

**FUNKTIONELLE, STRUKTURELLE UND PHYLOGENETISCHE  
UNTERSUCHUNGEN AN LIPOPROTEINEN DES FLUSSKREBSSES  
*ASTACUS LEPTODACTYLUS***

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades ‚Doktor der Naturwissenschaften‘

**am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz**

**Stefanie Stieb**

**geb. in Freiburg im Breisgau**

**Mainz, den 16.01.2012**

**Gutachter**

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2012

D77 (Dissertation Johannes Gutenberg-Universität Mainz)



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
Veröffentlichungen / Tagungsbeiträge .....	3
Kooperationspartner .....	4
1 Zusammenfassung .....	5
2 Einleitung .....	6
2.1. Lipoproteine und Lipide .....	6
2.1.1. Lipoproteine .....	6
2.1.2. Lipide .....	16
2.2. Lipoprotein-Rezeptoren .....	19
2.2.1. Struktureller Aufbau .....	20
2.3. Ziele der Arbeit .....	22
3 Material und Methoden .....	24
3.1. Geräte .....	24
3.2. Versuchstiere .....	25
3.3. Verwendete Datenbanken und Software .....	26
3.4. Verbrauchsmaterialien .....	27
3.5. Protein- / DNA-Molekulargewichtsmarker .....	28
3.6. Antikörper .....	28
3.7. Puffer- / Lösungen .....	28
3.8. Bakterien und Phagen .....	29
3.8.1. Bakterien .....	29
3.8.2. Phagen .....	32
3.9. Molekularbiologische Methoden .....	34
3.9.1. RNA-Isolierung .....	34
3.9.2. RNA-Fällung .....	35
3.9.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren .....	36
3.9.4. Reverse Transkription .....	36
3.9.5. Entwicklung von <i>Primern</i> / degenerierten <i>Primern</i> .....	36
3.9.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	37
3.9.7. Agarose-Gelelektrophorese .....	38
3.9.8. Gelextraktion .....	39
3.9.9. Sequenzierung .....	40
3.9.10. Erstellen und Immuno- <i>Screening</i> einer cDNA-Bank .....	40
3.10. Bioinformatische Methoden .....	51
3.10.1. Datenbanksuche .....	51
3.10.2. Erstellen von <i>Alignments</i> .....	51
3.10.3. Sequenz-Analyse .....	51
3.10.4. Phylogenetische Sequenzanalysen .....	53
3.11. Proteinbiochemische Methoden .....	58
3.11.1. Entnahme der Hämolymphe .....	58
3.11.2. Gewinnung von Hämozyten .....	58
3.11.3. Dichtegradienten-Ultrazentrifugation .....	58
3.11.4. Membranprotein-Isolierung .....	59
3.11.5. Dialyse .....	59
3.11.6. BCA-Assay .....	60
3.11.7. Konzentrieren von Proteinlösungen .....	60
3.11.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	62

3.11.9.	<i>Blue native</i> -PAGE (BN-PAGE) .....	65
3.11.10.	Gelfiltration .....	65
3.11.11.	Gefriertrocknung .....	66
3.11.12.	Herstellung von primären Antikörpern .....	66
3.11.13.	Co-Immunpräzipitation (IP) .....	66
3.11.14.	Dot-Blot .....	67
3.11.15.	Western-Blot .....	67
3.11.16.	Ligandenblot.....	70
3.11.17.	<i>Enzyme-linked immunosorbent-Assay</i> (ELISA) .....	71
3.11.18.	Massenspektroskopie (MS) .....	72
3.11.19.	Lektin-Blot .....	75
3.12.	Histologische Methoden.....	76
3.12.1.	Dil-Aufnahmestudien.....	76
3.12.2.	Immunhistochemie (IHC).....	78
3.13.	Mikroskopie .....	79
3.13.1.	Fluoreszenz-Mikroskopie .....	79
3.13.2.	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) .....	79
3.13.3.	Rasterkraft-Mikroskopie ( <u>A</u> tom <u>F</u> orce <u>M</u> icroscopy - AFM) .....	80
4	Ergebnisse.....	81
4.1.	Molekularbiologie .....	81
4.1.1.	BGBP-Sequenz.....	81
4.1.2.	Phylogenetische Analysen .....	85
4.1.3.	Erstellen und Antikörper- <i>Screening</i> einer cDNA-Bank.....	91
4.2.	Proteinbiochemie.....	91
4.2.1.	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation .....	91
4.2.2.	SDS-PAGE .....	92
4.2.3.	<i>Blue native</i> (BN)-PAGE .....	93
4.2.4.	Antikörper-Spezifität.....	94
4.2.5.	Co-Immunpräzipitation (IP).....	95
4.2.6.	ELISA.....	96
4.2.7.	Limitierende Proteolyse .....	99
4.2.8.	Massenspektroskopie .....	100
4.2.9.	Glykosylierungs-Analyse durch Lektin-Blotting.....	102
4.2.10.	Ligandenblots.....	103
4.3.	Histologie .....	106
4.3.1.	Dil-Aufnahmestudien.....	106
4.3.2.	Immunhistochemie (IHC) .....	110
4.4.	Transmissions (TEM)- und Rasterkraft (AFM)-Mikroskopie.....	114
4.4.1.	Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	114
4.4.2.	Rasterkraft-Mikroskopie ( <u>A</u> tom <u>F</u> orce <u>M</u> icroscopy - AFM).....	117
5	Diskussion .....	119
5.1.	Molekularbiologie .....	119
5.1.1.	$\beta$ -Glukan-Bindeprotein (BGBP) .....	119
5.1.2.	Discoidales <i>High density</i> -Lipoprotein (dHDL).....	126
5.2.	Proteinbiochemie.....	129
5.2.1.	Isolierung der Lipoproteine.....	129
5.2.2.	Molekulare Struktur: Proteine, Kohlenhydrate und Lipide.....	129
5.2.3.	Antikörper-Spezifität / Co-Immunpräzipitation .....	137

5.2.4.	ELISA.....	139
5.2.5.	Proteolyse / Massenspektroskopie.....	141
5.2.6.	Ligandenblots.....	145
5.3.	Histologie .....	148
5.4.	Mikroskopische Struktur.....	152
6	Ausblick.....	155
7	Literatur .....	157
8	Anhang.....	173
8.1.	Revision der $\beta$ -1,3-Glukan-bindenden Proteine .....	173
8.2.	<i>Primer</i> -Sequenzen.....	174
8.3.	Korrektur der <i>Pacifastacus leniusculus</i> -BGBP-Sequenz .....	175
8.4.	Molekulargewichtsstandards.....	177
8.5.	Drei- und Ein-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren .....	177
8.6.	Eigene Publikation (Stieb <i>et al.</i> , 2008) .....	178
9	Danksagung .....	189
10	Erklärung.....	190
11	<i>Curriculum Vitae</i> .....	191

**Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$	<i>alpha / anti</i>
AFM	Rasterkraft-Mikroskopie
APP	<i>Amyloid Precursor-Protein</i>
AS	Aminosäure/n
<i>A. ast.</i>	<i>Astacus astacus</i>
<i>A. lep.</i>	<i>Astacus leptodactylus</i>
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
BCA	Bicinchoninsäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BGBP	$\beta$ -1,3-D-Glukan-Bindeprotein
BGRP	$\beta$ -Glukan-Erkennungsprotein
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BN	<i>Blue native</i>
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serumalbumin
cds	<i>coding sequence</i>
ConA	Concanavalin A
CP	<i>Clotting-Protein</i>
DABCO	1,4-Diaza-bicyclo(2,2,2)-Oktan
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes Wasser
dHDL	discoidales <i>High density</i> -Lipoprotein
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat
DMF	Dimethylformamid
(c)DNA	<i>(complementary)</i> Desoxyribonukleinsäure
[dT]	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent-Assay</i>
EM	Elektronenmikroskopie
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GRAVY	<i>Grand average of hydropathicity</i>
HDL	<i>High density</i> -Lipoprotein
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunohistochemie
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	kilo-Dalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC	<i>Liquid chromatography</i>
LDLR	<i>Low density</i> -Lipoprotein-Rezeptor
LGBP	Lipopolysaccharid- / $\beta$ -Glukan-Bindeprotein

LLTP	<i>Large lipid transfer-Protein</i>
Lp	Lipophorin
LpR	Lipophorin-Rezeptor
MALDI	<i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption Ionization</i>
MCMC	<i>Markov chain Monte Carlo</i>
MCMCMC	<i>Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
ML	<i>Maximum Likelihood</i>
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MMP	Magermilchpulver
MS	Massenspektroskopie
MTP	Mikrosomale Triglycerid-Transfer-ähnliche LLTP'S
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NJ	<i>Neighbor Joining</i>
Nv-dHDL	<i>Nereis virens</i> -discoidales Lipoprotein
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacryamid-Gelelektrophorese
PAK	Primärer Antikörper
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>
PBT	<i>Phosphate buffered Saline</i> + Tween 20
PC	Phenol-Chloroform
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>Plaques forming units</i>
pl	theoretischer isoelektrischer Punkt
PNA	<i>peanut agglutinin</i>
PVA-Sil	<i>Polyvinyl Alcohol functionalized Silica</i>
RACE	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
(m)RNA	( <i>messenger</i> ) Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rps	Umdrehungen pro Sekunde
RT	Raumtemperatur
SAK	Sekundärer Antikörper
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SpeedVac	Vakuum-Rotations-Konzentrator
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TOF	<i>Time of flight</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
u. a.	unter Anderem/n
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
VgR	Vitellogenin-Rezeptor
Vol.	Volumeneinheit
VTG	Vitellogenin
vWF	van Willebrand-Faktor
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid



**Veröffentlichungen**

**Stieb S**, Hoeger U, Schenk S (2008): A large discoidal lipoprotein present in only one of two closely related crayfish. *J. Comp. Physiol. B* 178: 755-765.

**Stieb S**, Schenk S, Hoeger U (2012): A rapid sensitive fluorescence based assay for lipids in biological samples. (in Vorbereitung)

Schenk S, **Stieb S**, Arnold P, Hoeger U (2012): Structural properties of large discoidal lipoproteins in two different invertebrates, annelid and crayfish. (in Vorbereitung)

**Tagungsbeiträge**

**Stieb S**, Schenk S, Hoeger U (2008): A novel discoidal high-density-lipoprotein in Crustacea – a prototype in lipoprotein architecture? 101. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Jena

**Stieb S**, Hoeger U (2009): Lipoproteins and their receptors: news from an extraordinary crayfish, *Astacus leptodactylus*. 102. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Regensburg

**Stieb S**, Hoeger U (2010): Lipoprotein endocytosis and storage in hemocytes of the crayfish, *Astacus leptodactylus*. 103. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Hamburg

**Kooperationspartner**

Vielen Dank an unsere Kooperationspartner:

**xxx**, Department of Life Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Israel

**xxx**, Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**xxx**, Institut für Zoologie, Abteilung für Molekulare Tierphysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

---

Diese Arbeit untersucht zwei Lipoproteine, das discoidale *High density*-Lipoprotein (dHDL) und das  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein (BGBP) aus dem Flusskrebs *Astacus leptodactylus* in funktioneller, struktureller und phylogenetischer Hinsicht. Die Nukleotid-Sequenz des BGBP konnte nahezu vollständig entschlüsselt werden. Dabei errechnet sich aus der abgeleiteten Aminosäure-Sequenz ein Molekulargewicht von 153 kDa. Das reife BGBP hat nur eine molekulare Masse von 105 kDa. Vermutlich kommt es durch eine Furin-ähnliche Protease zu einer post-translationalen N- und C-terminalen Prozessierung: zwei bisher nicht beschriebene, aber auch in der BGBP-Sequenz von anderen höheren Krebsen vorhandene, typische Furin-Schnittstellen (RAKR, bzw. RARR) wurden anhand von Sequenzvergleichen identifiziert. BGBP hat zwei Funktionen: zum Einen ist es für den Transport und die Aktivierung des proPhenoloxidase-Systems zuständig, zum Anderen für die Versorgung der Organe mit Lipiden, welche vermutlich der Energiegewinnung dienen. Eine 100 kDa große, BGBP-bindende Rezeptor-Fraktion konnte in Hämocyten-Membranen identifiziert werden.

Das Vorkommen von dHDL war aus eigenen Befunden bisher ausschließlich in *Astacus leptodactylus* bekannt, doch konnte in dieser Arbeit ein mit dem dHDL-Antikörper reagierendes Protein erstmalig auch in anderen Arthropoden-Spezies nachgewiesen werden. Die discoidale Form und das Untereinheiten-Muster (240 + 85 kDa) sind typisch für die bei Vertretern ursprünglicher Tiergruppen gefundenen Lipoproteine (z.B. beim Cheliceraten *Limulus* und beim Polychaeten *Nereis*). Eventuell handelt es sich bei dHDL also um einen ‚Prototypen‘ in der Lipoprotein-Evolution. Obwohl die Sequenz des dHDL auf Nukleotid-Ebene unbekannt ist, wurden die Sequenzen einiger dHDL-Peptide aus massenspektroskopischen Analysen gewonnen. Überraschenderweise befinden sich diese Sequenzen in der Aminosäuresequenz des BGBP. Dabei liegen alle Peptide am N- und/oder am C-Terminus der abgeleiteten BGBP-Aminosäure-Sequenz, und zwar in den Bereichen, die vermutlich durch das erwähnte Furin vom BGBP abgeschnitten werden, im reifen BGBP also gar nicht mehr vorkommen. Deshalb ist zu vermuten, dass BGBP und dHDL ein gemeinsames Vorläuferprotein haben und durch Genduplikation entstanden sind, oder dass es sich beim dHDL- und beim BGBP-Gen um ein und dasselbe Gen handelt. Das Genprodukt wird dann auf unterschiedliche Weise prozessiert und es entstehen die beiden Proteine dHDL und BGBP. Die Funktion von dHDL ist noch nicht eindeutig geklärt, es ließen sich aber dHDL-bindende Rezeptor-Fractionen mit einer molekularen Masse von 160 kDa in somatischen Geweben (Muskel, Darm, Hepatopankreas, Kiemen und Samenleiter) sowie in Oocyten und Hämocyten nachweisen. Deshalb wird vermutet, dass dHDL als Energielieferant in Stoffwechsel-aktiven Organen und als Speicherprotein in Oocyten dient. Eine endocytotische Aufnahme konnte gezeigt werden.

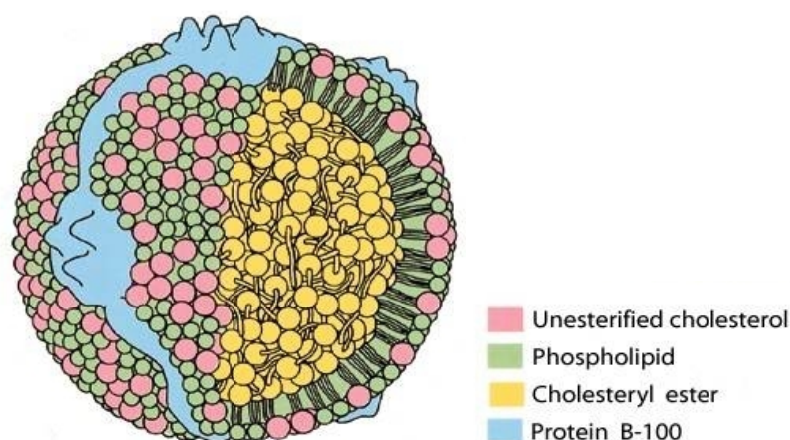
## 2 EINLEITUNG

### 2.1. Lipoproteine und Lipide

Lipide sind für alle Organismen von zentraler Bedeutung, denn sie sind Hauptbestandteil der Zellmembran und so die Grundvoraussetzung für zelluläres Leben. Das ist jedoch nicht ihre einzige Aufgabe. Lipide haben vielmehr noch ein ganzes Spektrum weiterer Funktionen (siehe 2.1.2. Lipide). Sie dienen als Speicher für Energie, wirken als Hormone und Vitamine, isolieren Nervenfasern und sammeln Lichtenergie (Purves *et al.*, 2006). Diese kleine Auswahl an Funktionen macht deutlich, wie wichtig Lipide für jeden Organismus sind; und wie wichtig es ist, dass sie bei Bedarf immer an den richtigen Ort gebracht werden, um dort wirken zu können. Die Proteine, die für den Transport der Lipide verantwortlich sind, heißen Lipoproteine und werden im Folgenden näher vorgestellt.

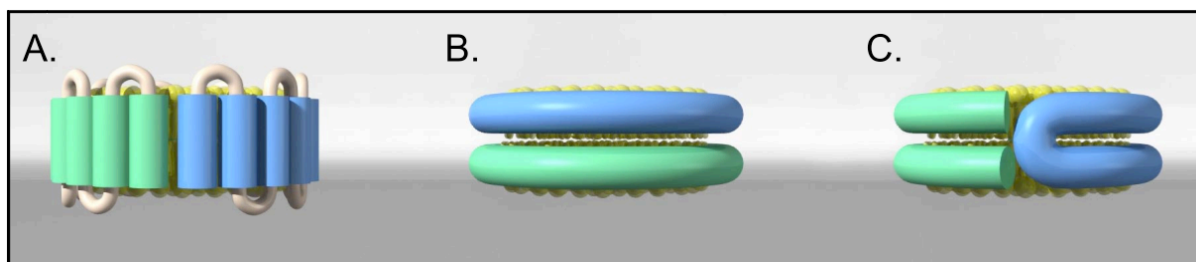
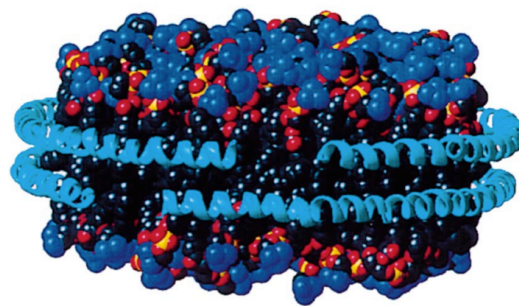
#### 2.1.1. Lipoproteine

Lipoproteine sind die Partikel, die Lipide im Blut, in der Hämolymphe oder auch intrazellulär transportieren. Sie bestehen aus zwei Komponenten; den Lipiden und den Apolipoproteinen. Die Apolipoproteine müssen so aufgebaut und angeordnet sein, dass sie mit einer hydrophoben Seite die Lipide komplexieren können, während sie mit einer hydrophilen Seite den Komplex nach außen wasserlöslich machen (siehe Beispiel in Abbildung 1).



**Abbildung 1. Schematische Darstellung eines humanen *Low Density-Lipoprotein (LDL)*-Partikels.** Das Apolipoprotein B-100 komplexiert die Lipide. Im Inneren des typischerweise globulären Komplexes befinden sich die unpolaren Neutrallipide, welche von den Apolipoproteinen und den polaren Phospholipiden umgeben werden. (aus Stryer *et al.*, 2003)

Neben den hauptsächlich vertretenen globulären Lipoprotein-Partikeln gibt es aber auch Lipoproteine mit einer discoidalen Form. Dazu gehört unter Anderem das humane *High Density*-Lipoprotein (HDL) mit seinem Apolipoprotein A-I, welches zumindest im naszierenden Zustand discoidal vorliegt, bevor es zu einem reifen sphärischen Partikel reift (Yokoyama, 1998). Für die Anordnung der Apolipoproteine in discoidalen Lipoproteinen gibt es verschiedene Modelle, und zwar das ‚*Picket fence*‘-Modell, das ‚*Double belt*‘-Modell und das ‚*Hair pin*‘-Modell (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2. Schematischer Aufbau des humanen discoidalen *High density*-Lipoproteins (HDL) mit seinem Apolipoprotein A-I.** Oben: *Ribbon*-Struktur des humanen discoidalen HDL nach dem ‚*Double belt*‘-Modell (blau: Cholin-Kopfgruppe, rot: Sauerstoffatome, gelb: Phosphoratome, schwarz: alle anderen Atome). (aus Segrest *et al.*, 2000) Unten: Drei mögliche Modelle der Apolipoprotein-Anordnung; A: ‚*Picket fence*‘-Modell, B: ‚*Double belt*‘-Modell, C: ‚*Hair pin*‘-Modell (gelb: Lipide, grün und blau: Apoproteine). (aus Martin *et al.*, 2006)

Je nachdem, wie das Massenverhältnis von Lipiden und Apolipoproteinen ist, verändert sich die Dichte der Lipoproteine. Deshalb kann man sie anhand ihrer Schwebdichte im Kaliumbromid-Dichtegradienten in fünf Klassen einteilen (Chapman, 1980). Dabei kann die Dichte zwischen 0,9 g/ml (Dichte von reinem Lipid) und 1,4 g/ml (Dichte von reinem Protein) schwanken:

- *Very low density*-Lipoproteine (VLDL's)  $\rho = < 1,006 \text{ g/ml}$
- *Intermediate density*-Lipoproteine (IDL's)  $\rho = 1,006 - 1,019 \text{ g/ml}$
- *Low density*-Lipoproteine (LDL's)  $\rho = 1,019 - 1,063 \text{ g/ml}$
- *High density*-Lipoproteine (HDL's)  $\rho = 1,063 - 1,210 \text{ g/ml}$
- *Very high density*-Lipoproteine (VHDL's)  $\rho = > 1,210 \text{ g/ml}$ .

Bei allen oviparen Lebewesen kann man die Lipoproteine grob in die geschlechtsunabhängigen Lipoproteine und die weibchen-spezifischen Dotterproteine (Vitellogenine / Vitelline) einteilen. In dieser Arbeit wird der Fokus ausschließlich auf die geschlechtsunabhängigen Lipoproteine gelegt.

Die bis jetzt bekannten elf Apolipoproteine der Säugetiere sind sehr gut untersucht, denn sie spielen bei zahlreichen humanen Krankheiten eine Rolle (zum Beispiel bei Typ II Diabetes mellitus, Adipositas und Arteriosklerose) (Taskinen, 2005). Auch zu den Lipoproteinen der fliegenden Insekten (hier werden die Lipoproteine Lipophorine genannt) gibt es zahlreiche Publikationen (siehe Übersichten bei Chino *et al.*, 1981, Kashiwazaki *et al.*, 1985, Van der Horst, 1990, Canavoso *et al.*, 2001, Van der Horst *et al.*, 2002, Rodenburg *et al.*, 2005, Weers *et al.*, 2006). Abgesehen von den Insekten sind jedoch die verschiedenen Gruppen der Invertebraten in Hinblick auf ihre Lipoproteine wenig untersucht. Dabei zeigen die verschiedenen Invertebraten auch die unterschiedlichen Stadien der Evolution tierischer Organismen; vergleichende Analysen der Lipoproteine verschiedener Invertebraten-Taxa könnten also sowohl eventuelle ‚Prototypen‘ in der Lipoprotein-Entwicklung zu Tage bringen, als auch allgemeine Einblicke in die Evolution der Wirbellosen auf biochemisch / physiologischer Ebene geben.

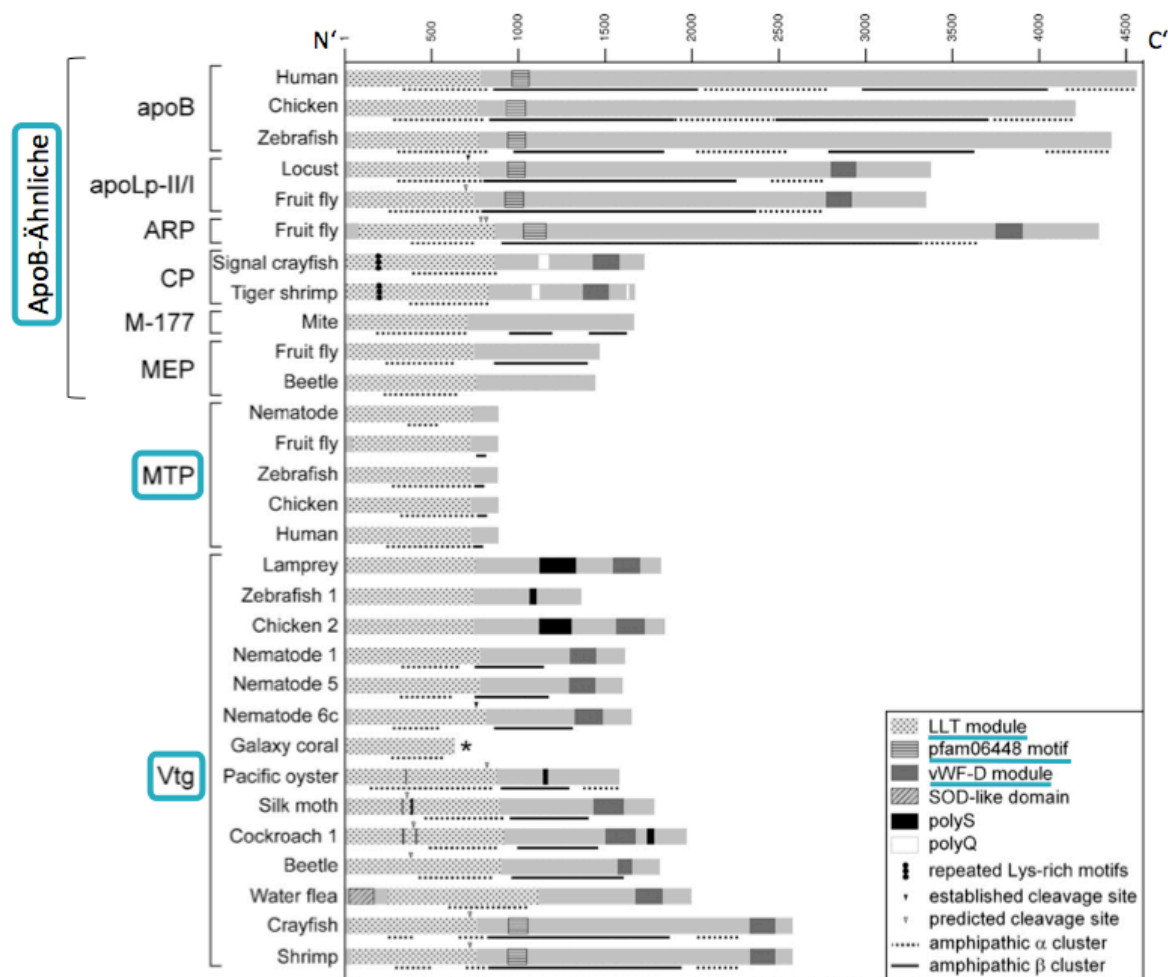
Bei Crustaceen wurden bislang zwei geschlechtsunabhängige Lipoproteine beschrieben, das sogenannte *Clotting*-Protein (CP), welches primär im Immunsystem der Tiere eine Rolle spielt und keinen wesentlichen Lipidtransport zeigt (Perazzolo *et al.*, 2005), und das  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein (BGBP), auf welches unten näher eingegangen wird. Nur der Flusskrebs *Astacus leptodactylus* besitzt offensichtlich ein weiteres, drittes Lipoprotein (Stieb *et al.*, 2008), das discoideale *High density*-Lipoprotein (dHDL). dHDL wurde bislang in keinem anderen Krebs gefunden und ist in seiner Struktur, verglichen mit den beiden anderen Lipoproteinen der Crustaceen, einzigartig. Auch dieses Protein wird unten eingehend beschrieben.

### Apolipoproteine

Die meisten Apolipoproteine gehören der Superfamilie der großen Lipidtransfer-Proteine (*Large lipid transfer*-Proteine - LLTP's) an. Diese Familie ist über das Vorhandensein einer N-terminalen, ca. 900 Aminosäuren langen Lipidbindedomäne (LLT-Modul) definiert und hat viele Mitglieder.

Anhand von Sequenzähnlichkeiten lassen sich die LLTP's in drei Familien gliedern; 1. die ApoB-ähnlichen LLTP's inklusive Lipophorine, 2. die Vitellogenin-ähnlichen LLTP's, und 3. die Mikrosomalen Triglycerid-Transfer-ähnlichen LLTP's (MTP's) (Babin *et al.*, 1999). Die Aufgabe der ApoB-ähnlichen LLTP's ist die Aufnahme und Verteilung von Lipiden aus der Nahrung. Apolipophorine kommen nur bei Insekten vor; sie sind mehrfach beladbare ‚Lipid-Shuttles‘, welche schnell Speicherlipide für die Flugmuskulatur mobilisieren (Ryan *et al.*, 2000). Die Vitellogenin-ähnlichen LLTP's fungieren als Dotterproteine, während die MTP's nicht für den Lipidtransport, sondern für die korrekte Faltung und intrazelluläre Lipidbeladung der anderen Lipoproteine zuständig sind. Außerdem können sie den *Turnover* der anderen Lipoproteine modulieren (Smolenaars *et al.*, 2007).

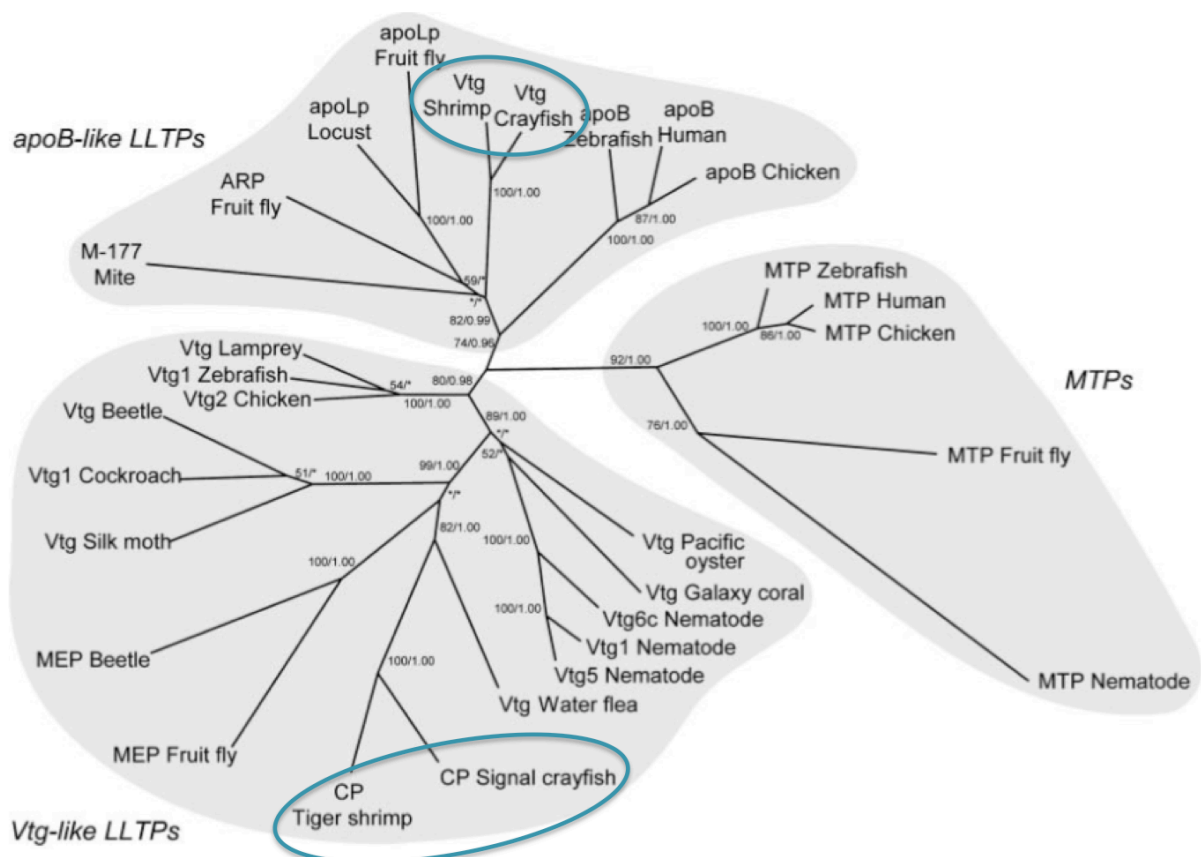
Die Größe der LLTP's schwankt erheblich zwischen ca. 600 und bis zu 4500 Aminosäuren. Es gibt drei strukturelle Motive, die vielen LLTP's gemeinsam sind: das LLT-Modul (siehe oben), die Pfam 06448-Domäne und die eher C-terminal gelegene von Willebrand-Faktor (vWF)-Domäne (siehe Abbildung 3). Da es sich um sezernierte Proteine handelt, befindet sich jeweils am N-Terminus die entsprechende Signalsequenz.



**Abbildung 3.** Domänenstruktur einiger LLTP's, eingeteilt in ihre drei Familien ApoB-ähnliche LLTP's, Mikrosomale Triglycerid-Transfer-ähnliche LLTP's (MTP's) und Vitellogenin (Vtg)-ähnliche LLTP's. Nahezu alle LLTP's weisen die drei charakteristischen Domänen Lipidbindedomäne (LLT-Modul), Pfam 06448-Domäne und van Willebrand-Faktor (vWF) - Domäne auf, in ihrer Größe variieren sie jedoch deutlich. (nach Smolenaars *et al.*, 2007)

Eine Besonderheit in der klassischen Einteilung der LLTP-Familien stellen ausgerechnet die Lipoproteine der Crustaceen dar. Auffällig ist, dass die Vitellogenine der Crustaceen mit den ApoB-Ähnlichen anstatt mit den Vitellogenin-ähnlichen LLTP's *clustern* (siehe Abbildung 4). Aus diesem Grund schlagen Avarre *et al.* (2007) eine alternative Bezeichnung der Crustaceen-Vitellogenine (die ja keine ‚echten‘ Vitellogenine sind) vor: Apolipocrustaceine. Diese Bezeichnung hat sich allerdings bisher nicht durchgesetzt. Aber auch die Crustaceen haben Vertreter unter den Vitellogenin-ähnlichen LLTP's, nämlich die *Clotting*-Proteine. Es bleibt die Frage, warum sich die ursprünglich Vitellogenin-ähnlichen LLTP's zu den geschlechtsunspezifischen *Clotting*-Proteinen gewandelt haben, während Vertreter der ApoB-ähnlichen LLTP's die Rolle der geschlechtsspezifischen Vitellogenine eingenommen haben (Smolenaars *et al.*, 2007, Avarre *et al.*, 2007, Hayward *et al.*, 2010, Babin *et al.*, 2009).





**Abbildung 4. Phylogenetischer Stammbaum (Maximum Likelihood (ML)) der großen Lipidtransfer-Protein (LLTP)-Superfamilie, berechnet anhand der Sequenz ihrer Lipidbindedomäne (LLT-Modul).** Die Zahlen geben die ML-Bootstrap-Werte und die Bayesianische posteriore Wahrscheinlichkeit an. Die ausgewählten Vertreter der LLTP's gliedern sich in drei Proteinfamilien: die Mikrosomalen Triglycerid-Transfer-ähnlichen LLTP's (MTP's), die ApoB-ähnlichen LLTP's und die Vitellogenin (Vtg)-ähnlichen LLTP's. Interessanterweise *clustern* die Vitellogenine der Crustaceen mit den ApoB-ähnlichen LLTP's, während die *Clotting*-Proteine (CP) der Crustaceen mit den Vitellogenin-ähnlichen LLTP's *clustern* (siehe grüne Umrandungen). (nach Smolenaars *et al.*, 2007)

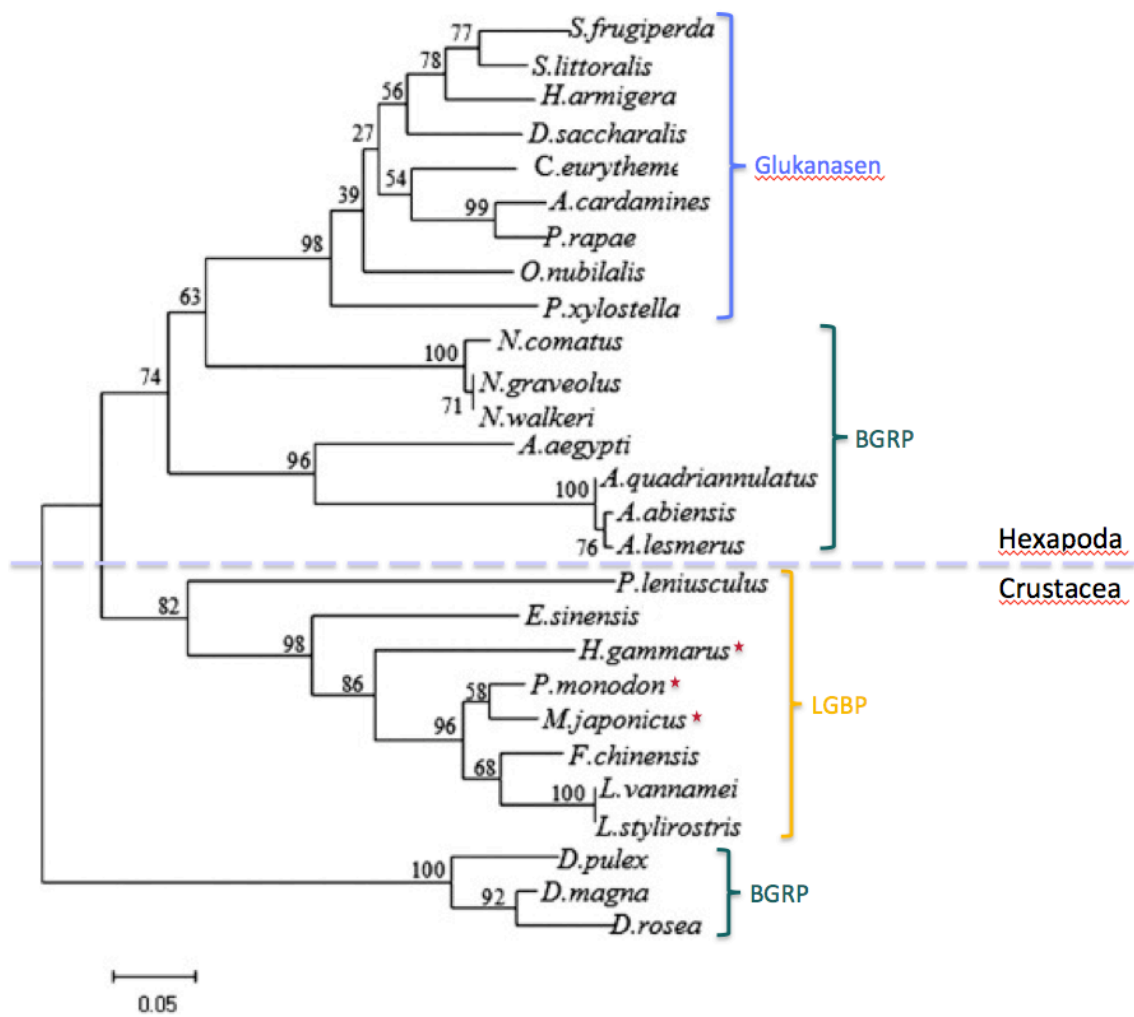
Das ebenfalls geschlechtsunabhängige Lipoprotein dieser Familie, das  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein, besitzt nicht die klassische Lipidbindedomäne LLT-Modul. Tatsächlich lässt sich die evolutive Abstammung der BGBP's nicht bei den Lipid-Transferproteinen finden. Eventuell kann stattdessen vermutet werden, dass die evolutive Herkunft der BGBP's bei den Glukan-bindenden Proteinen liegt, die BGBP's vielleicht eher mit Glukanasen verwandt sein könnten?

### $\beta$ -Glukan-bindende Proteine

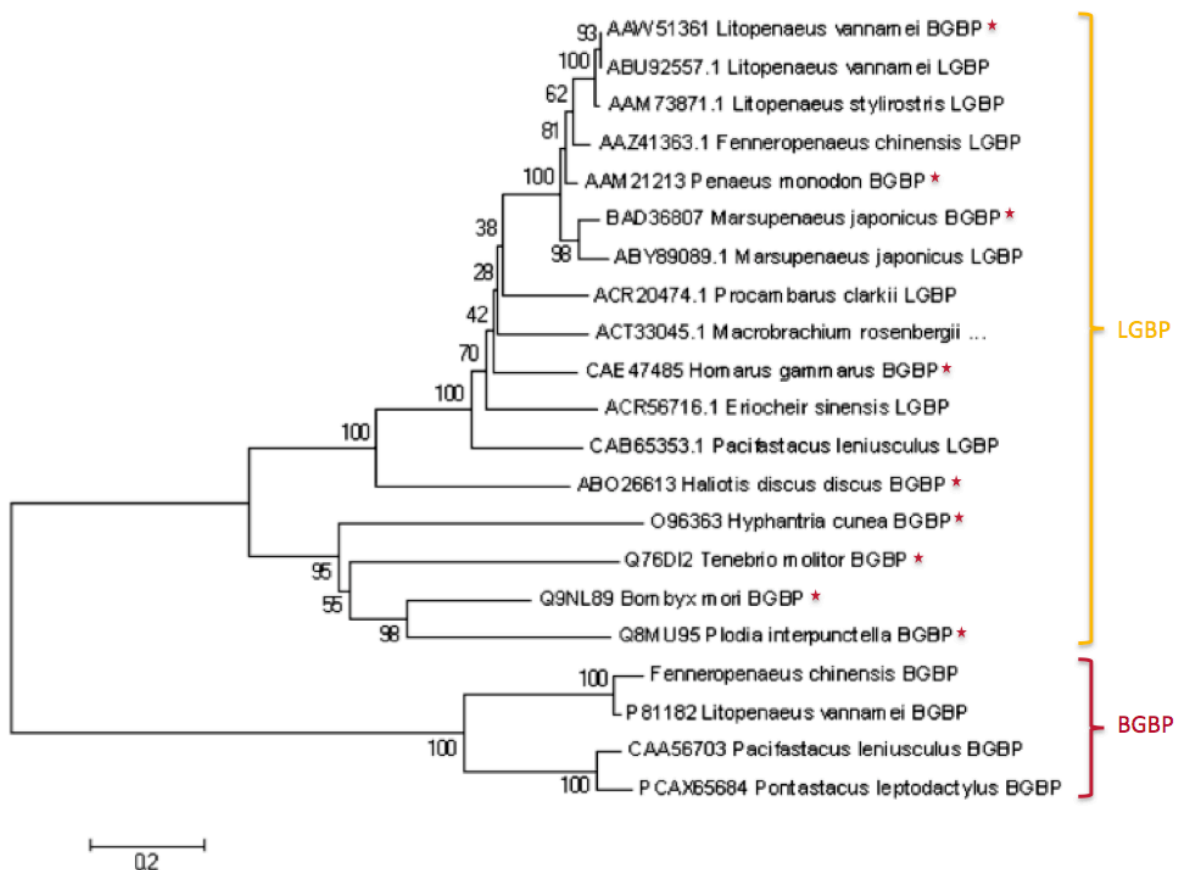
Die meisten Arthropoden (Hexapoda und Crustacea) haben vier Arten von  $\beta$ -1,3-Glukan-bindenden Proteinen: die Lipopolysaccharid-/ $\beta$ -Glukan-Bindeproteine (LGBP), die *High density*-Lipoproteine/ $\beta$ -Glukan-Bindeproteine (BGBP), die  $\beta$ -Glukan-Erkennungsproteine (BGRP) und die Glukanasen (Zhao *et al.*, 2009). Alle diese Proteinklassen haben eine

Glukanase-Domäne und eine  $\beta$ -Glukan-Bindedomäne, allerdings ist die Glukanase-Domäne in allen  $\beta$ -Glukan-bindenden Proteinen außer den Glukanasen inaktiv (Cerenius *et al.*, 1994). Das Vorhandensein dieser konservierten Domänen und die hohe Sequenzähnlichkeit der Proteine lassen darauf schließen, dass sie einen gemeinsamen Vorfahren haben und alle Isoformen desselben Gens sind, die durch Genduplikationen entstanden sind. Die  $\beta$ -Glukan-bindenden Proteine spielen alle eine Rolle im angeborenen Immunsystem der Invertebraten und können das pro-Phenoloxidase-System (proPO-System) aktivieren (Söderhäll *et al.*, 1992). Außerdem sind sie Glyko- und zum Teil Lipoproteine.

Leider sind nicht alle  $\beta$ -1,3-Glukan-bindenden Proteine konsistent benannt. Tatsächlich herrscht in den Datenbanken ziemliches ‚Nomenklatur-Chaos‘. Insbesondere die Unterscheidung zwischen den kurzen Lipopolysaccharid-/ $\beta$ -Glukan-Bindeproteinen ohne Lipidbindestelle (LGBP, ca. 1000 bp) und den längeren *High density*-Lipoproteinen/ $\beta$ -Glukan-Bindeproteinen mit Lipidbindestelle (BGBP, ca. 6400 bp) ist uneinheitlich und müsste dringend revidiert werden. Die Abbildungen 5 und 6 zeigen beide phylogenetische Stammbäume der Proteinfamilien LGBP, BGBP, BGRP und Glukanasen. Hier wird die uneinheitliche und zum Teil falsche Bezeichnung einzelner Familienmitglieder deutlich. Viele vermeintliche BGBP's sind in Wirklichkeit LGBP's. Eine Übersicht der in der Datenbank eingetragenen  $\beta$ -1,3-Glukan-bindenden Proteine mit inkorrektur Bezeichnung und einem Revisionsvorschlag findet sich im Anhang (siehe 8.1.). Im Verlauf dieser Arbeit werden ausschließlich die korrekten Bezeichnungen nach Anhang 8.1. verwendet.



**Abbildung 5. Phylogenetischer Stammbaum (Neighbour Joining (NJ)) der  $\beta$ -Glukan-Bindeproteine von einigen Hexapoden und Crustaceen basierend auf ihren Aminosäuresequenzen.** Die enge phylogenetische Verwandtschaft der drei  $\beta$ -Glukan-bindenden Proteine Glukanasen, Lipopolysaccharid-/ $\beta$ -Glukan-Bindeproteine (LGBP's) und  $\beta$ -Glukan-Erkennungsproteine (BGRP's) lassen auf einen gemeinsamen Vorfahren schließen, von dem sich die drei Proteinklassen ableiten. Zahlen geben *Bootstrap*-Werte an. Rote Sternchen markieren LGBP's, die in der Datenbank fälschlich als *High density*-Lipoproteine/ $\beta$ -Glukan-Bindeproteine (BGBP's) benannt sind. (verändert nach Zhao *et al.*, 2009)



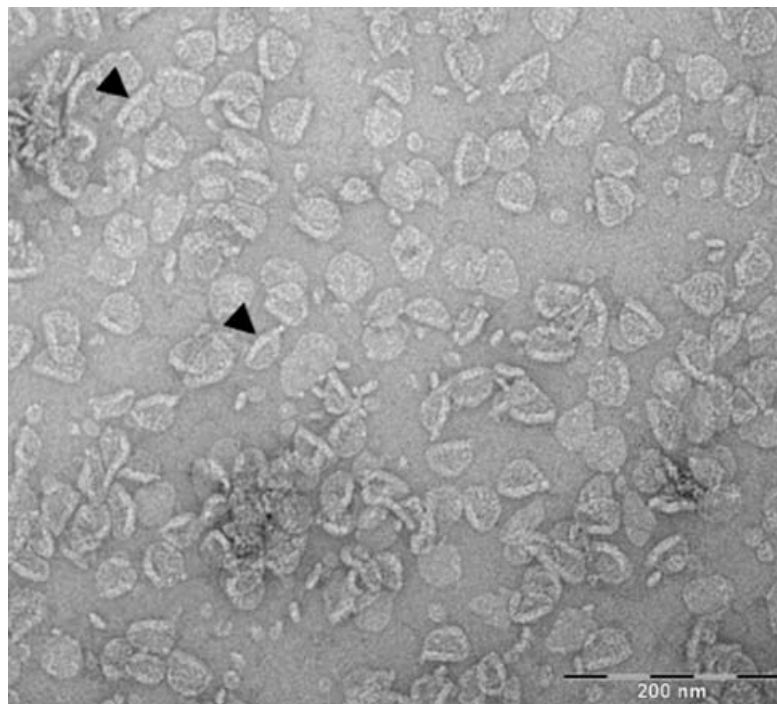
**Abbildung 6. Phylogenetischer Stammbaum (Neighbour Joining (NJ)) einiger Arthropoden-LGBP's und -BGBP's basierend auf ihren Aminosäure-Sequenzen.** High density-Lipoproteine/β-Glukan-Bindeproteine (BGBP's) und Lipopolysaccharid-/β-Glukan-Bindeproteine (LGBP's) gliedern sich deutlich auf verschiedene Äste des Stammbaums. Rote Sternchen markieren LGBP's, die in der Datenbank fälschlich als BGBP's benannt sind. (verändert nach Lai *et al.*, 2011)

Die Aminosäurezusammensetzung der BGBP's ist stark hin zu Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten verschoben. Glycin, Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin machen zusammen 34% der Aminosäuren aus (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998); wären sie gleichmäßig verteilt, dürften sie nur 23% ausmachen. Darin liegt wohl ihre Lipidbindeeeigenschaft begründet. Das für diese Arbeit relevante Lipoprotein BGBP von *Astacus leptodactylus* hat einen Lipidanteil von 25-30% (Stieb *et al.*, 2008).

