. (2016): Influence of the Extrapallial Fluid of *Pinctada fucata* on the Crystallization of Calcium Carbonate and Shell Biomineralization. In: *Crystal Growth & Design* 16 (2), S. 672–680. DOI: 10.1021/acs.cgd.5b01203.

<https://www.vektorbiologie.uni-tuebingen.de/buch/index.htm>,

<http://www.parasitologie-wenk-renz.de/ts/index.html>

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die durch ihr Mitwirken diese Arbeit ermöglichen haben.

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Jürgen Markl für die Bereitstellung des Themas, sowie des Laborplatzes. Für die Betreuung der Experimente, die bereichernden Diskussionen und die geduldige Unterstützung bei allen wissenschaftlichen Fragen, sowie die kritische Durchsicht und Kommentierung des Manuskripts.

Ich danke Prof. Dr. Dirk Schneider, meinem Zweitgutachter, für seine Unterstützung.

Ich danke dem Max Planck Graduate Center (MPGC) in Mainz für die Gewährung eines dreijährigen Doktorandenstipendiums.

Ich danke Prof. Dr. Bernhard Lieb und Dr. Gebauer für die guten Ratschläge und die Betreuung bei vielen Experimenten.

Ich möchte mich außerdem bei Frau Dr. Julia Markl für die Hilfe bei der Erstellung isoformspezifischer cDNA-Sonden für die *In-situ*-Hybridisierung bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich für die Kooperationen bedanken, die im Rahmen des MPGC zu Stande kamen. Ich danke...

... Mirko Montigny und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tremel (JGU Mainz) für die Synthese der Calciumcarbonat Polymorphe, die zahlreichen Messungen und die gute und enge Zusammenarbeit bei allen Calciumcarbonat-Experimenten.

...Frau Dr. Maria Kokkinopoulou aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (MPI, Mainz) für die Einarbeitung und Hilfe bei der 3D- Elektronentomographie.

...Dr. Hao Lu aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] (MPI Mainz) für Erstellung der oberflächenspezifischen Schwingungsspektren.

Außerdem danke ich Dr. Ron Unger vom Institut für Pathologie der Universitätsmedizin in Mainz, für die Hilfe bei der PAS Färbung zur Lokalisation von Glycogen in den Gewebeproben.

Ich möchte mich außerdem bei Dr. Frank Depoix und Dr. Kristiane Rusitzka für die vielen wertvollen Tipps zur Elektronenmikroskopie bedanken.

Außerdem danke ich Herrn Thomas Schubert, Frau Gabriela Stern-Schneider und Frau Elisabeth Sehn für die exzellente technische Unterstützung.

Desweiteren danke ich Gabriela Schäfer, Dr. Martin Haugwitz, Helena Zeise, Dr. Julia Markl, Ricky Fröhlich sowie der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Markl für das allgemein gute Arbeitsklima, die vielen interessanten Gespräche, Diskussionen und die großartige Zeit die ich mit Euch allen erleben durfte.

Meinem Partner Tom Schäfer danke ich für seine Unterstützung und die Durchsicht des Manuskripts.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre Unterstützung und ganz besonders für die Betreuung meines Sohnes.

Erklärung

Hiermit bestätige ich, Daniela Treiber, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Untersuchungen zur Expression und Funktion der Acetylcholin-Bindeproteine der Posthornschnecke *Biomphalaria glabrata*“ selbständig verfasst und keine als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

“I hereby declare that I wrote the dissertation submitted without any unauthorized external assistance and used only sources acknowledged in the work. All textual passages which are appropriated verbatim or paraphrased from published and unpublished texts as well as all information obtained from oral sources are duly indicated and listed in accordance with bibliographical rules. In carrying out this research, I complied with the rules of standard scientific practice as formulated in the statutes of Johannes Gutenberg-University Mainz to insure standard scientific practice.”

Ort, Datum

Unterschrift

Abstract

Analyses of the expression and function of acetylcholine binding-proteins in the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*

Nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) are membrane proteins and play an important neurophysiological role in animals. Acetylcholine-binding proteins (AChBPs) are pentameric hemolymph proteins in some molluscs. They are structural and functional homologues of the ligand-binding domain (LBD) of nAChR and due to their solubility in water are often used in ligand-binding studies as surrogates of nAChR. The biological roles of these proteins in molluscs are less well studied. We found previously that in the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* (a schistosomiasis parasite vector), twelve AChBP pentamers are further assembled as a regular pentagonal dodecahedron, 25 nm in diameter. This symmetry and size allows high-resolution 3D reconstructions from electron microscopical images. *B. glabrata* has two AChBP isoforms (*Bg-AChBP1* and *Bg-AChBP2*). They have been recombinantly expressed as dodecahedra (*Bg-AChBP1*) and pentamers (*Bg-AChBP2*).

The goal of my thesis was collecting information about possible biological functions of *Bg-AChBP1* and *Bg-AChBP2*. Their expression patterns in adult animals could be revealed by immunofluorescence microscopy with isoform-specific antibodies, and by *in situ* hybridization using isoform-specific cDNA probes. *Bg-AChBP1* is expressed in glia-like cells of the cerebral ganglion and, very strongly, in the mantle epithelial cells. *Bg-AChBP2* is exclusively produced in the cerebral ganglion; co-expression with *Bg-AChBP1* occurs only in some of these cells. Similar experiments with larval stages showed that they express only *Bg-AChBP1*, but this from the beginning. In a large pile of experiments on shell formation in cooperation with working groups in the Material Sciences of our university, I could show that both isoforms bind to amorphous calcium carbonate and promote the formation of aragonite over calcite, especially in combination with magnesium ions. Nevertheless, due to its expression in the mantle epithelium, only *Bg-AChBP1* is in a position to be enriched in the extrapallial fluid and thereby able to influence shell growth. Moreover I could show, by immunofluorescence microscopy, the presence of *Bg-AChBP1* and the absence of *Bg-AChBP2* in the organic insoluble matrix of the shell. All these results strongly suggest a role of *Bg-AChBP1* in shell growth and make such a role highly unlikely for *Bg-AChBP2*. As deduced from the observed differential expression of both isoforms in the brain, they might play a somewhat differing role in the regulation of synaptic transmission.