Der Proteinanteil der BGBP's besteht aus einem Apolipoprotein mit einer molekularen Masse von ca. 110 kDa. Bisher sind die BGBP's der Garnelen *Fenneropenaeus chinensis* (Lai *et al.*, 2011) und *Litopenaeus vannamei* (Romo-Figueroa *et al.*, 2004), sowie der Flusskrebse *Astacus leptodactylus* (Stieb *et al.*, 2008) und *Pacifastacus leniusculus* (Cerenius *et al.*, 1994) bekannt. Die Expression von BGBP konnte in den Geweben Hepatopankreas, Muskel, Darm, Kiemen, sowie in den Hämocyten nachgewiesen werden (Lai *et al.*, 2011).

### Discoidales *High density*-Lipoprotein (dHDL)

Wie bereits oben erwähnt, handelt es sich bei dem Lipoprotein dHDL um ein im Crustaceen-Reich eher außergewöhnliches Lipoprotein. Äußerlich hebt sich es vor Allem durch seine Größe (natives Molekulargewicht von 930 kDa) und seine discoidale Form (Abbildung 7) von den anderen Lipoproteinen ab. Auch seine Lipidbindekapazität von 67% ist enorm. Dazu kommt ein für Crustaceen ungewöhnliches Muster an Apolipoproteinen; die zwei Untereinheiten haben Molekulargewichte von 240 und 85 kDa und liegen in einer 1:1-Stöchiometrie vor (Stieb *et al.*, 2008). Dieses Muster der Untereinheiten erinnert an die Apolipoprotein-Zusammensetzung der Insekten, denn auch die Lipophorine haben eine 240 und eine 80 kDa große Untereinheit (ApoLp II+I) (Van der Horst *et al.*, 2002), während elektronenmikroskopische Aufnahmen eine ähnlich discoidale Lipoprotein-Form bei *Limulus polyphemus* und *Nereis virens* zeigen (Schenk *et al.*, 2006 und Sven Schenk, mündliche Information).



**Abbildung 7. Elektronenmikroskopische Aufnahme des discoidalen Lipoproteins dHDL aus *Astacus leptodactylus*.** Die Proteine sind mit 2% (w/v) Uranyl-Acetat negativ kontrastiert. Einige der discoidalen Partikel stehen hochkant (Pfeile). Die Proteine haben einen Durchmesser von 42 nm. (aus Stieb *et al.*, 2008)

Sequenzinformationen zu diesem Protein liegen bisher weder auf Aminosäure- noch auf Nukleotidebene vor, ebenso ist bislang keine physiologische Funktion bekannt.

### 2.1.2. Lipide

Lipide sind wasserunlösliche Biomoleküle, die in organischen Lösungsmitteln wie Chloroform sehr gut löslich sind (Definition nach Stryer *et al.*, 2003). Eine chemische Definition dieser sehr heterogenen Stoffgruppe gibt es nicht, wohl aber eine Einteilung nach chemischen Gesichtspunkten. Die Einteilung variiert allerdings je nach Autor; außerdem gibt es Überschneidungen der verschiedenen Gruppen. So unterscheidet Latscha *et al.* (2002) Acylglyceride, Phospholipide und Glykolipide. Purves *et al.* (2006) unterscheiden nach eher biologischen Gesichtspunkten die sechs Gruppen Triglyceride, Phospholipide, Carotinoide, Steroide, Lipidvitamine und Wachse. Abgesehen davon kann man in polare- und Neutrallipide, in verseifbare und unverseifbare Lipide, oder in komplexe und einfache Lipide einteilen (Thiele, 1979). Es gibt noch viel mehr Arten der Einteilung; deshalb beschränke ich mich hier auf die für die ‚Lipoprotein-Forschung‘ relevanten Gruppen Triglyceride, Diglyceride, Phospholipide (ohne Sphingolipide) und Cholesterin.

MTP's und Vitellogenine können hauptsächlich Phospholipide binden, ApoB-Ähnliche auch Neutrallipide / Acylglyceride (ApoB-Ähnliche: Triglyceride, Lipophorine: Diglyceride).

#### Acylglyceride (Triglyceride / Diglyceride)

Triglyceride bestehen aus Glycerin, einem dreiwertigen Alkohol, dessen Hydroxylgruppen mit drei Fettsäuren verestert sind (siehe Abbildung 8). Bei Diglyceriden hingegen sind nur zwei der drei Hydroxylgruppen mit Fettsäuren verestert.

#### Phospholipide

Phospholipide sind ähnlich wie die Acylglyceride aufgebaut, mit dem Unterschied, dass eine Hydroxylgruppe des Glycerins mit einem Phosphorsäurerest verestert ist, an welchen in der Regel ein Alkohol gebunden ist (siehe Abbildung 8). Die biologisch wichtigsten Vertreter sind Phosphatidylcholin und -ethanolamin. Phospholipide bilden in wässrigem Milieu eine Lipiddoppelschicht aus und sind deshalb der Hauptbestandteil von Biomembranen.

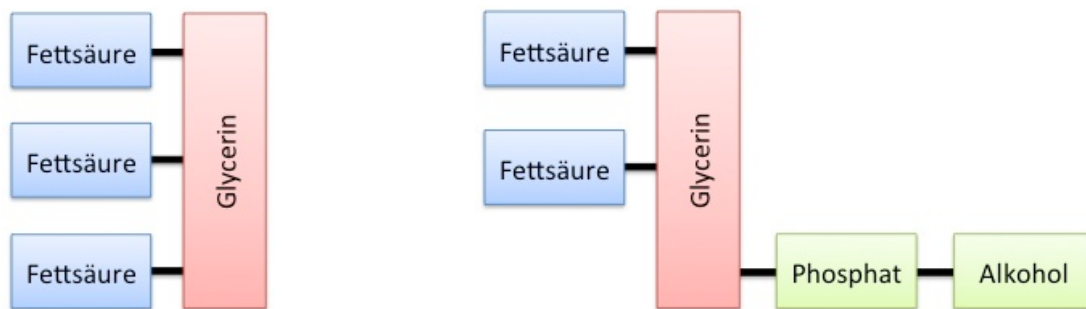


Abbildung 8. Strukturschema von a) Triglyceriden und b) Phospholipiden. (verändert nach Stryer *et al.*, 2003).

### Cholesterin:

Cholesterin (siehe Abbildung 9) gehört zur Gruppe der Steroide, es ist also ein polyzyklischer Alkohol. Es wird in die Zellmembran eingebaut und erhöht so ihre Stabilität. Außerdem ist es Ausgangsmaterial für die Bildung von Steroidhormonen. Unter den Invertebraten können mindestens Arthropoden Cholesterin nicht selbst synthetisieren, sondern sind auf eine Zufuhr durch die Nahrung angewiesen (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998).

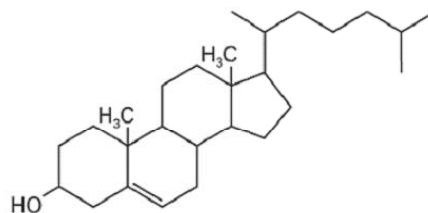


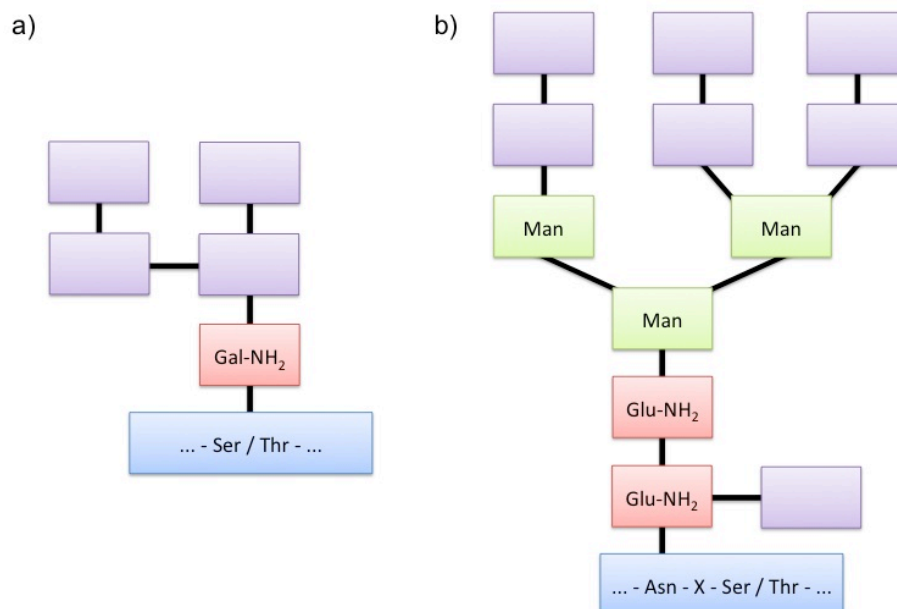
Abbildung 9. Strukturformel von Cholesterin.

Die biologische Relevanz der Lipide spiegelt sich in den verschiedensten Funktionen wider. Als Hauptmembrankomponente jeder Zelle nehmen Phospholipide wichtige strukturelle Aufgaben wahr. Durch ihre hohe Energiedichte und enge (hydratwasserfreie) Packbarkeit spielen Acylglyceride eine wichtige Rolle als Energielieferant und -speicher. Zudem gibt es zahlreiche Lipidhormone, Lipidvitamine und Lipidpigmente.

## Lipoglykoproteine / Glykosylierung

(Rehm, 2006, Stryer *et al.*, 2003, Parodi, 2000)

Unter Proteinglykosylierung versteht man eine kovalente Bindung von Kohlenhydraten an ein Protein. Bei Lipoproteinen ist diese Bindung sehr häufig, so dass man auch von Lipoglykoproteinen sprechen kann. Man unterscheidet die beiden Arten O- und N-Glykosylierung. Bei der O-Glykosylierung sind die Oligosaccharide an das Sauerstoffatom in der Seitenkette von Serin oder Threonin gebunden und in der Regel kurz (bis zu vier Monosaccharide). Bei der N-Glykosylierung sind die Kohlenhydrate an das Stickstoffatom der Amidgruppe in der Seitenkette des Asparagins gebunden. Dies kann jedoch nur geschehen, wenn auf das Asparagin nach einer beliebigen Aminosäure (außer Prolin) ein Serin oder Threonin folgt (Asn - X - Ser / Thr). Bei N-Glykosylierungen findet man immer dieselbe Grundstruktur bestehend aus zwei N-Acetylglukosamin- und drei Mannoseresten. An diese Grundstruktur werden weitere Zucker gebunden, die reich verzweigt sein können. Je nachdem, ob es sich um einen mannose-reichen oder einen komplexen Typ handelt, werden mehrere Mannosereste oder eben andere Zucker gebunden (siehe Abbildung 10).



**Abbildung 10. Beispielhafter schematischer Aufbau von a) O-glykosidisch und b) N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden.** O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide sind immer über ein Gal-NH<sub>2</sub> mit Serin- oder Threoninresten des Proteins (blau) verbunden. Lila Kästchen stehen für beliebige Monosaccharide. (Gal-NH<sub>2</sub>: N-Acetylgalaktosamin, Glu-NH<sub>2</sub>: N-Acetylglukosamin, Man: Mannose, Ser: Serin, Thr: Threonin, Asn: Asparagin, X: beliebige Aminosäure) (nach Kornfeld *et al.*, 1985)



Ob ein Protein glykosyliert wird und welche der potentiellen Aminosäuren tatsächlich mit Zuckern beladen werden, hängt unter Anderem von der Spezies, der Proteinstruktur, dem Alter und dem Zustand des Organismus, sowie vom Zelltyp ab, in dem das Protein transkribiert wird. Außerdem handelt es sich um einen dynamischen Prozess; Kohlenhydrate können innerhalb des Golgi-Apparates an- und wieder abgehängt werden. Das bedeutet, dass ein Protein mehrere Glykoformen haben kann.

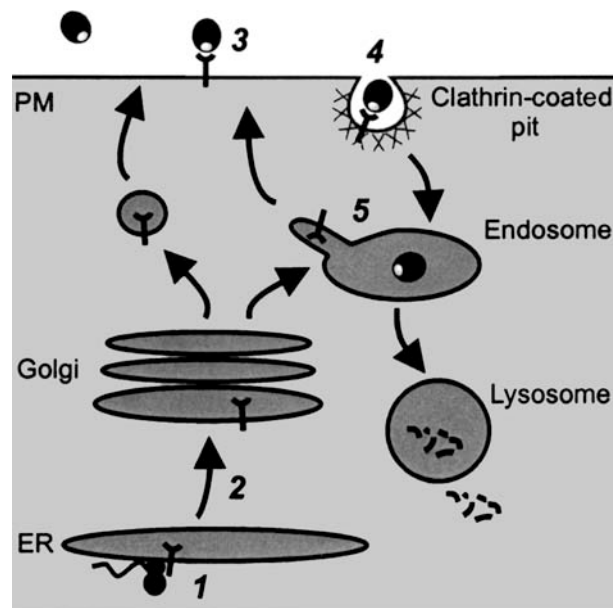
Die Glykosylierung geschieht im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (N-Glykosylierung) und im Golgi-Apparat (N- und O-Glykosylierung).

Die Proteinglykosylierung kann verschiedene Funktionen haben. Zum Einen schützen die Zuckerketten das Protein vor Abbau durch Proteasen, aber auch (Rezeptor-) Affinität, Aktivität, korrekte Faltung, intrazellulärer Transport und Sekretion spielen eine Rolle.

## 2.2. Lipoprotein-Rezeptoren

Die Familie der Lipoprotein-Rezeptoren hat viele Mitglieder, die sich in ihrer Größe und Funktion zum Teil erheblich voneinander unterscheiden. In phylogenetischen Analysen (*Maximum Likelihood*) *clustern* sie in acht Gruppen, nämlich in die Vitellogenin-Rezeptoren (VgR) der Insekten, die Megaline, die Megalin-Ähnlichen, die Lipoprotein-receptor-related-Proteine-1 (LRP1), die Lipophorin-Rezeptoren (LpR), die LDL-Rezeptoren (LDLR), die Lipoprotein-receptor-related-Proteine-8 (LRP8) und die Vertebraten-VgR-VLDL-Rezeptoren (Ciudad *et al.*, 2007).

Lipoprotein-Rezeptoren sind für die Erkennung, Bindung und Internalisierung von Lipoproteinen zuständig (siehe Abbildung 11). Aber interessanterweise haben sie noch viele weitere Aufgaben. Dazu gehören unter Anderen die Aufnahme von Makromolekülen (wie zum Beispiel Protease-/Protease-Inhibitor-Komplexe) und sie spielen eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation durch Beteiligung in vielen Signalwegen (Willnow *et al.*, 2007). Als pathologische Funktionen sind die Beteiligung an der Alzheimer Erkrankung durch die Bindung des *Amyloid precursor*-Proteins (APP) und des A $\beta$ -Peptids sowie eine Beteiligung bei der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum zu nennen (Dieckmann *et al.*, 2010).



**Abbildung 11. Schematischer Überblick über den Weg eines LDL-Rezeptors.** 1. Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) findet die korrekte Faltung des Rezeptors statt. 2. Durch die Golgi-Kompartimente wird der Rezeptor an die Zellmembran (PM) transportiert, wo dann 3. die Ligandenerkennung und -bindung stattfindet. 4. Nach Clathrin-vermittelter Endocytose gelangen die Lipoprotein-/Lipoprotein-Rezeptor-Komplexe in die sauren Endosomen (5.), wo die Dissoziation von Lipoproteinen und Rezeptoren erfolgt. Die Lipoproteine werden in Lysosomen degradiert, während die Rezeptoren *recyclet* werden und erneut an die Zellmembran gelangen (5.). (aus Gent *et al.*, 2004)

Mitglieder der Familie der LDLR's haben sich offensichtlich nicht gerade in einem langsamen evolutiven Prozess entwickelt. Im Gegenteil; es muss schon mehrere Vertreter direkt mit der Entstehung der mehrzelligen Lebewesen gegeben haben. Anders wäre es nicht zu erklären, dass bereits ein recht basaler mehrzelliger Organismus, der Nematode *Caenorhabditis elegans*, in seinem Genom gleich mehrere große und kleine LDLR's codiert, die jeweils humane Homologe haben und sich sogar in ihrer Exon- und Intronstruktur ähneln (Yochem *et al.*, 1993). Dies bedeutet, dass sich die Genfamilie sehr früh und schnell durch Genduplikationen entwickelt haben muss.

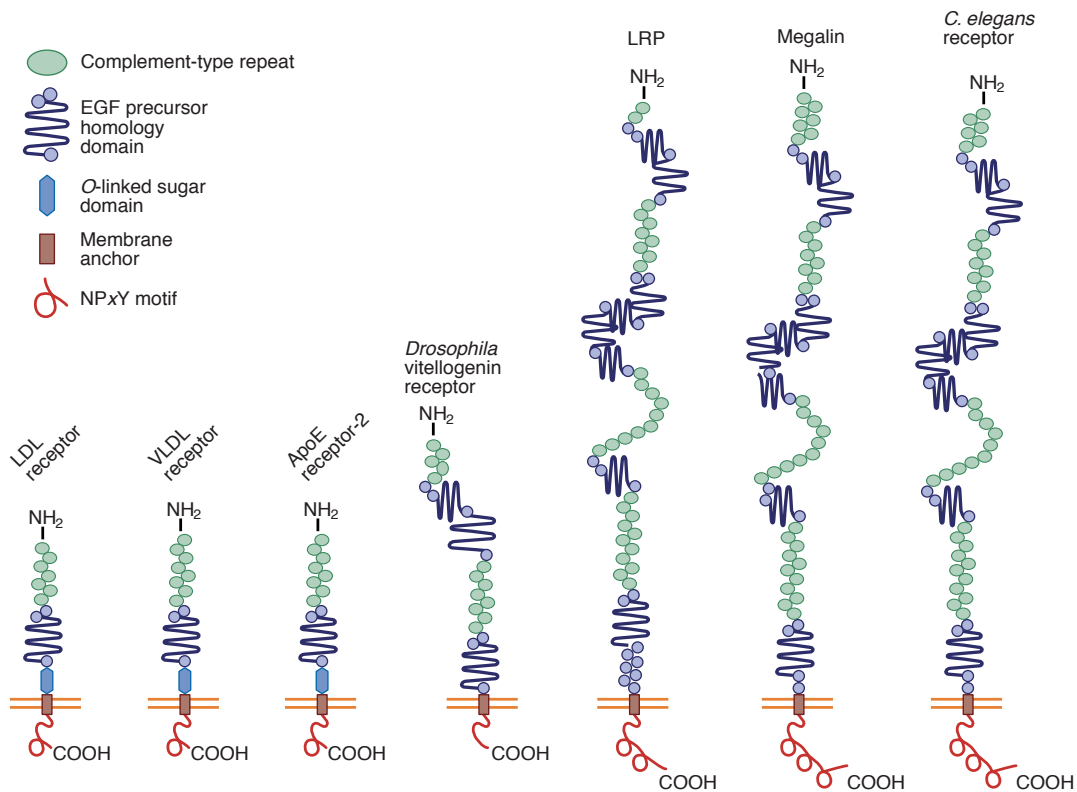
### 2.2.1. Struktureller Aufbau

Es gibt vier konstitutionelle und eine weitere optionale Domäne, die sich in allen Mitgliedern der Genfamilie finden (siehe Abbildung 12). Die fünf Domänen sind beginnend vom N-Terminus (Dieckmann *et al.*, 2010, Rodenburg *et al.*, 2006):

1. Die Liganden-Bindedomäne. Sie besteht aus mehreren Cystein-reichen *Repeats*, die für die Ligandenbindung verantwortlich sind. Je nach Anzahl und Art der *Repeats*

können verschieden viele Liganden mit unterschiedlicher Spezifität gebunden werden.

2. Die *Epidermal growth factor precursor homology* (EGF)-Domäne. Die EGF-Domäne besteht aus mehreren EGF-*Repeats* und YWTD-Propeller-Domänen, welche für die pH-abhängige Freisetzung der Liganden in den sauren Endosomen zuständig sind.
3. Optional: eine O-glykosidische Domäne, welche mehrere O-Glykosylierungsstellen enthält. Die Funktion dieser Domäne ist noch unklar (Gent *et al.*, 2004).
4. Die Transmembrandomäne ist für die Verankerung des Rezeptors in der Membran zuständig.
5. Der cytoplasmatische Schwanz. Hier befindet sich mindestens ein NPxY-Motiv, welches die Internalisierung des Rezeptor-Liganden-Komplexes in *Clathrin-coated Pits* bewirkt.



**Abbildung 12. Übersicht über die Vertreter der LDL-Rezeptor-Familie.** Alle Mitglieder sind aus denselben modularen Domänen aufgebaut, die teilweise mehrmals innerhalb eines Proteins vorkommen. (aus Willnow *et al.*, 1999)

### 2.3. Ziele der Arbeit

Das erst kürzlich entdeckte (Stieb *et al.*, 2008) und so außergewöhnliche Lipoprotein dHDL wirft viele Fragen auf. Noch ist, außer einigen strukturellen und biochemischen Eigenschaften, nichts über dieses Protein bekannt. Und das, obwohl es sich problemlos in größeren Mengen aus der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* isolieren lässt, also zu den hochexprimierten Proteinen gehört und demnach wohl physiologisch relevante Funktionen inne hat. Wie schon der Titel der vorliegenden Arbeit deutlich macht, sollen drei wesentliche Dinge bezüglich dieses Lipoproteins untersucht werden, und zwar die Struktur, die physiologische Funktion und die Phylogenie. Da es sich bei dHDL um ein Lipoprotein mit extremer Lipidbindekazapazität handelt, und es zusätzlich zum BGBP in *Astacus leptodactylus* vorkommt, wird natürlich auch die Funktion des BGBP in diesem Krebs hinterfragt werden müssen.

BGBP wird, wie alle Lipoproteine (außer den Lipophorinen), in Crustaceen über rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen. Es gibt also einen Rezeptor, welcher hochspezifisch BGBP binden und internalisieren kann (Duvic *et al.*, 1992). Geht man davon aus, dass auch dHDL über rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen wird, stellt sich auch hier die Frage nach dem Rezeptor. Hat dHDL einen ‚eigenen‘ Rezeptor? Dann muss man diesen zusätzlichen Rezeptor in *Astacus leptodactylus* finden können. Oder kann dHDL über andere Rezeptoren, zum Beispiel den BGBP-Rezeptor, aufgenommen werden?

Bisher gibt es keine Sequenzinformationen bezüglich dem auf Proteinebene entdeckten dHDL. Dabei ist gerade hier eine Sequenzanalyse wichtig, da sie eventuell zu interessanten phylogenetischen Erkenntnissen führen kann. Die Tatsache, dass strukturell dem dHDL ähnliche Proteine in verschiedenen niederen Tieren (z.B. Insekten, *Nereis virens* (Van der Horst *et al.*, 2002, Schenk *et al.*, 2006)) vorkommen, legt die Vermutung nahe, dass es sich evtl. um einen Vorläufer, einen ‚Prototypen‘ in der Lipoprotein-Entwicklung handeln könnte. Allein hier helfen nur Sequenzanalysen weiter. Deshalb ist ein Hauptanliegen dieser Arbeit, die Nukleotid-Sequenz des discoidalen Lipoproteins zu entschlüsseln.

Ob der Krebs *Astacus leptodactylus* eine Sonderrolle innerhalb der Crustaceen einnimmt, lässt sich durch vergleichende Untersuchungen herausfinden. Zum Einen müssen weitere

Krebse nach dHDL *gescreent* werden (mittels ELISA oder Sequenzanalyse), zum Anderen kann man Verwandtschaften auf Lipoprotein-Ebene auch auf der Ebene des BGBP sehen. Deshalb ist wichtig, die Sequenz des *Astacus leptodactylus*-BGBP zu entschlüsseln, um damit Stammbäume zu rechnen.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

---

### 3.1. Geräte

#### Waagen / Feinwaagen

XT 6200C-FR (Precisa)  
Sartorius research R 200 D (Sartorius)

#### Zentrifugen

Beckman Optima MAX™ Ultracentrifuge (Beckman Coulter)  
Rotor: TLA 110 (Festwinkel)  
Sorvall RC-5B (DuPont Instruments)  
Rotoren: HB-4 (Ausschwing), SS-34 (Festwinkel)  
Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf)  
Rotoren: A-4-44 (Ausschwing), F-34-6-38 (Festwinkel)  
Biofuge pico (Heraeus), Tischzentrifuge  
Centrifuge 5415 R (Eppendorf), Tischzentrifuge

#### Photometer

NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Peqlab)  
MR 5000, Mikrotiterplattenphotometer (Dynatech)  
Ultrospec 2100 pro (Amersham Biosciences)

#### Elektrophorese- und Blotapparaturen

MiniProtean 3 Vertikalelektrophoresekommer (10,1 x 8,2 cm, Gelstärke: 0,75 mm) (BioRad)  
Mini 440.000 Flachbettelektrophoresekommer für DNA-Gele (Harnischmacher)  
Blotapparatur (semi-dry) (Biotec-Fischer)  
GENIE® Electrophoretic Transfer: Genie Blotter (Idea Scientific)

#### Spannungsgeber

Power Station 300 Plus (Labnet International)

#### Schüttler

3011 (GFL)  
Promax 2020 (Heidolph)

#### Leuchttisch / UV-Tisch

Transilluminator TI 3 (Biometra)

#### Geldokumentation

CCD Video Camera Modul (Kaiser Fototechnik)  
Linsensystem, 49 mm (Kaiser)  
BioDocAnalyze, Software (Biometra)

**Vakuumpzentrifuge (SpeedVac)**

Vacuum Concentrator (Bachofer)

**Thermocycler**

T personal (Biometra)

T gradient (Biometra)

**Homogenisatoren**

SONOREX RK 156, Ultraschallbad (Bandelin)

LABSONIC 1510, Ultraschallgerät mit Spitzenaufsatz (B. Braun)

ULTRA-TURRAX® T8 (IKA)

**Fluoreszenzmikroskop**

DM6000 B (Leica Microsystems)

**Elektronenmikroskop und Zubehör**

Technai 12 (Philips)

Kamera: MegaView III (Olympus)

AnalySIS, Software (Olympus)

Vakuump-Beschichter (Edwards)

**HPLC**

Binäres Niederdruck-Gradientensystem (Kontron Instruments), bestehend aus:

- Pumpe 422
- HPLC Detektor 430
- Autosampler 360
- Steuer- und Auswertungssoftware: Chromeleon V.6.04 (Dionex GmbH)
- Säule: HemaBio 1000, 1 x 30 cm (Mz Analystechnik)

**Gefriertrocknungsanlage**

Alpha 2-4 (CHRIST)

**Mikrotom**

Microm HM 560 (MICROM)

**Rasterkraftmikroskop**

MFP-3D (Asylum Research)

**3.2. Versuchstiere**

Die in dieser Arbeit untersuchten Tiere sind Flusskrebse der Art *Astacus leptodactylus*. Die Tiere werden im Feinkostgeschäft ‚FrischeParadies‘ (Firma Edelfisch, Frankfurt) erworben.

### Haltung und Fütterung der Tiere

Die Haltung der Krebse erfolgt zu je fünf Tieren in 70 x 30 x 30 cm-Durchflusswasserbecken in einem klimatisierten Raum mit 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit bei 18°C. Verfüttert werden ein- bis zweimal wöchentlich tiefgekühlte Zuckmückenlarven und Futterchips für Krebse (Novo Crabs, JBL). Jungtiere bekommen dreimal wöchentlich kleingeriebenes Fisch-Flockenfutter (Novo Bel, JBL) gefüttert.

### **3.3. Verwendete Datenbanken und Software**

#### **Datenbanken**

NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>)

EXPASY (<http://expasy.org/>)

#### **Software**

BLASTN und BLASTP (Basic local alignment tool; [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome); Wheeler *et al.*, 2007)

CHROMAS (Version 2.01; Technelysium Pty Ltd 2005)

CLUSTALX (Version 2.0; <http://www.clustal.org/#Download>; Larkin *et al.*, 2007)

COBALT (Constraint-based Multiple Alignment Tool; Papadopoulos *et al.*, 2007)

CONSERVED DOMAINS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)

EXCEL (Microsoft® Excel® für Mac 2011, Version 14.0.0; Microsoft Corporation)

MASCOT (MASCOT MS/MS Ions Search; [http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS); Perkins *et al.*, 1999)

MRBAYES (Version 3.1.2; <http://mrbayes.csit.fsu.edu/index.php>; Huelsenbeck *et al.*, 2001, Ronquist *et al.*, 2003)

OGPET (Version 1.0; O-Glycosylation Prediction Electronic Tool; <http://ogpet.utep.edu/OGPET/index.php>)

OLIGO CALC (Oligonucleotide Properties Calculator; <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>; Kibbe, 2007)

PEPTIDECUTTER ([http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/); Gasteiger *et al.*, 2005)

PROTPARAM (<http://web.expasy.org/protparam/>; Gasteiger *et al.*, 2005)

PROTTEST (Version 2.4; <http://darwin.uvigo.es/software/protest.html>; Abascal *et al.*, 2005)

SEAVIEW (Version 4.2.4; <http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>; Gouy *et al.*, 2010)

SIGNALP (Version 3.0; <http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>; Kiefer *et al.*, 2009)

TRANSLATE (<http://web.expasy.org/translate/>)

YIN O YANG (Version 1.2; <http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang/>; Gupta *et al.*, 2002)



### 3.4. Verbrauchsmaterialien

#### Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich, Carl Roth, Fisher Scientific, AppliChem und Acros Organics und wurden in den höchstmöglichen Reinheitsgraden erworben.

Sonstige verwendete Chemikalien:

1,4-Diaza-bicyclo(2,2,2)-Oktan (DABCO; Carl Roth)  
Medium 199 mit Hanks Salzen (Sigma M9163)  
Rotiphorese<sup>®</sup> Gel A (Carl Roth), 30% Acrylamid-Lösung  
Rotiphorese<sup>®</sup> Gel B (Carl Roth), 2% Bisacrylamid-Lösung  
Tissue Tec (Richard-Allan-Scientific, Neg 50 Frozen Section Medium, Recorder No.: 6502)  
TRI Reagent<sup>®</sup> (Applied Biosystems)

#### Materialien

Amicon<sup>®</sup> Ultra-0.5 (Ultracel-30 Membrane; Millipore)  
Dialyseschläuche: Visking Typ 8/32 (Carl Roth), Visking Typ 20/32 (Carl Roth)  
MagneSphere<sup>®</sup> Magnetic Separation Products (Promega)  
Microtest Plate 96-Well, Flat Bottom (Sarstedt)  
Microtest Plate 6-Well, Flat Bottom (Sarstedt)  
Parafilm<sup>®</sup> M Verschlussfolie (Pechiney Plastic Packaging)  
Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter, steril, Porengröße 0,22 µm (Carl Roth)

#### Enzyme / Proteine / Nukleotide

Albumin Fraktion V (Carl Roth)  
Avidin-Peroxidase-Konjugat (Fluka)  
Concanavalin A aus *Canavalia ensiformis*, Biotin-Konjugat (Sigma-Aldrich)  
Deoxynucleotide Solution Mix, 10 mM pro Nukleotid (New England BioLabs)  
Lektin aus *Arachis hypogaea*, Biotin-Konjugat (Sigma-Aldrich)  
M-MuLV Reverse Transkriptase, 200.000 U/ml (New England BioLabs)  
Protease Inhibitor Cocktail for use with mammalian cell and tissue extracts (Sigma-Aldrich)  
Roth poly d(T)<sub>12-18</sub> -Primer (Carl Roth)  
Taq DNA Polymerase, 5.000 U/ml (New England BioLabs)

#### Kits

Dynabeads<sup>®</sup> mRNA DIRECT<sup>™</sup>-Kit (Invitrogen)  
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (C-Line) (PeqLab)  
peqGOLD Total RNA Kit (C-Line) (PeqLab)  
PolyATtract<sup>®</sup> System 1000 (Promega)  
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)  
ZAP Express<sup>®</sup> XR Library Construction Kit (Stratagene)

### 3.5. Protein- / DNA-Molekulargewichtsmarker

Die Bandenmuster der verwendeten Molekulargewichtsstandards befinden sich im Anhang (8.4.).

#### DNA-Marker

1kb-DNA-Ladder, 500 µg/ml (New England BioLabs)

#### Protein-Marker

SDS-6H2 (Sigma)

### 3.6. Antikörper

#### Primäre Antikörper

Es werden die folgenden primären Antikörper mit den angegebenen Verdünnungen eingesetzt (siehe Tabelle 1). Die Antikörper werden in 1% (w/v) BSA in PBT angesetzt.

**Tabelle 1. Übersicht über die eingesetzten primären Antikörper.** Außerdem ist ihre Herkunft und die eingesetzte Arbeitsverdünnung im Western-Blot angegeben. (BGBP:  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein, dHDL: discoidales *High density*-Lipoprotein, *Ast. lep.*: *Astacus leptodactylus*)

Antikörper	Antigen	Spenderorganismus	Eingesetzte Verdünnung	Bezogen von
$\alpha$ -BGBP	BGBP ( <i>Ast. lep.</i> )	Kaninchen	1:15.000	Pineda Antikörper Service
$\alpha$ -dHDL	dHDL ( <i>Ast. lep.</i> )	Kaninchen	1:15.000	

#### Sekundäre Antikörper

$\alpha$ -Kaninchen-IgG, Alkalische Phosphatase-Konjugat, aus Ziege (Sigma-Aldrich), eingesetzte Verdünnung: 1:10.000

$\alpha$ -Kaninchen-IgG, Peroxidase-Konjugat, aus Ziege (Sigma-Aldrich), eingesetzte Verdünnung: 1:2.500

$\alpha$ -Kaninchen-IgG, Alexa Fluor® 488, aus Ziege (Invitrogen), eingesetzte Verdünnung: 1:400

### 3.7. Puffer- / Lösungen

Hier sind nur die allgemein gebräuchlichen Puffer- und Lösungen aufgelistet. Speziellere Puffer- / Lösungen finden sich an entsprechender Stelle im Text.

<u>PBS</u>	<u>PBT</u>	<u>Dialysepuffer</u>
137 mM NaCl	137 mM NaCl	1 mM EDTA
2,7 mM KCl	2,7 mM KCl	in PBS
8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	pH 7,4
1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
pH 7,4	0,1% (v/v) Tween 20	
	pH 7,4	
<u>TBS I</u>	<u>TBS II</u>	<u>TBS III</u>
50 mM Tris-HCl	1 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl	1 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	347 mM NaCl
pH 7,5	1 mM MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	pH 7,5
	in TBS I	
<u>2x-Krebsringer</u>	<u>TAE-Puffer</u>	<u>HEPES-Puffer</u>
225 mM NaCl	40 mM Tris-HAc	10 mM HEPES
10 mM Na <sub>2</sub> -EDTA	1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA	150 mM NaCl
0,2 mM PMSF	pH 8	10 mM KCl
pH 7,1		2 mM MgCl <sub>2</sub>
		2 mM CaCl <sub>2</sub> (vorgelöst)
		pH 7
<u>Blockierungspuffer I</u>	<u>Blockierungspuffer II</u>	<u>Blockierungspuffer III</u>
5% (w/v) BSA	5% (w/v) BSA	5% (w/v) Magermilchpulver
in TBS I	in PBT	in PBT

### 3.8. Bakterien und Phagen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien und Phagen entstammen alle dem ZAP Express<sup>®</sup> XR Library Construction Kit (Stratagene, siehe 3.9.10., Erstellen und Immuno-Screening einer cDNA-Bank).

#### 3.8.1. Bakterien

##### Verwendete Bakterien

In Tabelle 2 findet sich eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme. Zusätzlich sind die Medien und Agars je nach Verwendungszweck angegeben.

**Tabelle 2. Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme, sowie deren Genotyp und Medien / Agars je nach Verwendung.** (aus Instruction Manual: „*Escherichia coli* Host Strains“, <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200256.pdf>)

Stamm	Genotyp	Agar und Medien für Bakterienkultivierung und Glycerin-Stammkulturen	Medien für Kulturen vor der Phagen-Anheftung	Agar und Top Agar für Plaque-Bildung	Agar für Exzisionsprotokoll
<b>XL1-Blue MRF'</b>	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\Delta} \Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)]}$	LB-Tetrazyklin	LB-Medium mit Zusätzen	NZY	-
<b>XLOLR</b>	$\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\Delta} \Delta\text{M15 Tn10 (Tet}^{\text{r}}\text{)] Su}^{\text{r}}$ (nonsuppressing) $\lambda^{\text{r}}$ (lambda resistant)	LB-Tetrazyklin	LB-Medium mit Zusätzen	-	LB-Kanamycin
<b>VCS257</b>	Derivat von DP50 $\text{supF}^{\text{c}}$ : $\text{supE44 supF58 hsdS3(r}_B\text{ m}_B\text{)} \text{dapD8 lacY1 glnV44 } \Delta(\text{gal-uvrB})47 \text{ tyrT58 gyrA29 tonA53 } \Delta(\text{thyA57})$	LB	LB-Medium mit Zusätzen	NZY	-

### Medien und Agars

#### LB-Medium

10 g NaCl  
10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O  
pH 7  
autoklavieren

#### NZY-Medium

5 g NaCl  
2 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
5 g Hefeextrakt  
10 g Pepton  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O  
pH 7,5  
autoklavieren

#### SM-Puffer

5,8 g NaCl  
2 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
50 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,5  
5 ml 2% (w/v) Gelatine

#### LB-Medium mit Zusätzen

1 l LB-Medium  
10 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> (steril-filtriert)  
10 ml 20% (w/v) Maltose (steril-filtriert)

#### NZY-Agar

5 g NaCl  
2 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
5 g Hefeextrakt  
10 g Pepton  
15 g Agar  
ad 1 l dH<sub>2</sub>O  
pH 7,5  
autoklavieren,  
in Petrischalen gießen  
( $\varnothing = 15 \text{ cm}$ )

#### LB-Agar

20 g Agar  
1 l LB-Medium  
autoklavieren,  
in Petrischalen gießen  
( $\varnothing = 9 \text{ cm}$ )

#### NZY-Top-Agar

0,7% (w/v) Agarose  
1 l NZY-Medium  
autoklavieren

ad 1 l dH<sub>2</sub>O

### **Antibiotika-Stammlösungen**

10 mg/ml Tetrazyklin

10 mg Tetrazyklin  
ad 1 ml 70% EtOH  
steril-filtriert

50 mg/ml Kanamycin

50 mg Kanamycin  
ad 1 ml dH<sub>2</sub>O  
steril-filtriert

100 mg/ml Ampicillin

100 mg Ampicillin  
ad 1 ml dH<sub>2</sub>O  
steril-filtriert

### **IPTG- und X-Gal-Stammlösungen**

1,05 M IPTG-Stammlösung

1,05 M IPTG  
in dH<sub>2</sub>O  
steril-filtriert

50 mg/ml X-Gal-Stammlösung

50 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktosid  
ad 1 ml DMF

Auf die Agar-Platten werden 40 µg/ml IPTG- und 50 µg/ml X-Gal-Stammlösung verteilt (die IPTG- und X-Gal-Stammlösungen werden dafür direkt in die Agar-, bzw. Top Agar-Lösung gegeben).

### **Bakterienkultivierung**

Die Bakterien werden wöchentlich auf frische Agarplatten ausgestrichen. Hierzu wird mit einer sterilen Impföse eine Kolonie gepickt und ein Vereinzelausstrich durchgeführt. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend, mit Parafilm<sup>®</sup> abgedichtet, bei 4°C gelagert. Aus Tabelle 2 geht hervor, welche Bakterienstämme auf welchen Agarplatten ausgestrichen werden.

### **Ansetzen von Gebrauchs-Bakterienlösungen**

Die Bakteriophagen gelangen über das Maltosetransportsystem in die Bakterien. Um deshalb die Expression von Maltoserezeptoren vor der Phagenzugabe zu initiieren, wird dem Medium für die Gebrauchs-Bakterienlösung Maltose zugesetzt. Im Gegensatz dazu dürfen Antibiotika nicht zugesetzt werden, da diese, genau wie die Phagen, an die Pili der Bakterien binden und diese dann nicht für die Phagen-Anheftung zur Verfügung stehen würden.

Mit einem sterilen Zahnstocher wird eine einzelne, maximal zwei Tage alte Bakterienkolonie gepickt und in 50 ml LB-Medium mit Zusätzen (u.a. Maltose, siehe 3.7. Puffer- / Lösungen) solange bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis die Suspension eine optische Dichte von OD<sub>600</sub> =

0,5 erreicht hat. Anschließend werden die Bakterien pelletiert (10 Minuten, 1000 x g, RT) und in 25 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert. Diese Bakterienlösung kann bei 4°C bis zu 2 Wochen gelagert werden. Vor Gebrauch wird die Lösung mit 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung auf OD<sub>600</sub> = 0,5 eingestellt.

### **Ansetzen von Glycerin-Stammkulturen**

10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (siehe Tabelle 2) werden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bis zur späten Log-Wachstumsphase inkubiert. Dann werden 4,5 ml sterile Glycerin/Medium-Lösung (1:1) zu den Bakterien gegeben und gut gemischt. Je 1 ml-Aliquots werden bei -80°C gelagert.

### **Photometrische Dichtebestimmung von Bakteriensuspensionen**

Die Dichtebestimmung von Bakteriensuspensionen erfolgt durch eine Absorptionmessung im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm.

## **3.8.2. Phagen**

### **Verwendete Phagen**

- ZAP Express-Vektor (1 µg/µl) → λ-Phagen\*
- ExAssist interference-resistant-Helferphage (~1 x 10<sup>10</sup> pfu/ml)
- R408 interference-resistant-Helferphage (~7,5 x 10<sup>10</sup> pfu/ml)

\* Nach Verpacken des ZAP Express-Vektors mit dem Packaging Extrakt werden daraus λ-Phagen. Allerdings fehlen diesen λ-Phagen die M13-Gene zur Exzision und Rezirkularisierung von Phagmiden. Diese M13-Gene werden durch Co-Infektion der Bakterien mit den Helferphagen, welche Varianten des M13-Phagen sind, zugesteuert. Also kann es nur bei Co-Infektion mit den Helferphagen zu einer *in vivo*-Exzision des pBK-CMV-Phagemid-Vektors aus dem ZAP Express-Vektor kommen. Der pBK-CMV-Phagemid-Vektor ist in den ZAP Express-Vektor integriert; die Start- und Endpunkte der Phagenreplikation (f1 origin of replication: 1. Initiation, 2. Termination) umspannen genau den pBK-CMV-Phagemid-Vektor mit seinem Insert.

### Bestimmung des Phagentiters

- bei Phagen mit Testintegrat  
10 µl einer 1:10-verdünnten Phagenlösung werden zu 200 µl Gebrauchslösung VCS257-Bakterien gegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert.
- bei Phagen mit cDNA-Integrat  
5 µl unverdünnte Phagenlösung werden zu 200 µl Gebrauchslösung XL1-Blue MRF'-Bakterien gegeben und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Phagen-/Bakterien-Gemische werden zusammen mit 500 µl X-Gal-Stammlösung und 15 µl IPTG-Stammlösung zu 7 ml 47°C-NZY-Top-Agar gegeben, gemischt und anschließend auf eine vorgewärmte (37°C) NZY-Agar-Platte inklusive X-Gal und IPTG gegeben. Die Platte wird über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet. Dazu werden die auf dem gleichmäßigen Bakterienrasen durch die Phagen verursachten Lysehöfe gezählt. Außerdem kann das Verhältnis von Phagen mit (weiße Kolonien) und ohne (blaue Kolonien) cDNA-Integrat bestimmt werden.

Mit folgender Formel kann der Phagentiter, in *Plaque-forming Units* pro ml (pfu/ml), errechnet werden:

$$\left[ \frac{\text{Anzahl an Plaques (pfu)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{eingesetztes Volumen } [\mu\text{l}]} \right] \times 1000 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}}$$

### 3.9. Molekularbiologische Methoden

#### 3.9.1. RNA-Isolierung

##### Gewebeentnahme

Ein *Astacus leptodactylus* wird für ca. 30 Minuten auf Eis betäubt und dann durch Dekapitieren getötet. Das Hepatopankreas wird zügig auf Eis präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und fein gemörsert. Das so homogenisierte Gewebe wird in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

##### Gesamt-RNA-Isolierung mit TRI Reagent® (Applied Biosystems)

(nach Chomczynski *et al.*, 1987)

Die RNA-Isolierung mit TRI Reagent® ist eine Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion. Guanidinthiocyanat inaktiviert aufgrund seiner chaotrophen, stark denaturierenden Wirkung schnell und effektiv RNasen. In wässrigen Phenol-Chloroform-Lösungen kommt es nach Zentrifugation zu einer Phasentrennung. Bei pH 4 befinden sich die Proteine in der unteren organischen Phase, die DNA in der Interphase und die RNA in der oberen wässrigen Phase. Die wässrige RNA-Phase kann abgenommen und die RNA mit Ethanol ausgefällt werden. Anschließend wird das RNA-Pellet in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Durchführung der RNA-Isolierung mit TRI Reagent® geschieht nach Anleitung des Herstellers ([http://www.ambion.com/techlib/prot/bp\\_9738.pdf](http://www.ambion.com/techlib/prot/bp_9738.pdf)).

##### Gesamt-RNA-Isolierung mit dem peqGOLD Total RNA Kit (PeqLab)

Verwendet wird das peqGOLD Total RNA Kit (C-Line) der Firma PeqLab. Dieses Kit verwendet kleine Kieselgelsäulen sowie ein Hoch-Niedrig-Salzsystm zum Binden bzw. Eluieren der Nukleinsäuren. Die RNA wird mithilfe von Ethanol selektiv an die Membran der Säule gebunden. Proteine und andere Zellbestandteile werden durch mehrere Waschschrte entfernt und die RNA schließlich mit 70°C warmen DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert. Dazu werden 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O direkt auf die Membran der Säule pipettiert und eine Minute inkubiert.



Die Durchführung erfolgt nach Anleitung des Herstellers ([http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6634-01\\_m.pdf](http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6634-01_m.pdf)).

#### **mRNA-Isolierung mit dem Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit (Invitrogen)**

Reine mRNA lässt sich entweder direkt aus dem homogenisierten Gewebe oder nach einer Gesamt-RNA-Isolierung (siehe oben) gewinnen. Oligo[dT]-gekoppelte magnetische *Beads* binden spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA's und können mit einem Magneten im Reaktionsgefäß gehalten werden, während das restliche Gewebehomogenisat oder die RNA-Lösung abgenommen werden. Mit diesem Prinzip kann man auch Waschschriffe durchführen. Die Elution erfolgt in DEPC-H<sub>2</sub>O.

Die Durchführung erfolgt nach Anleitung des Herstellers ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/Dynabeads\\_mRNA\\_DIRECT\\_Kit\(rev008\).pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/Dynabeads_mRNA_DIRECT_Kit(rev008).pdf)).

#### **mRNA-Isolierung mit PolyATtract® System 1000 (Promega)**

Auch in diesem mRNA-Isolierungskit kommen magnetische *Beads* zum Einsatz; allerdings sind diese nicht Oligo[dT]-, sondern Streptavidin-gekoppelt. Die eingesetzten Oligo[dT]-*Primer* sind biotinyliert, so dass es zu einer sehr starken nicht kovalenten Bindung kommt.

Die Durchführung erfolgt nach Anleitung des Herstellers (<http://www.promega.com/tbs/tm228/tm228.pdf>).

### **3.9.2. RNA-Fällung**

Zu der RNA-Lösung werden 0,1 Vol. 8 M LiCl-Lösung und 2,5 Vol. 100% EtOH gegeben. Die Lösung wird durch Invertieren gemischt und die RNA anschließend über Nacht bei -20°C gefällt. Die gefällte RNA wird 30 Minuten bei 4°C und 11.000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird mit 1 ml 75% (v/v) EtOH gewaschen und dann in einem minimalen Volumen (die RNA muss sich gerade vollständig lösen können) DEPC-H<sub>2</sub>O wieder aufgenommen.

### 3.9.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

(nach Sambrook *et al.*, 1989)

Die Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Lösungen lassen sich photometrisch bestimmen. Die aromatischen Basen der Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$ . Nach Sambrook *et al.* (1989) hat eine DNA-Lösung mit  $50 \mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA und einer Küvetten-Schichtdicke von  $1 \text{ cm}$  eine Absorption von  $OD_{260} = 1$ .

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten RNA erfolgt im NanoDrop-Spektrometer (PeqLab). Es werden jeweils  $1,5 \mu\text{l}$  Probe eingesetzt.

### 3.9.4. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die isolierte RNA (siehe 3.9.1. RNA-Isolierung) mithilfe des Enzyms reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese werden Oligo[dT]-*Primer* verwendet.

Pro Ansatz wird  $1 \mu\text{g}$  RNA eingesetzt. Die RNA wird mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf  $13 \mu\text{l}$  aufgefüllt und mit  $1 \mu\text{l}$  Oligo[dT]-*Primer* gemischt. Es folgt eine zehnmünütige Inkubation im Thermocycler bei  $65^\circ\text{C}$ . Anschließend werden zugegeben:

- 1  $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor (New England BioLabs)
- 2,5  $\mu\text{l}$  10x-RT-Puffer (New England BioLabs)
- 1,25  $\mu\text{l}$  dNTPs (New England BioLabs)
- 1  $\mu\text{l}$  M-MLV RT (New England BioLabs)
- 5,25  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O

Es folgen eine einstündige Inkubation bei  $40^\circ\text{C}$  und eine fünfminütige Hitzeinaktivierung der reversen Transkriptase bei  $95^\circ\text{C}$ .

Die synthetisierte cDNA wird entweder direkt in nachfolgenden PCR's (3.9.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)) eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.9.5. Entwicklung von *Primern* / degenerierten *Primern*

#### Entwicklung von *Primern*

Die *Primer* werden so entwickelt, dass sie zwischen 18 und 23 Basen lang sind und eine Schmelztemperatur zwischen  $50$  und  $60^\circ\text{C}$  haben. Die Schmelztemperaturen von

*Primerpaaren* sollen möglichst eng beieinander liegen ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Mögliche *Self annealing* oder *Hairpin*-Stellen werden mit Hilfe des Programms OLIGO CALC ausgeschlossen.

### Entwicklung von degenerierten Primern

Degenerierte *Primer* werden anhand der kurzen MS-Aminosäuresequenzdaten (4.2.8. Massenspektroskopie) entworfen. Zuerst wird die Aminosäuresequenz mittels einer Code-Sonne in alle möglichen Tripletts übersetzt. Die prozentuale Verteilung der Tripletts kann aus einer *Codon usage*-Tabelle abgelesen werden. Eine *Codon usage*-Tabelle gibt an, wie häufig ein bestimmtes Triplet für die zugehörige Aminosäure in dem angegebenen Organismus codiert. In dieser Arbeit wurde die *Codon usage*-Tabelle für *Pacifastacus leniusculus* verwendet (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=6720>), da die Abdeckung bei diesem Tier bei 36 Sequenzen liegt (Stand: 30.11.2010). Die Abdeckung für *Astacus leptodactylus* mit nur einer Sequenz wurde für zu niedrig befunden. Die *Primer* enthalten ein bis drei mögliche Tripletts pro Aminosäure. Ansonsten werden die Regeln wie für die Entwicklung nicht-degenerierter *Primer* (siehe oben) beachtet.

Alle *Primer* werden bei der Firma biomers.net GmbH bestellt. Die Sequenzen der *Primer* befinden sich im Anhang (8.2. *Primer*-Sequenzen).

### **3.9.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

(nach Mühlhardt, 2008)

Die PCR ist die wichtigste Methode zur spezifischen Amplifikation von DNA-Abschnitten. Man unterscheidet im Allgemeinen drei Phasen:

1. Denaturierungsphase

Bei hoher Temperatur ( $95^\circ\text{C}$ ) wird der DNA-Doppelstrang in seine beiden Einzelstränge aufgetrennt.

2. *Annealing*-Phase

Bei der *Annealing*-Temperatur lagern sich die *Primer* an die entsprechenden DNA-Abschnitte der Einzelstränge an.

3. Extensionsphase

Bei einer Temperatur von 72°C synthetisiert die DNA-Polymerase den neuen DNA-Abschnitt. Startpunkte bilden die an die Matrize angelagerten *Primer*.

Durch mehrfaches Wiederholen dieser Schritte wird die Menge an DNA exponentiell vermehrt. Die verwendete DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) ist hitzestabil und hängt an die 3'-Enden der Amplifikate A'-Überhänge an, welche bei eventuell folgendem T/A-Klonieren erforderlich werden.

Um herauszufinden, welche *Annealing*-Temperatur für das gewählte *Primer*paar optimal ist, wird zuerst eine Gradienten-PCR durchgeführt. Es werden folgende Temperaturen getestet: 50, 51,4, 53,7, 56,2, 58,7, 61,3, 63,6 und 65°C.

#### Pipettierschema für einen 25 µl-PCR-Ansatz

1 µl cDNA  
 2,5 µl Thermo-Pol-Puffer (New England BioLabs)  
 0,5 µl *Taq*-Polymerase (New England BioLabs)  
 1 µl dNTPs (New England BioLabs)  
 1 µl *forward Primer*  
 1 µl *reverse Primer*  
 ad 25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O

**Tabelle 3. Thermocyclerprogramm für die PCR.** Die *Annealing*-Temperatur (*Annealing*-Temp.) ist von den eingesetzten *Primer*paaren abhängig.

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95°C	5 min	1
95°C <i>Annealing</i> -Temp. 72°C	1 min 45 sec 1 min	39
72°C 4°C	10 min Pause	1

### 3.9.7. Agarose-Gelelektrophorese

(nach Ausubel *et al.*, 1992)

Zur Kontrolle der PCR wird eine Agarose-Gelelektrophorese mit den PCR-Produkten durchgeführt.

#### 10x-DNA-Probenpuffer

1% (w/v) SDS

50% (v/v) Glycerin

0,02% (w/v) Bromphenolblau

#### Zusammensetzung eines analytischen Gels (1% / 1,5%)

1% / 1,5% Universal-Agarose (Bio & Sell) in 60 ml TAE-Puffer aufkochen,

0,25 µg/ml EtBr zugeben

#### Zusammensetzung eines präparativen Gels (1%)

1% Agarose MP (AppliChem) in 80 ml TAE-Puffer aufkochen,

0,25 µg/ml EtBr zugeben

Nach der Aushärtung des Gels wird dieses in die Horizontal-Elektrophoreseapparatur gesetzt, mit TAE-Puffer überschichtet und mit den zuvor mit 10x-DNA-Probenpuffer versetzten Proben beladen.

Als Molekulargewichtsmarker dient die 1kb-DNA-Ladder (New England BioLabs).

Das Gel läuft ca. 45 Minuten bei 120 V, bis die Bromphenolblau-Front 2/3 des Gels durchlaufen hat.

Zum Sichtbarmachen der DNA-Banden im Gel legt man das Gel auf einen UV-Leuchttisch. Das planare Ethidium-Kation, welches zwischen die Basen der DNA interkaliert, fluoresziert bei Anregung mit UV-Licht orange. Folgt eine Gelextraktion (3.9.8. Gelextraktion) wird die UV-Bestrahlungsintensität und -dauer möglichst gering gehalten, um Brüche und Quervernetzungen im DNA-Strang zu vermeiden.

### **3.9.8. Gelextraktion**

#### Ausschneiden der Banden

Die Gelbanden werden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt.

#### Gelextraktion

Die Extraktion der DNA aus dem Agarosegel wird mit dem ‚QIAquick Gel Extraction Kit‘ von Qiagen durchgeführt.

Die Durchführung erfolgt nach Anleitung des Herstellers (<http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=201083>).

### 3.9.9. Sequenzierung

(nach Sanger *et al.*, 1977)

DNA-Sequenzierungen werden von den Firmen GENterprise Genomics (Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH, Mainz) und StarSEQ® GmbH (Mainz) durchgeführt. Die manuelle Auswertung der Elektropherogramme erfolgt mit der Software CHROMAS.

### 3.9.10. Erstellen und Immuno-Screening einer cDNA-Bank

Zur Identifizierung der für das dHDL kodierenden mRNA wird eine  $\lambda$ -ZAP-cDNA-Expressionsbank erstellt. Als Ausgangsmaterial wird die aus dem Hepatopankreas eines männlichen, augenscheinlich gesunden *Astacus leptodactylus* isolierte mRNA verwendet. Die Erstellung der Bank geschieht mit Hilfe des Kits ‚ZAP Express® XR Library Construction Kit‘ der Firma Agilent, ehemals Stratagene (Bestellnummer: 200451, Manual: <http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200401.pdf>); zum Screenen der Bank wird der  $\alpha$ -dHDL-Antikörper (Tabelle 1) verwendet.

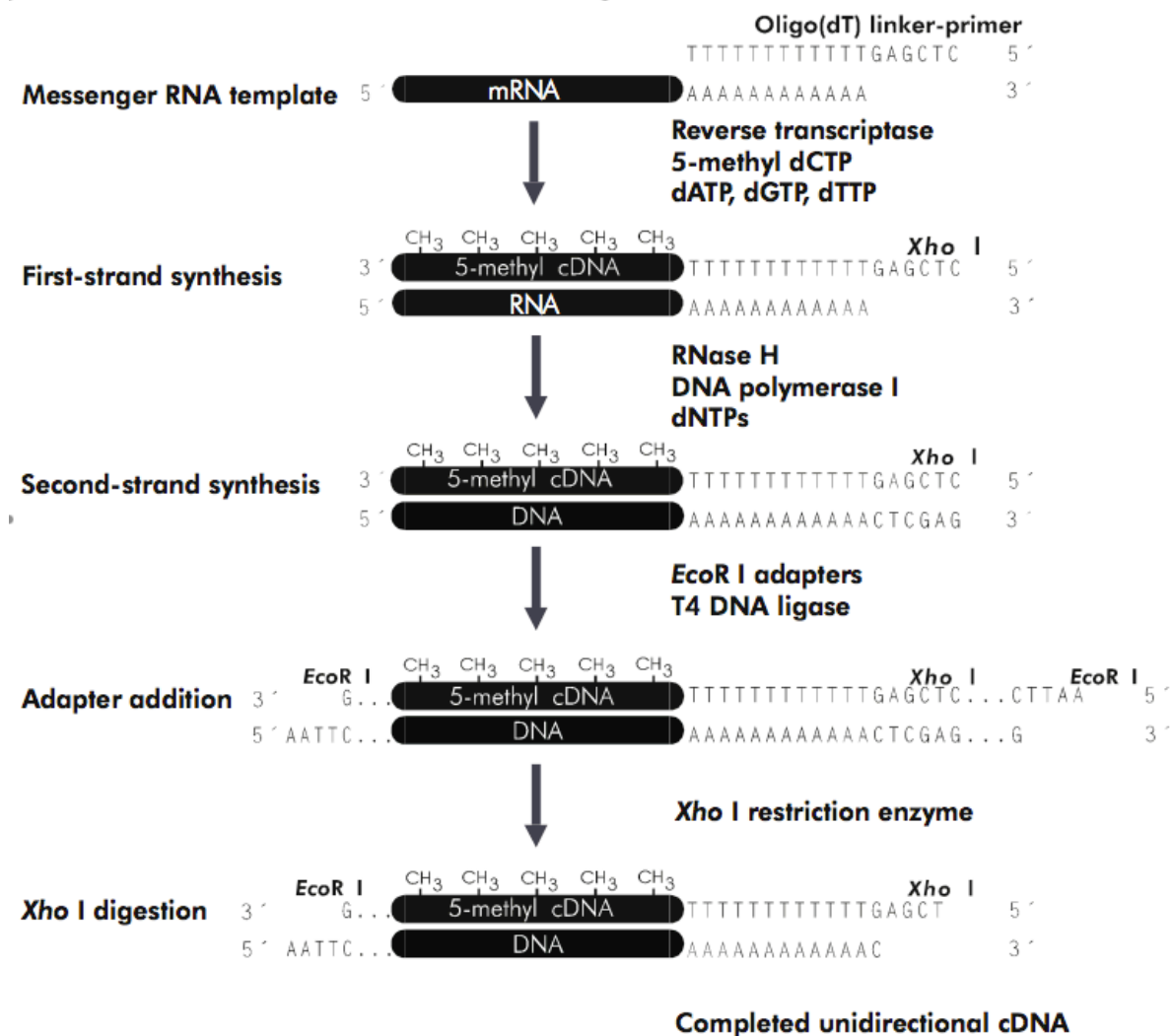
Alle verwendeten Enzyme und Puffer werden dem Kit entnommen. Eine radioaktive Kontrolle wird nicht mitgeführt.

### Isolierung der mRNA

Die Isolierung der mRNA erfolgt mit dem PolyATtract® System 1000 von Promega (siehe 3.9.1. RNA-Isolierung) aus Hepatopankreas-Gewebehomogenisat. Zur Aufkonzentrierung wird die RNA anschließend gefällt (siehe 3.9.2. RNA-Fällung) und in einem geringeren Volumen DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum Erstellen der Bank werden insgesamt 6  $\mu$ g mRNA eingesetzt.

### cDNA-Synthese und -Modifikationen

Eine Übersicht über den Ablauf der cDNA-Synthese ist in Abbildung 13 dargestellt.



**Abbildung 13. Übersicht über die Schritte der cDNA-Synthese.** Nach Hybridisierung der mRNA mit einem Oligo[dT]-Adapter-Primer wird der erste cDNA-Strang von der AccuScript Reversen Transkriptase synthetisiert. Durch den Adapter wird eine *Xho* I-Schnittstelle angehängt. Außerdem werden methylierte dCTPs eingebaut, um eine spätere Restriktion der cDNA mit *Xho* I zu verhindern. Anschließend wird die RNA mit dem Enzym RNase H verdaut. Die *nicks*, welche die RNase H während ihres Verdaus in den RNA-Strang einfügt, werden während der Zweitstrangsynthese durch *nick Translation* von der DNA-Polymerase I als *Primer* verwendet. Das Produkt nach den beiden Synthesen ist eine doppelsträngige, hemimethylierte cDNA mit angehängter *Xho* I-Restriktionsschnittstelle. Nun werden mit Hilfe der T4 DNA Ligase *EcoR* I-Adapter an die cDNA ligiert. Nach anschließendem Restriktionsverdau mit *Xho* I entsteht eine unidirektionale cDNA mit *sticky ends* (am 3'-Ende befindet sich ein überhängendes *EcoR* I-Ende, am 5'-Ende befindet sich ein überhängendes *Xho* I-Ende). (aus <http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200401.pdf>)

### Synthese des ersten cDNA-Strangs

Der Oligo[dT]-Adapter-Primer besteht aus 50 Nukleotiden. Er enthält neben dem 18 Basen langen poly[dT]-3'-Schwanz zusätzlich eine ‚GAGA‘-Sequenz und eine *Xho* I-Restriktions-Schnittstelle (die ‚GAGA‘-Sequenz dient dem Schutz der *Xho* I-Schnittstelle):



Die AccuScript Reverse Transkriptase ist ein *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-) Reverse Transkriptase-Derivat, das zusätzlich eine *proofreading-3'-5'*-Exonuklease-Aktivität besitzt. So kann eine hohe Genauigkeit in der Umschreibung von RNA in DNA garantiert werden.

50 µl Ansatz:

- 5 µl 10x Erststrang-Puffer
- 3 µl Erststrang-Methyl-Nukleotid-Mix
- 2 µl Oligo[dT]-Adapter-Primer (1,4 µg/µl)
- 16 µl DEPC-H<sub>2</sub>O
- 1 µl RNase Block Ribonuklease-Inhibitor (40 U/µl)
- 6 µg mRNA (= 20 µl)

Oben stehender Ansatz wird gemischt und zur Hybridisierung des Oligo[dT]-Adapter-Primers an die mRNA 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 3 µl AccuScript Reverse Transkriptase zugegeben. Von dem Ansatz werden 5 µl als Kontrolle entnommen und bei -20°C gelagert, der Rest wird eine Stunde bei 42°C inkubiert.

Um eine spätere Restriktion der cDNA mit *Xho* I zu verhindern, wird ein Nukleotid-Mix verwendet, der methyliertes dCTP enthält.

Synthese des zweiten cDNA-Strangs

Zu dem Ansatz der Erststrang-Synthese wird Folgendes pipettiert:

- 20 µl 10x Zweitstrang-Puffer
- 6 µl Zweitstrang-dNTP-Nukleotid-Mix
- 114 µl DEPC-H<sub>2</sub>O
- 2 µl dNTPs
- 2 µl RNase H (1,5 U/µl)
- 11 µl DNA Polymerase I (9 U/µl)

Es folgt eine 150-minütige Inkubation bei 16°C.

Blunting der cDNA-Enden

Die von der DNA-Polymerase I hinterlassenen *sticky ends* werden im Folgenden von der klonierten *Pfu* DNA-Polymerase entweder abgebaut oder aufgefüllt, so dass glatte Enden (*blunt ends*) entstehen.

Zu dem Ansatz der Zweitstrang-Synthese wird Folgendes pipettiert:



23 µl Blunting dNTP Mix  
2 µl klonierte *Pfu* DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

Der Ansatz wird 30 Minuten bei 72°C inkubiert und anschließend durch eine Phenol-Chloroform (PC)-Fällung extrahiert. Dazu werden 200 µl einer Phenol-Chloroform-Mischung (1:1 (v/v)) zugegeben, sorgfältig gemischt und zwei Minuten bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge, Raumtemperatur) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase enthält nun die cDNA und wird vorsichtig abgenommen. Zu dieser abgenommenen cDNA-Lösung wird das gleiche Volumen Chloroform gegeben, gemischt und zwei Minuten bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge, RT) zentrifugiert. Die cDNA befindet sich wieder in der oberen, wässrigen Phase und wird abgenommen. Durch Zugabe von 20 µl 3 M Natriumacetat und 400 µl 100% Ethanol wird die cDNA über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wird die cDNA eine Stunde bei 4°C (13.000 rpm, Tischzentrifuge) pelletiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wird mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nochmals zwei Minuten (13.000 rpm, Tischzentrifuge, RT) zentrifugiert. Der Ethanol wird abgenommen und das cDNA-Pellet in der SpeedVac getrocknet.

#### Ligation der *EcoR* I-Adapter

Das beim *Blunting* der cDNA entstandene cDNA-Pellet wird in 9 µl *EcoR* I-Adaptoren-Lösung (0,4 µg/µl) resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Als Kontrolle wird 1 µl dieses Ansatzes entnommen und bei -20°C gelagert. Zum restlichen Ansatz wird Folgendes hinzugegeben:

1 µl 10x Ligase-Puffer  
1 µl 10 mM rATP  
1 µl T4-DNA-Ligase

Der Ligationsansatz wird zwei Tage bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Ligase durch 30-minütige Inkubation bei 70°C hitzeinaktiviert und dann wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

#### Phosphorylierung der *EcoR* I-Enden

Nun werden die 14 bp-langen *EcoR* I-Adaptoren phosphoryliert, damit sie an die dephosphorylierten ZAP Express-Vektorarme ligiert werden können. Folgende Reagenzien werden zu obigem Ansatz pipettiert und für 30 Minuten miteinander inkubiert:

- 1  $\mu$ l 10x Ligase-Puffer
- 2  $\mu$ l 10 mM rATP
- 5  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O
- 2  $\mu$ l T4-Polynukleotid-Kinase (5 U/ $\mu$ l)

Die Kinase wird durch eine 30-minütige Inkubation bei 70°C hitzeinaktiviert.

#### Xho I-Verdau

Da bei der Erststrangsynthese (siehe oben) methyliertes dCTP eingesetzt wurde, ist dieser Strang vor einem Verdau mit Restriktionsenzymen geschützt. Nur der nicht-methylierte, zweite cDNA-Strang kann mit *Xho* I an der durch den Oligo[dT]-Adapter-*Primer* angehängten *Xho* I-Schnittstellensequenz geschnitten werden. Dazu werden zu obigem Ansatz 28  $\mu$ l *Xho* I-Buffer Supplement und 3  $\mu$ l *Xho* I (40 U/ $\mu$ l) gegeben. Der Verdau wird 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Es entsteht eine unidirektionale cDNA mit einem überhängenden *Xho* I-Ende und einem *Eco*R I-*sticky end*.

Anschließend wird die cDNA durch Zugabe von 5  $\mu$ l 10x STE-Puffer und 125  $\mu$ l 100% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach einstündiger Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.000 rpm) bei 4°C wird das Pellet getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### 10x STE-Puffer

- 200 mM Tris-HCl
- 1 M NaCl
- 100 mM EDTA
- pH 7,5

#### Größenfraktionierung

Die Größenfraktionierung, bei der die kleinen Adapterreste und nicht eingebauten Nukleotide von den größeren cDNA's getrennt werden sollen, geschieht per Sepharose-Gelfiltration.

#### Herstellen der Säule

Eine 1 x 13 cm große Glassäule und runde Filterpapiere ( $\varnothing$  = 1 cm) werden mit 70% (v/v) Ethanol sterilisiert und getrocknet. Drei Filterpapiere werden auf die Fritte der Säule gelegt. Anschließend wird die Säule mit 1x STE-Puffer gefüllt. Die Säule wird möglichst gleichmäßig

und luftblasenfrei mit Sepharose CL-2B befüllt. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das Säulenbett niemals austrocknet.

Die fertige Säule wird mit 10 ml 1x STE-Puffer gewaschen.

#### Kalibrieren der Säule

Für die Größenkalibrierung der Säule werden 20 µl 1kb-DNA-*Ladder* (New England BioLabs), versetzt mit 3 µl ‚Column loading dye‘, auf die Säule gegeben und Fraktionen à 5 Tropfen gesammelt. Anschließend wird die Säule mit 10 ml 1x STE-Puffer gewaschen.

Die einzelnen DNA-Fraktionen werden im Agarose-Gel (siehe 3.9.7. Agarose-Gelelektrophorese) analysiert.

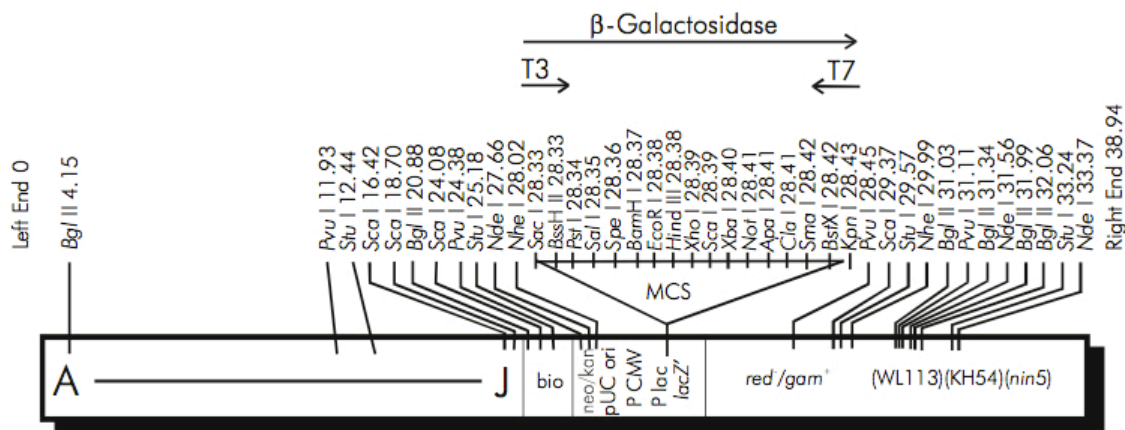
#### Gelfiltration

Die gefällte cDNA (siehe oben) wird in 14 µl 1x STE-Puffer gelöst und mit 3,5 µl ‚Column loading dye‘ versetzt. Die Probe wird auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen. Analog zum ‚Kalibrieren der Säule‘ werden Fraktionen à 5 Tropfen gesammelt. Insgesamt werden 24 Fraktionen gesammelt, wobei sich die cDNA in den Fraktionen 5-12 befinden sollte. Je 8 µl dieser Fraktionen werden wiederum auf einem Agarose-Gel analysiert; die restlichen Proben werden PC-extrahiert (siehe oben) und die cDNA über Nacht gefällt (siehe oben).

Die cDNA-Pellets werden in je 3,5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und vereint. Anschließend wird die DNA-Konzentration und -Reinheit photometrisch überprüft (siehe 3.9.3. Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren).

#### Ligation in den ZAP Express-Vektor

Der ZAP Express-Vektor (siehe Abbildung 14) wurde bereits mit *EcoR* I und *Xho* I verdaut und liegt nun in linearisierter Form vor. Die durch den Verdau entstandenen *sticky ends* des Vektors sind zu denen der cDNA komplementär, so dass es zum unidirektionalen Einbau der cDNA kommt. Durch die Ampicillin-Resistenz des Vektors und das in dessen *Multiple Cloning Site* (MCS) liegende β-Galaktosidase-Gen wird eine Doppelselektion ermöglicht.



**Abbildung 14. ZAP Express-Vektor.** Dargestellt ist die *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors. (aus <http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200401.pdf>)

#### Pipettierschema des Ligationsansatzes:

100 ng cDNA ( $\approx 2,2 \mu\text{l}$ )  
 0,5  $\mu\text{l}$  10x Ligase-Puffer  
 0,5  $\mu\text{l}$  10 mM rATP (pH 7,5)  
 1  $\mu\text{l}$  ZAP Express-Vektor (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  
 0,5  $\mu\text{l}$  T4 DNA-Ligase (4 U/ $\mu\text{l}$ )  
 ad 5  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O

#### Pipettierschema des Testansatzes:

1,6  $\mu\text{l}$  pBR322, *Sal* I- und *Eco*R I-verdaut  
 0,5  $\mu\text{l}$  10x Ligase-Puffer  
 0,5  $\mu\text{l}$  10 mM rATP (pH 7,5)  
 1  $\mu\text{l}$  ZAP Express-Vektor (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )  
 0,5  $\mu\text{l}$  T4 DNA-Ligase (4 U/ $\mu\text{l}$ )  
 1,6  $\mu\text{l}$  DEPC-H<sub>2</sub>O

Die Ansätze werden zwei Tage bei 4°C inkubiert.

#### In vitro-Verpackung

Die Verpackung des ZAP Express-Vektors in Phagen erfolgt mit dem Gigapack III Gold Packaging Extrakt (Stratagene, siehe oben).

Der *Packaging* Extrakt wird angetaut, sofort mit 5  $\mu\text{l}$  des Vektors vermischt und dann für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 500  $\mu\text{l}$  SM-Puffer und 20  $\mu\text{l}$  Chloroform beigegeben und gemischt. Es folgt eine zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge, RT). Die fertigen Phagen befinden sich im Überstand und werden bei 4°C gelagert.

#### SM-Puffer

50 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5  
 5,8 g NaCl  
 2 g MgSO<sub>4</sub> \* 7 H<sub>2</sub>O  
 5 ml 2% (w/v) Gelatine  
 ad 1 l dH<sub>2</sub>O

### **Amplifizierung der primären cDNA-Bank**

Die primäre cDNA-Bank wird in eine sekundäre cDNA-Bank amplifiziert, um eine höhere Stabilität und einen höheren Phagentiter zu erreichen.

Zur Vorbereitung werden 10 NZY-Agar-Platten auf 37°C vorgewärmt. Der flüssige NZY-Top-Agar wird im Wasserbad auf 47°C temperiert.

Je 48 µl der primären Phagenlösung werden mit 600 µl XL1-Blue MRF'-Gebrauchs-Bakterienlösung (siehe 3.8.1.) gemischt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann werden die Suspensionen mit je 7 ml NZY-Top-Agar gemischt und auf den 37°C NZY-Agar-Platten gleichmäßig verteilt. Nachdem sich der Top-Agar verfestigt hat, werden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

Um die amplifizierten Phagen zurückzugewinnen, werden die Platten mit 10 ml SM-Puffer überschichtet, mit Parafilm® abgedichtet und bei 4°C über Nacht geschwenkt. Die Phagen diffundieren in den SM-Puffer, welcher am nächsten Tag in sterile 50 ml Reaktionsgefäße abgegossen und *gepoolt* wird. Die Platten werden nochmals mit 2 ml SM-Puffer gewaschen. Zur Zell- und Phagenlyse wird die Suspension mit 5% (v/v) Chloroform versetzt, gemischt und 15 Minuten inkubiert. Dann können Zellreste abzentrifugiert werden (10 Minuten, 500 x g, RT). Der klare Überstand wird mit 0,3% (v/v) Chloroform und 7% (v/v) DMSO versetzt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **Immuno-Screening der cDNA-Bank**

Da es sich bei der hier erstellten cDNA-Bank mit dem ZAP Express-Vektor um eine exprimierende Bank handelt, ist es möglich, die ins Phagengenom integrierten Sequenzen und ihre Translationsprodukte mit einem geeigneten Antikörper zu *screenen*. Zur Identifizierung eines Klons, welcher (Teile der) dHDL-cDNA enthält, wird zum *Screening* der α-dHDL-Antikörper eingesetzt.

600 µl XL1-Blue MRF'-Gebrauchs-Bakterienlösung werden mit  $5 \times 10^4$  pfu Phagenlösung auf NZY-Platten (ohne IPTG und X-Gal) ausplattiert (siehe 3.8.) und vier Stunden bei 42°C inkubiert. Anschließend wird eine in 10 mM IPTG getränkte und getrocknete Nitrocellulose-

Membran auf den Agar aufgelegt und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die durch die Bakterien exprimierten Proteine werden so auf der Membran fixiert und können anschließend analog einem Western-Blot (siehe 3.11.15. Western-Blot) analysiert werden. Um die Membran besser von der Platte abheben zu können, wird diese mindestens zwei Stunden bei 4°C abgekühlt, dann die Orientierung der Membran auf der Platte markiert und die Membran vorsichtig entfernt.

### Vereinzeln von positiven Plaques

Von *Plaques*, die im Western-Blot positiv mit dem Antikörper reagiert haben, werden Vereinzelausstriche auf frischen Agar-Platten gemacht. Nur *Plaques*, die vereinzelt positiv *gescreent* werden, werden für die *in vivo*-Exzision (siehe unten) verwendet.

### In vivo-Exzision

Die klonierten cDNA-Fragmente können aus dem ZAP Express-Vektor mit Hilfe der Helferphagen wieder herausgeschnitten und als pBK-CMV Phagmid-Vektor (siehe Abbildung 15) rezirkularisiert werden. Dabei verwendet man beim XL0LR-Bakterienstamm den ExAssist interference-resistant-Helferphagen, bei den übrigen Bakterienstämmen den R408 interference-resistant-Helferphagen.

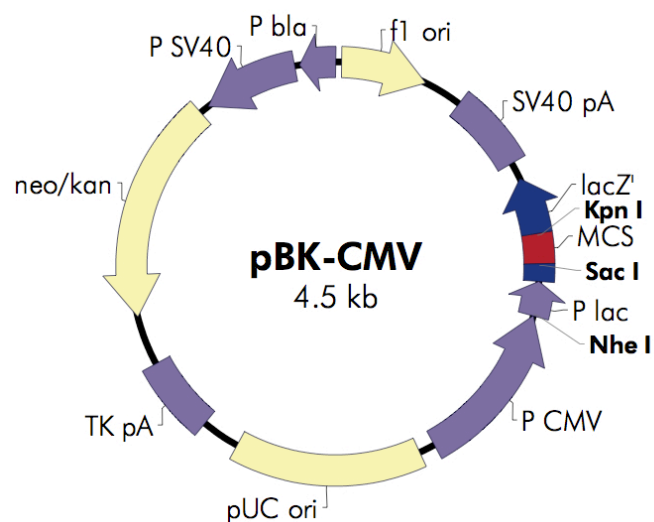


Abbildung 15. Schematische Darstellung des pBK-CMV-Phagmids, welches nach Rezirkularisierung aus dem  $\lambda$ -ZAP Express-Vektor hervorgeht. (aus <http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200401.pdf>)

Die positiven Plaques werden mit einer sterilen Pipettenspitze aus dem Agar ausgestochen und in 500  $\mu$ l SM-Puffer und 20  $\mu$ l Chloroform überführt. Das 1,5 ml-Reaktionsgefäß wird gemischt, so dass die Phagen in den Puffer diffundieren können. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur kann die Phagenlösung bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Vor Gebrauch wird der Titer der Phagenlösung und der Helferphagen bestimmt (siehe 3.8.2. Bestimmung des Phagentiters).

Von den XL0LR- und den XL1-Blue MRF'-Zellen werden 50 ml-Übernacht (ÜN)-Kulturen in LB-Medium mit Zusätzen angesetzt (30°C). Dann werden die Zellen abzentrifugiert (1000 x g, 2 min, RT) und die Zell-Pellets in 25 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert. Die Bakterienlösung wird dann mit einer 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung auf OD<sub>600</sub> = 1 verdünnt.

Folgender Ansatz wird in einem 14 ml-Falcon® pipettiert:

- 200  $\mu$ l XL1-Blue MRF'-Bakterien (siehe oben)
- 250  $\mu$ l Phagenlösung (Titer > 1 x 10<sup>5</sup> Phagenpartikel, Chloroform-frei)
- 1  $\mu$ l ExAssist interference-resistant-Helferphagen (> 1 x 10<sup>6</sup> pfu/ $\mu$ l)

Zum Phagen*attachment* wird der Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend werden 3 ml LB-Medium mit Zusätzen zugegeben und weitere drei Stunden bei 37°C und 180 rpm inkubiert.

Um die Zellen und die Phagen zu lysieren und so das pBK-CMV-Phagmid zu gewinnen, wird der Ansatz 20 Minuten bei 70°C inkubiert; anschließend werden die Zellreste durch 15-minütige Zentrifugation bei 1000 x g pelletiert. Der Überstand, in dem sich das pBK-CMV-Phagmid in Form von filamentösen Phagen befindet, wird dekantiert und bei 4°C gelagert.

#### Plattieren der Phagen

Zu 200  $\mu$ l XL0LR-Zellen (OD<sub>600</sub> = 1, siehe oben) werden 100  $\mu$ l Phagenlösung gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach werden je 300  $\mu$ l NZY-Medium zugegeben und dieser Ansatz für 45 Minuten bei 37°C inkubiert (in dieser Zeit kann sich das Kanamycin-Resistenz-Genprodukt bilden). Nun werden je 200  $\mu$ l der Bakterien auf Kanamycin (50  $\mu$ g/ml)-LB-Agar-Platten ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### Plasmidisolierung („Mini-Prep“)

Um die Plasmide zu gewinnen, wird eine üN-Kultur positiver Klone in (50 mg/ml) Kanamycin-LB-Medium angelegt.

Die Plasmidisolierung wird mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (C-Line) der Firma PeqLab durchgeführt. Durch diese Methode erhält man hochreine Plasmid-DNA, die man direkt für eine Sequenzierung (siehe 3.9.9. Sequenzierung) einsetzen kann.

Die Durchführung erfolgt nach Anleitung des Herstellers ([http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6942-00\\_m.pdf](http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6942-00_m.pdf)). Eluiert wird die Plasmid-DNA mit 2x 30 µl 70°C DEPC-H<sub>2</sub>O.



### 3.10. Bioinformatische Methoden

Eine Auflistung aller verwendeten Datenbanken und Programme für die bioinformatischen Analysen findet sich unter 3.3..

#### 3.10.1. Datenbanksuche

BLAST (Basic local alignment search tool)

Für Homologiesuchen von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen werden die Module BLASTN, bzw. BLASTP des NCBI-Servers verwendet.

#### 3.10.2. Erstellen von *Alignments*

Multiple Sequenz-*Alignments* werden entweder mit dem Programm COBALT sowie dessen Standardeinstellungen erstellt, oder mit dem Programm CLUSTALX. Die so erstellten *Alignments* können mit dem Programm SEAVIEW manuell nachbearbeitet werden. Lücken (*Gaps*) in den Sequenzen werden als ‚-‘ gekennzeichnet.

#### 3.10.3. Sequenz-Analyse

Übersetzen

Zur Übersetzung einer Nukleotidsequenz in die abgeleitete Aminosäuresequenz wird das Programm TRANSLATE verwendet.

Allgemeine Parameter / GRAVY-Index

Mit Hilfe des Programms PROTPARAM werden die molekulare Masse und der theoretische isoelektrische Punkt (pI) errechnet. Außerdem bestimmt PROTPARAM den GRAVY-Index (Kyte *et al.*, 1982). Mithilfe des GRAVY-Index kann man die Gesamt-Hydrophobizität eines Proteins bestimmen (Anteil an hydrophoben Aminosäuren). In dieser Arbeit wurde die Sequenz des  $\beta$ -Glukan-Bindeproteins zudem auch bereichsweise untersucht. Dazu wurde die Sequenz in 20 Teilbereiche à 70 Aminosäuren zerlegt und dann analysiert. So kann man besonders hydrophobe Bereiche innerhalb des Proteins erkennen. Insbesondere die (noch nicht bekannte) Lipidbindedomäne sollte relativ viele hydrophobe Aminosäuren enthalten und somit einen höheren GRAVY-Index haben. Zum Vergleich wurden andere typische

Lipoproteine, wie humanes ApoE (GenBank-Nr. NP\_000032), humanes ApoB (GenBank-Nr. NP\_000375), *Locusta migratoria*-Lipophorin (GenBank-Nr. CAB51918.2) und *Homarus americanus*-Vitellogenin (GenBank-Nr. ABO09863), auf diese Weise untersucht (zum Teil mit angepassten Teilabschnittslängen). In allen Fällen konnte gezeigt werden, dass die sogenannten amphipathischen  $\alpha$ -Cluster (siehe Abbildung 3), wie sie vorzugsweise in der Lipidbindedomäne vorkommen, relativ gesehen einen größeren GRAVY-Index aufweisen ( $> -0,2$ ). Diese Methode könnte also erste Hinweise auf die Lokalisation der Lipidbindedomäne geben.

#### Signalpeptid

Die Identifikation eines Signalpeptids sowie dessen Schnittstelle erfolgt mit dem Programm SIGNALP.

#### Schnittstellen

Potentielle Protease-Schnittstellen werden mit dem Programm PEPTIDECUTTER gesucht. Da Furin nicht in PEPTIDECUTTER implementiert ist, werden Furin-Schnittstellen manuell gesucht. Die Konsensussequenz der Schnittstelle ist R-X-X-R (<http://www.neb.com/nebecomm/products/productP8077.asp>), bevorzugt wird jedoch bei R-X-K/R-R geschnitten (Smolenaars *et al.*, 2005).

#### Glykosylierung

Nach potentiellen O-Glykosylierungsstellen wird mit dem Programm OGPET mit dessen Standardeinstellungen gesucht. Nach potentiellen N-Glykosylierungsstellen (N-X-S/T) wird manuell gesucht. Nach potentiellen O-GlcNAcylierungsstellen wird mit dem Programm YINYOYANG mit dessen Standardeinstellungen gesucht.

#### Motiv- und Domänensuche

Nach konservierten Motiven und Domänen wird mit dem Programm CONSERVED DOMAINS gesucht. Außerdem werden RGD-Zelladhäsionsmotive (D'Souza *et al.*, 1991) und putative Glukanase-Regionen (Romo-Figueroa *et al.*, 2004) manuell gesucht.

#### 3.10.4. Phylogenetische Sequenzanalysen

Homologe und ähnliche Sequenzen können durch die Berechnung von phylogenetischen Stammbäumen analysiert werden. Um die Verwandtschaftsverhältnisse sowohl zwischen den Proteinfamilien BGBP, LGBP, CP und VTG als auch innerhalb dieser Familien zu klären, aber auch, um mehr Klarheit in die zum Teil verwirrende Nomenklatur der  $\beta$ -Glukanbindenden Proteine BGBP und LGBP zu bringen (siehe Einleitung), wird ein phylogenetischer Stammbaum von repräsentativen Vertretern dieser Familien erstellt. Dabei soll auch gezeigt werden, ob es sich bei dem in dieser Arbeit sequenzierten Protein *Astacus leptodactylus*-BGBP auch tatsächlich um ein  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein handelt. Eine Besonderheit stellt das Vitellogenin von *Daphnia* dar, welches zusätzlich die Funktion einer Superoxid-Dismutase hat (Kato *et al.*, 2004). Dessen Einordnung in den Stammbaum ist noch unklar.

Für die Stammbaumerstellung werden ausschließlich Crustaceen-Proteine berücksichtigt; lediglich als Außengruppe wird die Lipophorin-Sequenz der Wanderheuschrecke mit eingefügt. Eine Übersicht über die verwendeten Sequenzen findet sich in Tabelle 4.

**Tabelle 4. Übersicht über die in der Stammbaumberechnung verwendeten Aminosäure-Sequenzen.** Die Sequenzen wurden bei Ncbi heruntergeladen; entsprechende Zugriffsnummern sind aufgelistet. Hom\_ga\_LGBP und Pen\_mo\_LGBP sind in der Datenbank fälschlicherweise als BGBP ausgewiesen, deshalb die Doppelbezeichnung in der Kategorie ‚Proteinfamilie‘. Sind Sequenzen noch nicht publiziert, wird der Autor und das Datum des GenBank-Eintrags unter ‚Quelle‘ angegeben. Auf ‚et al.‘ wird aus Platzgründen verzichtet. (AS: Aminosäuren, BGBP: HDL /  $\beta$ -1,3-Glukan-Bindeprotein, LGBP: Lipopolysaccharid- /  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein, CP: Clotting-Protein, VTG: Vitellogenin)

Verwendete Abkürzung	Zugriffsnummer (GenBank)	Proteinfamilie	Spezies	Anzahl AS	Quelle
Ast_le_BGBP	CAX65684	BGBP	<i>Astacus leptodactylus</i>	1353	diese Arbeit
Pac_le_BGBP	Q26048	BGBP	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	1339	Cerenius, 1994
Lit_va_BGBP	AAO92933	BGBP	<i>Litopenaeus vannamei</i>	1454	Romo-Figueroa, 2004
Mar_ja_BGBP	AAT46565	BGBP	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	205	Pan, 2005
Fen_ch_BGBP	ADW10720	BGBP	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	2021	GenBank (Lai, 2011)
Pen_mo_VTG	ABB89953	VTG	<i>Penaeus monodon</i>	2584	Tiu, 2006
Lit_va_VTG	AAP76571	VTG	<i>Litopenaeus vannamei</i>	2587	Raviv, 2006
Che_qu_VTG	AAG17936	VTG	<i>Cherax quadricarinatus</i>	2584	Abdu, 2002
Pan_hy_VTG	BAD11098	VTG	<i>Pandalus hypsinotus</i>	2534	Tsutsui, 2004
Hom_am_VTG	ABO09863	VTG	<i>Homarus gammarus</i>	2583	GenBank (Hui, 2007)
Cal_sa_VTG	ABC41925	VTG	<i>Callinectes sapidus</i>	2563	Zmora, 2007
Por_tr_VTG	AAX94762	VTG	<i>Portunus trituberculatus</i>	2560	GenBank (Yang, 2006)
Mar_ja_VTG	BAB01568	VTG	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	2587	Tsutsui, 2000
Mac_ro_VTG	BAB69831	VTG	<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	2537	Yang, 2000
Dap_pu_VTG	EFX76379	VTG	<i>Daphnia pulex</i>	1627	Colbourne, 2011
Pac_le_CP	AAD16454	CP	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	1721	Hall, 1999
Mar_ja_CP	ABK59925	CP	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	1671	Cheng, 2008
Pen_mo_CP	AAF19002	CP	<i>Penaeus monodon</i>	1670	Yeh, 1999
Lit_va_CP	ABI95361	CP	<i>Litopenaeus vannamei</i>	1666	Cheng, 2007
Pac_le_LGBP	CAB65353	LGBP	<i>Pacifastacus leniusculus</i>	361	Lee, 2000
Hom_ga_LGBP	CAE47485	(BGBP) LGBP	<i>Homarus gammarus</i>	367	Hauton, 2005
Art_si_LGBP	ADK23914	LGBP	<i>Artemia sinica</i>	356	Zheng, 2011
Dap_pu_LGBP	EFX72306	LGBP	<i>Daphnia pulex</i>	351	Colbourne, 2011
Pen_mo_LGBP	AAM21213	(BGBP) LGBP	<i>Penaeus monodon</i>	366	GenBank (Sritunyaluck-sana, 2002)
Lit_va_LGBP	ABU92557	LGBP	<i>Litopenaeus vannamei</i>	367	Cheng, 2005
Pro_cl_LGBP	ACR20474	LGBP	<i>Procambarus clarkii</i>	369	GenBank (Dong, 2009)
Eri_si_LGBP	ACR56716	LGBP	<i>Eriocheir sinensis</i>	362	Zhao, 2009
Por_tr_LGBP	ADK77876	LGBP	<i>Portunus trituberculatus</i>	365	GenBank (Jin, 2011)
Fen_ch_LGBP	AAX63902	LGBP	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	366	GenBank (Xiang, 2004)
Loc_mi_Lph	CAB51918	Lipophorin	<i>Locusta migratoria</i>	3380	GenBank (Bogerd, 2007)

Zuerst wird ein Aminosäure-*Alignment* der zu vergleichenden Sequenzen erstellt (siehe oben: Erstellen von *Alignments*). Das *Alignment* wird im Nexus-Format (.nxs) abgespeichert.

Als nächstes wird das optimale Evolutionsmodell für das *Alignment* bestimmt. Dazu wird das Programm PROTTEST verwendet, welches die folgenden möglichen Modelle / Substitutionsmatrizen testet: JTT, MtREV, Dayhoff, WAG, RtREV, CpREV, Blosum62 und VT. Außerdem kann man die Zusatzeinstellungen +I (*invariable sites*), +G (Gamma-Verteilung), +I+G und +F (*empirical base frequencies*) testen lassen (Reeves, 1992, Yang, 1993, Cao *et al.*, 1994). Das hier getestete *Alignment* mit den obigen Sequenzen (Tabelle 4) wird durch das JTT+G+F-Modell am Zutreffendsten beschrieben. Als das Beste in MRBAYES implementierte Modell wird WAG+G+F angegeben, welches auch für die nachfolgende Berechnung verwendet wird.

Das *Alignment* wird im Nexus-Format (.nxs) im selben Verzeichnis wie das Programm MRBAYES abgespeichert und soll folgendermaßen aussehen:

```
#NEXUS
BEGIN DATA;
Dimensions ntax=<Anzahl der Taxa> nchar=<Anzahl der Charaktere>;
Format interleave=yes datatype=PROTEIN gap=-;

matrix
...
...
...
;
end;
```

Die Stammbäume werden mit dem Konsolen-Programm MRBAYES berechnet. Dieses Programm berechnet die ‚Bayesian Interference of phylogeny‘ nach Larget *et al.* (1999). Um die posteriore Wahrscheinlichkeit der Bäume anzunähern, verwendet MRBAYES Markov chain Monte Carlo (MCMC)-Berechnungen (Geyer *et al.*, 1991). Der Stammbaumerstellung liegt als parametrisches Schätzverfahren die *Maximum Likelihood*-Methode zu Grunde (Tuffley *et al.*, 1997). Die *posterior probability* ist die Wahrscheinlichkeit, nach der die getroffene Annahme unter Berücksichtigung des angewandten Modells richtig ist.

Nach dem Starten des Programms im Terminal werden die Daten durch den Befehl

```
execute <Dateiname>.nxs
```

eingelassen. Nun werden folgende Einstellungen vorgenommen:

```
prset aamodelpr=fixed(Wag);  
lset nst=6 rates=gamma;  
mcmc ngen=100000 printfreq=100 samplefreq=5 nchains=4 savebrlens=yes;
```

Mit dem Befehl `prset` wird die *prior probability* festgelegt, indem man die Parameter für das zu verwendende Evolutionsmodell eingibt. Bei allen Bayes-Analysen muss man bereits vor dem Start der Daten-Berechnungen Annahmen treffen, wie zum Beispiel der Austausch von Aminosäuren gewertet wird. In MRBAYES sind für Aminosäure-Sequenz-Rechnungen elf Evolutionsmodelle/-matrizen implementiert (Poisson, Jones, Dayhoff, Mtrev, Mtmam, Wag, Rtrev, Cprev, Vt, Blosum, Equalin und GTR). Man kann sich entweder für eines der Modelle entscheiden (`fixed(Modell)`), oder man wählt den Befehl `,mixed'`. In diesem Fall testet die Markov-Kette die ersten zehn Modelle auf ihre Wahrscheinlichkeiten und gibt das jeweils verwendete Modell an. In dieser Arbeit wurde das fixe Modell Wag als Annahme festgelegt.

Mit dem Befehl `lset` legt man die Parameter des zu verwendenden Substitutionsmodells fest. Mit `nst` bestimmt man die Anzahl an Substitutions-Möglichkeiten; `nst=6` erlaubt allen Raten unterschiedlich zu sein. Außerdem nimmt man eine Gamma-Verteilung der Raten-Variations-Seiten an (Yang, 1993).

MCMC startet die Markov Ketten Monte Carlo-Berechnung. Dabei beschreibt `ngen` die Anzahl an Zyklen des MCMC-Algorithmus (in dieser Arbeit wird mit 200.000 Zyklen gestartet, die Anzahl kann allerdings später nach oben korrigiert werden). Nach je 100 Zyklen werden diese auf dem Bildschirm angezeigt (`printfreq`). Nur jeder fünfte Rechenzyklus geht in die spätere Phylogenie mit ein (`samplefreq`). Wählt man den Befehl `nchains=4` ändert man den MCMC-Algorithmus in einen MCMCMC (Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo)-Algorithmus mit drei heißen und einer kalten Kette um. `savebrlens` speichert die Längen der einzelnen Äste des Stammbaums.

Das Programm startet automatisch mit der Rechnung. Nach 200.000 Zyklen fragt das Programm, ob es die Analyse weiterführen soll. Ist die Standardabweichung der *split frequencies*  $< 0,01$ , so kann man die Rechnung beenden. Wenn die Standardabweichung der *split frequencies*  $> 0,01$  ist, sollte man solange weiterrechnen, bis sie unter 0,01 fällt. Nach Beendigung der Rechnungen gibt man

sump burnin=<Anzahl ngen /Anzahl samplefreq x 0,25>

ein. Das Programm speichert und zeigt nun eine Tabelle der Parameter des Substitutionsmodells (mean, mode und 95% credibility intervall) an. Die Werte sollten alle nahe 1 sein, ansonsten muss man die Analyse mit mehr Generationen rechnen. Um die Stammbäume zusammen zu fassen, gibt man

sumt burnin=<Anzahl ngen/Anzahl samplefreq x 0,25>

ein. Die Stammbäume werden nun als .con-Datei gespeichert und können mit dem Programm SEAVIEW visualisiert werden.

### 3.11. Proteinbiochemische Methoden

#### 3.11.1. Entnahme der Hämolymphe

Zum Betäuben werden die Tiere (*Astacus leptodactylus*) ca. zehn Minuten auf Eis gelegt. Anschließend werden die Tiere mit einer Kanüle zwischen Carapax und Pleon punktiert und die Hämolymphe in einem sterilem Reaktionsgefäß mit vorgelegtem 2x-Krebsringer auf Eis gesammelt.

Zum Entfernen von Zellen und Zelltrümmern wird die Hämolymphe zweimal wie folgt zentrifugiert:

1. 1 Minute, 1000 x g, 4°C;
2. 10 Minuten, 4500 x g, 4°C.

Der Überstand wird entweder direkt weiterverwendet (siehe 3.11.3. Dichtegradienten-Ultrazentrifugation) oder bei -20°C gelagert.

#### 3.11.2. Gewinnung von Hämozyten

Die Hämozyten befinden sich im Pellet, nachdem die Hämolymphe eine Minute bei 1000 x g zentrifugiert wurde (siehe 3.11.1.), und können vorsichtig in frischem Krebsringer resuspendiert werden.

#### 3.11.3. Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Da Lipoproteine aufgrund ihres Lipidgehalts eine geringere Dichte haben als andere Proteine, kann man sie mittels einer Dichtegradienten-Ultrazentrifugation von den übrigen Proteinen einer Proteinlösung trennen.

##### Isolierung in Kaliumbromid (KBr)

In das Zentrifugenglas werden 1,7 ml KBr-Lösung (in PBS,  $\rho = 1,35 \text{ g/ml}$ ) pipettiert. Dann werden vorsichtig 1,7 ml Hämolymphe-Lösung darüber geschichtet. Die Zentrifugation erfolgt in der Beckman-Ultrazentrifuge mit folgenden Einstellungen: 4°C, 411.000 x g, 3 h, TLA-110-Rotor, Beschleunigungsstufe 2, Bremsstufe 9. Während dem Zentrifugationslauf bildet das Kaliumbromid einen kontinuierlichen Dichtegradienten, in den sich die Proteine gemäß ihrer Schwebdichte einordnen. Die entstandenen Lipoprotein-Banden können anschließend mit einer 1 ml-Spritze mit Kanüle abgenommen und dialysiert (siehe 3.11.5. Dialyse) werden.



#### **3.11.4. Membranprotein-Isolierung**

Um die Lipoprotein-Rezeptoren zu gewinnen, wird eine Gesamt-Membranpräparation von *Astacus leptodactylus*-Gewebe hergestellt.

##### **Membranprotein-Isolierung aus Hämocyten**

Das, wie unter 3.11.2. beschrieben, gewonnene Hämocyten-Pellet wird in HEPES-Puffer aufgenommen und durch dreimalig durchgeführte Ultrabeschallung (Ultraschallstab, je 30 Sekunden, dazwischen 30 Sekunden auf Eis) homogenisiert. Die weitere Behandlung erfolgt analog dem Vorgehen der ‚Membranprotein-Isolierung aus Geweben‘ (siehe unten).

##### **Membranprotein-Isolierung aus Geweben**

Gewebe werden aus einem frisch getöteten Krebs (siehe 3.9.1.) entnommen und mit Hilfe eines ULTRA-TURRAX® in HEPES-Puffer homogenisiert. Die Zellen werden dann mit dem Ultraschallstab aufgebrochen (dreimal 30 Sekunden, dazwischen 30 Sekunden auf Eis). Das Homogenat wird bei 4°C und 100.000 x g 60 Minuten zentrifugiert. Das Pellet, in dem sich die Membranbruchstücke befinden, wird in HEPES-Puffer inkl. 40 mM Octylglucopyranosid resuspendiert und 2 h auf Eis unter leichtem Rühren inkubiert. Um die Membranproteine in Octylglucopyranosid-Mizellen zu solubilisieren, wird die Lösung erneut dreimal 30 Sekunden mit dem Ultraschallstab behandelt. Die Membranbruchstücke werden durch einstündiges Zentrifugieren (100.000 x g, 4°C) pelletiert; die Membranproteine befinden sich im Überstand und können bei Bedarf mit Amicon®-Zentrifugenfiltern aufkonzentriert werden (3.11.7.). Die Proteinlösung wird auf 0,1% (w/v) NaN<sub>3</sub> gebracht und bei 4°C gelagert.

#### **3.11.5. Dialyse**

Zum Entsalzen der Proteinlösung wird eine Dialyse durchgeführt. Dazu wird die Proteinlösung in einen ausgekochten Dialyseschlauch gefüllt, dieser verschlossen und über Nacht bei 4°C gegen 2x 1 l Dialysepuffer dialysiert. Nach einer Stunde erfolgt ein Pufferwechsel. Die dialysierten Proteine werden mit 0,1% (w/v) Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert.

### 3.11.6. BCA-Assay

(nach Smith *et al.* 1985)

Der BCA-Test zur Proteinbestimmung beruht auf dem Prinzip der Komplexbildung von Proteinen mit Kupfer in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Die  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen werden dabei zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert und bilden zusammen mit dem  $\text{Cu}^+$ -spezifischen Metallchelator Bicinchoninsäure einen violettfarbigen Komplex. Die Extinktion dieses Komplexes bei 550 nm ist proportional zur eingesetzten Proteinmenge.

#### BCA-Lösung A

2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
0,16% (w/v) Na-Tartrat  
0,4% (w/v) NaOH  
0,95% (w/v)  $\text{NaHCO}_3$

#### BCA-Lösung C

4% (w/v)  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

#### BCA-Lösung B

1% (w/v) BCA  
in BCA-Lösung A

#### Gebrauchsreagenz

50 Teile BCA-Lösung B  
1 Teil BCA-Lösung C

Die BSA-Standardreihe (0, 2, 4, 6, 8 und 10  $\mu\text{g}$  BSA, mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 10  $\mu\text{l}$  auffüllen) und die Proben (x  $\mu\text{l}$  Probe ad 10  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ) werden im Dreifachansatz in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Es werden je Well 200  $\mu\text{l}$  Gebrauchsreagenz zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 60°C werden die Extinktionen im Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt. Anhand einer aus den Standardwerten erstellten Eichgerade kann man die Proteinkonzentration der Proben errechnen.

### 3.11.7. Konzentrieren von Proteinlösungen

Es wurden verschiedene Methoden zur Proteinkonzentrierung angewandt. Je nach weiterem Verwendungszweck der Probe ist es wichtig, die Puffermolarität nicht zu ändern (Amicon-Filter), die Probe mit oder ohne Salze einzutrocknen (SpeedVac und Gefriertrocknung, bzw. Acetonfällung), oder die Lösung inkl. der Salze zu konzentrieren (SpeedVac).

### **SpeedVac**

(nach Pohl, 1990)

Im Vakuum kochen wässrige Proteinlösungen schon bei Raumtemperatur. Bei gleichzeitigem Zentrifugieren verdunstet das Wasser im Vakuum. Bei dieser Methode konzentriert man jedoch nicht nur die Proteine, sondern auch die Puffersalze; je nach Puffer oder Anwendung kann das problematisch sein.

### **Zentrifugation mit Amicon®-Zentrifugenfiltern**

Mithilfe von Amicon® Ultra-0.5-Zentrifugenfiltern (Millipore) kann man Proteinlösungen reinigen, aufkonzentrieren, entsalzen oder einen Pufferwechsel durchführen. In ein 2 ml-Reaktionsgefäß wird ein Zentrifugenfilter mit einer Membran (Ausschlussgröße 30 kDa) eingesetzt. Die Proteinlösung wird auf den Filter gegeben und alle Moleküle, die kleiner als die Ausschlussgröße sind, werden durch die Membran zentrifugiert. Nur die Proteine, welche größer als das Ausschlussvolumen sind, verbleiben im Reservoir über dem Filter und können in einer geeigneten Menge Puffer entnommen werden.

Die Durchführung erfolgt nach Anleitung des Herstellers ([http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/859e4d359e35eddd852575b7005e90a6/\\$FILE/PR02725.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/859e4d359e35eddd852575b7005e90a6/$FILE/PR02725.pdf)).

### **Acetonfällung**

(nach Englard *et al.*, 1990)

Die Proteinlösung wird im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Aceton (-20°C) auf Eis gemischt und über Nacht bei -20°C gefällt. Dann wird das Gemisch für 20 Minuten bei 13.000 rpm (Sorvall, HB-4) und 0°C zentrifugiert. Der Überstand wird möglichst vollständig entfernt. Anschließend wird das Pellet im Abzug getrocknet. Um die Effizienz zu testen werden Doppelansätze durchgeführt und eine der beiden Proben in einem bestimmten Volumen PBS gelöst und einer Proteinbestimmung unterzogen. Die errechnete Proteinausbeute der Acetonfällung liegt demnach zwischen 90 und 95%.

**3.11.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

(nach Laemmli, 1970)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dies geschieht, indem die Proteine proportional zu ihrem Molekulargewicht durch SDS mit negativer Ladung beladen werden. Im elektrischen Feld wandern sie durch den ‚Siebeffekt‘ der Acrylamid-Matrix entsprechend ihrem Stokes-Radius und somit ihrem Molekulargewicht. Die Proteine werden evtl. zuvor mit DTT denaturiert und zerfallen so in ihre Untereinheiten.

<u>Trenngelpuffer</u>	<u>Trenngelpuffer (mit Glycerin)</u>	<u>Sammelgelpuffer</u>
1,5 M Tris-HCl	1,5 M Tris-HCl	0,5 M Tris-HCl
0,4% (w/v) SDS	0,4% (w/v) SDS	0,4% (w/v) SDS
pH 8,8	in 50% (v/v) Glycerin	pH 6,8
	pH 8,8	
<u>APS-Lösung</u>	<u>Laufpuffer</u>	
10% (w/v) APS	25 mM Tris-HCl	
in dH <sub>2</sub> O	192 mM Glycin	
	0,02% (w/v) SDS	
	pH 8,3	
<u>2x Probenpuffer</u>	<u>5x Probenpuffer</u>	
125 mM Tris-HCl	313 mM Tris-HCl	
2 mM Na <sub>2</sub> -EDTA	5 mM Na <sub>2</sub> -EDTA	
20% (v/v) Glycerin	50% (v/v) Glycerin	
4% (w/v) SDS	1% (w/v) SDS	
0,04% (w/v) BBP	0,1% (w/v) BBP	
0,1 M DTT	0,25 M DTT	
pH 6,8	pH 6,8	

Es kommen lineare Gele (10%, bzw. 12%) und Gradientengele (3,5-15%) zum Einsatz.

**Herstellen von linearen Gelen**

Die Zusammensetzungen der linearen Gele sind in Tabelle 5 zu ersehen. Die Reagenzien werden alle (bis auf die APS-Lösung und TEMED) in ein 14 ml-Röhrchen pipettiert und gemischt. Zuletzt werden die Radikalinitiatoren, bzw. -katalysatoren APS und TEMED zugegeben. Nun wird das Gel zügig zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit einer 60%-igen (v/v) Isopropanol-Lösung überschichtet.

Tabelle 5. Zusammensetzung von linearen SDS-Gelen (10%, bzw. 12%).

Reagenz	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)	Sammelgel (3.5%)
Rotiphorese® Gel A	1333 µl	1600 µl	233 µl
Rotiphorese® Gel B	533 µl	640 µl	41 µl
Trenngelpuffer	1000 µl	1000 µl	-
Sammelgelpuffer	-	-	500 µl
dH <sub>2</sub> O	1111 µl	737 µl	1225 µl
APS-Lösung	20 µl	20 µl	10 µl
TEMED	3 µl	3 µl	2,5 µl

Nach dem Aushärten des Trenngels wird die Isopropanol-Lösung abgegossen und die Geloberfläche mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wird die Sammelgel-Lösung (Ansatz analog dem Trenngel-Ansatz) auf das Trenngel gegossen und der 10-Taschen-Kamm eingesteckt.

### Herstellen von Gradientengelen

Tabelle 6. Zusammensetzung von 3,5-15%-igen-SDS-Gradientengelen.

Reagenz	Trenngel (3,5%)	Trenngel (15%)	Sammelgel (3.5%)
Rotiphorese® Gel A	228 µl	985 µl	233 µl
Rotiphorese® Gel B	40 µl	173 µl	41 µl
Trenngelpuffer (mit Glycerin)	-	488 µl	-
Trenngelpuffer	488 µl	-	-
Sammelgelpuffer	-	-	500 µl
dH <sub>2</sub> O	1195 µl	305 µl	1225 µl
APS-Lösung	10 µl	10 µl	10 µl
TEMED	1,5 µl	1,5 µl	2,5 µl

Tabelle 6 zeigt die Zusammensetzung der 3,5-15%-igen-Gradientengele. Der Gradient wird mit Hilfe eines Gradientenmischers (Anfertigung der Feinmechanischen Werkstatt des Instituts für Zoologie, Universität Mainz) hergestellt. Der Gradientenmischer besteht aus zwei Kammern (Volumen je ca. 2 ml), welche über einen mit einer Schraube verschließbaren Kanal miteinander verbunden sind. Die hintere Kammer ist über einen Schlauch an eine Pumpe angeschlossen. Man pipettiert nun die Reagenzien für die 15%-ige Acrylamid-Lösung in die hintere Kammer und die Reagenzien für die 3,5%-ige Acrylamid-Lösung in die vordere Kammer. Nach Zugabe von APS-Lösung und TEMED wird die Schraube zwischen den beiden Kammern geöffnet und die Pumpe eingeschaltet. Durch den Schlauch fließt nun die Acrylamid-Lösung mit absteigender Prozentigkeit zwischen die zwei Glasplatten der Elektrophorese-Apparatur. Das weitere Vorgehen ist analog der Herstellung von linearen Gelen.

### **Gellauf**

Die gelgefüllten Glasplatten werden in die Laufkammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Nach vorsichtigem Entfernen des Kammes können die Taschen mit maximal 17 µl Probenlösung inkl. Probenpuffer beladen werden. Die Gele laufen je nach Prozentigkeit zwischen 30 und 60 Minuten bei 200 V.

### **Fixieren und Färben**

Zum Fixieren und Anfärben der Proteine wird das Gel für eine Stunde in Coomassie-Färbelösung eingelegt und geschüttelt. Danach wird die Färbelösung abgegossen und der Hintergrund mit Coomassie-Entfärbelösung entfärbt. Die Entfärbelösung wird so häufig gewechselt, bis sie farblos bleibt. Nach Entfärben der Gele werden diese auf dem Leuchttisch photographiert und dokumentiert.

#### Coomassie-Färbelösung

1,1 g Coomassie R  
210 ml dH<sub>2</sub>O  
200 ml Isopropanol  
20 ml Essigsäure

#### Coomassie-Entfärbelösung

20% (v/v) Isopropanol  
7,5% (v/v) Essigsäure

### 3.11.9. *Blue native*-PAGE (BN-PAGE)

(verändert nach Schägger *et al.*, 1994)

Die 3,5-15%-igen-Gele werden analog den SDS-Gradientengelen (siehe Tabelle 6) hergestellt, allerdings mit dem Unterschied, dass statt Trenn- und Sammelgelpuffer der SDS-freie BN-PAGE-4x-Gelpuffer verwendet wird. Je 4 µg jeder Probe werden vor Auftrag im Verhältnis 1:1 mit 2x-BN-PAGE-Probenpuffer vermischt und nicht gekocht.

<u>2x-BN-PAGE-Probenpuffer</u>	<u>BN-PAGE-4x-Gelpuffer</u>
1 M Norleucin	2 M Norleucin
100 mM Bis-Tris-HCl	200 mM Bis-Tris-HCl
0,06% (w/v) CBB G250	pH 7,0
in 50% (v/v) Glycerin	
pH 7,0	
<u>Anodenpuffer</u>	<u>Kathodenpuffer</u>
50 mM Bis-Tris-HCl	50 mM Tricin
pH 7,0	15 mM Bis-Tris-HCl
	0,01% CBB G250
	pH 7,0

Als Molekulargewichtsstandards werden die Proteine Ferritin-Dimer (900 kDa), Tyroglobulin (670 kDa) und Catalase (240 kDa) eingesetzt.

Der Gellauf findet für vier Stunden bei 500 V und 4°C statt.

### 3.11.10. Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Proteine anhand ihrer Größe aufgetrennt (Größenausschluss-Chromatographie). Dies erreicht man durch ein poröses Säulenbett, wobei die Poren einen bestimmten Durchmesser haben und deshalb nur Proteine, welche einen kleineren Durchmesser haben, in die Poren der Matrix eindringen können. Proteine, die zu groß für die Poren sind, gelangen ohne Umweg durch das Säulenbett und eluieren zuerst. Kleinere Proteine hingegen nehmen den Umweg durch die Poren und eluieren später. So erfolgt eine Größenauftrennung der Proteine eines Gemischs mit abnehmender Größe, was bei globulären Proteinen mit ihrem Molekulargewicht korreliert.

Zur Aufreinigung der Lipoproteine wird eine HemaBio-Säule eingesetzt. Als Standardproteine zur Molekulargewichtsbestimmung dienen *Nereis virens*-Hämoglobin (3500 kDa),

Tyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), BSA-Dimer (134 kDa), DNase I (31 kDa) und Lysozym (14,3 kDa).

Laufpuffer (vakuum-filtriert)

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

150 mM NaCl

1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

pH 7,4

Die Flussrate der Säule wird auf 0,3 ml/min eingestellt, die Extinktion wird bei 280 nm gemessen.

### **3.11.11. Gefriertrocknung**

(nach Pohl, 1990)

Bei der Gefriertrocknung wird das Wasser aus einer gefrorenen Proteinlösung durch Sublimation im Vakuum entfernt. Die Proben werden in 2 ml-Reaktionsgefäßen eingefroren und anschließend mit geöffnetem Deckel in die Gefriertrocknungsanlage eingestellt. Die Gefriertrocknung läuft über Nacht. Am nächsten Tag werden die Probengefäße entnommen und direkt verschlossen.

### **3.11.12. Herstellung von primären Antikörpern**

Gegen die beiden Lipoproteine dHDL und BGBP werden Antikörper hergestellt. Dazu werden die Proteine durch Gelfiltration (3.11.10.) gereinigt und anschließend gefriergetrocknet (3.11.7.). Die gereinigten Proteine werden zu der Firma Pineda Antikörper-Service (Berlin) zur Immunisierung von Kaninchen geschickt. Nach dem 75. Immunisierungstag werden die Tiere ausgeblutet und die Seren gewonnen. Die von Pineda zugesandten Antikörper- und Präimmunseren werden per Dot-Blot (3.11.14.) auf ihre Spezifität und optimale Arbeitsverdünnung hin überprüft. Als Spezifitätskontrolle dient BSA.

### **3.11.13. Co-Immunpräzipitation (IP)**

IP-Puffer

40 mM Tris

10 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

0,2% (w/v) BSA

1% (w/v) Na-Desoxycholat

1% (v/v) Triton X-100



Antigene können durch Immunpräzipitation zusammen mit ihrem Antikörper aus Lösungen ausgefällt werden. Dazu mischt man die Proteinlösung oder die Hämolymphe im Verhältnis 1:1 mit IP-Puffer und gibt zu 400 µl dieses Gemisches je 60 µl Antikörper-Serum. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C werden die Antigen-Antikörper-Komplexe 15 Minuten bei 13.000 rpm (Tischzentrifuge, 4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in PBS resuspendiert, um dann auf ein SDS-Gel aufgetragen zu werden. Der Nachweis des präzipitierten Antigens erfolgt durch einen anschließenden Western-Blot (siehe 3.11.15.).

In dieser Arbeit werden die Antigene aus *Astacus leptodactylus*- und *Astacus astacus*-Hämolymphe mit dem  $\alpha$ -dHDL-Antikörper gefällt.

#### **3.11.14. Dot-Blot**

Der Dot-Blot ermöglicht einen schnellen Nachweis von Antigenen in einer Proteinlösung. Mit diesem Verfahren kann man zum Beispiel die Spezifität und Arbeitsverdünnung von Antikörpern austesten, oder eine Probe auf das Vorhandensein von Antigenen testen, wenn das Molekulargewicht des Antigens dabei nicht interessiert.

Proteinlösungen werden auf einen Streifen Nitrocellulose-Membran aufgetropft und getrocknet. Die Tropfenfläche wird dabei möglichst klein gehalten; es wird immer je 1 µl aufgetropft und erst nach dessen Trocknen der nächste Tropfen aufgetragen. Befinden sich die Proteine auf der Membran, wird diese wie eine normale Western-Blot-Membran behandelt und entwickelt (siehe 3.11.15.).

#### **3.11.15. Western-Blot**

Durch das Western-Blot-Verfahren werden Proteine aus SDS-Gelen elektropheretisch auf eine Membran übertragen, wo sie kovalent binden. Auf der Membran können bestimmte Proteine dann mit einem Antikörper spezifisch nachgewiesen werden. Unterschieden werden zwei Methoden des Western-Blots; der sogenannte Wet-Blot, bei dem der elektrophoretische Übertrag in einem Pufferreservoir stattfindet, und der Semidry-Blot, bei dem die Filterpapiere zuvor in Puffer getränkt werden.

**Wet-Blot**

(nach Bolt *et al.*, 1997)

**Wet-Blot-Puffer**

40 mM Tris-HAc  
 20 mM Na-Acetat  
 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
 0,05% (w/v) SDS  
 20% (v/v) MeOH

Die Schichtung der einzelnen Lagen in der Wet-Blot-Apparatur ist folgende:

(oben)  
 Rahmen  
**- Kathode -**  
 Rahmen  
 2 puffernasse Schwämme  
 2x puffernasses Filterpapier  
 SDS-Gel  
 Nitrocellulose-Membran  
 2x puffernasses Filterpapier  
 2 puffernasse Schwämme  
 Rahmen  
**+ Anode +**  
 Rahmen  
 (unten)

Die Wet-Blot-Apparatur wird mit Wet-Blot-Puffer vollständig aufgefüllt und im Kühlraum bei 4°C und 10 V für drei Stunden *geblottet*.

**Semidry-Blot**

(nach Kyhse-Andersen, 1984)

**Blotpuffer I**

25 mM Tris-HCl  
 20% (v/v) MeOH  
 pH 10,4

**Blotpuffer II**

0,3 M Tris-HCl  
 20% (v/v) MeOH  
 pH 10,4

**Blotpuffer III**

25 mM Tris-HCl  
 40 mM Norleucin  
 pH 9,4

Die Whatman-Filterpapiere sowie das Gel und die Nitrocellulose-Membran werden in den entsprechenden Blotpuffern (siehe oben) inkubiert.

Übersicht über die Schichtung der einzelnen Lagen für den Semidry-Blot:

(oben)  
**- Kathode -**  
9x Filterpapier (Blotpuffer III)  
SDS-Gel (Blotpuffer III)  
Nitrocellulose-Membran (Blotpuffer I)  
4x Filterpapier (Blotpuffer I)  
7x Filterpapier (Blotpuffer II)  
**+ Anode +**  
(unten)

Die Elektrophorese erfolgt über 90 Minuten bei 45 mA/Gel.

#### Ponceau-S-Färbung

Nach erfolgtem elektrophoretischen Übertrag der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wird die Membran mit dem roten Azofarbstoff Ponceau-S reversibel angefärbt. Dies dient zum Einen der Kontrolle des Protein-Übertrags und zum Anderen der Visualisierung der Markerbanden, welche in der nachfolgenden Immunodetektion nicht erkannt werden. Die Membran wird für 20 Minuten in die Ponceau-S-Lösung gelegt; anschließend wird sie mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, bis der Hintergrund verschwindet, die Banden aber noch deutlich zu erkennen sind. Die Markerbanden werden dann mit einem weichen Bleistift nachgezeichnet.

#### Ponceau-S-Lösung

0,2% (w/v) Ponceau-S  
3% (v/v) Trichloressigsäure  
3% (v/v) Schwefelsalicylsäure

#### Blockieren der freien Bindungsstellen

Freie Bindestellen auf der Nitrocellulose-Membran werden mit Blockierungspuffer III (siehe 3.7. Puffer- / Lösungen) abgesättigt. Die Inkubation erfolgt entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

#### Immunodetektion

Nach zweimaligem Waschen der Membran mit PBT erfolgt die Inkubation mit der primären Antikörper-Lösung (siehe 3.6. Antikörper; Inkubation: 1 h, RT oder üN, 4°C). Nun wird die Membran fünfmal je fünf Minuten mit PBT gewaschen und anschließend mit dem

sekundären Antikörper inkubiert (siehe 3.6. Antikörper; Inkubation: 1 h, RT oder üN, 4°C). Es folgen je zwei Waschschritte in PBT, drei in PBS und einer in dH<sub>2</sub>O (je 5 Minuten).

### Entwickeln der Membranen

(nach Blake *et al.*, 1984)

Zum Entwickeln der Membranen werden diese zuerst eine Minute in Äquibrierungslösung inkubiert. Dazu werden 150 µl BCIP-Lösung und 200 µl NBT-Lösung pipettiert. Die Farbreaktion dauert zwischen 5 und 60 Minuten und wird abgestoppt, indem die Membranen in dH<sub>2</sub>O gelegt werden. Nun können die Membranen getrocknet und eingescannt werden.

#### Äquibrierungslösung

100 mM Tris-HCl  
100 mM NaCl  
50 mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 9

#### BCIP-Lösung

2% (w/v) BCIP  
(p-Toluidin-Salz)  
in DMF

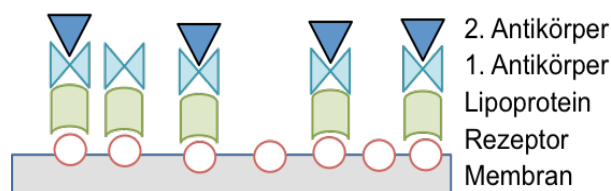
#### NBT-Lösung

3% (w/v) NBT  
in 75% (v/v) DMF

### 3.11.16. Ligandenblot

(verändert nach Daniel *et al.*, 1983)

Der Ligandenblot, auch Far Western-Blot genannt, ist eine Methode zum Nachweis von Rezeptor-Liganden-Bindungen und außerdem eine indirekte Methode zur Molekulargewichtsbestimmung des Rezeptors, wenn es gegen diesen noch keinen Antikörper gibt. Eine schematische Übersicht über die an ein *Sandwich* erinnernde Schichtung der verschiedenen Proteine findet sich in Abbildung 16.



**Abbildung 16. Übersicht über die Schichtung der einzelnen Proteine beim Ligandenblot.** Die Membranpräparation, in der sich unter anderem die gesuchten Lipoprotein-Rezeptoren befinden, wird elektrophoretisch auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. In Calcium-haltigem HEPES-Puffer falten sich die Rezeptoren so zurück, dass bei Inkubation mit den Lipoproteinen diese spezifisch an ihren jeweiligen Rezeptor binden können. Die Lipoproteine können wiederum mit dem primären und sekundären Antikörper nachgewiesen werden.

Damit eine Bindung des Lipoproteins an seinen Rezeptor stattfinden kann, muss dieser korrekt gefaltet vorliegen. Aus diesem Grund wird die Membranpräparation (siehe 3.11.4. Membranprotein-Isolierung) mit Probenpuffer ohne vorherige Zugabe von DTT auf das SDS-Gel aufgetragen, um die intramolekularen Disulfidbrücken nicht zu zerstören. Außerdem wird die Nitrocellulose-Membran nach dem Elektrotransfer (siehe 3.11.15. Western-Blot) in Calcium-haltigem HEPES-Puffer weiter behandelt.  $\text{Ca}^{2+}$  bindet als Cofaktor an die Cysteinereichen Repeats der Ligandenbindedomäne des Rezeptors und ist somit wichtig für die Ligandenerkennung (Gent *et al.*, 2004).

Nach Ponceau-S-Färbung und Blockieren der freien Bindungsstellen mit Magermilchpulver-Lösung wird die Ligandenlösung (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dHDL, bzw. BGBP in HEPES-Puffer) auf die Membran gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit HEPES-Puffer wird die Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper (1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C), und nach weiteren fünf Waschschritten mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Das Entwickeln der Membran wird wie beim normalen Western-Blot durchgeführt (siehe 3.11.15. Western-Blot).

#### Laminarin-Behandlung

Nach Duvic und Söderhäll (1992) wird das  $\beta$ -1,3-Glukan Laminarin spezifisch von BGBP erkannt und gebunden und bewirkt dessen Aktivierung, die essentiell für die spätere Bindung an seinen Rezeptor ist (untersucht wurden bisher nur die Hämocyten). Diese ‚Laminarin-Aktivierung‘ wird untersucht, indem 2,5 mg/ml Laminarin zur BGBP-Ligandenlösung gegeben und mit inkubiert werden.

#### **3.11.17. Enzyme-linked immunosorbent-Assay (ELISA)**

ELISA ist eine immunologische Methode zum (quantitativen) Nachweis von Antigenen. In dieser Arbeit soll mittels ELISA die Konzentration der Lipoproteine dHDL und BGBP in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* bestimmt werden. Da ELISA eine extrem sensitive Methode ist, die Spuren von Antigenen nachweisen kann, werden die Hämolymphe weiter Krebse auf das Vorhandensein von dHDL getestet.

Substratpuffer

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 25 mM Zitronensäure  
 pH 5

Substratlösung (frisch ansetzen)

0,4 mg/ml o-Phenylendiamin  
 0,4 µl/ml 30% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 in Substratpuffer

Alle Bestimmungen werden als Doppel-Bestimmungen angesetzt. Die Standardreihe für BGBP geht von 0,1 bis 100 ng/Well, die für dHDL von 1 bis 200 ng/Well ((200 ng), 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,13 ng, 1,56 ng, 0,78 ng, 0,39 ng, 0,2 ng, 0,1 ng). Die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte werden entsprechend mit den Standards beladen.

Exakt 100 µl Hämolymphe werden mit 100 µl eiskaltem Krebsringer gemischt und die Hämocyten direkt pelletiert (1000 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wird abgenommen und weiter mit PBS verdünnt, so dass folgende Endverdünnungen entstehen: 1:20.000, 1:40.000, 1:80.000, 1:160.000, 1:320.000. Je 50 µl dieser Verdünnungen werden in jedes Well pipettiert. Die Platte wird für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Ausschlagen der Platte werden freie Bindungsstellen vier Stunden bei 37°C mit je 300 µl/Well Bockierungspuffer II abgesättigt. Nach Ausschlagen der Platte wird mit dem primären Antikörper inkubiert (1 h, 37°C, Verdünnung von α-dHDL, bzw. α-BGBP: 1:1.000 in 1% (w/v) BSA in PBS). Im Anschluss werden die Wells mit je dreimal 200 µl PBT gewaschen. Als sekundärer Antikörper wird ein Peroxidase-gekoppelter α-Kaninchen-IgG aus Ziege verwendet (Verdünnung 1:2.500 in 1% (w/v) BSA in PBS, 50 µl/Well, Inkubation: 1h, RT). Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl/Well PBT werden 50 µl/Well Substratlösung zugegeben. Die Entwicklungsdauer beträgt zwischen 10 und 30 Minuten; dann wird die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1N Schwefelsäure abgestoppt und die Platte bei 490 nm im Photometer gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit den Programmen REVELATION und EXCEL. Dabei werden nur Daten ausgewertet, die im linearen Teil der typischerweise sigmoidal verlaufenden Kurve der Standardwerte liegen.

**3.11.18. Massenspektroskopie (MS)**

Massenspektroskopie ist eine Methode zur Molekulargewichtsbestimmung von Peptiden / Proteinen. Verdaut man Proteine mit Proteasen, die immer nach dem selben bekannten Muster (z.B. nach spezifischen Seitenketten) schneiden, entsteht nach Bestimmung der Massen der einzelnen Peptide für jedes Protein ein charakteristisches Fragmentmuster (sog. *Fingerprinting*). Bei bekannter Aminosäuresequenz kann man die Methode zur Validierung

bestimmter Proteine nutzen. Spaltet man die Peptide noch weiter auf, kann man deren Bruchstücke für eine *de novo*-Sequenzierung von Proteinen mit unbekannter Aminosäuresequenz nutzen.

### Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgt ausschließlich in Weichmacher-freien Eppendorf 1,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf).

#### 1. SDS-PAGE

Die Proteine werden per SDS-PAGE (siehe 3.11.8.) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Färbelösung angefärbt. Dann werden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und in 30% (v/v) EtOH zur Analyse geschickt. Dabei werden die Untereinheiten getrennt voneinander analysiert.

oder

#### 2. Acetonfällung

Die Proteine werden mit Aceton gefällt (siehe 3.11.7.). In diesem Fall kann man die Untereinheiten nicht trennen.

Die so gereinigten und konzentrierten Proteine werden zur weiteren Analyse an folgende externe Firmen, bzw. Kooperationspartner, geschickt:

- Firma ChromaTec GmbH (Greifswald)
- Proteomics International Pty Ltd (Nedlands, Australien)
- Arbeitsgruppe Prof. Amir Sagi, Department of Life Sciences, Ben-Gurion University of the Negev (Beer-Sheva, Israel)

Dort erfolgt eine enzymatische Fragmentierung der Lipoproteine mit den Proteasen V8, bzw. Trypsin. Die V8-Protease aus *Staphylococcus aureus* spaltet Peptidbindungen auf der carboxyterminalen Seite von Asp- und Glu-Resten. Die Schnittstellen von Trypsin sind an der carboxyterminalen Seite von Lysin- und Argininresten (wenn danach kein Prolin folgt). Der Verdau wird nach Standardmethoden direkt im Gel durchgeführt (nach Rosenfeld *et al.*, 1992). Die Peptide werden mit Acetonitril-haltigem Ammoniumcarbonat-Puffer extrahiert. Die Peptide werden entweder durch MALDI-TOF/TOF oder durch LC-MS/MS analysiert.

### **MALDI-TOF/TOF**

(Rehm, 2006)

Die Peptide werden auf ein Metallplättchen überführt, in eine Matrix eingelagert (z.B.  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizsäure), in das Massenspektrometer eingebracht und der Protonenübergang per UV-Laserpuls induziert. Die positiv geladenen Protein-Ionen fliegen im elektrischen Feld nach folgender Formel:

$$E = (m/z) \times v^2$$

(E = Energie, m = Masse, z = Ladung, v = Geschwindigkeit)

Da die Ladung der Protein-Ionen im Vakuum in der Regel +1 ist ( $[M + H]^+$ ), trennen sich die Moleküle nach Masse, also dem Molekulargewicht. Sie treffen nach unterschiedlicher Flugzeit (TOF = *Time of flight*) auf dem Detektor ein und werden dort registriert. Die einzelnen Fragmente werden in einem zweiten Schritt nochmals fragmentiert (TOF/TOF) und das entstehende Fragmentationenspektrum für die Bestimmung des betreffenden Trypsin-Fragments (*Parent Ion*) verwendet.

### **Auswertung**

Die Auswertung der Daten geschieht mit dem Programm MASCOT Ms/Ms IONS SEARCH und folgenden Suchparametern:

Database: MSDB

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Allow up to 1 missed cleavages

Peptide tol.  $\pm 50$  ppm

MS/MS tol.  $\pm 0,6$  Da

Peptide charge: 1+

Instrument: MALDI-TOF-TOF

### **LC-MS/MS**

(nach Shechter *et al.*, 2008)

LC-MS/MS-Analysen von dHDL wurden in Kooperation mit der AG Prof. Amir Sagi (Department of Life Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Israel) durchgeführt.



### 3.11.19. Lektin-Blot

(nach Stieb *et al.*, 2008)

Lektin-Blots werden zum Nachweis von Glykosylierungen eingesetzt. Lektine sind Proteine, die ubiquitär vorkommen und nur an bestimmte Zucker binden. *In vivo* dient dies zum Beispiel Zell-Zell-Interaktionen. Es gibt eine Reihe käuflich erwerblicher Lektine aus verschiedenen Organismen mit unterschiedlicher Spezifität. Zur Unterscheidung von O- und N-Glykosylierungen werden hier die Lektine Concanavalin A (Con A) aus der Jackbohne (erkennt N-Glykosylierungen) und *peanut agglutinin* (PNA) aus der Erdnuss (erkennt O-Glykosylierungen) eingesetzt.

Die Lipoproteine werden per SDS-PAGE (3,5-15%) aufgetrennt und dann nach dem Wet-Blot-Verfahren (siehe 3.11.15.) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Blockierung freier Bindungsstellen auf der Membran erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungspuffer I. Nach zweimaligem Waschen in TBS I wird die Membran mit den biotinylierten Lektinen (siehe unten) (10 µg/ml in TBS II) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Daraufhin wird die Membran zweimal in TBS II gewaschen, bevor sie für eine Stunde mit Peroxidase-gekoppeltem Avidin (0,05 µg/ml in TBS III) inkubiert wird. Nach nochmaligem Waschen in TBS I wird die Membran in der Chloro-Naphtol-Gebrauchslösung entwickelt.

#### Verwendete Lektine:

- Con A (aus *Canavalia ensiformis*)  
Spezifität: α-D-Man, α-D-Glc  
Cofaktoren: Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>
- PNA (aus *Arachis hypogaea*)  
Spezifität: β-D-Gal(1-3)-D-GalNAc  
Cofaktoren: keine

#### Chloro-Naphtol-Gebrauchslösung

0,5 mg/ml Chloro-Naphtol (in MeOH vorlösen)  
0,05‰ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
in TBS I

## 3.12. Histologische Methoden

### 3.12.1. Dil-Aufnahmestudien

#### Dil-Markierung

Zu 100 µl dHDL-Lösung (2,2 mg/ml) werden 30 µl frisch verdünnte 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat (Dil)-Stammlösung im Verhältnis 1:30 (in PBS) gegeben. Der Ansatz wird drei Stunden auf dem Magnetrührer gerührt. Anschließend wird ausgefallenes Dil fünf min bei 13.000 x g abzentrifugiert.

#### Dil-Stammlösung

3 mg/ml Dil  
in DMSO

#### Lebendinjektion

Einem jungen *Astacus leptodactylus* (Größe < 3 cm, Alter < 1 Jahr, 10 min in Eiswasser betäubt) werden 22 µg Dil-markiertes dHDL injiziert. Die Injektion erfolgt in Teilschritten à 5 µl Injektionsvolumen im Abstand von einer halben Stunde. Dabei wird eine 10 µl Hamilton-Spritze mit Schliff in den Spalt zwischen Carapax und Pleon eingeführt.

Vor dem Fixieren wird der Krebs wiederum auf Eis betäubt, dann werden ihm alle Extremitäten abgeschnitten. Die Fixierung erfolgt in wässriger 4%-iger (w/v) Paraformaldehyd (PFA)-Lösung, ab Todeszeitpunkt für zwei Stunden. Anschließend wird das Tier 4 x 15 Minuten in PBS gewaschen. Dann können die Organe und Gewebe entnommen werden.

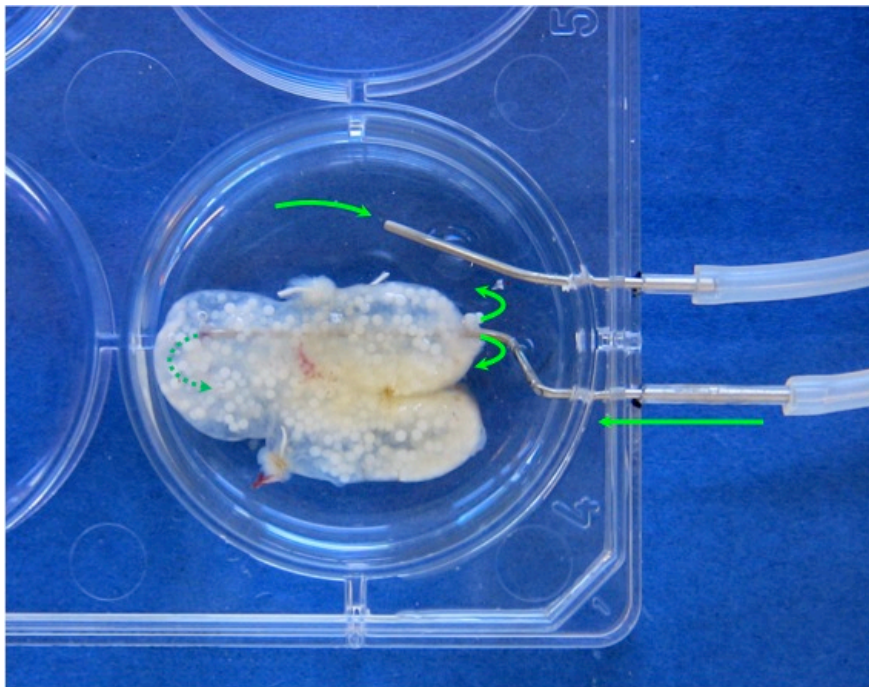
#### Ovarien-Inkubation

Das Ovarium eines weiblichen *Astacus leptodactylus* wird vorsichtig und zügig präpariert und anschließend in Kultur-Medium gelegt. Dem Kulturmedium werden 0,1 mg/ml Dil-markiertes dHDL zugegeben.

#### Kultur-Medium

500 µl 10x Medium 199 mit Hanks Salzen  
0,125 mg/ml Penicillin  
0,5 mg/ml Streptomycin  
in 5 ml Krebsringer

Die Kultur erfolgt im Well einer 3x2-Kulturplatte. Eine Kanüle wird so in das Ovarium eingestochen, dass ein idealer Medium-Fluss stattfinden kann (siehe Abbildung 17); die andere Kanüle führt das Medium zur Peristaltikpumpe. Die beiden Kanülen werden an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und das Ovarium mit einer Flussrate von 0,6 ml/min für sechs Stunden perfundiert. Anschließend wird das Medium gegen PBS ausgetauscht und das Ovarium für 30 Minuten weiter perfundiert. PBS wird anschliessend durch 4%-ige (w/v) wässrige PFA-Lösung ersetzt und die Perfusion für zehn Minuten weitergeführt. Die weitere Fixierung (50 min) erfolgt ohne Perfusion. Die PFA-Lösung wird anschließend unter dreimaligem Wechsel mit PBS ausgetauscht. Als letzter Schritt wird PBS gegen 10% Saccharose in PBS ausgetauscht und die Perfusion für zehn Minuten fortgesetzt. Das Präparat wird dann im Kühlschrank über Nacht aufbewahrt. Die weitere Vorbereitung für die Herstellung von Dünnschnitten erfolgt wie unten beschrieben.



**Abbildung 17. Übersicht über die Perfusion eines *Astacus leptodactylus*-Ovariums.** Das präparierte Ovarium befindet sich in Kultur-Medium. Die Kanülen sind an eine Peristaltikpumpe angeschlossen und pumpen mit einer Flussrate von 0,6 ml/min das Medium durch das Ovar. Die grünen Pfeile geben die Flussrichtung der Lösung an. (Bild: Ulrich Hoeger)

### **Fixieren und Schneiden**

Das Fixieren von Geweben, Organen, Zellen und kleinen Ganztierpräparaten erfolgt nach dreimaligem Waschen in PBS in wässriger 4%-iger (w/v) PFA-Lösung, je nach Präparatgröße zwischen einer Stunde (Zellen) und über Nacht (Ganztier). Danach wird das Präparat erneut

in PBS gewaschen und dann zum Wasseraustausch einer aufsteigenden Saccharose-Lösungsreihe zugeführt. Begonnen wird mit 10%-iger (w/v) Saccharose-Lösung (in PBS) über eine 20%-ige (w/v) Saccharose-Lösung (in PBS) und final in einer 30%-igen (w/v) Saccharose-Lösung (in PBS). Der Wechsel erfolgt immer dann, wenn die Präparate untergehen, weil dann die Dichte der jeweiligen Lösung erreicht ist. Die Inkubation geschieht bei 4°C.

Um Dünnschnitte der Präparate herzustellen, werden diese in Tissue Tec eingebettet und am Microm HM 560 geschnitten. Die Objekt- und Messertemperatur wird dabei auf -22°C eingestellt; die Dicke der Schnitte beträgt zwischen 10 und 14 µm. Die Schnitte werden auf 76 x 26 mm große Objektträger (Roth) aufgenommen, trocknen gelassen und mit DAPI-DABCO-Glycerin eingedeckelt.

#### DAPI-DABCO-Glycerin

0,15 µg/ml DAPI

2,5 mg/ml 1,4-Diaza-bicyclo(2,2,2)octan (DABCO; Carl Roth)

90% (v/v) Glycerin

in PBS

### **3.12.2. Immunhistochemie (IHC)**

Präparatschnitte werden wie unter 3.12.1. (Fixieren und Schneiden) hergestellt. Nach dem Trocknen und vor dem Eindeckeln der Schnitte erfolgt die Antikörper-Färbung. Zuerst werden die Schnitte mit einem *liquid blocker* (Super Pap Pen) auf dem Objektträger umrandet. Alle Flüssigkeiten werden nun direkt in die Umrandung getropft und auch dort wieder vorsichtig mit einer Pipette abgesogen. Die Schnitte werden mit PBT gewaschen (5 min), bevor sie blockiert werden. Zum Blockieren wird 5%-iges Ziegen Serum verwendet, die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Der primäre Antikörper, bzw. das Präimmunserum in der Negativkontrolle, wird zweifach konzentrierter als im Western-Blot eingesetzt, im Fall von  $\alpha$ -dHDL und  $\alpha$ -BGBP also 1:7.500. Die Inkubation erfolgt über 90 Minuten bei Raumtemperatur. Danach werden die Schnitte dreimal für je 10 Minuten mit PBS gewaschen. Da der sekundäre Antikörper Fluorogengekoppelt ist (Alexa 488), muss ab jetzt im Dunkeln gearbeitet werden. Die Inkubation des 1:400 in PBS verdünnten Antikörpers erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach werden die Schnitte wiederum dreimal für 10 Minuten in PBS gewaschen, bevor sie mit DAPI-DABCO-Glycerin eingedeckelt werden.

## Hämocyten

Die fixierten Hämocyten werden eine Minute bei 500 x g zentrifugiert, mit PBT gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5%-igem Ziegen Serum (Sigma) blockiert. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit den primären Antikörpern (1:7.500 in PBS + 1% BSA) ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für zehn Minuten mit PBS muss im Dunkeln gearbeitet werden. Die Zellen werden mit dem sekundären Antikörper (Alexa 488; Konzentration 1:400, in 0,15 µg/ml DAPI, 1% BSA, in PBS) eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wird dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit DABCO-Glycerin eingedeckelt.

### **3.13. Mikroskopie**

#### **3.13.1. Fluoreszenz-Mikroskopie**

Immunfluoreszenz-Schnitte, Quetsch-, Zupf- und Schnittpräparate aus den Dil-Aufnahmestudien, sowie fluoreszenz-markierte Hämocyten werden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop DM6000 B betrachtet. Dabei werden die entsprechenden Filter verwendet. Es kommen das 20-fach, 40-fach und 60-fach-Objektiv, sowie das 80-fach und 100-fach Öl-Immersionsobjektiv zum Einsatz. Die Belichtungszeit wird in den Positiv- und Negativkontrollen gleich eingestellt. Um die Tiefenschärfe zu verbessern, werden Stapelaufnahmen gemacht. Diese werden anschließend elektronisch in 5 bis 10 Iterationsschritten dekonvoluiert.

#### **3.13.2. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)**

(nach Harris *et al.*, 1991)

#### Beschichtung der Kupfernetzchen mit Kohlenstoff

Zur Beschichtung der Kupfernetzchen mit Kohlenstoff wird zuerst im Vakuum ein Kohlenstofffilm durch Bedampfung auf Glimmer (befindet sich auf den Objektträgern im Vakuum-Beschichter) aufgebracht. Nun wird der Glimmer in Wasser eingetaucht und so der Kohlenstofffilm abgehoben, welcher nun auf der Wasseroberfläche schwimmt. Unter der Wasseroberfläche befinden sich die Kupfernetzchen auf einem Filterpapier. Nun wird das Wasser langsam abgelassen und der Kohlenstoff so auf die Netzchen gebracht.

### Probenvorbereitung

Auf ein Stück Parafilm® werden vier Tropfen ddH<sub>2</sub>O (à 20 µl), 20 µl der Probe und 10 µl 2%-ige (w/v) Uranylacetat-Lösung (pH 4,5) gegeben. Nun wird das Kupfernetzchen mit einer Pinzette am Rand gefasst und mit der beschichteten Seite zuerst in die Proteinlösung getaucht. Dabei sollte der Tropfen auch nur die beschichtete Seite benetzen. Nach 30 Sekunden wird die Flüssigkeit vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt. Zum Waschen wird das Netzchen wieder mit der beschichteten Seite nacheinander in die Wassertropfen getaucht und das Wasser jeweils mit dem Filterpapier abgesaugt. Dann wird das Netzchen (mit der beschichteten Seite) in die Uranylacetat-Lösung getaucht und für 30-60 Sekunden inkubiert, bevor der Tropfen wiederum mit einem Filterpapier entfernt wird.

### 3D-Rekonstruktion

(nach Gatsogiannis *et al.*, 2009)

Die Bildung von Klassensummen und die 3D-Rekonstruktion wurden in Zusammenarbeit mit Philipp Arnold (Institut für Zoologie, Abteilung für Molekulare Tierphysiologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) durchgeführt.

#### **3.13.3. Rasterkraft-Mikroskopie (AtomForce Microscopy - AFM)**

Da bei der rasterkraftmikroskopischen Probenvorbereitung keine Fixierung und keine Kontrastierung vorgenommen wird, kann man sagen, dass diese Aufnahmen im Vergleich zu elektronenmikroskopischen Aufnahmen als eher *in vivo* anzusehen sind. Allerdings müssen die Partikel dabei auf einer Glimmerunterlage fixiert werden.

Die AFM-Aufnahmen werden von der AG Kühnle (Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) erstellt. Es werden 10 µl einer wässrigen 4 µg/ml dHDL-Lösung auf Glimmer aufgetropft und der Glimmer bei 30 rps zentrifugiert (*Spin coating*), bis die Probe trocken ist. Die Aufnahmen werden mit einem VT AFM 25 im *Tapping*-Modus gemacht. Dazu wird ein *Cantilever* der Firma NANOSENSORS™ (PPP-NCLAuD) verwendet.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1. Molekularbiologie

#### 4.1.1. BGBP-Sequenz

Die mRNA-Sequenz (bzw. die der zugehörigen cDNA) des *Astacus leptodactylus*-BGBP wurde erfolgreich entschlüsselt und unter der GenBank-Nummer FN298411.2 und der Bezeichnung ‚*Astacus leptodactylus* partial mRNA for beta-1,3-glucan-binding protein (bgbp gene)‘ in der NcBI-Datenbank veröffentlicht (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/FN298411.2>) (siehe Abbildung 18). Sie besteht aus 4062 Nukleotiden, die sich in Stopp-Codon-freiem Leseraster in eine 1353 Aminosäuren umfassende Proteinsequenz übersetzen lässt. Die daraus errechnete molekulare Masse beträgt 153 kDa. In der Sequenz befinden sich drei Cysteine; außerdem 194 negativ geladene Reste (Asp und Glu) und 161 positiv geladene Reste (Arg und Lys). Da auf keines der Arginine und Lysine ein Prolin folgt, ergeben sich 161 potentielle Trypsin-Schnittstellen. Der errechnete theoretische isoelektrische Punkt des Proteins liegt bei  $pI = 5,56$ . Ein Signalpeptid konnte nicht identifiziert werden, allerdings ist der vollständige N-Terminus noch nicht bekannt (aber auch Lai *et al.* (2011) finden in der *Fenneropenaeus chinensis*-BGBP-complete coding sequence kein Signalpeptid). Die vorhergesagte Sekundärstruktur des Proteins enthält 19,4%  $\alpha$ -Helixen, 34,1%  $\beta$ -Faltblätter und 46,6% ungeordnete Strukturen. An konservierten Domänen, bzw. Motiven konnten ein RGD-Zelladhäsionsmotiv sowie eine putative Glukanase-Domäne gefunden werden.

#### *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz:

```

E I T K V N D N S Y K A E W K R N N N Y V T A
GGGAAATAACAAAGGTGAATGACAATTCATATAAAGCGGAATGGAAGAGAAACAACAACATATGTGACGGCT
S I E K E G R S R A F S L E I K S E L Q G W E F
TCAATTGAGAAAGAGGGCCGTAGCCGAGCTTTTAGTTTGGAGATTTAAAAGTGAACACTACAAGGCTGGGAGTTC
L A L T G K L D Q D A L Q G Y V S G A I N E E K
CTGGCCCTCACCGGCAAGCTTGACCAGGACGCCCTGCAGGGCTATGTCAGCGGCGCCATTAATGAAGAAAAG
V T L S I Q G R H D V E G E F T L N M T T P Y D
GTCACCCTCTCTATAACAAGGACGACATGACGTGGAGGGGGAGTTCACCCTCAACATGACAACCTCCTTATGAC
N Y R T V E G G K L A Y S L R K R Q M K L E A S S
AACTATCGCACTGTTGAGGGCAAATTAGCTTACAGTTTGGAGAAAAGACAGATGAAAACCTGGAGGCCCTCGTCT
S S S E F H Y I F K Y T R R N G V E S H L L V P
TCAAGCTCAGAATTTTCATTACATTTTTTAAATACACGAGAAGGAACGGCGTGGAGTCACACCTGCTGGTGCCC
N E Q Q N T E L T V N L G P L A G K I V F T S R
AACGAGCAGCAGAACACCGAGCTCACTGTCAACCTCGGTCTTTGGCGGGTAAAATTGTCTTTACATCTCGA
F E A L R N F H H E Y K V T F E Q H T G L V M F
TTCGAAGCCCTCAGAAATTTCCACCATGAATACAAAGTAACATTTGAACAGCATAACAGGGCTTGTTATGTTC
S N K I T I N D I D V F S T E F E G N S A E K K
TCCAATAAAATCACCATAAATGATATTGATGTATTTTCTACGGAGTTTGGAGGGCAAACCTCTGCAGAAAAGAAAG
L H L E V H T R L P G R H S V F H V H R E G F S

```

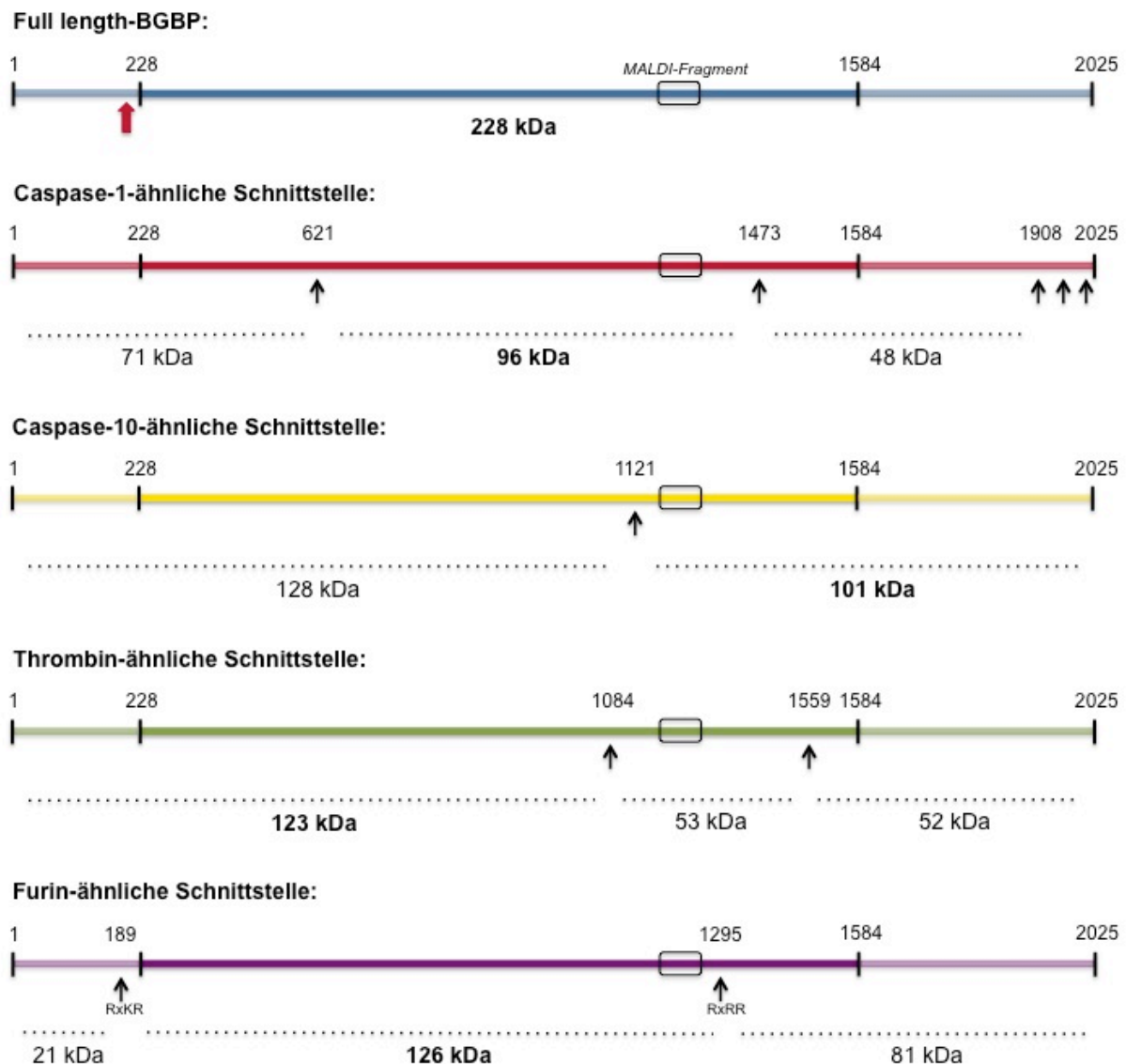
CTTCACTTGGAAGTCCACACACGTCTACCAGGCAGACACTCGGTCTTCCACGTTTCATAGAGAAGGTTTTTCC  
 I F N L N F K R Q I E V S G D V V E K E F K V E  
 ATTTTCAATTTAAATTTTAAACGCCAGATCGAAGTCTCTGGAGATGTAGTAGAAAAGGAATTTAAAGTTGAA  
 L S G S G D L P E E G T I N A I I T N T F R E Q  
 CTCTCAGGATCTGGAGACCTACCTGAGGAAGGAACAATTAATGCCATCATTACCAACACATTCGGAGAGCAA  
 P R T I T A K I D V N R L T S P K T I R I E V N  
 CCAAGGACTATAACAGCAAAAATTGATGTGAATAGACTTACAAGTCCAAAAACAATAAGGATTGAAGTTAAC  
 P T P S G L Y I F D I T Y N I D L T Q P S H G D  
 CCAACACCAAGTGGACTTTTATATCTTTGACATAAATTATAACATCGACTTGACACAGCCATCACATGGTGAT  
 Y D I R I T **T** P D R S A A P W K H I S G S W D V  
 TATGATATCAGAATTACAACCCAGACAGATCAGCTGCCCCATGGAAACATATCTCCGGCAGCTGGGACGTG  
 Q D T D T A Q L T F N I G D V T Y T A N G K L G  
 CAAGATACTGACACTGCACAACCTTCAATATCGGTGATGTAACATACACAGCCAATGGCAAATTTGGGA  
 I R E S T M I L S A D G S E N I F L Q W K F E R  
 ATCCGAGAATCAACAATGATTCTGTCTAGCCGACGGTAGTGAAAATATATTCCTTCAATGGAAATTTGAGAGG  
 E G A Y R D Y Y L K L G R E S R Y G M L K L K G  
 GAAGGCGCTTACAGGGACTACTACTTGAAGCTTGGTCGAGAGTCAAGGTACGGAATGCTAAAATTTAAAGGGA  
T I T D I A H V D I E G G F K V G P F Q P E E F  
 ACTATCACCGATATCGCTCACGTGCACATCGAAGGGGGCTTCAAGGTCCGGCCATTCCAACCAGAAGAATTT  
 L F T S K W N K G P D G S V T G E G S F N Y G D  
 TTATTCACATCAAAGTGAACAAAGGCCCTGATGGCTCTGTAAGTGGAGAAGGATCATTTAACTACGGTGAT  
 Y H G S H T L E E F H R D A A Q R S A T F R W T  
 TACCATGGGAGCCACACCCTGGAGGAATTCACCGGGATGCTGCTCAAAGATCCGCCACCTTCAGATGGACA  
 S **T** S N F P D Y E Q I S V S G N Y D V Y G K F V  
 TCAACCTCAAATTTCTGATTATGAACAGATTTCCGTATCTGGAAACTACGATGTTTATGGCAAATTCGTG  
 F N A K I K V N E R E S K I D I **N I S** N L N P K  
 TTTAATGCAAAGATAAAAGTAAATGAACGTGAGTCAAAAATTGATATAAAATATATCGAATCTGAACCCAAAG  
 R S S N T L E W D V P I L G E F G K V Q L T L S  
 CGATCTAGCAACACCTTGGAGTGGGACGTCCCAATACTTGGTGAGTTTGGCAAAGTTCAGTTGACGCTCAGT  
 H N F R K A T S K **S** I A A V A K I G R R Q A F V  
 CATAATTTTAGAAAAGCAACTAGCAAGTCCATCGCAGCTGTGGCAAAGATAGGGCGAAGGCAGGCATTCGTG  
 K A N W **N R S** E N F E T L D G T I E V K S K Y L  
 AAAGCTAATTGGAACAGAAGTGAAAACCTTTGAGACTCTTGATGGGACAATTGAAGTAAAGTCAAAAATATCTT  
 G D I **N I S** I K Y D V T N I Q D A N A E V K Y S  
 GGAGATATTAACATCTCTATTAAGTACGATGTTACCAACATTCAGATGCAAACGCTGAGGTTAAGTACTCC  
 R K A A D Q Q E K Y A N I K W H R K S S A E H L  
 AGAAAGCAGCAGATCAACAGGAAAAATATGCCAACATTAATGGCATAGAAAAGTAGCGTGAACACTTG  
 E G E I I I D T S L E H L S H A R V Y N K A D F  
 GAAGGTGAAATCATTATAGATACATCACTTGAACATCTTTACACGCTCGTGTTTACAACAAAGCTGACTTC  
 S D I F Q L R S G L E W N D K A I S L D F N V G  
 AGTGACATCTTCCAGTTAAGATCTGGCCTCGAATGGAATGATAAGGCAATATCACTTGACTTTAATGTCGGC  
 K N S L S G K I T T P F E N F E T I E G E L T Y  
 AAGAATTCATTATCAGGAAAAATCACAACACCATTTCGAAAACCTTCGAAACAATTGAAGGCGAATTAACATAT  
 S M E S K D K V V T L K Y E R G E R K V N M **N F**  
 AGTATGGAGAGTAAAGACAAAGTGGTAACTCTGAAATATGAACGTGGTGAACGGAAAGTTAATATGAACCTT  
**T** L N R K S K K **R G D** F E L S L T T P F D V M R  
 ACCTTGAACAGGAAGTCTAAGAAGAGGGGAGATTTTGGAGCTGAGTCTAACAACGCCCTTTGACGTGATGAGG  
 N V N I K G S W N K G Q A Q V N Y E R N D V K Y  
 AATGTTAACATCAAGGGAAGTTGGAACAAAGGTCAAGCCCAAGTAAACTATGAGAGAAATGATGTTAAGTAC  
 S F E G Q A D V Q G D K S D F D I T F R G P G G  
 AGTTTTCGAAGGTCAAGCAGATGTCCAAGGTGATAAATCAGATTTTACATAACCTTCAGAGGTCCAGGAGG  
 E S I R I A A A Y D V E N F L A G R G T E P K N  
 GAATCCATCAGAATAGCTGCCGCTATGACGTAGAGAACTTCTTGGCTGGAAGGGGAACTGAGCCTAAGAAT  
 L A S L K L E F E T F K I S Y N M Q G F R N S D  
 CTAGCAAGTCTTAAACTCGAATTTGAAACTTTCAAATCAGTTATAATATGCAAGGCTTCGTAACAGTGAT  
R I Y I E A D G E S T L L T L K K L H L K L D S  
 AGGATATACATAGAGGCTGATGGAGAGTCTACCTTGTTAACTGAAGAAATTACACTTGAAGCTAGACTCT  
 E L S T E A R D G S F E I T V N D F E F K I D N  
 GAACTAAGTACTGAAGCTCGTGATGGCAGCTTCGAAATAACAGTTAATGACTTCGAGTTTAAATTTGATAAC  
 H F E R H E N Q D Y Y F K S K I E S **T** L T P L P  
 CACTTTGAGAGGCATGAAAATCAAGACTATTATTTCAAGAGTAAATTTGAGAGCACACTGACGCCTCTGCCA  
 A L V F G I G R K D E E R I I T L G Y G E G Q E  
 GCACCTGGTGTTTGGCATAGGACGCAAGGACGAGGAACGCATCATCACTCTGGGATACGGTGAAGGCAGGAG



I T F S I K G K N N F R S G F S G S A D I P N Y  
 ATCACTTTCTCCATCAAGGGCAAGAACAACCTTTAGATCTGGATTTCAGCGGCTCTGCTGACATCCCTAACTAT  
 G Y E G V K F D V D Y G F E S D D E L V V K I E  
 GGATATGAAGGAGTTAAATTCGATGTTGATTATGGATTTCGAAAAGTGATGATGAGCTCGTTGTTAAGATTGAA  
 I E L G E D D Q E V E A H F T Y N S E G V K A R  
 ATTGAGCTGGGTGAAGACGACCAGGAGGTAGAGGCTCACTTCACTTACAACCTCTGAGGGCGTGAAGGCTCGT  
 L S S P Y T G D H S L R A R R S I A S D S F F T  
 CTCAGCTCCCCGTACACAGGCGACCACAGTCTCCGGGCAAGACGCTCCATCGCATCTGACAGCTTCTTCACA  
 E L G L D D Y N V K L R G G L L G D G T K R G A  
 GAACTTGGCCTCGATGATTACAACGTCAAGCTCCGGGGTGGCTTGTGGGGCGACGGTACTAAGCGAGGAGCT  
 M L E G D I F G N K F L I D S L F Q S E G Q Q Y  
 ATGTTAGAAGGAGATATTTTTGGTAACAAGTTCCTAATAGATTCCCTTTTCCAGTCTGAGGGCCAGCAGTAC  
 S E G K L V I Q T P F R C M E K M G G L F T L S  
 TCTGAGGGCAAGCTTGTATTTCAGACGCCATTCCGTTGTATGGAGAAGATGGGAGGCTTGTTTACTACTGTCT  
 N V N T N I M A H A E V F L P S C S T P K L T G  
 AATGTAACACAAACATCATGGCTCATGCTGAAGTGTCTTACCCTCTTGCTCAACACCGAAACTAACTGGA  
 K F N L N L N D K I D G Y V T V D V A G E Q F T  
 AAATTCAACTTGAACCTAAATGATAAAATTTGATGGCTATGTTACAGTGGATGTGGCGGGTGAACAGTTCACT  
 L K S N L V G A S L S Q G Y Q G T L E I Y T P F  
 CTGAAGAGTAATCTAGTCGGTGCTTCACTTAGCCAAGGATACCAAGGTACTCTCGAAATATATACACCTTTC  
 H A L S S V V I N G K I K M E G L S L L E A D L  
 CATGCTCTCTCAAGTGTGTCATTAATGGAAAAATTAATAATGGAAGGTTTGTTCATTGCTAGAAGCTGACCTG  
 K V V E P S V H V L Q V K Y Q L S P E T L T A S  
 AAAGTCGTGGAGCCTTCTGTTACAGTGTTCAGGTCAAGTATCAGCTCTCTCCTGAAACACTGACAGCCAGT  
 L N L N S I K S E D G I K I N F I M E G F G S A  
 CTCAATCTTAACTCAATCAAATCCGAAGATGGAATAAAAATTAACCTTCAATCATGGAAGGTTTCGGCTCTGCT  
 H K K M E L N L C N D K L V A E Y T I S E S T F  
 CACAAGAAGATGGAACCTCTGTAATGATAAACTGGTTGCTGAGTACACCATCAGTGAGTCTACCTTC  
 K F T L D S L I I G V P R Q L S L E A K Y L S L  
 AAGTTCACCTTAGACTCATTAAATTATAGGTGTTCCACGCCAACTGTCTCTTGAAGCTAAGTATTTACTACTG  
 E A M E G S F V T A  
 GAAGCTATGGAGGGTCTTTTGTCACTGCTC

**Abbildung 18. Nukleotid- (unten) und zugehörige Aminosäuresequenz (oben, im Einbuchstaben-Code) des  $\beta$ -Glukan-Bindeproteins aus *Astacus leptodactylus*.** Die Nukleotid-Sequenz wurde unter der GenBank-Nummer FN298411.2 in die NCBI-Datenbank eingefügt. Sie besteht aus 4062 Nukleotiden, die sich in 1353 Aminosäuren übersetzen lassen. (Putative Glukanase-Region nach Cerenius *et al.* (1994), Zelladhäsionsmotiv (RGD) nach D'Souza *et al.* (1991), potentielle N-Glykosylierungsstelle (N-X-S/T, wobei X  $\neq$  P), potentielle O-Glykosylierungsstelle, potentielle O-GlcNAcylierungsstellen, durch MALDI sequenzierte Bereiche)

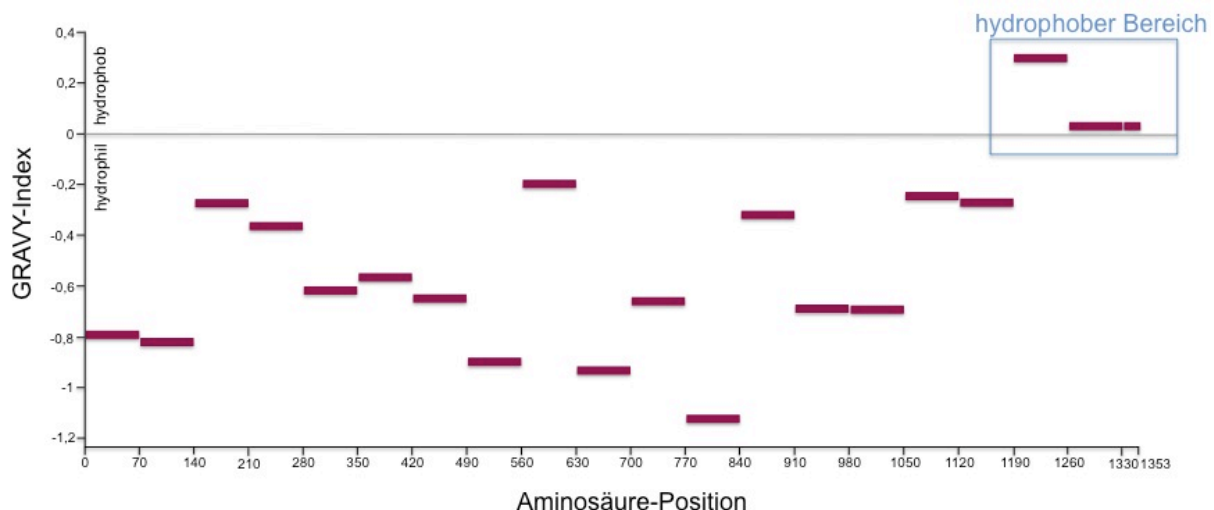
Offensichtlich gibt es eine Diskrepanz zwischen der anhand der Aminosäure-Sequenz errechneten molekularen Masse von 153 kDa und der in der SDS-PAGE beobachteten molekularen Masse von ca. 105 kDa (siehe Abbildung 24). Post-translationale Prozessierung des Proteins durch Proteasen könnte ein Grund dafür sein. Verwendet man zur Bestimmung potentieller Schnittstellen das Programm PEPTIDECUTTER finden sich drei Proteasen, welche BGBP so selten schneiden, dass Bruchstücke entstehen, die etwa 100 kDa groß sind: Caspase-1, Caspase-10 und Thrombin. Da Furin nicht in PEPTIDECUTTER implementiert ist, wurde außerdem manuell nach Furin-Schnittstellen gesucht. Abbildung 19 zeigt eine Übersicht über die möglichen Arten der BGBP-Prozessierung mit Angabe der entstehenden Fragmentgrößen.



**Abbildung 19. Mögliche Arten der post-translationalen Prozessierung von BGBP durch verschiedene Proteasen.** Kräftige Farben zeigen den Abschnitt der bekannten *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz (*partial sequence*) an, blassere Farben zeigen die Verlängerung zum *Full length*-Protein durch die *Fenneropenaeus chinensis*-BGBP-Sequenz (*complete cds*) an. Das 228 kDa große *Full length*-Protein kann durch Caspase-1-, Caspase-10-, Thrombin- und Furin-ähnliche Proteasen geschnitten werden. Ein durch MALDI im reifen Protein nachgewiesenes Peptid ist eingerahmt. Es entstehen Fragmente, die etwa 100 kDa groß sind, also dem reifen BGBP entsprechen könnten, und den ‚MALDI-Bereich‘ vollständig enthalten. Schwarze Pfeile deuten auf die Schnittstellen, wobei Zahlen oberhalb des Proteinschemas die Aminosäurepositionen angeben (Nummerierung: Aminosäuren 228 - 1584 entsprechen den Aminosäuren 1- 1353 der *Astacus leptodactylus*-BGBP-AS-Sequenz), an denen geschnitten wird; Zahlen unterhalb der gestrichelten Linie geben die molekulare Masse der Fragmente nach proteolytischer Prozessierung an. Der virtuelle Verdau erfolgte für die Proteasen Caspase-1, Caspase-10 und Thrombin mit dem Programm PEPTIDECUTTER (EXPASY), Furin-Schnittstellen wurden manuell gesucht. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte mit dem Programm PROTPARAM (EXPASY). Der rote Pfeil gibt den reifen N-Terminus nach Romo-Figueroa *et al.* (2004) an.

Um lipophile Regionen und somit im Idealfall auch die Lipidbindedomäne ausfindig zu machen, wurde die Sequenz bereichsweise nach hydrophoben Regionen hin untersucht (siehe Abbildung 20). Zur Analyse wurde der GRAVY (*Grand average of hydropathicity*)-Index verwendet, der den relativen Anteil an hydrophoben Resten innerhalb einer Sequenz

bestimmt (Kyte *et al.*, 1982). Je höher der Wert des GRAVY-Index ist, desto hydrophober ist die untersuchte Sequenz. Negative Werte zeigen hydrophile Sequenzen an. Der GRAVY-Index für gesamt-BGBP liegt bei -0,506. Nahe dem C-Terminus (Aminosäure-Positionen 1190-1260) konnte ein besonders hydrophober Bereich ausfindig gemacht werden, der eventuell die Lipidbindedomäne darstellt. Zum Vergleich wurden andere typische Lipoproteine wie humanes ApoE (GenBank-Nr. NP\_000032), humanes ApoB (GenBank-Nr. NP\_000375), *Locusta migratoria*-Lipophorin (GenBank-Nr. CAB51918.2) und *Homarus americanus*-Vitellogenin (GenBank-Nr. ABO09863) auf diese Weise untersucht (zum Teil mit angepassten Teilabschnitts-Längen). In allen Fällen konnte gezeigt werden, dass die sogenannten amphipathischen  $\alpha$ -Cluster (siehe Abbildung 3), wie sie vorzugsweise in der Lipidbindedomäne vorkommen, relativ betrachtet einen größeren GRAVY-Index aufweisen ( $> -0,2$ ). Diese Methode könnte also erste Hinweise auf die Lokalisation der Lipidbindedomäne geben.



**Abbildung 20. Hydrophobizitäts-Analyse der *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz mit Hilfe des GRAVY (*Grand average of hydrophobicity*)-Index (Kyte *et al.*, 1982).** Die Aminosäure-Sequenz wurde in Abschnitte à 70 Aminosäuren unterteilt. Für jeden Abschnitt wurde der GRAVY-Index bestimmt. Der Aminosäure-Abschnitt 1190-1260 ist im Vergleich zu den anderen Bereichen sehr hydrophob. Es findet sich zumindest in diesem Abschnitt eine Lipidbindedomäne.

#### 4.1.2. Phylogenetische Analysen

Eine BLAST-Suche mit der oben stehenden Aminosäure-Sequenz ergibt drei signifikante Treffer ( $E$  value = 0,0), und zwar mit den jeweils homologen  $\beta$ -Glukan-Bindeproteinen von *Pacifastaus leniusculus* (CAA56703.1, Identität: 89%), *Fenneropenaeus chinensis* (ADW10720.1, Identität: 54%) und *Litopenaeus vannamei* (P81182.2, 55%).

Multiples Aminosäure-Sequenz-Alignment:

```

Ast.lep. -----
Pac.len. -----
Fen.chi. MSFELTTPFDIAIKTLSLSAQYIWTTSQKSATLNITYNDKNFVLSSSLQLSTRASDITFQA
Lit.van. MSFDLTTPFDVIKTVLSARYSWTTSQKGATLNITYNDKNFVLSSSLQLSTRASNITFQA

```

```

Ast.lep. -----
Pac.len. -----MILGKDTYNFVTSTYIEDKIAYFKCSLMSPLP
Fen.chi. RTPFNGFQNTFIEIKYDIDNREELLAFRATADHRYSFVVGGFIEDKLATFKWNLNSPFS
Lit.van. TTPFEGFQNSFIEIKYDIDNREELLASRVSVDDHSYSFVVGGYIEDKLAVFKWNLNSPLT

```

```

Ast.lep. -----
Pac.len. GWTSAKFEVKVDFSQDDKILEISVEKDGNVKAI AISGKLIGSTMDFSLKTPFTGLKLNLV
Fen.chi. GWTDAKFVAKIDLSSSENKNLEISLEKEGDLKAI AVSGKFIGSTLDFNLRTPFRLNMFNV
Lit.van. GWTDAKFVAKIDLSSSENKNLEISLEKEGDLKAI AVSGKFIGSTLDFNLRTPFRLNMFNV

```

```

Ast.lep. -----EITKVNDSYKAE
Pac.len. FGSLNRAKRSLEFKMMNDAGEASLVTFNSAKLHLKTPFARAEVETWEITKVNDSYKAE
Fen.chi. FGSLNRSKRSLEMRMMNDAGRASLAGNFNSLKFNIKTPFERAEQISWEITKTGEGSYKAE
Lit.van. FGSLNRSKRSLEMRMMNDAGQASLAGNFNSLRFNMKTPFERAEQISWEVTKTGEGSYKAE
                                     * * * * *

```

```

Ast.lep. WKRNNNYVTASIEKEGRSRAFSLEIKSELQGWFLALTGKLDQDALQGYVSGAINEEKVT
Pac.len. WKRNNNYVTASIEKEGRSRAFSLEIKSELQGWELLALTGKLDQDDLQGYVSGAINEEKVT
Fen.chi. WRRNDNYATLTTEKDGKKNFSQVNVKSEFRGWEILALTGRLDEEAKQAYLSGAINEQKIT
Lit.van. WRRNDNYATFTIEKDVSKQSFDLNIKSEFRGWEILALTGRLDQETKQAYLSGAINEQKIT
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Ast.lep. LSIQGRHDVEGEFTLNMTTPYDNYRTVEGKLAISLRKRMKLEASSSSSEFHYIFKYTRR
Pac.len. LSIQGRHDVEGEFTLNMTTPYDNYRTVEGKLVYSLRKRQMKLEASSSSSEFHYIFKYTKR
Fen.chi. ISGSGSFGSRSNYMKIETPYDNYRVINIELDYLKRRNTMKIEASSSSSDFHLLWSRSG-
Lit.van. VTGSGSITNKIKFSMTIETPYENYRQVKAQLNYAKRKNAIKLEASSSSSDFHLLWSRSG-
                                     * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Ast.lep. NGVESHLLVPNEQONTELTVNLGPLAGKIVFTSRFEALRNHFHHEYKVTFEQHTGLVMFSN
Pac.len. NGVDSHLLVPNAPRTPNSLSPSMLWREKIAFTSRFEALRNHFHHEYKVTMGD---I IKFSD
Fen.chi. AGLEAHLIVPNSQONTEISVNLTPTOGKITITSRFDPIRDYLOEYHVNLTGET--VITADQ
Lit.van. SGLEAHLIVPNSRQONTEISINLTPTOGKITITSRFEPIRDYLOEYHVNLTGQN--EITADH
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Ast.lep. KITINDIDVFSTEFEGNSAEKKLHLEVHTRLRPGRHVSFHVHREGFSIFNLNFKRQIEVSG
Pac.len. KTTINDIDVSLRSLRAILQKKLHLEVHTRLRPGRHVSFHVHREGFSIFNFSFKRQIEVNG
Fen.chi. I IKLNGHEVFKMEFERNATEQKGHLEIHIHVADRHTTIFHFHREGFSKLNFLFKREVPQYG
Lit.van. I IKLNGHEVFKMDFERNAPEQKVHLEIHTHVAERHTTIFHFHREGFSKLNFLFKREVPQYG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Ast.lep. DVVEKEFKVELSGSGLPEEGTINAIITNTFREQPRTITAKIDVNRLTSPKTIRIEVNPT
Pac.len. DVVEKEFKVELSGSGLPEEGTINAIITNTFREQPRTITAKIDVNRLASPKILRIEVNPA
Fen.chi. ---EKHFVKVDITGSGALPEKGALDIVVENTFREPARTINARVEVDRTGARKKITLEVIPK
Lit.van. ---EKHFVKVDITGSGALPQKALDIVVENTFREPAKTINARVEVDRTGARKKIMLEVSPR
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Ast.lep. PSLGYIFDITYNIDLTPSHGDYDIRITTPDRSAAPWKHISGSWDVQDQDTAQLTFNIGD
Pac.len. QSVLYVFDITYNIDLNRNPTHGDYDIRITTPDRSAAPWKHISGSWNVDIDAAELTFNIGD
Fen.chi. QSRLYVFNLEYDADLQSPRHGDFTLISITPAKRAAPWQNMGSNWNVENPNDATITFTMGN
Lit.van. QSRVYIFNLEYIADLESPOHGDFTLKITTP--NNSPWQNISGNWNVEDPNDATITFTVGN
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Ast.lep. VTYTANGKLGIRESTMILSAD--GSENIFLQWKFEREGAYRDYLLKLGRESRYGMLKLG  
 Pac.len. VIYRANGKLGIRESTMILSAD--GNENIFLQWKFEREGAYRDYFLKLGRESRYGMLKLG  
 Fen.chi. ITYNARGKLLTRESTMILSSTNPSAENIYLQWKFERDGSTRDYFLKLGRESKYGMLKLG  
 Lit.van. VTYNAKGLTRESTMILSSTDPSAENIYLQWKFERNGDTKDYFLKLGSRYSRYGMLKLTG  
 \* \* \*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*

Ast.lep. TITDIAHVDIEGGFKVGFQPEEFLFTSKWNKGPDGSVTGEFSFYGDYHGSHTLEEFHR  
 Pac.len. TITDIAHVDIEGGFKVGFQPEEFLFTSKMKNKGPDGSVTGEFSYSYGDHGHSHSLEEFRR  
 Fen.chi. TIIDIAHVDIEGGLKAGPFMPDEFLLFTSMWDKS-NGVVTGEGTFDYGNHGHSHRLVKFER  
 Lit.van. TITDIAHVDIEGGFKAGPFMPNEFLFTSMWGKS-NGVVTGEGTFDYGNHGHSHRLVKFER  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\* \* \*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \* \* \*

Ast.lep. DAAQRSATFRWTSTSNFPDYEQISVSGNYDVYKGFVFNKIKVNERESKIDINISNLNPK  
 Pac.len. DAAERSATFRWTSTSNIPDYEQISVSGNYDVKGKGFVFNKIKVNEREPKIDINISNLSPK  
 Fen.chi. NAERKSASFWSATSNIPOQNSVSIISGNDFDVKVIVFVLINADGRESKIDVNIADINPT  
 Lit.van. NAERKSASFWSATSNIPOQNSVSVSGNYDFNHKVVIVFVINADGRESKIDINIADINPT  
 \* \*\* \*

Ast.lep. RSSNTLEWDVPILGE-FGKVQLTSLHNFRAKATSKSIAAVAKIGRRQAFVKANWNRSENF  
 Pac.len. RSRNTIEWDVPILGE-FGKVQLTSLHNFREATSKSITAVAKLGRQAYVKANWNRSENF  
 Fen.chi. RSRNTAMISIPLLGSTFERTELTVSHDFSHPNRKSISAVAKFGRSQSFINAKWNRSDGFE  
 Lit.van. SSRNTAMISIPLLGPTFKRTELTVSHDFSHPNRKSISAVAKFGRSESFINAKWNRSDGFD  
 \* \*\* \*

Ast.lep. TLDGTIEVKSXYLGDINISIKYDVTNIQDANAEVKYSRKAADQOEKYANIKWHRKSSAEH  
 Pac.len. TLDGTIEVKSXYLGDINISIKYDVTNIQDAHADEVKYSRKPADQOEKYANIKWHRKSSAEH  
 Fen.chi. TLEGKIEAKSRFLGDFINVRDMSNIANAHAEVDYSRTTMDGDKKEFKLNWTRKSTDDH  
 Lit.van. TLEGNIEAKSRFLGDFLINVRYDMSNIADAHAEVDYLRTTTDGDKKEFKLNWTRKSTDDH  
 \*\* \*

Ast.lep. LEGEI I IDTSLEHLSHARVYNKADFSDFQLRSGLEWNDKAI SLDFNVGKNSLSGKITTP  
 Pac.len. LEGEVI I IDTSLELLSHARVFNKADFSDFIHLRSGLEWNDKVI TLDVDGRQEF S IRKLS TP  
 Fen.chi. LENEMIFDSNFETLSHARAYANA EYGSNFKLLSGLDWN DKEINLTLEVRKNKISGKLTTP  
 Lit.van. LENEMVFDNSNFETLSHARAYANADYGGIFKLLSGLDWD DKKISLTLEVRKNKISGILTTP  
 \*\* \*

Ast.lep. FENFETIEGELTYSMESKDKVVTLKYERGERKVMNFTLNRKSKKRGDFELSLTTPFDVM  
 Pac.len. FENFETIEGELTYSLAGKDKVVTLKYERGERKVDNMFSLNRKSKKRGDFELSLTTPFDVM  
 Fen.chi. FEGFETIEVDLQYKLTGKDKSVKATYQRGDRKASLNMDMSIKGK-GSFNVDLSTPFAVA  
 Lit.van. FEGFETLEIDLQYKLTGKDKSVKATYQRGDRKASFNMEMSTKGGKGGSFKVDLSTPFEVV  
 \*\* \*\*\* \*

Ast.lep. RNVNIKGSWNKGQAQVNYERNVDKYSFEGQADVQGDKSDFDITFRGPGGESIRIAAADYDV  
 Pac.len. RNVNIKGSWNKGQAQVNYQRNDVKYSFEGQADVQGDKSDFDITFTGPGGESIRIAAADYDV  
 Fen.chi. KNLHIDGQYENKVAQVNYQRNDIQMNFSGKANIKSSKASFDISFTPPSGQNIRIAASYDV  
 Lit.van. KNLHIDGQYENKVAQINQRNDIQMNFNGKANIKSSKASFDISFTPPSGQNIRIAASYDV  
 \*

Ast.lep. ENFLAGRGTEPKNLASLKLFEFETFKISYNMQGFNRSDRIYIEADGESTLLTLKHLKLD  
 Pac.len. EDFLAGGGTEPKLAGLKLFEFETFKINFMQGFNRSERIYIEIDGESSLLTLKHLKLD  
 Fen.chi. QDFIAGTGTEEKELASLALFEFEGNSLDFSLHGFRNDRLYVMIHGSSSFVAVLKMFLKLD  
 Lit.van. QDFIDGTGDEEKELASLLEFEGNSMDFSLHGFRNDRLYVMIHGTSSSFVAVLKMFLKLD  
 \*

Ast.lep. SELSTEARDGSFEITVNDFEFKIDNHFERHENQDYFFKSKIESTLTPLPALVFGIGRDE  
 Pac.len. SELSTEAREGSFEITVNDFELKIDNHFERHENGDYFFKSKIESTLTPLPALVFGIGRDE  
 Fen.chi. SELNTEARDGTFELTFNDFKFNVSNHFERRENNGYFFRSKIESTLTPLPALI IGLGREGE  
 Lit.van. SELNTEARDGTFELTFNDFKFNVSNHFERRANNGYFFRSKIESTLTPLPALI IGLGREGQ  
 \*\*\* \*\*\*\*\* \*

Ast.lep. ERIITLGYGEGQEITFSIKGKNFRSGFSGSADIPNYGYEGVKFDVDYGFESDDELVVKI  
 Pac.len. ERIVTLGYGEGQEITFSVKGKNFRSGFSGSADIPNYGYEGVNFVVEYGFQGDDELVVKI

Fen.chi. ERIITIGYGEDKEITFSVKGKNNFLSGFSGKVDIPSLGYEGVEYEVVDYSFFPGDNHLQIHV  
 Lit.van. ERIITIGYGEDKEITFSVKGKNNFLSGFSGKVDIPSIGYEGVEYDVDYSFFPGDNHLQIKV  
 \*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\* \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

Ast.lep. EIELGEDDQEVEAHFTYNSEGVKARLSSPYTGDHSLRARRSIASDSFFTEIGLDDYINVKL  
 Pac.len. EIELGEDDQEVEAHFTYNSEGVKARLNSPYTGDHSLRARRSIASDSFFTEIGLDDYINVKL  
 Fen.chi. EIDLNENGQEVEATFFLDSEGIKARLTSTVLGDHSLRVRRSVSPDGFYAEAGLDDYSLKL  
 Lit.van. EIDLNENGQEVEATFFLDSEGIKARLSSAVLGDHSLRVRRSVAPDGFYAEAGLDDYNLKL  
 \*\* \* \* \*\*\*\*\* \* \*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\*

Ast.lep. RGGLLDGDTKRGAMLEGDIFGNKFLIDSLFQSEGQYSEGKLVIOQTPFRCEKMGGLFTL  
 Pac.len. RGGLMGDGTKRGAMLEGDIFGNKFLIDSLFQSEGQYSEGKLVIOQTPFRCEKMGGLFTL  
 Fen.chi. RGGFKNEDTARGVLLLEGEVFGNRFLIDTLFQSEGKRYSEGKLIHTPFPGMEKMGGLFTW  
 Lit.van. RGGFKNEDTARGVQLEGEVFGKRFLIDTLFQSEGKRYSEGKLIHTPFHGMEKMGGLFTW  
 \*\*\* \* \*\* \*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \*\* \*\*\*\*\*

Ast.lep. SNVNTNIMAHAEVFLPSCSTPKLTGKFNLNLNDKIDGYVTVDVAGEQFTLKSNLVGASLS  
 Pac.len. SNVNTNIMAHAEVFLPSCSLPKLTGKFNLNLNDKIDGYVTVDFAGEQFTLKVI-----  
 Fen.chi. SNANKKIMTRAEHLPSYTTPTITGEISLDLKKKISGYVTLDVAGEEFTLKCENLAGSSIS  
 Lit.van. SNQNKKIMAHAEHLPSYTTPTITGEISLDLKKKINGYVTLDVAGEEFTLKCENLAGSSIS  
 \*\* \* \*\* \*\* \* \*\* \*

Ast.lep. QGYQGTLEIYTPPHALSSVINGKIKMEGLSLEADLKVVEP-SVHVLQVKYQLSPETLT  
 Pac.len. -----  
 Fen.chi. QGYIGSLEFFSPLHAVSHVVLTDGIKMQALSLLDMEVKIDAPFATHDLKLYQLTADKVS  
 Lit.van. QGYTGSLEFYTTI--PCCITCCGDR-----

Ast.lep. ASLNLNSIKSEDIKINFIMEGFGSAHKMELNLCNDKLVAEYTISESTFKFTLDSLIIIG  
 Pac.len. -----  
 Fen.chi. GEAFLESTRLYNTIQLSLNIEGLSTENVEVDLTVNDNKINAHYTMASQSTFKFDVTTVIFN  
 Lit.van. -----

Ast.lep. VPRQLSLEAKYLSLEAMEGSFVTA-----  
 Pac.len. -----  
 Fen.chi. KERQFSIEAKYPSLESLEGVVAVTLEGEKHMVSGSLNIVNRIQALDLESDLIEGPRKL  
 Lit.van. -----

Ast.lep. -----  
 Pac.len. -----  
 Fen.chi. VLDVSKPSASYKQASFKIIFTSSDPHSFYLELDLRSGLEATVKIDTPVFPKVTATLQVAP  
 Lit.van. -----

Ast.lep. -----  
 Pac.len. -----  
 Fen.chi. AIAGITIEPTKGTGHKVVQVSWRQTRRMPDWDIASLELISPLLPENYLFSVNLGSKHIMAE  
 Lit.van. -----

Ast.lep. -----  
 Pac.len. -----  
 Fen.chi. QTGSIKHTLEARTSVSNYGGDLSLMIDTPFENINKVTLASLNFQNNVEMYITAKFANTV  
 Lit.van. -----

Ast.lep. -----  
 Pac.len. -----  
 Fen.chi. NSFRFNLDKENRKLISIVESPYIPTGMAEAEAMLTGNTNENMQMKMALKNAEDTISGILN  
 Lit.van. -----

```

Ast.lep. -----
Pac.len. -----
Fen.chi. IKIKSSQNINTNLKIITPFKGYKKMNFGARYLKDEVTNISVFADKPLKFKADLQFGNTED
Lit.van. -----

Ast.lep. -----
Pac.len. -----
Fen.chi. VVSTHLVVETPIEDFERIEAEMKVPLYKFAPKVMLTLPNRYGFTADYGSDFSQKVSAG
Lit.van. -----

Ast.lep. -----
Pac.len. -----
Fen.chi. VTVNEESYDGYISLRTKAPYELAYDYNLAHLASTRFHLRTDSSFFSVFA
Lit.van. -----

```

**Abbildung 21. Multiples Aminosäure-Sequenz-Alignment der Crustaceen- $\beta$ -Glukan-Bindeproteine (BGBP's).** Dieses Alignment wurde mit dem Programm COBALT erstellt. Während es sich bei den Sequenzen von *Pacifastacus leniusculus*, *Fenneropenaeus chinensis* und *Litopenaeus vannamei* um complete coding sequences handelt, ist die *Astacus leptodactylus*-Sequenz am N- und am C-Terminus unvollständig.

Erklärungen:

\*: identische Aminosäuren,

—: gaps, bzw. unbekannte Bereiche,

Ast.lep.: *Astacus leptodactylus*-BGBP (CAX65684.2, 1353 Aminosäuren),

Pac.len.: *Pacifastacus leniusculus*-BGBP (CAA56703.1, 1339 Aminosäuren),

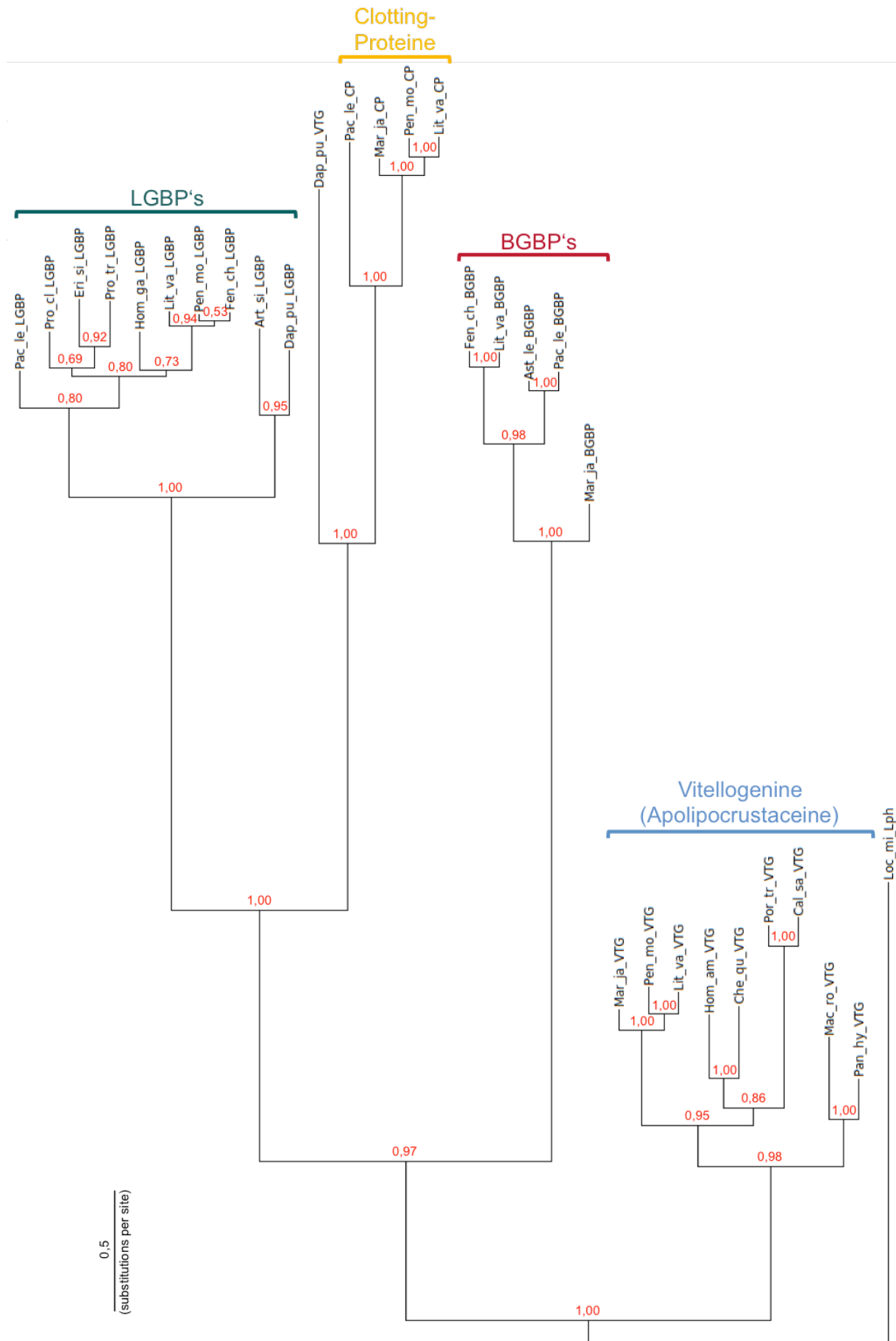
Fen.chi.: *Fenneropenaeus chinensis*-BGBP (ADW10720.1, 2021 Aminosäuren),

Lit.van.: *Litopenaeus vannamei*-BGBP (P81182.2, 1454 Aminosäuren),

| : reifer N-Terminus (nach Romo-Figueroa *et al.*, 2004 und Duvic *et al.*, 1990).

Ein phylogenetischer Stammbaum der Crustaceen-Proteinfamilien BGBP's, LGBP's, Vitellogenine und Clotting-Proteine wurde erstellt, um zum Einen die Einordnung des oben beschriebenen Proteins (4.1.1. BGBP-Sequenz) als BGBP zu validieren, und zum Anderen, um die zum Teil in der Datenbank nicht korrekt bezeichneten Proteine richtig benennen zu können.

Als Außengruppe wurde das Lipophorin von *Locusta migratoria* verwendet (siehe Abbildung 22). Der Stammbaum zeigt eine deutliche Aufspaltung in vier Proteinfamilien: LGBP's, Clotting-Proteine, BGBP's und Vitellogenine (da es sich ausschließlich um Crustaceen-Vitellogenine handelt: Apolipocrustaceine). Diese vier Hauptäste haben eine sehr gute Unterstützung von  $\geq 0,97$ . Nur das Vitellogenin von *Daphnia* ordnet sich keiner Proteinfamilie zu. Bekanntermaßen hat das *Daphnia*-Vitellogenin eine Doppelfunktion und agiert gleichzeitig als Superoxid-Dismutase (Kato *et al.*, 2004). Die oben angegebene Sequenz des *Astacus leptodactylus*-Lipoproteins ordnet sich ganz klar bei den  $\beta$ -Glukan-Bindeproteinen der anderen Crustaceen ein.





**Abbildung 22. Stammbaum (Bayesianische Statistik) der hier betrachteten Crustaceen-Proteinfamilien Vitellogenine, BGBP's, Clotting-Proteine und LGBP's.** Als Außengruppe wurde das Apolipoprotein von *Locusta migratoria* verwendet. Die roten Zahlen geben die posteriore Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Knotens an.

(Verwendete Abkürzungen: LGBP: Lipopolysaccharid- /  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein, CP: Clotting-Protein, BGBP: HDL /  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein, VTG: Vitellogenin, Pac\_le: *Pacifastacus leniusculus*, Pro\_cl: *Procambarus clarkii*, Eri\_si: *Eriocheir sinensis*, Por\_tr: *Portunus trituberculatus*, Hom\_ga: *Homarus gammarus*, Lit\_va: *Litopenaeus vannamei*, Pen\_mo: *Penaeus monodon*, Fen\_ch: *Fenneropenaeus chinensis*, Art\_si: *Artemia sinica*, Dap\_pu: *Daphnia pulex*, Mar\_ja: *Marsupenaeus japonicus*, Ast\_le: *Astacus leptodactylus*, Hom\_am: *Homarus americanus*, Che\_qu: *Cherax quadricarinatus*, Cal\_sa: *Callinectes sapidus*, Mac\_ro: *Macrobrachium rosenbergii*, Pan\_hy: *Pandalus hypsinotus*, Loc\_mi: *Locusta migratoria*.)

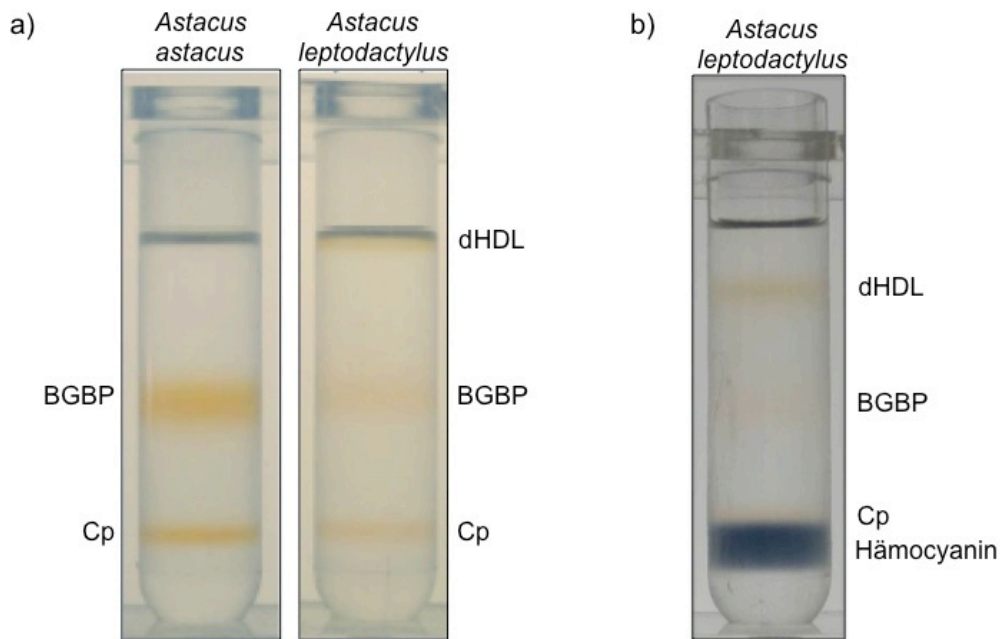
#### 4.1.3. Erstellen und Antikörper-Screening einer cDNA-Bank

Ausgehend von der mRNA des *Astacus leptodactylus*-Mitteldarmdrüsen Gewebes wurde eine exprimierende  $\lambda$ -ZAP-cDNA-Bibliothek hergestellt. Das Screening der Bank erfolgte mit dem  $\alpha$ -dHDL-Antikörper. Die cDNA's einiger im Hepatopankreas exprimierter Proteine, wie zum Beispiel Hämocyanin, Trypsin, Astacin und andere, konnten im Rahmen dieser Arbeit sequenziert werden. Diese Daten sprechen für eine intakte Bank. Trotzdem konnte die dHDL-Nukleotid-Sequenz bisher nicht entschlüsselt werden. Auf Aminosäure-Ebene konnten hingegen einige Peptide mittels massenspektroskopischer Analysen identifiziert werden (siehe 4.2.8.).

## 4.2. Proteinbiochemie

### 4.2.1. Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Aus der Hämolymphe werden die Lipoproteine durch KBr-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isoliert. Sie ordnen sich anhand ihrer Dichte in den selbstgenerierenden Gradienten ein. Das typische Bandenmuster decapoder Crustaceen sind zwei Lipoprotein-Banden, die vermutlich aufgrund ihrer enthaltenen Carotinoide orange gefärbt sind. Die obere Bande mit der geringeren Dichte entspricht dem  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein ( $\rho = 1,16$  g/ml, Stieb *et al.*, 2008), die untere Bande mit der entsprechend höheren Dichte entspricht dem Clotting-Protein ( $\rho = 1,24$  g/ml, Stieb *et al.*, 2008). Dieses typische Muster ist in Abbildung 23 beispielhaft für *Astacus astacus* gezeigt. *Astacus leptodactylus* weicht von diesem typischen Muster ab und enthält ein weiteres, geschlechtsunabhängiges Lipoprotein, dHDL, das eine noch geringere Dichte ( $\rho = 1,1$  g/ml; Stieb *et al.*, 2008) aufweist. Proteine ohne Lipidbeladung pelletieren aufgrund ihrer höheren Dichte bei der gewählten KBr-Konzentration. Hämocyanin, welches eine geringe Lipidbeladung aufweist (Cunningham *et al.*, 1999), ist meist im unteren Viertel des Zentrifugenglases zu sehen (Abbildung 23).

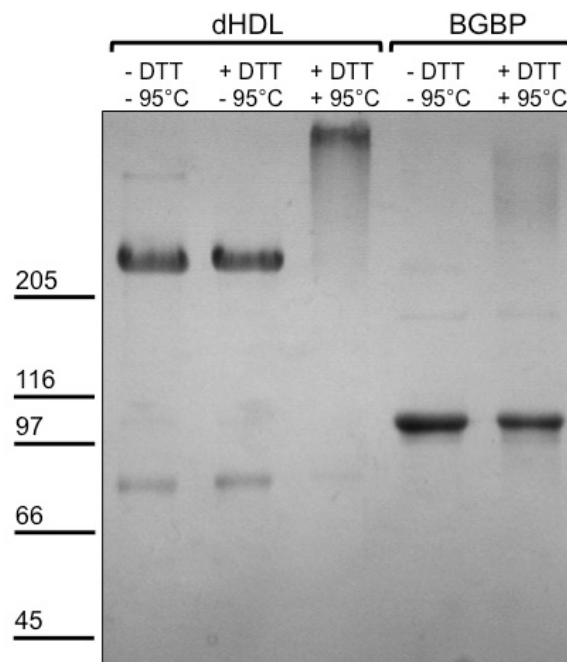


**Abbildung 23. Dichtegradienten-Ultrazentrifugation zur Isolierung von Lipoproteinen aus der Hämolymphe von *Astacus astacus*, bzw. *Astacus leptodactylus*.** a) Lipoprotein-Isolierung aus einem KBr-Gradienten nach Vorkonzentrierung der Lipoproteine. *Astacus astacus* zeigt das typische Decapoden-Muster aus  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein (BGBP) und Clotting-Protein (Cp) auf. Bei *Astacus leptodactylus* kann man im Meniskus das dritte geschlechtsunabhängige Lipoprotein dHDL erkennen (aus Stieb *et al.*, 2008). b) *Astacus leptodactylus*-Lipoprotein-Isolierung aus einem KBr-Gradienten ohne Vorkonzentrierung. Das ebenfalls mit Lipiden beladene Hämocyanin pelletiert nicht und ist als blaue Bande sichtbar.

#### 4.2.2. SDS-PAGE

Die Lipoproteine dHDL und BGBP aus *Astacus leptodactylus* wurden per SDS-PAGE charakterisiert (Abbildung 24). dHDL besteht aus zwei Untereinheiten mit 240 und 85 kDa. Eine Inkubation bei 95°C führt zum ‚Verklumpen‘ des Proteins und zu einer Aggregatbildung (Stieb, 2007), weshalb bei allen weiteren Untersuchungen dHDL nicht hitzeinkubiert wurde. Das reduzierende Agens DTT reicht aus, um die Disulfidbrücken zu spalten; ohne Zugabe von DTT bleibt eine kleine Bande bei ca. 325 kDa (= 240 kDa + 85 kDa) im Gel sichtbar. Dies lässt auf ein Heterodimer schließen, bei dem die beiden Untereinheiten in einer 1:1-Stöchiometrie vorliegen.

BGBP besteht aus einer einzigen Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 105 kDa. In der Lane ohne DTT im Probenpuffer ist bei ca. 210 kDa eine schwache Bande zu erkennen, eventuell kommt es zu einer Homodimer-Bildung.

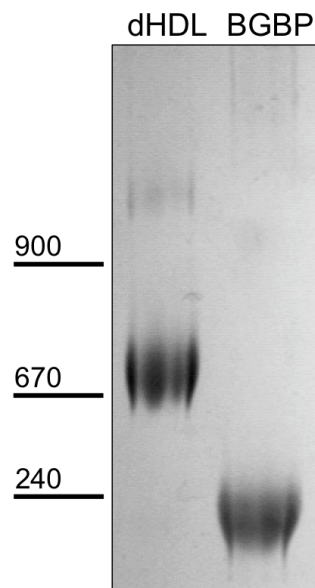


**Abbildung 24. SDS-PAGE der Lipoproteine dHDL und BGBP von *Astacus leptodactylus* in reduziertem und nicht-reduziertem Zustand.** dHDL ist aus den beiden Untereinheiten von 240 und 85 kDa aufgebaut. Eine Inkubation des dHDL bei 95°C führt zum ‚Verklumpen‘ des Proteins; ohne DTT-Zugabe kann man eine Bande bei 325 kDa erkennen. BGBP besteht aus einer Untereinheit von ca. 105 kDa; hier kommt es evtl. zu einer Homodimer-Bildung, da in der Probe ohne DTT-Zugabe eine schwache Bande bei ca. 210 kDa sichtbar ist. Die Zahlen links geben Molekulargewichte in kDa an.

#### 4.2.3. Blue native (BN)-PAGE

Blue native-PAGE untersucht die Lipoproteine in ihrer nativen Form. Diese PAGE wird ohne die Zugabe von SDS oder reduzierenden Substanzen durchgeführt. Das zugegebene, negativ geladene Coomassie bindet an die positiv geladenen Aminosäuren des Proteins, so dass das Protein nach außen durch die verbleibenden negativ geladenen Aminosäuren in etwa proportional zu seinem Molekulargewicht im Gel läuft. So kann man Aussagen über die native Konformation der Proteine machen.

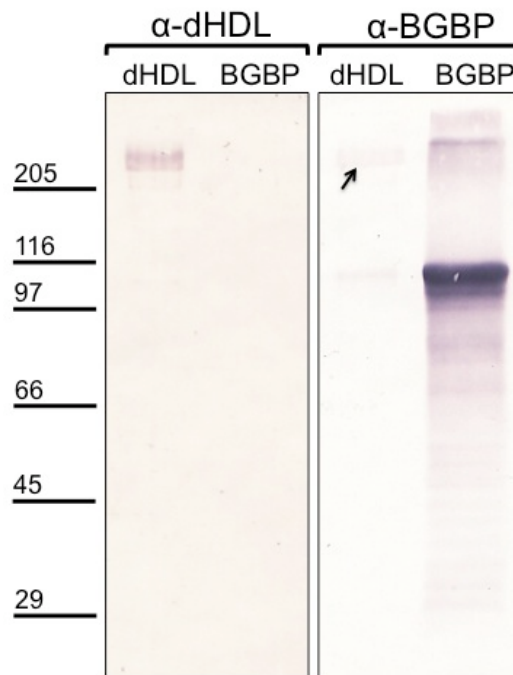
dHDL zeigt eine deutliche Bande bei ca. 700 kDa, während BGBP eine Bande bei ca. 200 kDa aufweist (siehe Abbildung 25). Die beiden dHDL-Untereinheiten von 240 und 85 kDa ergeben in einem Heteromer zusammen 325 kDa; die restlichen 375 kDa des dHDL müssen demnach aus Lipiden zusammengesetzt sein. Nimmt man für BGBP ein Monomer an, verbleiben in diesem Fall 95 kDa für Lipide.



**Abbildung 25. Blue native (BN)-PAGE der beiden *Astacus leptodactylus*-Lipoproteine dHDL und BGBP.** Die Proteine wurden auf einem 3,5-15%-igen-Gel aufgetrennt. dHDL hat eine prominente Bande bei ca. 700 kDa, BGBP zeigt eine Bande bei ca. 200 kDa. Die Zahlen links geben Molekulargewichte in kDa an.

#### 4.2.4. Antikörper-Spezifität

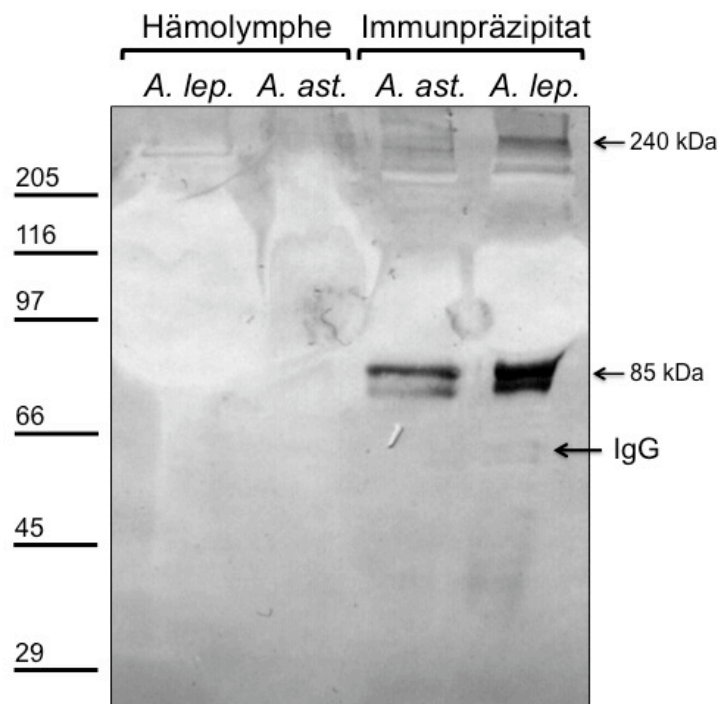
Gegen die beiden Proteine dHDL und BGBP aus *Astacus leptodactylus* wurden polyklonale Antikörper in Kaninchen hergestellt. Eine Dot-Blot-Analyse zeigt, dass beide Antikörper nicht mit BSA kreuzreagieren und die optimale Verdünnung für Blot-Analysen 1:15.000 ist. Beide Antikörper geben sehr gute Signale im Western-Blot (Abbildung 26). Der  $\alpha$ -dHDL-Antikörper erkennt stark die 240 kDa-Untereinheit und sehr schwach die 85 kDa-Untereinheit von dHDL, nicht hingegen das BGBP. Der  $\alpha$ -BGBP-Antikörper erkennt BGBP, dessen Aggregate und Abbauprodukte, sowie zu einem geringen Anteil die große Untereinheit des dHDL.



**Abbildung 26. Spezifität und Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper  $\alpha$ -dHDL und  $\alpha$ -BGBP.** Der  $\alpha$ -dHDL-Antikörper erkennt die große Untereinheit des dHDL und nur sehr schwach die Kleine. Er zeigt keine Kreuzreaktivität mit BGBP. Der  $\alpha$ -BGBP-Antikörper erkennt BGBP sowie dessen Aggregate und Abbauprodukte. Außerdem zeigt er eine schwache Kreuzreaktivität mit der großen dHDL-Untereinheit (Pfeil). Eingesetzte Verdünnung der Antikörper: 1:15.000. Die Zahlen links sind Molekulargewichte in kDa.

#### 4.2.5. Co-Immunpräzipitation (IP)

Da das dHDL bisher nicht aus anderen Dekapoden durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isoliert werden konnte, sollte als alternative Methode die Immunpräzipitation durchgeführt werden, um eventuell vorhandene dHDL-ähnliche Antigene nachzuweisen. Bei der Co-Immunpräzipitation wurden die Hämolymphe von *Astacus astacus* und *Astacus leptodactylus* mit dem dHDL-Antikörper inkubiert, die entstandenen Präzipitate abzentrifugiert, auf ein SDS-Gel aufgetragen und *geblottet* (siehe Abbildung 27). *Astacus leptodactylus* zeigt wie erwartet die Banden der beiden dHDL-Untereinheiten (240 und 85 kDa). Überraschenderweise konnte per IP auch aus der *Astacus astacus*-Hämolymphe ein Protein gefällt werden, das der kleinen dHDL-Untereinheit (85 kDa) entspricht. Offensichtlich ist entgegen bisheriger Vermutungen ein dHDL-ähnliches Protein auch in der Hämolymphe dieses Krebses vorhanden. Dass es sich dabei um ein lipidbeladenes Protein handelt ist unwahrscheinlich; es lässt sich schließlich nicht per Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isolieren (Stieb *et al.*, 2008).



**Abbildung 27. Co-Immunpräzipitation von *Astacus astacus*- und *Astacus leptodactylus*-Hämolymphe mit dem dHDL-Antikörper.** Zellfreie Hämolymphe von *Astacus astacus* und *Astacus leptodactylus* wurde mit dem dHDL-Antikörper immunpräzipitiert. Anschließend wurden der Überstand (zell- und nun dHDL-freie Hämolymphe) sowie die Immunpräzipitate auf ein 3,5-15%-iges-SDS-Gel aufgetragen und *geblottet* (primärer Antikörper:  $\alpha$ -dHDL, 1:15.000). Wie zu erwarten, finden sich im Immunpräzipitat von *Astacus leptodactylus* die charakteristischen dHDL-Untereinheiten bei 240 und 85 kDa. Zumindest die kleine Untereinheit findet sich jedoch auch im Immunpräzipitat der *Astacus astacus*-Hämolymphe. Die Zahlen links sind Molekulargewichte in kDa.

Die Banden des primären Antikörpers, welcher auf dem mit Gel aufgetragen ist, sind nur sehr schwach zu erkennen. Immunglobulin G (IgG) hat zwei leichte ( $\approx$  22 kDa) und zwei schwere ( $\approx$  50 kDa) Ketten. In Abbildung 27 kann man lediglich die schwere Kette bei 55 kDa schwach erkennen; die leichte Kette ist aus dem Gel heraus gelaufen.

Die großen weißen Bereiche auf dem Gel (um 100 kDa) stellen Bereiche dar, in denen die Membran mit Protein überladen ist, welches nicht mit dem primären Antikörper reagiert. Dabei handelt es sich vermutlich um Hämocyanin-Untereinheiten.

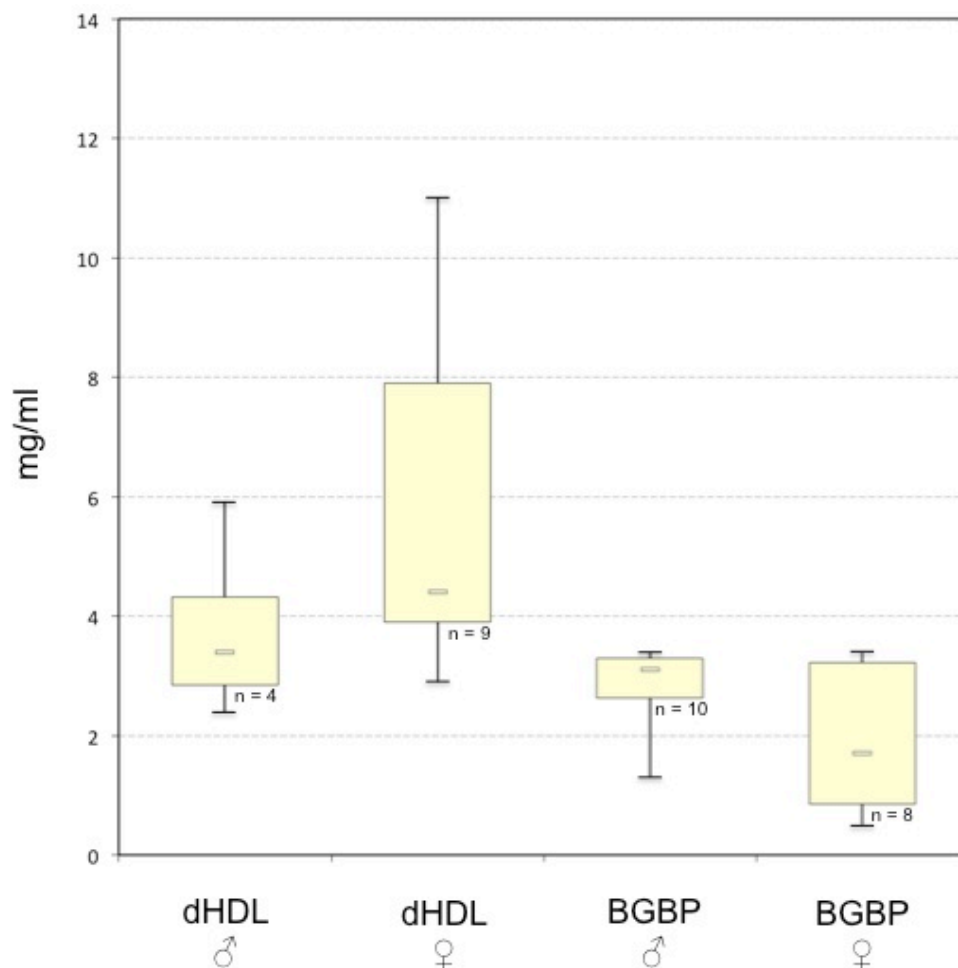
#### 4.2.6. ELISA

ELISA-Analysen wurden zur Bestimmung der Hämolympfkonzentration der beiden Lipoproteine dHDL und BGBP durchgeführt. Dazu wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit verschiedenen Hämolymphverdünnungen beschichtet und die Menge an gebundenem dHDL / BGBP anhand einer Eichkurve durch die entsprechenden Antikörper detektiert. Da die Antikörper sehr sensibel auf die Lipoproteine ansprechen und die Konzentration der

Lipoproteine in der Hämolymphe relativ hoch ist, mussten Verdünnungen der Hämolymphe bis 1: 320.000 gewählt werden.

Durch zahlreiche Negativkontrollen konnten folgende Kreuzreaktionen ausgeschlossen wurden:

- unspezifische Bindung des primären Antikörpers an Hämocyanin,
- unspezifische Bindung des primären Antikörpers an ein anderes Antigen in der Hämolymphe,
- unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers an Hämocyanin,
- Phosphatase-Aktivität in der Hämolymphe,
- unspezifische Farbreaktionen mit den verwendeten Puffern.












**Abbildung 28. Boxplot zur Bestimmung der Konzentration der beiden Lipoproteine dHDL und BGBP in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* mittels ELISA.** Die Konzentration wird als mg Lipoprotein pro ml Hämolymphe angegeben. Die Konzentration an dHDL in der Hämolymphe ist mit ca. 4 mg/ml generell höher als die Konzentration an BGBP mit ca. 2 mg/ml. Es gibt geschlechtsspezifische Unterschiede; so ist die Spannweite der Lipoprotein-Konzentration in Weibchen generell größer. dHDL kann in Weibchen Konzentrationen bis 11 mg/ml annehmen. Erklärungen zum Boxplot: in der gelben Box liegen die mittleren 50% der Daten, das kleine Rechteck innerhalb der gelben Box gibt den Median an, die kleinsten bzw. größten 25% der Daten liegen innerhalb des unteren bzw. oberen ‚whisker‘, an den Enden der ‚whiskers‘ befinden sich der kleinste, bzw. größte Datenwert, n = Anzahl der untersuchten Tiere.

Die Konzentrationen an Lipoprotein in der Hämolymphe bewegen sich im mg Lipoprotein pro ml Hämolymphe-Bereich (siehe Abbildung 28). Die Konzentration von BGBP ist dabei mit ca. 2 mg/ml halb so groß wie die Konzentration von dHDL mit ca. 4 mg/ml. Weibchen zeigen generell eine größere Bandbreite, was die Konzentration der beiden Lipoproteine in der Hämolymphe betrifft; die dHDL-Konzentration kann dabei Werte bis 11 mg/ml erreichen.

Die Hämolympfen anderer Crustaceen wie dem Marmorkrebs, dem Taschenkrebs, der Seespinne oder auch des Polychaeten *Nereis virens* wurden mittels ELISA auf das Vorhandensein eines dHDL-ähnlichen Lipoproteins untersucht (Tabelle 7).

**Tabelle 7. Bestimmung der dHDL-Konzentration in den Hämolympfen anderer Spezies mittels ELISA.** Die Werte sind relativ zur Konzentration von dHDL in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* (= 100%) angegeben. (Da es sich um Einzelmessungen handelt, sind die Werte als Schätzwerte anzusehen.)

	Spezies	Prozentualer Gehalt an dHDL in der Hämolymphe (im Vergleich zur <i>Astacus leptodactylus</i> -dHDL-
	<i>Astacus leptodactylus</i>	100%
	<i>Hyas araneus</i>	19%
	Marmorkrebs	14%
	<i>Cancer pagurus</i>	10%
	<i>Cherax quadricarinatus</i>	9%
	<i>Astacus astacus</i>	8%
	<i>Procambarus clarkii</i>	6%
	<i>Idotea spec.</i>	3%
	<i>Nereis virens</i>	1%

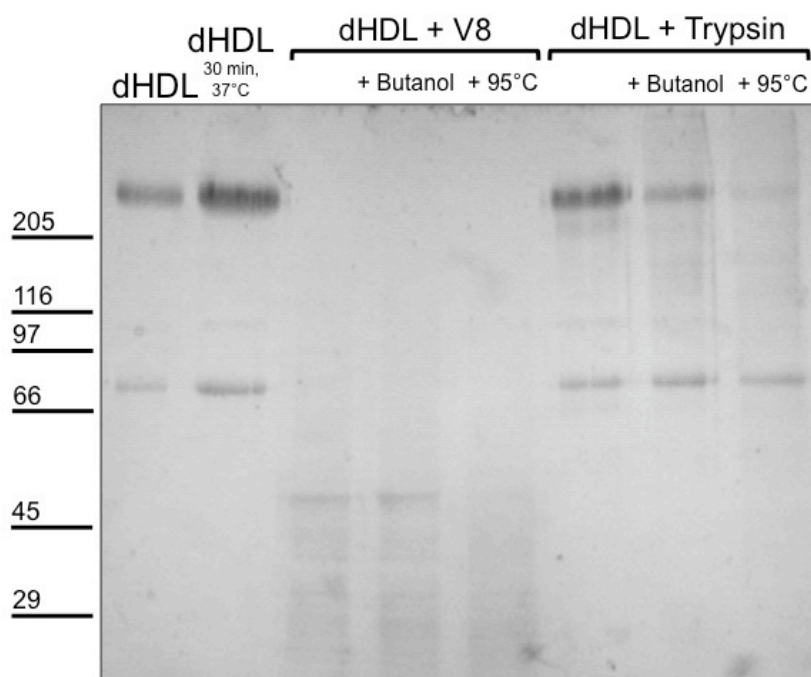
In allen untersuchten Spezies reagiert der  $\alpha$ -dHDL-Antikörper, wenn auch teils nur sehr schwach, mit der Hämolymphe. Da der Antikörper gegen *Astacus leptodactylus*-dHDL generiert wurde, ist ohnehin davon auszugehen, dass homologe Proteine anderer Spezies schwächer mit diesem Antikörper reagieren werden. *Hyas araneus*-Hämolymphe reagiert am



Deutlichsten und erreicht Werte bis ca. 20%. Es folgt der Marmorkrebs mit ca. 14%. Werte zwischen 5 und 10% werden von *Astacus astacus*, *Procambarus clarkii*, *Cherax quadricarinatus* und *Cancer pagurus* erreicht. Schlusslichter bilden die evolutiv am weitesten entfernte Meeresassel *Idotea* sowie der Polychaet *Nereis virens*. In *Nereis virens* wurde bereits ein dem dHDL sehr ähnliches, ebenfalls discoidales Lipoprotein gefunden (Schenk *et al.*, 2006).

#### 4.2.7. Limitierende Proteolyse

Das Ergebnis der limitierten Proteolyse, bei der dHDL mit den beiden Proteasen V8 und Trypsin verdaut wurde, ist in Abbildung 29 zu sehen. Während Trypsin dHDL nur schwach hydrolysiert, kommt es durch den Verdau mit V8 zu einem starken dHDL-Abbau. In beiden Fällen macht es einen merklichen Unterschied, ob dHDL nativ, entfettet oder denaturiert vorliegt. Die Proteasen haben offensichtlich einen besseren Zugang zu entfetteten Proteinen; am Besten lassen sich jedoch die denaturierten Proteine verdauen.



**Abbildung 29.** Limitierte Proteolyse von dHDL. dHDL wurde in nativem, entfetteten (+ Butanol) und denaturiertem (+ 95°C) Zustand mit den Proteasen V8 und Trypsin verdaut. Als Kontrollen wurden natives dHDL und für 30 Minuten bei 37°C inkubiertes dHDL aufgetragen. Während nach dem Verdau durch die Protease V8 eine vollständige Degradation beider dHDL-Untereinheiten stattgefunden hat, wird dHDL kaum durch Trypsin verdaut. Denaturierung und Entfettung bieten den Proteasen offensichtlich bessere Angriffsflächen und führen so zu einem schnelleren Verdau. Die Zahlen links geben Molekulargewichte in kDa an; SDS-PAGE: 3,5-15%.

#### 4.2.8. Massenspektroskopie

MALDI-TOF-Analysen dienen der Identifizierung von Proteinen, deren Sequenzen oder homologe Sequenzen bereits in der Datenbank enthalten sind (*fingerprinting*). Durch MALDI-TOF/TOF-Analysen oder LC-MS/MS kann man neben der Identifizierung bekannter Sequenzen, unter Verwendung spezieller Algorithmen, auch eine sogenannte *de novo*-Sequenzierung von bisher auf Sequenzebene unbekanntem Proteinen vornehmen.

##### BGBP

Zur sicheren Identifizierung des vermeintlichen  $\beta$ -Glukan-Bindeproteins, welches durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aus der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* isoliert werden konnte (siehe Abbildung 23), wurden MALDI-TOF/TOF-Analysen durchgeführt. Das Protein konnte anhand eines Trypsin-Verdau-Fragments mit einer Masse von 1.784 Da (IESTLTPLPALVFGIGR) sicher als BGBP identifiziert werden. Dieses Fragment findet sich in der BGBP-Sequenz von *Pacifastacus leniusculus* (GenBank-Nr. A55301) wieder (siehe Stieb *et al.*, 2008).

##### dHDL

Da für das Protein dHDL bisher keine Sequenzinformationen vorliegen, sollten mit massenspektroskopischen Analysen erste Aminosäure-Sequenzinformationen gewonnen werden. Insgesamt konnten 18 Peptide, welche aus einem dHDL-Trypsin-Verdau beider Untereinheiten hervorgingen, mittels LC-MS/MS bestimmt werden (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8. Ergebnisse der massenspektroskopischen Analysen nach Trypsin-Verdau der beiden dHDL-Untereinheiten.** Vier der insgesamt 18 Fragmente wurden ausschließlich in der großen dHDL-Untereinheit gefunden, elf Fragmente ausschließlich in der kleinen. Überraschenderweise wurden drei Fragmente sowohl in der kleinen als auch in der großen Untereinheit detektiert.

<b>MALDI-Fragment stammt aus der großen dHDL-Untereinheit</b>	<b>MALDI-Fragment stammt aus der kleinen dHDL-Untereinheit</b>	<b>MALDI-Fragment wurde in beiden dHDL-Untereinheiten gefunden</b>
LIGSTMDFSLK VDFSQDDK AIAISGK TPFTGLK	SIASDSFFTELGLDDYNVK YQLSPETLTASLNLNSIK KMELNLCNDK LVAEYTISESTFK GLLGDGDK FNLNLNDK RGAMLEGDIFGNK INFIMEGFGSAHK LVIQTPFR VVEPSVHVLQVK QLSLEAK	FLIDSLFQSEGQQYSEGK FTLDSLIIIGVPR IKMEGLSLLEADLK

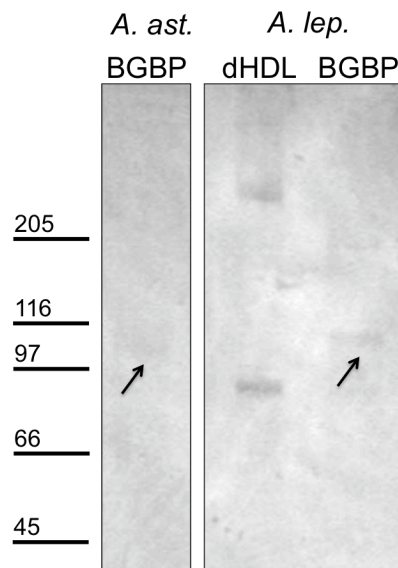
Drei dieser Peptide finden sich sowohl in der großen als auch in der kleinen Untereinheit wieder. Obwohl dHDL analysiert wurde und Kontaminationen mit BGBP ausgeschlossen werden können (Aufreinigung der Proben per SDS-PAGE, Dreifach-Bestimmung einiger Peptide), befinden sich alle 18 Peptide überraschenderweise in der BGBP-Sequenz (siehe Abbildung 30). Dabei befinden sie sich ausschließlich am C- und am N-Terminus der Sequenz, nicht aber in deren mittleren Region. Weiterhin fällt auf, dass die dem BGBP, bzw. dHDL gemeinsamen Sequenzen auch vor, bzw. hinter den vermutlichen Furin-Schnittstellen RAKR, bzw. RARR liegen. Bei immerhin 18 identifizierten Peptidfragmenten hätte man bei einer Zufallsverteilung auch Fragmente innerhalb dieser Schnittstellen finden müssen. Zusammengefasst haben diese 18 dHDL-Peptide eine molekulare Masse von 23 kDa, was einem Fünftel des  $\beta$ -Glukan-Bindeproteins entspricht.

MILGKDTYNFVTSTYIEDKIAFYKCSLMSPLPGWTSAKFEVK [VDFSQDDK]ILEISVEKDGNVK[AIAISG]  
 [K]LIGSTMDFSLK[TPFTGLK]NLNVFGSLN[RARR]SLEFKMMNDAGEASLVTNFNSAKLHLKTPFARAEVET  
 WEITKVNDSYKAEWKRNNNYVTASIEKEGRSRAFSLEIKSELQWEFLALTGKLDQDALQGYVSGAINE  
 EKVTLTSIQGRHDVEGEFTLNMTTPYDNYRTVEGKLAYSRLRKRQMKLEASSSSSEFHYIFKYTRRNGVESH  
 LLVPNEQQNTELTVNLGPLAGKIVFTSRFEALRNHFHHEYKVTTFEQHTGLVMFVSNKITINDIDVFSTEFEG  
 NSAEKKLHLEVHTRLPGRHSVFHVHREGFSIFNLNFKRQIEVSGDVVEKEFKVELSGSGDLPEEGTINAI  
 ITNTFREQPRITITAKIDVNRLTSPKTIKRIEVNPTPSGLYIFDITYNIDLTQPSHGDDIRITTPDRSAAP  
 WKHISGSWDVQDQDTAQLTFNIGDVTYTTANGKLGIRESTMILSADGSENIQWKFEREAYRDYLLKLG  
 RESRYGMLKLGKGTITDIAHVDIEGGFKVGPFPQPEEFLFTSKWNKGPDSVTGEGSFNYGDYHGSHTLEEF  
 HRDAAQRSATFRWTSTSNFPDYEQISVSGNYDVYKGFVFNNAKIKVNERESKIDINISNLNPKRSSNTLEW  
 DVPILGEFGKVLTLNHLNFRKATSKSIAAAVAKIGRRQAFVKANWNRSENFETLDGTIEVSKSKYLGDINIS  
 IKYDVTNIQDANAQEVKYSRKAADQOEKYANIKWHRKSSAEHLEGEI I IDTSLEHLSHARVYNKADFSDIF  
 QLRSGLEWNDKAI SLDFNVGKNSLSGKITTPFENFETIEGELTYSMESKDKVVTLYKERGERKVMNMF'TL  
 NRKSKKRGDFELSLTTPFDVMRNVNIKGSWNKGQAQVNYERNDVKYSFEGQADVQGDKSDFDITFRGPGG  
 ESIRIAAADVENFLAGRGTEPKNLASLKEFETFKISYNMQGFRNSDRIYIEADGESTLLTLKHLHLKL  
 DSELSTEARDGSFEITVNDFEFKIDNHFERHENQDYFYSK [ESTLTPLPALVFGIGR]KDEERIITLGYG  
 EGQEITFSIKGKNNFRSGFSGSADIPNYGYEGVKFDVDYGFESDDELVVKIEIELGEDDQVEVAHFTYNS  
 EGVKARLSSPYTGDHSL[RARR] [SIASDSFFTELGLDDYNVVKLR] [GGLLDGDKRGAMLEGDIFGNK] [FLIDS]  
 [LFQSEGQQYSEGK] [LVIQTPFR] [CMEKMGLFTLSNVNTNIMAAAEVFLPSCSTPKLTGK] [FNLNLDNKIDGY]  
 VTDVAGEQFTLKSNLV GASLSQGYQGTLEIYTPFHALSSVINGK [IKMEGLSLEADLK] [VVEPSVHVVLQ]  
 [VKYQLSPETLTASLNLNSIK] [SEDGIK] [INFIMEGFGSAHK] [KMELNLCNDK] [LVAEYTI SESTFK] [FTLDSLII]  
 [GVPP] [QLSLEAKYLSLEAMEGSFVTA] ]

**Abbildung 30. Aminosäure-Sequenz des  $\beta$ -Glukan-Bindeproteins von *Astacus leptodactylus* (schwarz, CAX65684.2).** Da der N-Terminus bisher unbekannt ist, wurde in blau der N-Terminus des *Pacifastacus leniusculus*-BGBP-Sequenz (Q26048) eingefügt. Farblich umrandet sind die durch massenspektroskopische Analysen bestimmten Peptide des dHDL-Proteins. Auffällig ist, dass sich die Peptide entweder am N- oder am C-Terminus des BGBP-Proteins befinden, nicht aber in dessen Mitte. Führt man mit den rot eingerahmten Bereichen ([ ]) eine BLAST-Suche durch, so ergeben sich ausschließlich mit den vier bekannten BGBP-Sequenzen (*Astacus leptodactylus*, *Pacifastacus leniusculus*, *Fenneropenaeus chinensis*, *Litopenaeus vannamei*) signifikante Treffer. Die eingerahmten Bereiche lassen sich auch nicht sinnvoll mit dem *Manduca sexta*-Apo-Lipophorin-Vorläufer (GenBank-Nr. AAB53254.1) *alignen*. Rot umrandet sind Peptide, die in der großen und der kleinen dHDL-Untereinheit vorkommen, blau umrandet sind Peptide, die bisher nur in der kleinen Untereinheit nachgewiesen wurden, grün umrandete Peptide wurden bisher nur in der großen dHDL-Untereinheit entdeckt. Die beiden Furchschnittstellen sind rot hinterlegt; hier findet vermutlich die Prozessierung des BGBP statt.

#### 4.2.9. Glykosylierungs-Analyse durch Lektin-Blotting

Die Tests auf N-, bzw. O-glykosidisch gebundene Zucker mit den beiden spezifischen Lektinen Con A und PNA führten lediglich im Fall von Con A zu Reaktionen (siehe Abbildung 31). Con A erkennt Mannose-reiche Kohlenhydrate, wie sie im Falle einer N-Glykosylierung vorkommen.

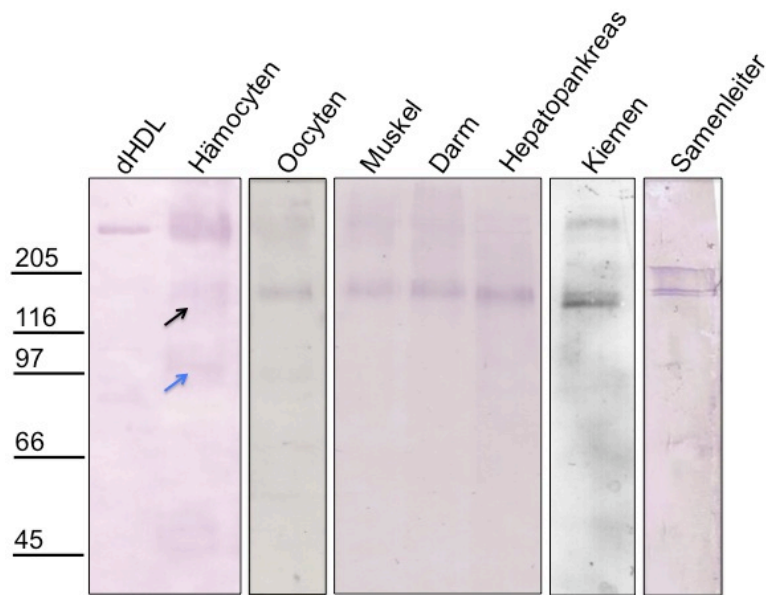


**Abbildung 31. Lektin-Blot mit dem Lektin Con A als Nachweis N-glykosidisch verknüpfter Kohlenhydrate.** Untersucht wurden die beiden BGBP's aus *Astacus astacus* (*A. ast.*) und *Astacus leptodactylus* (*A. lep.*) sowie dHDL aus *Astacus leptodactylus*, deren Untereinheiten auf einer 3,5-15%-igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran *geblottet* wurde. Die beiden Untereinheiten des dHDL reagieren deutlich mit dem Lektin, was auf eine ausgeprägte N-Glykosylierung schließen lässt. Die beiden BGBP's hingegen reagieren nur sehr schwach (Pfeile), sie sind offensichtlich kaum glykosyliert. Die Zahlen links geben Molekulargewichte in kDa an (verändert nach Stieb *et al.*, 2008).

Während die beiden  $\beta$ -Glukan-Bindeproteine von *Astacus astacus* und *Astacus leptodactylus* von Con A nur schwach erkannt werden, sieht man die Banden der beiden dHDL-Untereinheiten deutlich.

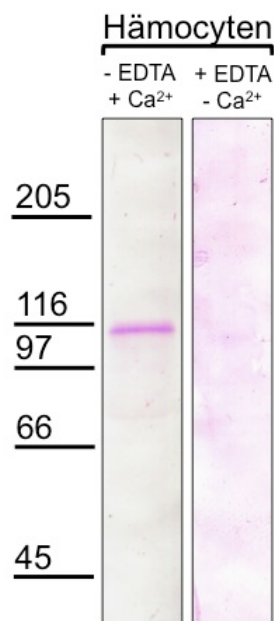
#### 4.2.10. Ligandenblots

Die durchgeführten Ligandenblots, bei denen aus verschiedenen Geweben extrahierte Zellmembranproteine auf eine Nitrocellulose-Membran *geblottet* wurden, um sie dann mit den Lipoproteinen dHDL und BGBP und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern zu inkubieren, sollen die Rezeptoren dieser Lipoproteine identifizieren und deren Expression in verschiedenen Geweben klären. Die repräsentativen Ligandenblots der Membranpräparationen, die mit dHDL als Ligand inkubiert wurden, zeigen einheitlich eine charakteristische Bande bei etwa 160 kDa (siehe Abbildung 32), und zwar in allen untersuchten Zellen und Geweben (Hämocyten, Oocyten, Muskel, Darm, Hepatopankreas, Kiemen und Samenleiter). Diese Ergebnisse konnten teilweise mehrmals reproduziert werden. Die Hämocyten-Membranpräparation zeigt neben der 160 kDa-Bande zwei weitere Banden (ca. 240 kDa und ca. 85 kDa); wahrscheinlich handelt es sich dabei um dHDL-Kontaminationen.



**Abbildung 32. Ligandenblots mit dHDL als Ligand und  $\alpha$ -dHDL als primären Antikörper.** Als Kontrolle wurde dHDL in die erste *Lane* aufgetragen (die kleine dHDL-Untereinheit wird von  $\alpha$ -dHDL nur schlecht erkannt). Analysiert wurden Membranpräparationen von Hämozyten, Oocyten und den Geweben Muskel, Darm, Hepatopankreas, Kiemen und Samenleiter. In allen aufgetragenen Proben findet sich eine charakteristische Bande bei etwa 160 kDa, die ein putativer dHDL-Rezeptor sein könnte. Der schwarze Pfeil zeigt die schwache 160 kDa-Bande in der Hämozyten-*Lane* an. Bei der 240 kDa-Bande in der Hämozyten-*Lane* handelt es sich vermutlich um eine dHDL-Kontamination. Der blaue Pfeil zeigt auf eine ca. 100 kDa große Bande, welche auch mit dHDL/ $\alpha$ -dHDL reagiert. Die Zahlen links geben Molekulargewichte in kDa an.

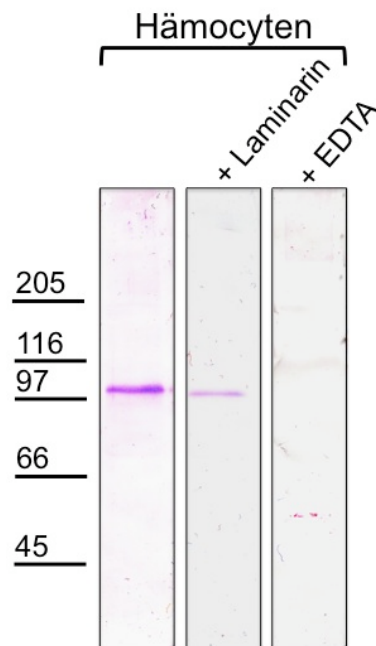
Lipoprotein-Rezeptoren benötigen als Cofaktor Calcium, welches an die Cystein-reichen *Repeats* der Ligandenbindedomäne komplexiert ist und eine korrekte Faltung und Ligandenerkennung des Rezeptors ermöglicht (Gent *et al.*, 2004). Als Nachweis, ob es sich bei den in Abbildung 32 detektierten Banden tatsächlich um Lipoprotein-Rezeptoren handelt, wurde im Falle der Hämozyten die Calcium-abhängige Bindung gezeigt (siehe Abbildung 33). So kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Signalen nicht etwa um dHDL-Abbauprodukte handelt, die auch durch den Antikörper erkannt würden.



**Abbildung 33. Ligandenblot von Hämocyten-Membranpräparationen mit dHDL als Ligand als Nachweis einer Calcium-abhängigen Rezeptorbindung.** Die linke Spur, deren Membran in Calcium-haltigem Puffer inkubiert wurde, zeigt eine deutliche Ligand-Rezeptor-Interaktion. Der putative Rezeptor hat ein Molekulargewicht von etwa 100 kDa. Die rechte Membran wurde in Calcium-freiem Puffer inkl. 10 mM EDTA inkubiert und zeigt keine Ligand-Rezeptor-Interaktion. Die Zahlen links geben Molekulargewichte in kDa an.

Das Molekulargewicht der Rezeptorbande dieses Calcium-Kontrollversuches (ca. 100 kDa) entspricht nicht dem in Abbildung 32 beobachteten Molekulargewicht von ca. 160 kDa. Die hier zu sehende Bande entspricht eher der kleinsten der drei Banden in der Hämocyten-Membranpräparation aus Abbildung 32 (blauer Pfeil). Die Calcium-Abhängigkeit der Ligand-Rezeptor-Bindung konnte deutlich gezeigt werden.

Die Ligandenblots, bei denen BGBP als Ligand diente, zeigen entweder keine, uneinheitliche oder nicht reproduzierbare Ergebnisse. Ausschließlich in den Hämocyten-Präparationen von *Astacus leptodactylus* ist ein klares Signal zu sehen (siehe Abbildung 34). Ähnlich wie oben beim dHDL (Abbildung 33) findet BGBP einen Interaktionspartner bei ca. 100 kDa, dessen Bindung mit BGBP in Calcium-freiem Puffer nicht zustande kommt. Laut Duvic und Söderhäll (1992) kann die Rezeptor-Ligandenbindung bei *Pacifastacus leniusculus* erst nach vorheriger Behandlung des BGBP mit dem  $\beta$ -1,3-Glukan Laminarin stattfinden. In der vorliegenden Arbeit scheint eine Vorbehandlung mit Laminarin allerdings nicht essentiell für die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor zu sein. Im Gegenteil, die entsprechende Bande fällt trotz gleichem Probenvolumen in allen *Lanes* eher schwächer aus.



**Abbildung 34. Ligandenblot von Hämocyten-Membranpräparationen mit BGBP als Ligand und  $\alpha$ -BGBP als primären Antikörper.** Die linke Spur zeigt ein deutliches Signal bei etwa 100 kDa. Die mittlere Membran wurde zusätzlich zum BGBP außerdem mit 2,5 mg/ml Laminarin inkubiert. Die Liganden-Rezeptor-Bindung ist weiterhin deutlich zu erkennen, allerdings fällt das Signal schwächer aus. Auch hier kann die Calcium-abhängige Bindung des Lipoprotein-Rezeptors durch Zugabe von 10 mM EDTA gezeigt werden. Die Zahlen links geben Molekulargewichte in kDa an.

### 4.3. Histologie

Die histologischen Experimente untersuchen verschiedene Gewebe (Hepatopankreas, Herz, Kiemen, grüne Drüse, Muskel, Darm) und Zellen (Oocyten, Hämocyten) auf das Vorhandensein der Lipoproteine dHDL und BGBP. Dabei werden zwei Ansätze durchgeführt. Zum Einen werden die Lipoproteine mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-Perchlorat (DiI) fluoreszenzmarkiert und dem Gewebe, bzw. den Zellen zur Aufnahme angeboten, so dass man sie nach dem Fixieren und Schneiden im Gewebe lokalisieren kann (4.3.1. DiI-Aufnahmestudien). Zum Anderen werden Immunfluoreszenzschnitte hergestellt, bei denen der sekundäre Antikörper aus der fluorogenen Alexa-Serie stammt (4.3.2. Immunhistochemie (IHC)).

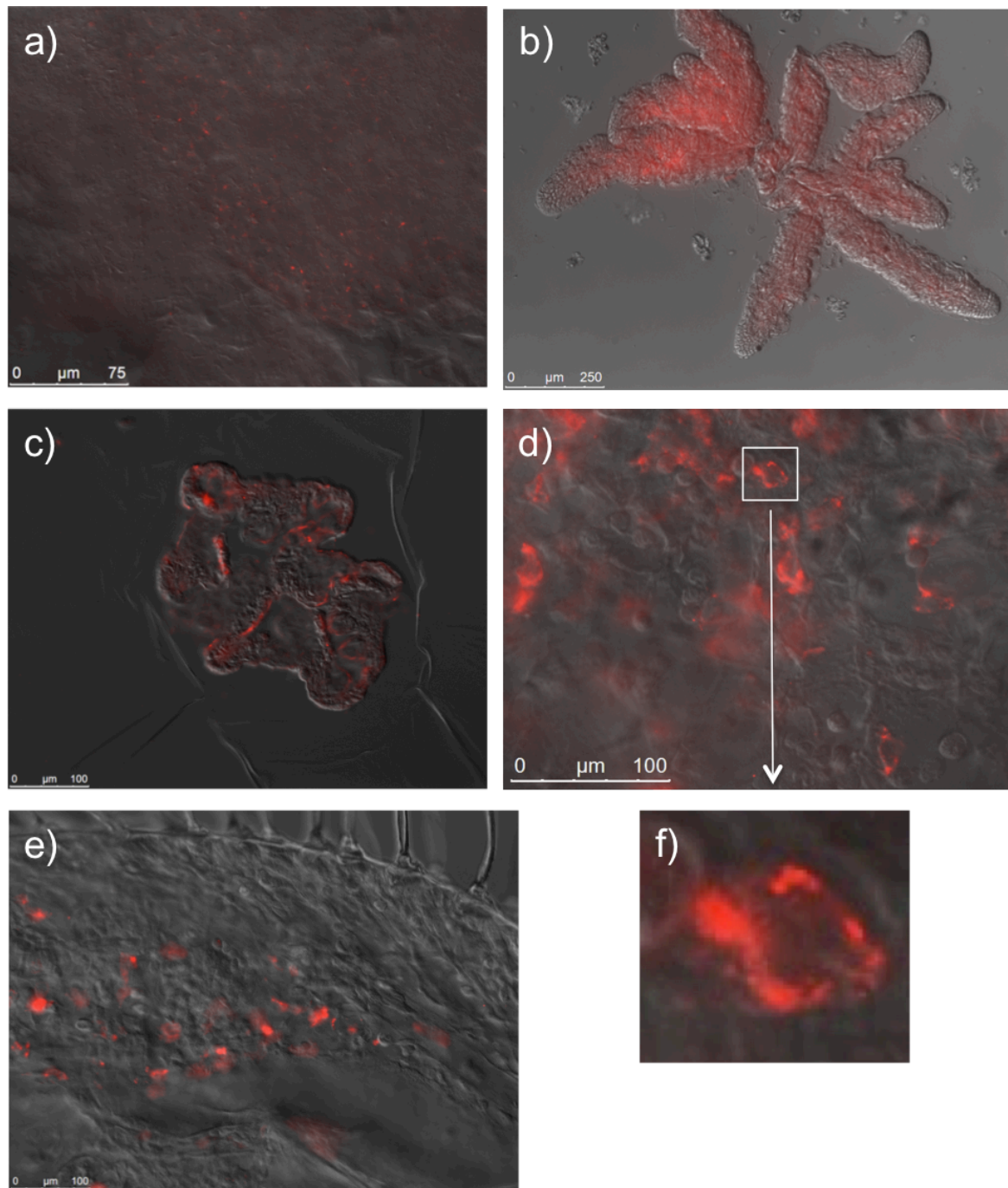
#### 4.3.1. DiI-Aufnahmestudien

DiI, ein lipophiler fluorogener Farbstoff, wird zur Fluoreszenzmarkierung von dHDL verwendet. Das so markierte dHDL wird Zellen oder Geweben unter seminativen Bedingungen zur Aufnahme angeboten. Nun kann man unter dem Fluoreszenz-Mikroskop



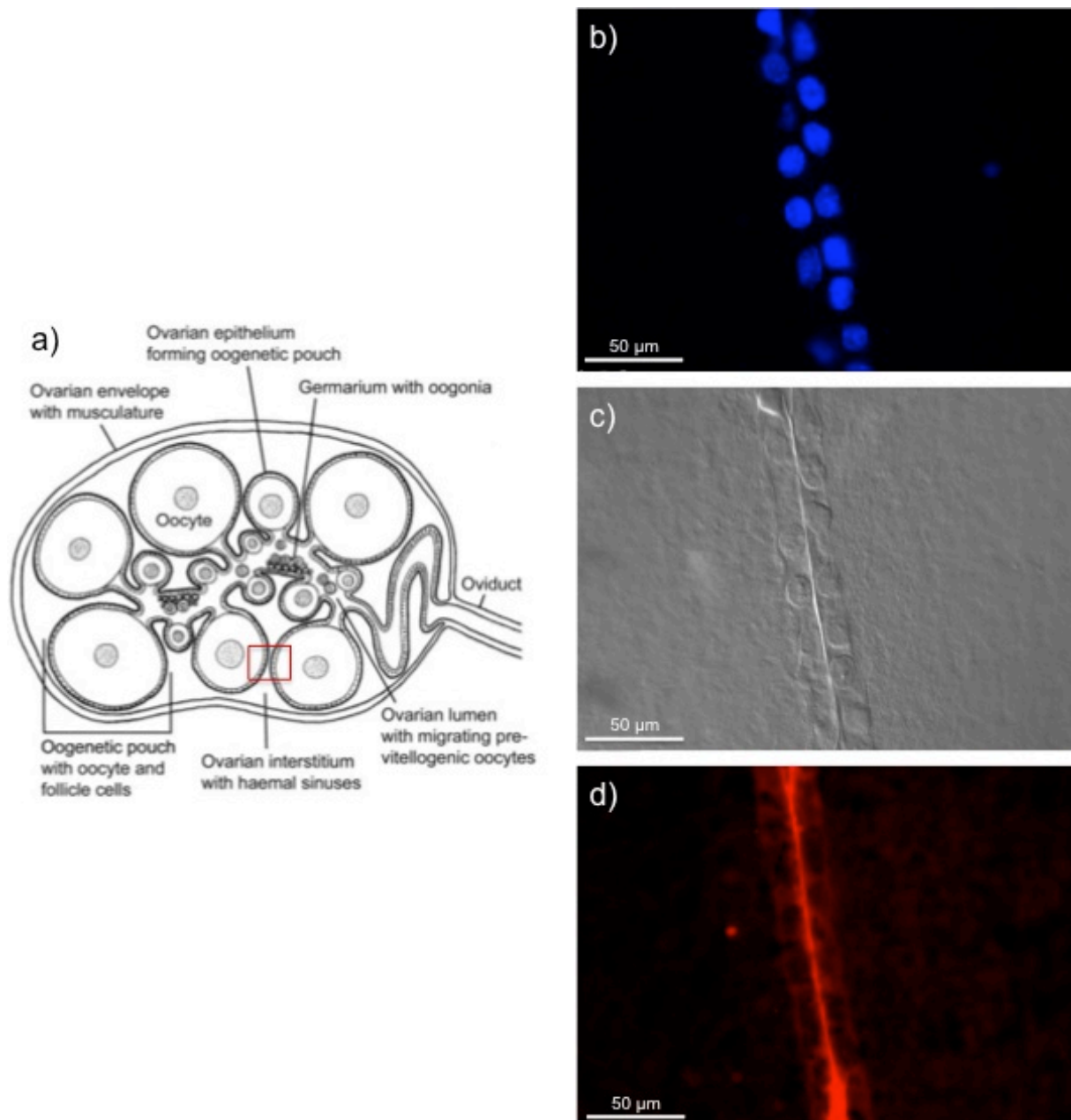
beobachten, ob die Zellen das dHDL aufgenommen haben. Teilweise ist auch eine Lokalisierung innerhalb der Zellen möglich.

In Abbildung 35 sieht man verschiedene Gewebe eines kleinen Flusskrebses (Größe < 3 cm, Alter < 1 Jahr), dem ein Tag vor Organentnahme markiertes dHDL in die Hämolymphe injiziert wurde. Alle untersuchten Organe (Mitteldarmdrüse, Kiemen, Epidermis, grüne Drüse, Darm) haben das Lipoprotein aufgenommen. Die Mitteldarmdrüse leuchtet so intensiv, dass man keine einzelnen Zellen ausmachen kann. Hier hat eine starke Aufnahme stattgefunden. In den anderen Organen kann man distinkte Zellen ausmachen, die das markierte dHDL aufgenommen haben. Insbesondere in der Epidermis sieht man die Färbung als kleine Pünktchen / Granula in der Peripherie dieser Zellen.



**Abbildung 35. Aufnahme von Dil-markiertem dHDL in verschiedenen Geweben eines jungen *Astacus leptodactylus*.** Dem lebenden Krebs wurde ein Tag vor Organentnahme Dil-markiertes dHDL in die Hämolymphe injiziert. Es handelt sich um Quetsch- bzw. Zupfpräparate. **a)** Grüne Drüse, **b)** Hepatopankreas, **c)** Darm, **d)** Epidermis (unter dem Carapax), **e)** Kiemen, **f)** Vergrößerung einer Zelle aus der Epidermis. Alle Organe haben das markierte dHDL aufgenommen. Während die gesamte Mitteldarmdrüse leuchtet, kann man in den anderen Geweben einzelne Zellen, welche das markierte dHDL aufgenommen haben, erkennen. Insbesondere in der Peripherie der Zellen leuchten einzelne Granula (f).

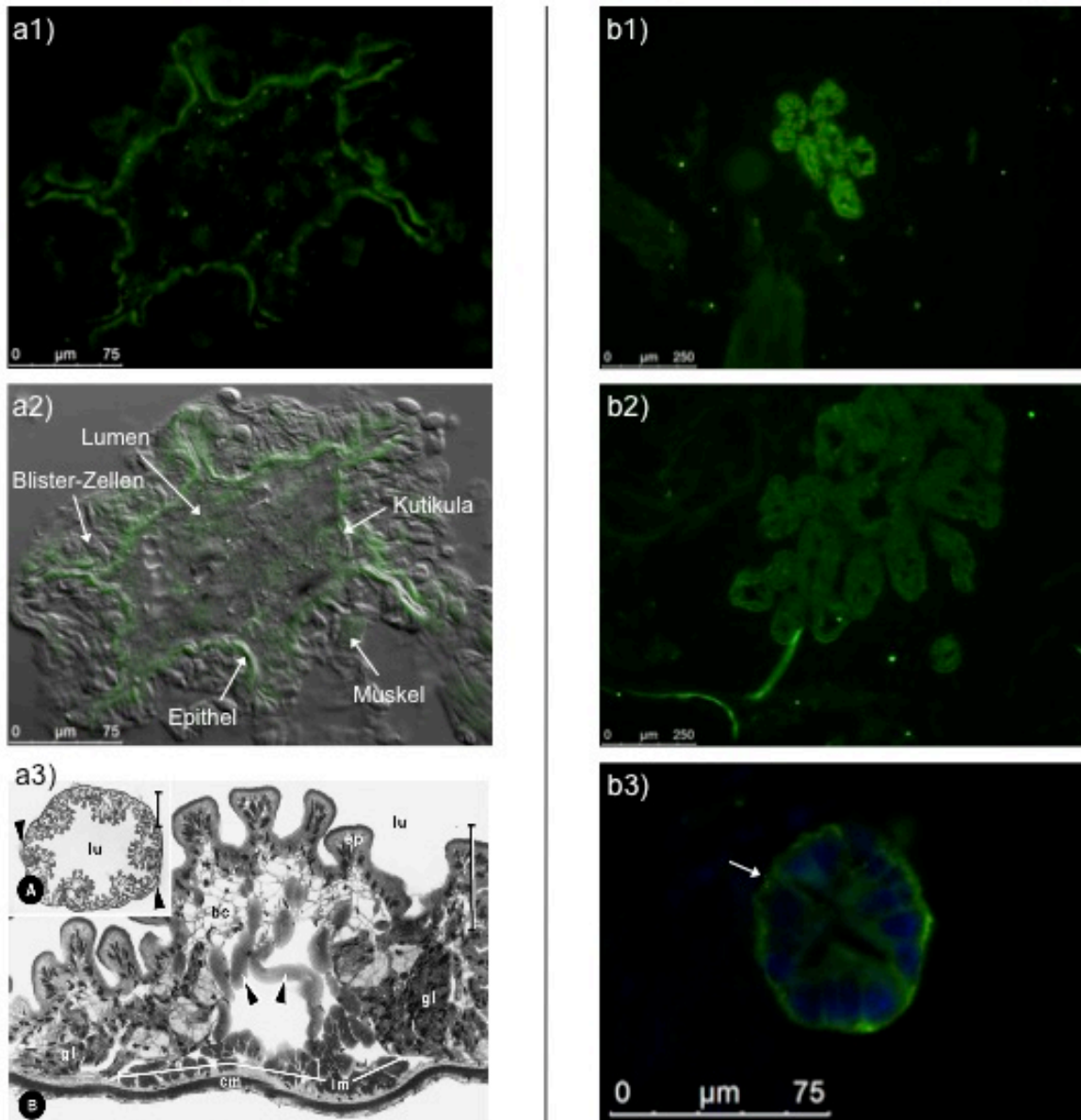
Dil-markiertes dHDL wurde außerdem von den Follikelzellen, welche eine Oocyte umschließen und versorgen, aufgenommen (siehe Abbildung 36). Insbesondere die zum Interstitium hin gelegene Zellmembran nimmt intensiv dHDL auf. Eine schwache Färbung ist auch im Inneren einer Oocyte zu erkennen; das dHDL kann entweder durch die Follikelzellen hindurch in die Oocytes gelangt sein, oder aber vom Lumen her aufgenommen worden sein.



**Abbildung 36. Kryoschnitte eines Ovariums, welches zuvor mit Dil-markiertem dHDL perfundiert wurde. a)** Schematische Übersicht eines Krebs-Ovariums (aus Vogt *et al.*, 2004). Die rote Box zeigt den Ausschnitt an, der in den Bildern b-d zu erkennen ist. **b)** DAPI-Färbung der Zellkerne, **c)** DIC-Aufnahme, **d)** Aufnahme von Dil-markiertem dHDL in die Follikelzellen nach Perfusion des Ovariums. (Durchgeführte Kontrollinkubationen (ohne Dil), unter den gleichen Bedingungen aufgenommen, zeigen keine Fluoreszenz-Signale.)

### 4.3.2. Immunhistochemie (IHC)

Histologische Schnitte, die mit primärem und Fluorogen-gekoppelten sekundärem Antikörper (Alexa 488) behandelt werden, lassen eine Lokalisierung von dHDL in den Geweben zu. Der spezifische Nachweis von dHDL in den Zellen kann allerdings keine Aussage darüber machen, ob dHDL in den Zellen produziert, aufgenommen oder abgebaut wird.

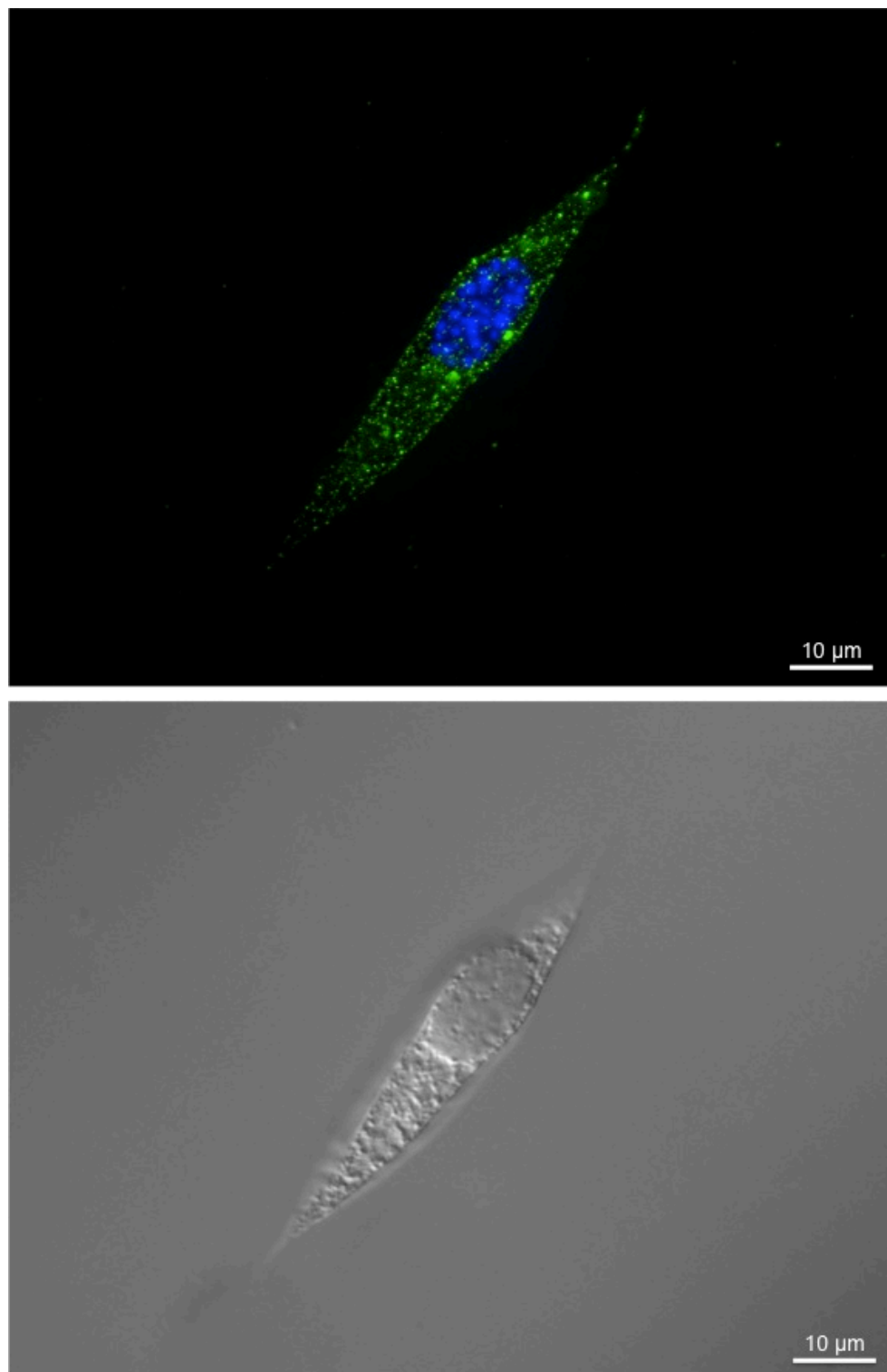


**Abbildung 37. Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Darm (a1-3) und Mitteldarmdrüse (b1-3).** Die Färbung erfolgte mit dem primären  $\alpha$ -dHDL-Antikörper und dem sekundären Alexa-488-Antikörper. Blaue Signale stammen von der DAPI-Färbung. **a1-2)** Zu sehen ist zweimal dieselbe Aufnahme, oben als Fluoreszenz-Bild, unten als *Overlay* von Fluoreszenz-Bild und DIC-Bild. Insbesondere die Epithelzellen des Darms sind stark angefärbt, zum Teil aber auch der Muskel. **a3)** Schematische Übersicht zum Aufbau des Krebs-Darms (aus To et al., 2004) (lu: Lumen, bc: Blister-Zellen, ep: Epithel, gl: Drüse, cm / lm: Muskel). **b1-3)** Quer angeschnittene Mitteldarmdrüsen-Kanälchen werden herangezoomt. Sie leuchten intensiv, zur Außenseite hin lassen sich kleine Granula erkennen (Pfeil in Abbildung b3)). (Durchgeführte Kontrollinkubationen, unter den gleichen Bedingungen aufgenommen, zeigen keine Fluoreszenz-Signale.)

Besonders stark ist die Immunfärbung im Epithel des Darms sowie in der Peripherie der Mitteldarmdrüsen-Kanälchen (siehe Abbildung 37) zu erkennen.

### **Hämocyten**

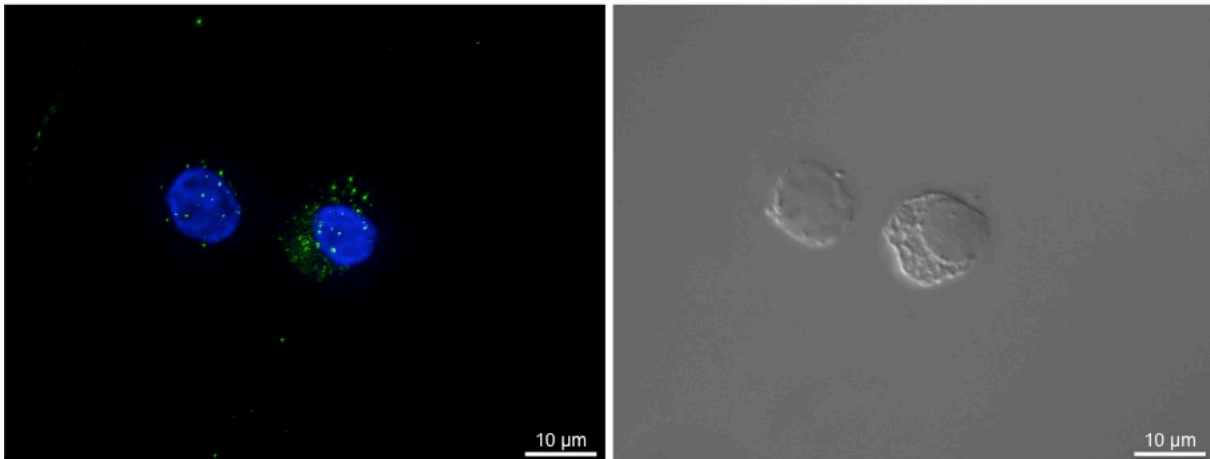
Hämocyten von *Astacus leptodactylus* wurden mit dem  $\alpha$ -dHDL-Antikörper inkubiert. Die Zellen zeigen unterschiedlich starke, jedoch deutliche Signale in Form von distinkten Granula (siehe Abbildung 38). Diese relativ kleinen Granula sind jedoch nicht co-lokalisiert mit den für diesen Zelltyp ansonsten typischen Speichergranula.



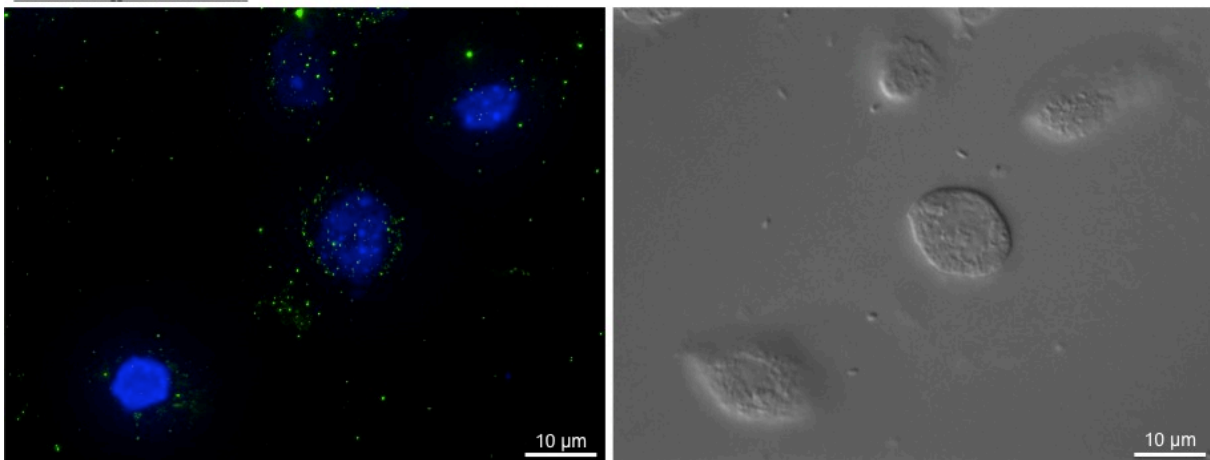
**Abbildung 38. *Astacus leptodactylus*-Hämocyte nach Inkubation mit dem  $\alpha$ -dHDL-Antikörper. Oben:** Immunofluoreszenz-Aufnahme einer Hämocyte; die Zelle ist in 4% PFA fixiert (grün: dHDL-Antikörper-Färbung (Primärer Antikörper:  $\alpha$ -dHDL, sekundärer Antikörper: Alexa 488), blau: DAPI-Zellkern-Färbung). **Unten:** Zugehörige DIC-Aufnahme. Deutlich kann man einzelne Granula erkennen, welche nicht mit den ansonsten für diesen Zelltyp typischen großen Speichergranula colokalisieren. (Durchgeführte Kontrollinkubationen, unter den gleichen Bedingungen aufgenommen, zeigen keine Fluoreszenz-Signale.)

In diesem Zuge wurden auch die Hämocyten der verwandten Arten Marmorkrebs und *Homarus americanus* untersucht. dHDL konnte in diesen Tieren nicht per Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aus der Hämolymphe isoliert werden. Trotzdem zeigen die Immunfluoreszenzen deutliche Signale, die das Vorkommen eines dHDL-ähnlichen Proteins in den Hämocyten anzeigen (siehe Abbildung 39).

Marmorkrebs:



*Homarus americanus*:



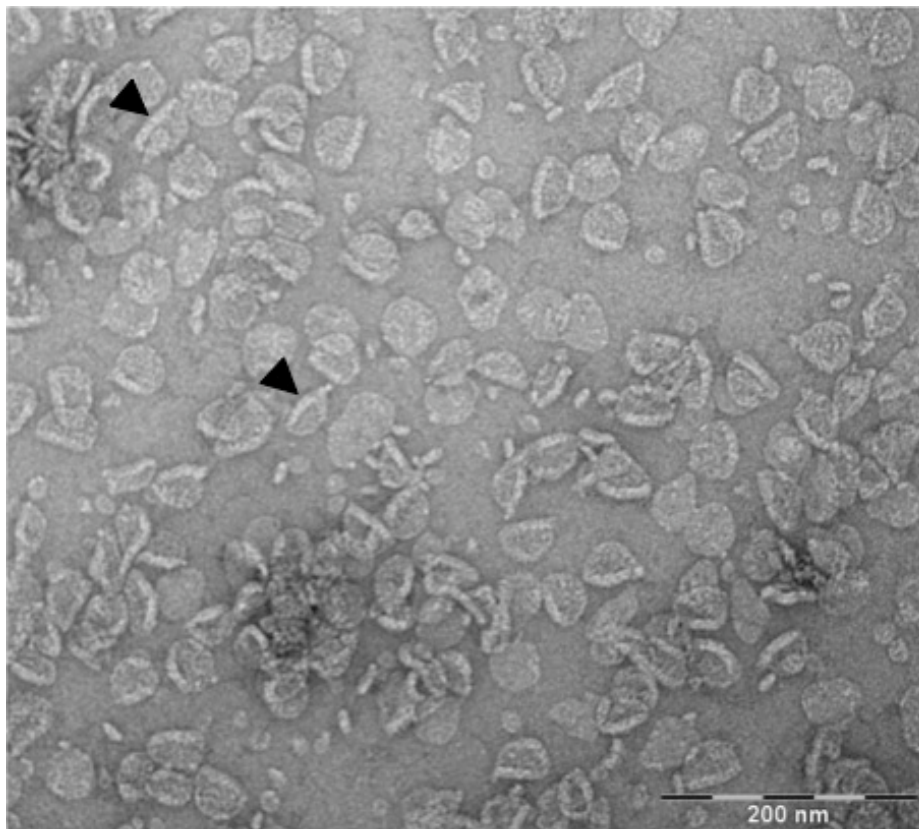
**Abbildung 39. Marmorkrebs (oben) und *Homarus americanus* (unten)-Hämocyten nach Inkubation mit dem  $\alpha$ -dHDL-Antikörper. Links:** Immunofluoreszenz-Aufnahme der Hämocyten; die Zellen sind in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert (grün: dHDL-Antikörper-Färbung (Primärer Antikörper:  $\alpha$ -dHDL, Sekundärer Antikörper: Alexa 488), blau: DAPI-Zellkern-Färbung). **Rechts:** Zugehörige DIC-Aufnahme. Deutlich kann man einzelne Granula erkennen. Obwohl der primäre Antikörper gegen *Astacus leptodactylus*-dHDL hergestellt wurde, reagieren viele Zellen sowohl vom Marmorkrebs als auch vom Hummer intensiv. In den Zellen befindet sich demnach auch ein dHDL-ähnliches Protein.

#### 4.4. Transmissions (TEM)- und Rasterkraft (AFM)-Mikroskopie

Die beiden Mikroskopie-Arten TEM und AFM sollen der strukturellen Darstellung der dHDL- und BGBP-Partikel dienen. Beide Arten sind außerdem dazu geeignet, die Partikelgröße zu vermessen.

##### 4.4.1. Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

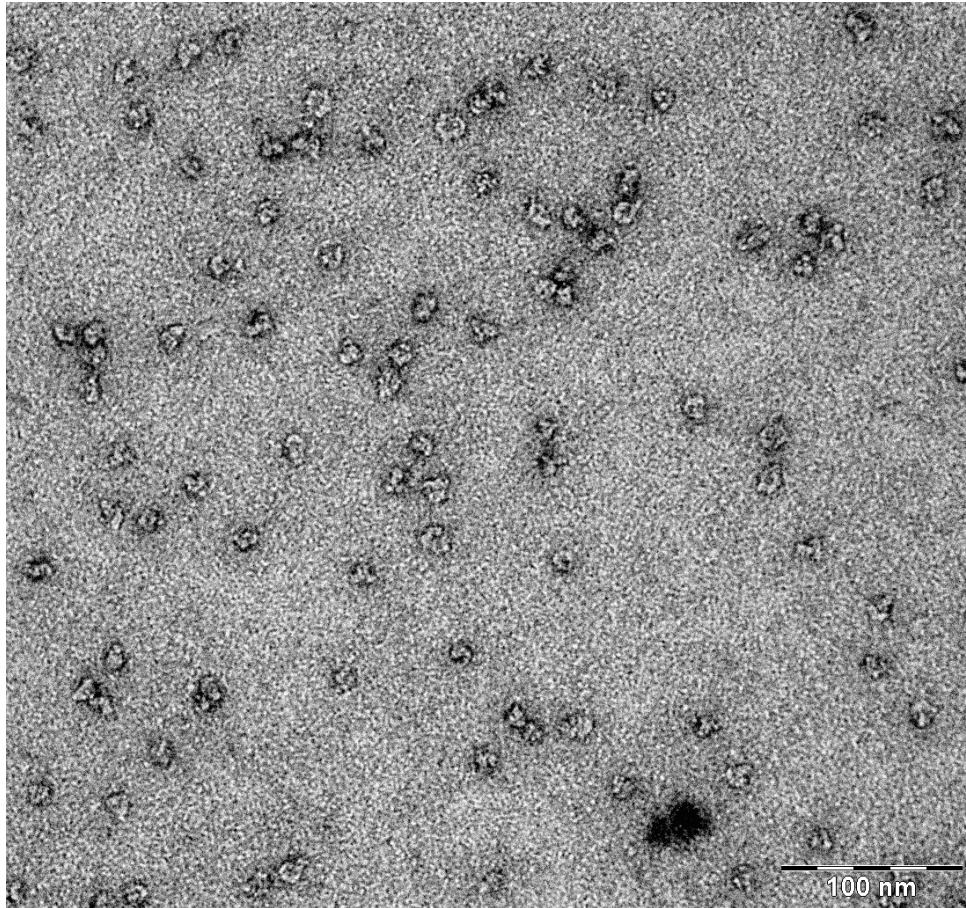
Im Elektronenmikroskop kann man die dHDL-Partikel als discoide Strukturen erkennen (siehe Abbildung 40). Die Ränder erscheinen verstärkt, während die Moleküle in der Mitte des Proteins eine geringere Elektronendichte aufweisen. Wahrscheinlich handelt es sich bei dem dickeren Rand um einen Proteinring, der die innen liegenden Lipide umschließt. Eine Vermessung der einzelnen Partikel ergab einen Durchmesser von 42 nm und eine Höhe von 7 nm (Stieb *et al.*, 2008).



**Abbildung 40.** Elektronenmikroskopische Aufnahme von dHDL-Partikeln nach der *Continuous Carbon*-Methode, mit 2% (w/v) Uranylacetat kontrastiert. Die strukturell sehr flexiblen Lipoproteine präsentieren sich als flache Scheiben mit einem verstärkten Rand und liegen entweder flach oder stehen aufrecht (Pfeile). Der Durchmesser der Partikel beträgt 42 nm, die Höhe 7 nm. (aus Stieb *et al.*, 2008)



BGBP präsentiert sich als von oben betrachtet rundes Protein (siehe Abbildung 41) mit einem mittleren Durchmesser von 14,7 nm ( $\pm 1,2$  nm, n = 24).

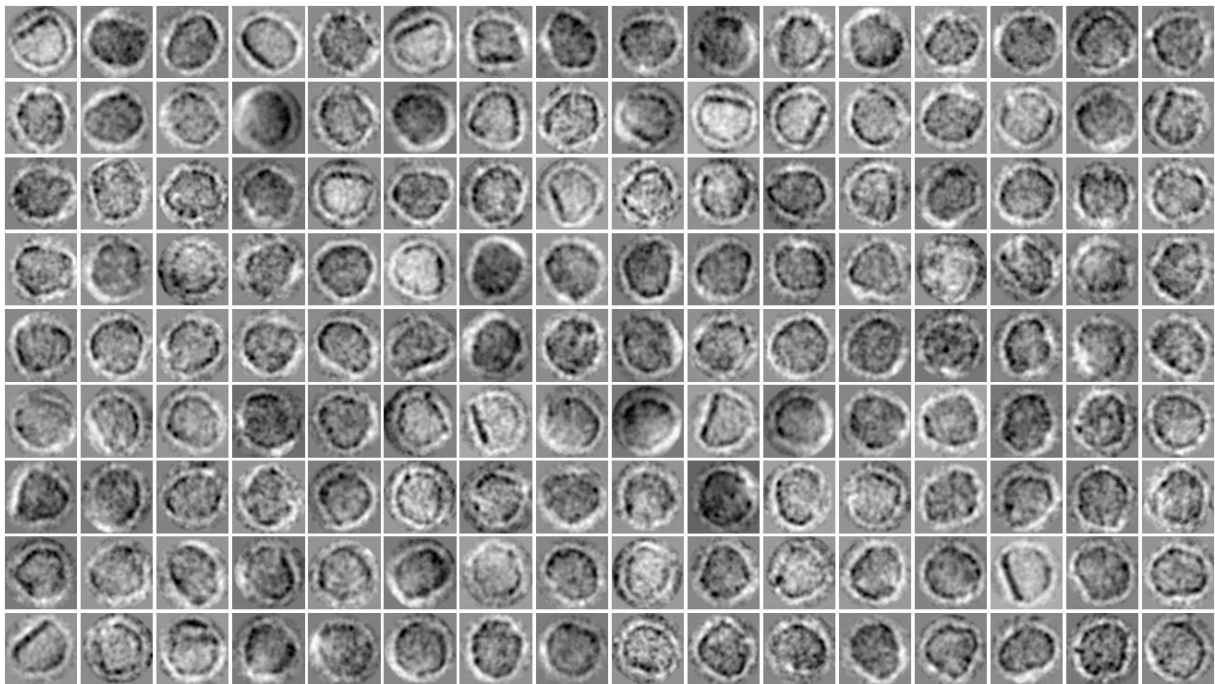


**Abbildung 41.** Elektronenmikroskopische Aufnahme von BGBP-Partikeln nach der *Continuous Carbon*-Methode, mit 2% (w/v) Uranylacetat kontrastiert. Die Partikel haben einen mittleren Durchmesser von 14,7 nm.

### 3D-Rekonstruktion

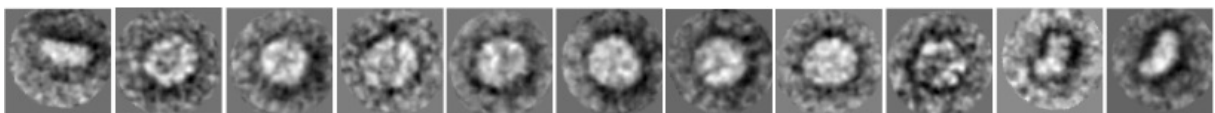
Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zur Rekonstruktion sowie die Klassensummen von dHDL und BGBP sind in Zusammenarbeit mit Philipp Arnold (Institut für Zoologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) entstanden.

dHDL ist ein sehr flexibles Protein, das in vielen verschiedenen Konformationen vorliegt. Die in Abbildung 42 dargestellten 144 Klassensummen stellen wiederum nur eine Auswahl der tatsächlich vorkommenden 449 Konformationen dar. Aufgrund dieser großen Flexibilität war uns eine 3D-Rekonstruktion von dHDL anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen leider nicht möglich.



**Abbildung 42. Auswahl einiger Klassensummen von dHDL-Partikeln nach *Negative staining*-Transmissions-Elektronenmikroskopie.** Die Proteine sind in ihrer Form sehr flexibel und lassen sich in insgesamt 449 Klassensummen einteilen (nicht alle gezeigt). (Diese Abbildung ist in Zusammenarbeit mit Philipp Arnold entstanden)

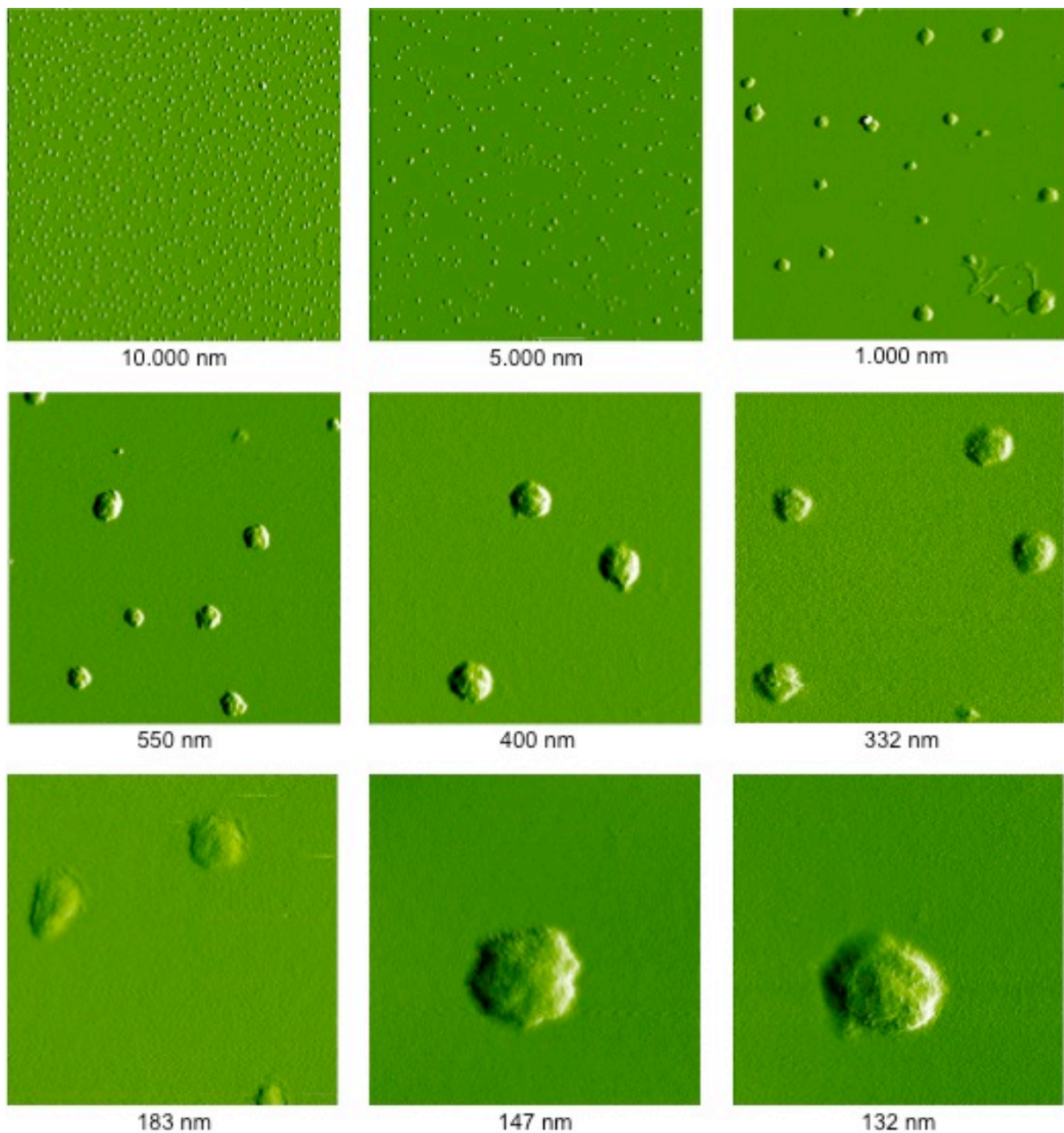
Da BGBP wesentlich unflexibler als dHDL ist, lassen sich die Partikel in nur elf Klassensummen einteilen (siehe Abbildung 43). Es handelt sich demnach um in der Aufsicht betrachtete runde Proteine, die in der Seitenansicht nierenförmig aussehen.



**Abbildung 43. Klassensummen von BGBP-Partikeln nach *Negative staining*-Transmissions-Elektronenmikroskopie.** In der Aufsicht sehen die Partikel rund aus, in der Seitenansicht nierenförmig. (Diese Abbildung ist in Zusammenarbeit mit Philipp Arnold entstanden)

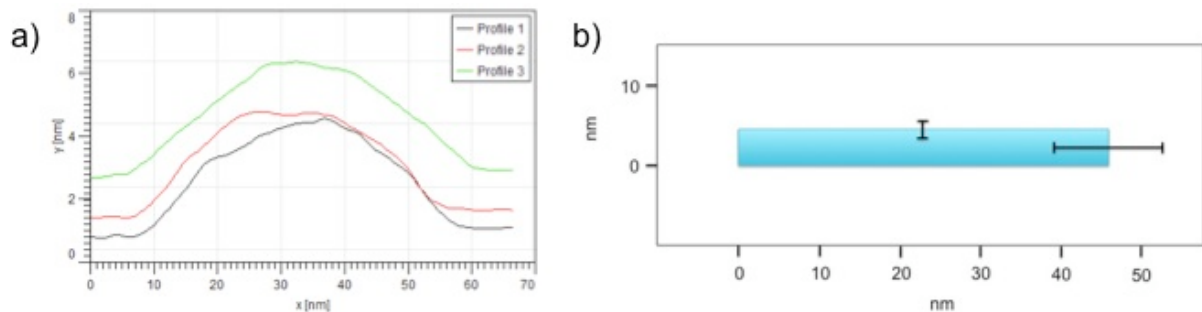
#### 4.4.2. Rasterkraft-Mikroskopie (Atomic Force Microscopy - AFM)

Die AFM-Aufnahmen wurden in Kooperation mit der AG Kühnle (Institut für Physikalische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) erstellt.



**Abbildung 44.** Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen von dHDL-Partikeln mit unterschiedlicher Auflösung. Bei diesen Aufnahmen handelt es sich um Amplituden-Bilder, welche im *Tapping*-Modus aufgenommen wurden. Die nm-Werte unterhalb der Bilder geben die Seitenlänge des jeweiligen Quadrats an. Deutlich zu erkennen sind runde, ebene Lipoprotein-Partikel.

Die Rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung 44) zeigen von oben betrachtet runde dHDL-Partikel in unterschiedlichen Auflösungen. Dass es sich dabei um discoidale Proteine handelt, ergab die Vermessung einzelner Partikel (Abbildung 45). Die für EM-Aufnahmen typische ‚Donut-ähnliche‘ Ringstruktur (siehe oben) ist hier jedoch nicht zu erkennen. Die Partikel weisen eine homogene Verteilung auf dem Glimmer auf. Im Vergleich zu den Elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist die Form wenig flexibel. Kein Partikel ist ein- oder umgeklappt, was vermutlich an dem Aufbringen auf den Glimmerfilm liegt.



**Abbildung 45. a) Beispiel für die Größen-Vermessung dreier dHDL-Partikel anhand rasterkraftmikroskopischer Aufnahmen.** Die x-Achse zeigt den Durchmesser der Partikel an, die y-Achse die Höhe. Demnach haben die Partikel eine Größe von etwa 46 x 4,5 nm. **b) Veranschaulichung der Ausmaße der vermessenen dHDL-Partikel.** Die türkisfarbene Figur symbolisiert einen ‚Standard-dHDL-Partikel‘. Schwarze Balken geben die Standardabweichung an.

Die Vermessung der dHDL-Partikel (Beispiel siehe Abbildung 45) ergab einen mittleren Durchmesser von 46 nm ( $\pm 6,9$  nm,  $n = 14$ ) und eine mittlere Höhe von 4,5 nm ( $\pm 0,9$  nm,  $n = 5$ ).

## 5 DISKUSSION

---

### 5.1. Molekularbiologie

#### 5.1.1. $\beta$ -Glukan-Bindeprotein (BGBP)

##### BGBP-Sequenz - Termini und Prozessierung

Die hier entschlüsselte Sequenz des  $\beta$ -Glukan-Bindeproteins von *Astacus leptodactylus* wurde unter der GenBank-Nr. FN298411 in die NCBI-Datenbank eingestellt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/254587356>). Bei dem 4062 bp (1353 AS) umfassenden Abschnitt handelt es sich um die nahezu vollständige Sequenz. Im Vergleich zur ‚*Fenneropenaeus chinensis* complete coding sequence‘ (GenBank-Nr. GU461662, inklusive 5'- und 3'-UTR) fehlen dem hier ermittelten Fragment jedoch 799 bp am 5'-Ende und 1595 bp am 3'-Ende. Zum reifen N-Terminus der *Litopenaeus vannamei*-BGBP-Sequenz fehlen lediglich 30 AS. Sowohl über den N- als auch über den C-Terminus herrscht allerdings in der Literatur Uneinigkeit. Lai *et al.* (2011) haben in ihrer Publikation eine andere *Fenneropenaeus chinensis*-BGBP-Aminosäure-Sequenz angegeben als in ihrem entsprechenden Datenbankeintrag, auf den auch verwiesen wird (GenBank: GU461662). Die Sequenz hat in der Publikation ein anderes Start-Methionin (im Paper: M1, in der Datenbank: M120) und ist deshalb am N-Terminus 119 Aminosäuren länger. Der C-Terminus der *Fenneropenaeus chinensis*-BGBP-Sequenz ist deutlich länger als der der drei anderen BGBP's (um 564 AS länger im Vergleich zur *Litopenaeus vannamei*-BGBP-Sequenz). Die Sequenz von *Pacifastacus leniusculus* hat wiederum andere N- und C-Termini (hier ist es womöglich zu Sequenzierungsfehlern gekommen, siehe unten). Die exakte Position des N- und des C-Terminus der BGBP-Konsensus-Sequenz ist aufgrund dieser uneinheitlichen Literatur unklar. Um Gewissheit über die tatsächliche Sequenz der Pro- und der reifen BGBP-Sequenz sowie der BGBP-Prozessierung zu bekommen, müssen zuerst 5'- und 3'-RACE (Rapid amplification of cDNA ends)-Analysen durchgeführt werden, so dass die BGBP-Sequenz korrekt und vollständig ist. Letztlich wird aber ausschließlich eine N-terminale Ansequenzierung des Proteins den wahren N-Terminus offenbaren. Hilfreich wären in diesem Zusammenhang auch weiterführende MALDI-Analysen. Kenntnisse über die genauen Schnittstellen ermöglichen dann auch fundiertere Spekulationen über die an der

Prozessierung beteiligten Proteasen. Eine Co-Lokalisation der in Frage kommenden Proteasen mit dem BGBP sowie eine *in vitro*-Prozessierung müssten in weiterführenden Versuchen gezeigt werden.

Der offene Leserahmen der *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz lässt sich in 1353 Aminosäuren übersetzen, welche zusammen eine theoretische molekulare Masse von 153 kDa ergeben. Die errechnete molekulare Masse des offenen Leserahmens der *Fenneropenaeus chinensis*-BGBP-Sequenz ergibt sogar 228 kDa. Laut reduzierender SDS-PAGE (siehe Abbildung 24) hat das native Protein aber nur eine Größe von ca. 105 kDa. Es muss also zu einer extensiven post-translationalen Prozessierung kommen, die theoretisch sowohl am N-, als auch am C-, wie auch an beiden Termini stattfinden kann. Über die an der Prozessierung beteiligte/n Protease/n ist bislang nichts bekannt, so dass man über die Schnittstellen nur spekulieren kann. Das Programm PEPTIDECUTTER findet nach virtuellem Verdau der Aminosäure-Sequenz drei Proteasen, die BGBP selten genug schneiden, um Fragmente entstehen zu lassen, die etwa 100 kDa groß sind. Dabei handelt es sich um Caspase-1, Caspase-10 und Thrombin (siehe Abbildung 19). Da das Peptid, welches durch MALDI-Analyse detektiert wurde (siehe Stieb *et al.*, 2008), zwingend auch im reifen Protein vorkommen muss, scheidet Thrombin aus. Caspasen sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose (Kuranaga, 2011). Sie leiten den programmierten Zelltod ein („Initiator-Caspasen“) und bauen zelleigene Proteine ab („Effektor-Caspasen“). Die Initiator-Caspasen sind wesentlich an der Aktivierung und Reifung von zum Großteil anderen „downstream-Caspasen“ beteiligt, können aber auch andere Proteine wie zum Beispiel Nukleasen aktivieren. Insbesondere für Caspase-1 ist auch eine Beteiligung an nicht-apoptotischen Prozessen bekannt (Beteiligung an Endzündungsprozessen). Caspase-1 und -10 werden, wie alle Caspasen, ubiquitär als Zymogene exprimiert und gehören zu den extrem gut regulierten und konservierten Initiator-Caspasen. Entsprechende Homologe finden sich auch in Invertebraten wie *Drosophila* (Dronc  $\triangleq$  Caspase-1, Dredd  $\triangleq$  Caspase-10). Dadurch, dass Caspasen nur in Ausnahmesituationen als aktive Proteasen vorliegen und eine sehr exakte Feinregulierung absolut notwendig ist, erscheint es eher unwahrscheinlich, diese Enzyme als mögliche BGBP-prozessierenden Enzyme anzunehmen.

Die Aminosäure-Sequenz wurde außerdem auf Furin-Schnittstellen untersucht. Furin ist für die Prozessierung der Insekten-Lipophorine zuständig (Smolenaars *et al.*, 2005); eine analoge Prozessierung für die Crustaceen-Lipoproteine scheint somit naheliegend. Tatsächlich konnten zwei vermutliche Furin-Schnittstellen RAKR und RARR identifiziert werden. Furin schneidet demnach am N-, bzw. C-Terminus derart, dass ein 126 kDa großes Protein entsteht und zudem das durch MALDI sequenzierte Peptid erhalten bleibt. Das reife BGBP-Protein erstreckt sich demnach über die Aminosäuren -38 bis 1071 ((Positionen analog der unter der GenBank-Nummer CAX65684.2 eingetragenen Sequenz), siehe außerdem Abbildung 30) und umfasst somit insgesamt 1109 Aminosäuren. Furin könnte also in der Tat für die Prozessierung des BGBP verantwortlich sein. Wie bereits oben erwähnt, ist es trotzdem unerlässlich, eine N- und C-terminale Sequenzierung durchzuführen, um die exakten Schnittstellen der Prozessierung zu bestimmen und davon ausgehend Furin als BGBP-prozessierende Protease zu verifizieren.

Bisher haben nur Cerenius *et al.* (1994) Spekulationen über die Prozessierung des *Pacifastacus leniusculus*-BGBP veröffentlicht. Als Grundlage für ihre Vermutungen haben sie jedoch eine Sequenz mit unvollständigem N- und C-Terminus vorausgesetzt (siehe unten). Cerenius *et al.* vermuten eine C-terminale Prozessierung. Sie schlagen als reife Aminosäurekette die Aminosäuren 109 bis ca. 1200 vor, setzen allerdings ihre ‚falsche‘ Sequenz (siehe unten) voraus. Dieser Vorschlag ergibt eine theoretische molekulare Masse von 124 kDa und damit deutlich mehr als die beobachtete molekulare Masse von ca. 105 kDa. Vermutungen, welche Proteasen für die Prozessierung in Betracht kommen, machen Cerenius *et al.* nicht.

#### Unstimmigkeiten in der von Cerenius *et al.* (1994) publizierten *Pacifastacus leniusculus* BGBP-Sequenz

(siehe auch Anhang 8.2., Abbildungen A1, A2 und A3)

Auffällig ist die Tatsache, dass die (deutlich kürzere) *Pacifastacus leniusculus*-BGBP-Sequenz im Vergleich zu anderen bekannten BGBP's einen anderen N- und C-Terminus aufweist. Dies erscheint unwahrscheinlich, haben die BGBP's doch zum Teil Identitäten von 89%. Eine genauere Betrachtung der Sequenzen zeigt, dass es an mehreren Stellen zu erheblichen

Abweichungen zwischen der *Pacifastacus leniusculus*-BGBP-Sequenz (GenBank-Nr. CAA56703.1) und den anderen drei bekannten BGBP's aus *Astacus leptodactylus* (CAX65684), *Fenneropenaeus chinensis* (ADW10720.1) und *Litopenaeus vannamei* (AY249858.1) gekommen ist. Dies betrifft insbesondere den N-Terminus (Abbildung A2), den C-Terminus (Abbildung A3), und mindestens drei Bereiche innerhalb der Sequenz (Abbildung A1). Dies ist umso auffälliger, da ja *Fenneropenaeus chinensis* und *Litopenaeus vannamei* als Vertreter der Penaeidae (Dendrobranchiata) taxonomisch weiter entfernt von *Astacus leptodactylus* stehen (Astacidae; Pleocyemata) und trotzdem in den besagten Bereichen (siehe Abbildung A1) eine Sequenzhomologie zeigen, aus der *Pacifastacus leniusculus* klar herausfällt. Noch deutlicher wird ein möglicher Sequenzierfehler bei der Betrachtung des C-terminalen Endes, bei der in der ‚Cerenius-Sequenz‘ relativ früh ein Stopp-Codon auftaucht. Nimmt man nun in dieser Sequenz eine Leserasterverschiebung aufgrund eines Sequenzierfehlers an und fügt ein einzelnes Nukleotid ein (in diesem Fall analog zur *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz ein Adenin), verschiebt sich das Leseraster, das Stopp-Codon an dieser Stelle verschwindet, und die neu übersetzte Sequenz ist zu 86% identisch mit der *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz.

Diese Überlegungen sprechen dafür, dass Cerenius *et al.* (1994) bei der Sequenzierung des *Pacifastacus leniusculus*- $\beta$ -Glukan-Bindeproteins einige Fehler unterlaufen sind. Aus diesem Grund müsste das BGBP von *Pacifastacus leniusculus* dringend neu sequenziert und eine korrigierte Version der Sequenz in die Datenbank eingestellt werden!

#### **BGBP-Sequenz - Domänen- und Motivanalyse**

Genau wie bei den homologen BGBP's von *Fenneropenaeus chinensis* und *Pacifastacus leniusculus* befindet sich am N-Terminus der *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz kein Signalpeptid. Da der N-Terminus von *Astacus leptodactylus*- und *Pacifastacus leniusculus*-BGBP noch nicht vollständig bekannt ist, könnte sich das Signalpeptid im noch nicht sequenzierten, weiter N-terminal gelegenen Bereich befinden. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da auch das homologe und vor Allem auf Nukleotidebene komplett entschlüsselte *Fenneropenaeus chinensis*-BGBP kein Signalpeptid aufweist (Lai *et al.*, 2011). Ein Signalpeptid liegt am N-Terminus und ist wichtig für die korrekte Sezernierung durch den Golgi-Apparat. Da es sich bei BGBP um ein sezerniertes Protein handelt, müsste eigentlich



ein entsprechendes Signalpeptid vorhanden sein. Wie eine Sezernierung ohne Signalpeptid zustande kommen kann, ist unklar.

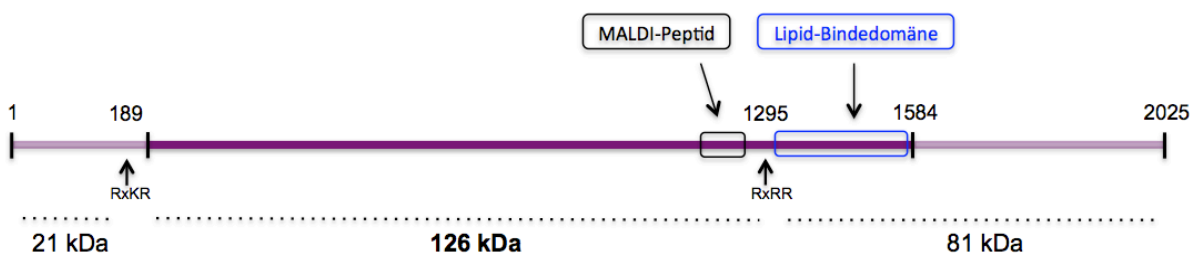
In der BGBP-Sequenz konnte ein putatives RGD-Zelladhäsionsmotiv zur Integrin-Bindung identifiziert werden. Zhao *et al.* (2009) vermuten, dass dieses Motiv zur Bindung an die Integrin- $\beta$ -Untereinheit dient, welche unter Anderem auf der Hämocyten-Oberfläche lokalisiert ist. So könnte BGBP eventuelle Immunantworten vermitteln. Dass BGBP eine Rolle im Immunsystem spielt, wurde von Vargas-Albores *et al.* (1996) gezeigt. Demnach kann BGBP das pro-Phenoloxidase (proPO)-System aktivieren. Bei diesem System handelt es sich um einen Pfad des angeborenen Immunsystems von Arthropoden. Nach bakterieller oder Pilz-Infektion des Organismus erkennt BGBP die auf der Zelloberfläche der Bakterien oder Pilze angehefteten  $\beta$ -1,3-Glukane und bindet dann vermutlich über seine Integrin-Bindestelle an die Hämocyten, welche daraufhin die Eindringlinge phagozytieren. BGBP hat in Arthropoden also durchaus eine Doppelfunktion, zum Einen den Lipidtransport und zum Anderen die  $\beta$ -1,3-Glukan-Erkennung mit anschließender Aktivierung des proPO-Systems. Weiterhin konnte für Arthropoden-Lipoproteine gezeigt werden, dass sie das proPO-System nicht nur aktivieren, sondern proPO, ihre Erkennungsproteine (wie zum Beispiel Peptidoglykan-bindende Proteine) und ihre aktivierenden Proteasen auch in der Hämolymphe transportieren (Rahman *et al.*, 2006). Diese Proteine sind dabei in die Lipidmatrix der Lipoproteine integriert. Aggregieren diese Proteine während zellfreier Abwehrmechanismen, kommt es demnach auch zu einer Lipoprotein-Aggregation (Schmidt *et al.*, 2010).

Mehrere potentielle Glykosylierungsstellen für sowohl N- als auch O-Glykosylierungen wurden identifiziert. Da es sich bei den BGBP's um Lipoglykoproteine handelt (siehe Einleitung), war dies zu erwarten. N-glykosidisch verknüpfte Glukane konnten mittels Lektin-Blot (Abbildung 31) tatsächlich nachgewiesen werden, im Gegensatz zu O-Glykosylierungen (Stieb *et al.*, 2008). Lipoproteine haben aufgrund ihrer Lipidbeladung Probleme mit ihrer Löslichkeit; die Glykosylierung könnte den Proteinen bezüglich ihrer Löslichkeit von Nutzen sein (Nalivaeva *et al.*, 2001). Außerdem erhöht eine Glykosylierung die Stabilität der Proteine, da diese nun schlechter für Proteasen erreichbar sind (Nalivaeva *et al.*, 2001). Dass zumindest dHDL ein Protein mit einer sehr langen Halbwertszeit von mehreren Tagen ist, konnte in Vorversuchen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Diese Stabilität könnte mit der

Glykosylierung zusammenhängen. Im Vergleich zu dHDL und anderen sezernierten Proteinen ist BGBP mit seinem Kohlenhydratgehalt von insgesamt 0,44% (Stieb, 2007) jedoch relativ schwach glykosyliert. Eventuell behindern die Kohlenhydrate die  $\beta$ -Glukan-Bindestelle des BGBP. Auch die Lipopolysaccharid-/ $\beta$ -Glukan-Bindeproteine (LGBP's) besitzen nur zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Lin *et al.*, 2008.), sind also wahrscheinlich ähnlich so schwach glykosyliert wie das BGBP.

Wie für die BGBP's von *Fenneropenaeus chinensis*, *Litopenaeus vannamei* und *Pacifastacus leniusculus* beschrieben (Lai *et al.*, 2011, Romo-Figueroa *et al.*, 2004, Cerenius *et al.*, 1994), finden sich auch in der *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz zwei putative Glukanase-Regionen. Diese Regionen haben Sequenzähnlichkeit zum aktiven Zentrum von bakteriellen 1,3-1,4- $\beta$ -D-Glukan-4-Glukanohydrolasen (z. B. *Bacillus licheniformis*; Lloberas *et al.*, 1991). Die Identität der *Astacus leptodactylus*-BGBP-Glukanase-Region mit der bakteriellen Konsensussequenz (GTPWDEIDIEFLGKDTTKVQF; Konsensus aus aktivem Zentrum von *Bacillus licheniformis*-, *Fibrobacter succinogenes*-, *Bacillus macerans*- und *Clostridium thermocellum*-1,3-1,4- $\beta$ -D-Glukan-4-Glukanohydrolasen; Lloberas *et al.*, 1991, Teather *et al.*, 1990, Borriss *et al.*, 1988, Schimming *et al.*, 1992) beträgt im Falle der ersten putativen Glukanase-Region 27%. Im Falle der zweiten putativen Glukanase-Region liegt die Identität noch deutlich niedriger (19%). Die Übereinstimmung auf Sequenzebene ist also sehr gering. Auch auf struktureller Ebene finden sich keine Ähnlichkeiten (Struktursuche mit dem Programm SWISS-MODEL: bei einer Suche mit der oben genannten bakteriellen Konsensussequenz bekommt man als Hit die Struktur der oben genannten bakteriellen Glukanase aus *Bacillus licheniformis*. Sucht man jedoch mit den Crustaceen-Sequenzen ergibt sich kein Hit.) Ob es sich hierbei also wirklich um eine Glukanase-Region handelt, scheint fragwürdig. Die Tatsache, dass BGBP  $\beta$ -Glukane binden kann und außerdem eben jene fragwürdige Glukanase-Region aufweist, ist für Cerenius *et al.* (1994) ein Hinweis auf die phylogenetische Abstammung dieser Proteine. Sie vermuten, dass BGBP's ursprünglich von Glukanasen abstammen, die im Laufe der Evolution ihre Glukanase-Aktivität verloren haben, ihre Eigenschaft  $\beta$ -Glukane zu binden jedoch beibehalten haben. Eine ähnliche Situation wird für die  $\beta$ -1,3-*glucan recognition*-Proteine bei Insekten vermutet (Pauchet *et al.*, 2009). Allerdings wird auch das Insekten-Konsensus-Motiv (ELDLxExxGKxP; Pauchet *et al.*, 2009) von SWISS-MODEL nicht als Glukanase-Region erkannt.

Durch Bestimmung des GRAVY-Index konnte ein lipophiler Bereich am C-Terminus der unprozessierten BGBP-Aminosäure-Sequenz identifiziert werden (Aminosäuren 1190 - 1353; Positionen analog der unter der GenBank-Nummer CAX65684.2 eingetragenen BGBP-AS-Sequenz). Bei diesem Bereich handelt es sich vermutlich um eine Lipidbindedomäne, denn eine räumliche Anhäufung hydrophober Aminosäurereste ist nötig für die Lipid-Komplexierung (Ruiz-Verdugo *et al.*, 1997). Auch die Lipidbindedomänen anderer typischer Lipoproteine wie humanes ApoE, humanes ApoB, *Locusta migratoria*-Lipophorin und *Homarus americanus*-Vitellogenin haben einen relativ höheren GRAVY-Index ( $> -0,2$ ). Diese vermeintliche Lipidbindedomäne liegt allerdings außerhalb des Bereichs, welcher vermutlich das reife BGBP-Protein bildet (wenn man eine Prozessierung durch eine Furin-ähnliche Protease annimmt, siehe oben) (Abbildung 46).



**Abbildung 46. Lage der potentiellen Lipidbindedomäne innerhalb der BGBP-Aminosäurekette.** Nimmt man eine BGBP-Prozessierung durch Furin-ähnliche Proteasen an (R-X-K/R-R-Schnittstellen eingezeichnet), so liegt diese Domäne nicht im reifen BGBP-Protein. Allerdings wurden in genau diesem Bereich dHDL-Peptide durch LC-MS/MS nachgewiesen (siehe Diskussion weiter unten). Nummerierung der Aminosäuren analog der Nummerierung in Abbildung 19.

Stattdessen entspricht diese Domäne den durch LC-MS/MS bestimmten Peptiden des dHDL. Darauf wird weiter unten detailliert eingegangen.

### BGBP-Sequenz - Phylogenie

Der errechnete Stammbaum einiger Crustaceen-LGBP's, -BGBP's, -Clotting-Proteine und -Vitellogene teilt sich in vier Äste, die jeweils eine Proteinfamilie darstellen (siehe Abbildung 22). Lediglich das *Daphnia pulex*-Vitellogenin lässt sich keiner Familie zuordnen, was auch nicht verwunderlich ist, hat es doch eine zusätzliche Funktion als Superoxid-Dismutase (Kato *et al.*, 2004). Die beiden Familien LGBP und BGBP *clustern* wie in der Publikation von Lai *et al.* (2011) auf verschiedenen Ästen. Das *Astacus leptodactylus*-BGBP ordnet sich wie erwartet bei den BGBP's ein und kann somit als solches identifiziert werden. Das *Marsupenaeus japonicus*-BGBP *clustert* nicht wie erwartet mit dem ‚Endzweig‘ der

Penaeiden, sondern trennt sich früher ab. Dies liegt vermutlich nicht an mangelnder Homologie, sondern daran, dass das *Marsupenaeus japonicus*-BGBP nur zu einem sehr kleinen Teil sequenziert ist (205 AS) und fehlende Sequenzbereiche bei der Stammbaumberechnung wie Lücken behandelt wurden. Nimmt man an, dass die publizierte *Pacifastacus leniusculus*-BGBP-Sequenz (siehe oben) einige Sequenzierungsfehler aufweist, so muss man davon ausgehen, dass die ‚richtige‘ Sequenz den anderen BGBP's sehr viel ähnlicher ist, als bisher angenommen, die BGBP's also noch konservierter sind, als dieser Stammbaum zeigen kann. Ob sich die LGBP's und die BGBP's tatsächlich einen gemeinsamen Vorläufer teilen, und ob dieser Vorläufer eher Glukanase (wie unter Anderen von Cerenius *et al.* (1994) vermutet) oder Lipidtransfer-Protein war, lässt sich anhand der vorhandenen Daten nicht sagen. Dieser Stammbaum unterstützt die Notwendigkeit einer Revision bzgl. der inkonsistenten Benennung vieler BGBP's und LGBP's (siehe Anhang 8.1.).

Da die untersuchten Protein-Familien wahrscheinlich nicht homolog sind, sind weitergehende phylogenetische Aussagen anhand des hier errechneten Stammbaums nicht möglich.

### 5.1.2. Discoidales *High density*-Lipoprotein (dHDL)

#### dHDL-Sequenz - cDNA-Bank

Die dHDL-Sequenz konnte mittels cDNA-Bank-Screening im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation nicht erlangt werden. Zwar gab es einige Plaques, welche mit dem Antikörper reagierten, das Vereinzeln und Sequenzieren führte allerdings nicht zur gewünschten Sequenz. Stattdessen wurden andere im Hepatopankreas exprimierte Proteine, wie zum Beispiel Verdauungsenzyme und rRNA's, sequenziert. Daraus kann man schließen, dass die Bank intakt ist, auch wenn sie leichte Verunreinigungen von ribosomaler RNA enthält.

#### Mögliche Schwierigkeiten

Dass die dHDL-Sequenz bisher nicht gefunden wurde, kann vor allen Dingen daran liegen, dass in dem begrenzten Zeitrahmen nicht genügend Phagen gescreent wurden. So konnte der Sequenz-beinhaltende Phage noch nicht identifiziert werden. Gerade bei eventuell niedrig exprimierten Proteinen muss ein extensives Screening durchgeführt werden. dHDL kommt zwar in der Hämolymphe in großen Mengen (ca. 4 mg/ml, siehe 5.2.4. ELISA) vor,

allerdings handelt es sich um ein sehr stabiles Protein mit einer geringen Abbaurate. Daher ist es denkbar, dass eine hohe Expressionsrate zum Halten des dHDL-Levels in der Hämolymphe nicht nötig ist.

Darüber hinaus kann es weitere Schwierigkeiten und Risiken beim *Screenen* einer cDNA-Bank geben. Selbstverständlich kann die Bank nur die cDNA's von Proteinen enthalten, die auch in der Mitteldarmdrüse exprimiert werden. Für das dHDL weiß man das nicht sicher. Da andere Lipoproteine wie zum Beispiel das BGBP in der Mitteldarmdrüse exprimiert werden, scheint diese Annahme aber vernünftig. Zudem muss die cDNA zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme exprimiert worden sein. Von Insekten weiß man, dass sie ihre Lipophorine nicht konstitutiv exprimieren, sondern die Expression durch Nahrungsaufnahme induziert wird (Van Heusden *et al.*, 1998). Dasselbe gilt für das  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein der Crustaceen; Nahrungsaufnahme induziert ein höheres mRNA-Level im Hepatopankreas (Muhlia-Almazán *et al.*, 2005). In dem hier vorliegenden Experiment wurden allerdings die Organe von Tieren verwendet, die einige Tage nicht gefüttert wurden, um die Experimente nicht durch Fremd-DNA zu verunreinigen.

Ein weiteres Problem kann die dHDL-Sequenz an sich sein. Über die Länge der mRNA ist nichts bekannt. Die zwei Untereinheiten des Proteins (240 und 85 kDa) können auf verschiedenen *Gen-Loci* liegen, sie können aber auch als eine mRNA exprimiert werden, welche später prozessiert wird. Die Lipophorine der Insekten, welche ein ähnliches Untereinheiten-Muster aufweisen (220-250 und 70-85 kDa; Smolenaars *et al.*, 2005), werden als eine mRNA transkribiert. Die prä-mRNA hat eine Größe von 10 kb (Van Heusden *et al.*, 1998). Desweiteren ist nichts über die 3'-UTR der dHDL-mRNA bekannt. Bei Invertebraten kann eine 3'-UTR bis zu 1000 bp lang sein (Farrell, 2010), im Durchschnitt ist sie 400 bp lang (Pesole *et al.*, 2000). Die *Inserts*, welche in die Phagen kloniert wurden, haben aber im Schnitt nur eine Länge von 500 bp; vom kodierenden Bereich würde man also im Falle einer großen 3'-UTR nichts sehen. In allen hier genannten Fällen (Protein evtl. auf zwei mRNA's kodiert, sehr lange mRNA oder sehr lange 3'-UTR) kommt es bei der bakteriellen Expression des entsprechenden *Inserts* nur zu einem bruchstückhaften Protein, welches der Antikörper eventuell nicht oder nur sehr schwach erkennen kann. Das bakterielle Expressionssystem an sich stellt auch noch weitere Probleme dar. Im Gegensatz zu eukaryotischen

Expressionssystemen wie zum Beispiel der Insekten-Zellkultur können Bakterien die exprimierten Proteine nicht korrekt falten oder post-translational modifizieren, was eventuell auch zu mangelnder Antikörper-Erkennung führen kann.

Dass es sich hier im besonderen Fall um Lipoproteine und einen Antikörper gegen die lipidierte Form handelt, dürfte hingegen kein Problem sein, da der Antikörper auch die einzelnen unlipidierten Untereinheiten im Western-Blot erkennt.

### Lösungsansätze

Um ein effektiveres *Screening* zu gewährleisten, sollte der primäre dHDL-Antikörper für weitere *Screening*-Runden durch Prä-Adsorption aufgereinigt werden. Dann fallen mögliche Fremdreaktionen mit anderen Proteinen weg und die Vereinzelung positiver Plaques wird erleichtert. Trotz Allem ist es nicht ungewöhnlich, in vermeintlich positiven Plaques die cDNA's anderer Hepatopankreas-Proteine zu finden; beim Ausstechen der Plaques pickt man auch immer das direkte Umfeld mit, wo sich andere Klone befinden. Sollte extensives *Screening* auch zu keinem Ergebnis führen, könnte man einen gegen die durch MALDI sequenzierten Bereiche und somit sehr viel spezifischeren Peptid-Antikörper einsetzen. Diese Bereiche liegen wahrscheinlich frei zugänglich an der Außenseite des gefalteten Proteins, sonst wären diese für den Trypsin-Verdau nicht zugänglich (hier muss man Daten aus MALDI-Analysen verwenden, bei denen das Protein durch Acetonfällung und Gelfiltration aufgereinigt wurde). Alternativ kann auch mit einer biotinylierten DNA-Sonde gegen die MALDI-Bereiche gescreent werden. Da sich mindestens 18 der MALDI-Fragmente auch im BGBP wiederfinden, könnte man die Nukleotidsequenz des BGBP als Grundlage verwenden und hoffen, dass auch auf Nukleotidebene eine hohe Übereinstimmung vorliegt.

Führen alle *Screening*-Versuche der cDNA-Bank zu keinem Ergebnis, bleibt zur Identifizierung der dHDL-Sequenz nur die vollständige Sequenzierung des *Astacus leptodactylus*-Transkriptoms mit anschließender bioinformatischer Auswertung.

## 5.2. Proteinbiochemie

### 5.2.1. Isolierung der Lipoproteine

Durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation konnten die Lipoproteine dHDL und BGBP aus der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* als reine Fraktionen isoliert werden. Als Zentrifugations-Medien kam hier Kaliumbromid zum Einsatz. Die bestimmte Dichte der isolierten Lipoproteine (dHDL: 1,10 g/ml, BGBP: 1,16 g/ml) charakterisiert beide eindeutig als *High density*-Lipoproteine (HDL's) (Stieb *et al.*, 2008). Bei Invertebraten sind HDL's die vorherrschende Lipoproteinklasse. Die  $\beta$ -Glukan-Bindeproteine der Crustaceen sind im Allgemeinen HDL's; so sind die Dichten der BGBP's der Krabben *Potamon potamois* und *Cancer antennarius* ( $\rho = 1,08$  g/ml, bzw. 1,19 g/ml; Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995), sowie der Garnelen *Litopenaeus vannamei* ( $\rho = 1,14$  g/ml; Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995) und *Penaeus semisulcatus* ( $\rho = 1,22$  g/ml; Lubzens *et al.*, 1997) bekannt. Das BGBP des Signalkrebse *Pacifastacus leniusculus* hat eine Dichte von 1,14 g/ml (Hall *et al.*, 1995). Die Lipophorine der Insekten haben Dichten zwischen 1,12 und 1,14 g/ml (Ryan *et al.*, 2000, Canavoso *et al.*, 2004, Rodenburg *et al.*, 2005) und sind somit auch als HDL's zu klassifizieren. Außerdem sind die Dichten einiger Schnecken- und Spinnen-Lipoproteine bekannt; sie variieren zwischen 1,10 und 1,17 g/ml (Haunerland *et al.*, 1989, Pollero *et al.*, 1992, Heras *et al.*, 2002). VHDL's kommen bei Invertebraten auch vor, z.B. das *Clotting*-Protein ( $\rho = 1,28$  g/ml; Komatsu *et al.*, 1998) und das Hämocyanin ( $\rho = 1,3$  g/ml; Hall *et al.*, 1995) der Crustaceen. Diese dienen dann aber nicht hauptsächlich dem Lipidtransport, sondern nehmen im Falle des *Clotting*-Proteins Aufgaben im Immunsystem wahr; Hämocyanin ist vor Allem für den Sauerstofftransport in der Hämolymphe zuständig.

### 5.2.2. Molekulare Struktur: Proteine, Kohlenhydrate und Lipide

#### Apolipoproteine

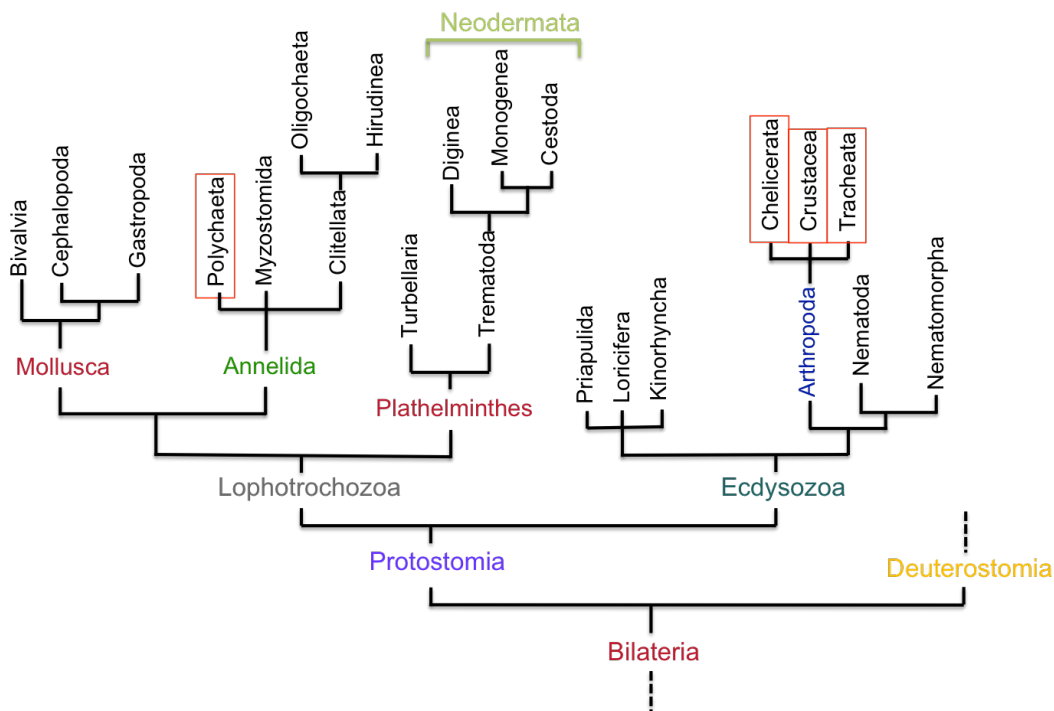
##### dHDL

Die SDS-PAGE (Abbildung 24) zeigt, dass dHDL aus zwei Untereinheiten besteht, und zwar einer Größeren mit 240 kDa und einer Kleineren mit 85 kDa. Zusammen bilden sie ein Heterodimer mit einer molekularen Masse von ca. 330 kDa (Stieb *et al.*, 2008). Diese Apolipoproteinstruktur erinnert an den Aufbau der Insekten-Apolipophorine (ApoLp).

Apolipoproteine bestehen ebenfalls aus zwei Untereinheiten (ca. 240 und 80 kDa), welche zusammen ein Heterodimer bilden. Die beiden Untereinheiten werden als eine mRNA (ApoLp-II/I) transkribiert. Erst die Aminosäurekette wird an seiner enthaltenen Furin-Schnittstelle (RQKR) post-translational durch eine Furin-ähnliche Protease in die beiden Untereinheiten geschnitten (Van der Horst *et al.*, 2002). Auch die Apolipoproteinstruktur des Polychaeten *Nereis virens* zeigt ein ähnliches Muster; die beiden Untereinheiten haben molekulare Massen von 247 und 85 kDa (Schenk *et al.*, 2006). Sogar der evolutiv sehr alte Organismus, das ‚lebende Fossil‘ *Limulus polyphemus*, hat ein Lipoprotein, welches aus zwei Untereinheiten mit 265 und 89 kDa besteht (Rehn *et al.*, 1994). Außerdem findet man ein solches Untereinheiten-Muster bei einigen Arachniden; die Vogelspinne *Eurypelma californicum* besitzt zwei Lipoproteine mit den Untereinheiten 250 und 80 kDa (Hauerland *et al.*, 1987), bzw. 220 und 80 kDa (Stratakis *et al.*, 1993). Lipoproteine mit dem Untereinheitenmuster 250 und 80 kDa finden sich außerdem bei der Riesenkrabbenspinne *Polybetes pythagoricus* (Cunningham *et al.*, 1994), der schwarzen Witwe *Latrodectus aspersus* und dem Skorpion *Hadrurus arizonensis* (Hauerland *et al.*, 1989). Die Walzenspinne *Eremobates spec.* hat ein Lipoprotein bestehend aus einer 250 und einer 90 kDa großen Untereinheit (Hauerland *et al.*, 1989). Nur bei Crustaceen wurde bisher, mit Ausnahme des hier untersuchten *Astacus leptodactylus*, bislang kein Lipoprotein mit einem solchen Untereinheiten-Muster gefunden. Dies ist umso ungewöhnlicher, als dass durchaus in mehreren Studien die Lipoprotein-Muster von Vertretern dieses Unterstammes untersucht wurden (siehe Einleitung). Natürlich könnte es sich bei anderen Spezies um ein farbloses Protein handeln (dHDL von *Astacus leptodactylus* ist vermutlich auf Grund der enthaltenen Carotinoide orange gefärbt), welches bei der klassischen Ultrazentrifugations-Isolierung eventuell leicht übersehen werden kann. Bei genauem Betrachten der Zentrifugations-röhrchen kann man aber auch farblose, schwebende Proteine erkennen, da die Lösung an dieser Stelle schwach opak erscheint. Deshalb schließe ich ein ‚Übersehen‘ des dHDL in den Hämolymphe zumindest der in unserem Labor untersuchten Spezies (*Astacus astacus*, Marmorkrebs, *Procambarus clarkii*, *Cherax quadricarinatus*, *Cancer pagurus*, *Hyas araneus*, *Idothea spec.*; nicht veröffentlichte Daten von Sven Schenk, Ulrich Hoeger und Stefanie Stieb) aus. Trotz des Abhandenseins von dHDL in weiteren Crustaceen-Spezies scheint es dennoch im Genpool der Arthropoden und Polychaeten vorhanden zu sein (wenn es in diesen beiden Spezies nicht unabhängig voneinander entstanden ist) (Abbildung 47).



Bei den meisten Crustaceen wird es aber offensichtlich nicht als Lipoprotein exprimiert (deshalb ist keine Isolierung per Dichtegradienten-Ultrazentrifugation möglich) oder nicht in die Hämolymphe sezerniert oder gar nicht exprimiert.



**Abbildung 47. Stammbaum der Protostomia mit den beiden Überstämmen Ecdysozoa und Lophotrochozoa.** Mit roten Kästchen sind die Klassen markiert, bei denen Lipoproteine mit einem Untereinheiten-Muster  $\sim 250 + 85$  kDa nachgewiesen wurden. Dies sind die Polychaeta (z.B. *Nereis virens*; Schenk *et al.*, 2006), Chelicerata (z.B. *Eurypelma californicum*; Hauerland *et al.*, 1987), Tracheata (z.B. *Manduca sexta*; Pattnaik *et al.*, 1979) und Crustacea (z.B. *Astacus leptodactylus*; Stieb *et al.*, 2008).

### BGBP

Das Apolipoprotein-Muster des  $\beta$ -Glukan-Bindeproteins (eine Untereinheit mit 105 kDa) ist auch bei anderen Crustaceen bekannt. Es wurde für *Astacus astacus* (ca. 100 kDa; Duvic *et al.*, 1993) beschrieben, ebenso für *Procambarus clarkii* (100 kDa; Duvic *et al.*, 1993), *Litopenaeus vannamei* (98 kDa; Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995), *Penaeus semisulcatus* (110 kDa; Lubzens *et al.*, 1997) und *Cherax quadricarinatus* (96 kDa; Yehezkel *et al.*, 2000). Dabei handelt es sich um ein Protein, das zwei Funktionen hat. Zum Einen ist es für den Lipidtransport in der Hämolymphe zuständig. Zum Anderen spielt es eine Rolle im angeborenen (innaten) Immunsystem der Invertebraten, und zwar bei der Aktivierung des proPO-Systems nach vorheriger  $\beta$ -Glukan-Bindung (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998) sowie beim Transport der proPO (Rahman *et al.*, 2006). Eine solche Doppelrolle ist eher ungewöhnlich,

braucht es doch zum sensiblen Triggern des Immunsystems sehr geringe Mengen an BGBP, während für einen effektiven Lipidtransport mehrere Milligramm BGBP pro Milliliter Hämolymphe nötig sind. Eine Hypothese, wie dies funktionieren kann, findet sich unter 5.2.6. (Ligandenblots - Auf der Suche nach dem BGBP-Rezeptor).

### **Glykosylierungs-Analyse durch Lektin-Blotting**

Das  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein reagiert im Lektin-Blot ausschließlich mit Con A, was im Allgemeinen ein Zeichen für eine N-Glykosylierung ist. Eine typische O-Glykosylierung konnte bereits mittels Monosaccharid-Analyse (HPLC) durch das Fehlen von Galaktosamin ausgeschlossen werden (Stieb, 2007). Weiterhin bestehen demnach lediglich 0,44% der Apolipoproteine aus Kohlenhydraten, also ca. 460 Da ( $105 \text{ kDa} \cdot 0,44\%$ ). Das Grundgerüst der N-glykosidisch verknüpften Kohlenhydrate, bestehend aus zwei N-Acetyl-Glukosaminen ( $2 \cdot 221 \text{ g/mol} = 442 \text{ g/mol} = 442 \text{ Da}$ ) und drei Mannosen ( $3 \cdot 180 \text{ g/mol} = 540 \text{ g/mol} = 540 \text{ Da}$ ) (siehe Einleitung) hat allerdings schon eine molekulare Masse von 982 Da ( $442 \text{ Da} + 540 \text{ Da}$ ), so dass höchstens jedes zweite Apolipoprotein maximal einfach glykosyliert sein kann. In der SDS-PAGE zeigt sich das BGBP in der Regel als Doppelbande, was eventuell auf eben dieses Glykosylierungsmuster zurückzuführen ist. In der BGBP-Aminosäuresequenz befinden sich drei potentielle Stellen für N-Glykosylierung und nur eine potentielle Stelle für typische O-Glykosylierung (siehe 4.1.1.). Neben der typischen O-Glykosylierung, bei der die Kohlenhydrate über ein Galaktosamin an Serin- oder Threoninreste gebunden werden, gibt es aber auch eine weitere Form der O-Glykosylierung, die sogenannte O-GlcNAcylierung (Hurtado-Guerrero *et al.*, 2008). Dabei wird lediglich ein einzelnes N-Acetyl-Glukosamin (N-GlcAc) an einen Serin- oder Threoninrest gebunden. Für diese Art der Glykosylierung gibt es fünf potentielle Stellen in der BGBP-Sequenz. Nimmt man an, dass zwei der fünf potentiellen Stellen O-GlcNAcyliert sind, so ergibt sich ein Kohlenhydratgehalt von 442 Da, was ziemlich genau dem durch HPLC bestimmten Wert von ca. 460 Da entspricht. N-Acetyl-Glukosamin ist ein Inhibitor für das Lektin Con A (Goldstein *et al.*, 1965). Also muss es zu einer Substrat-Inhibitor-Bindung kommen, was das positive Signal im Lektin-Blot erklären würde. Für die Art der BGBP-Glykosylierung gibt es also drei Möglichkeiten: 1. höchstens jedes zweite BGBP-Molekül ist an nur einer potentiellen N-Glykosylierungsstelle N-glykosyliert; 2. an zwei der fünf potentiellen O-GlcNAcylierungsstellen ist je ein N-Acetyl-Glukosamin gehängt; 3. BGBP

ist sowohl N-glykosyliert als auch O-GlcNAcyliert. Da frühere Untersuchungen (Stieb, 2007) neben N-Acetyl-Glukosamin auch die Kohlenhydrate Mannose, Galaktose, Glukose, u.a. nachweisen konnten, ist BGBP wohl sicher N-glykosyliert. Eine zusätzliche O-GlcNAcylierung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Für das BGBP von *Penaeus vannamei* wurde eine ausschließliche N-Glykosylierung gezeigt (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1995).

Auch dHDL ist weitgehend N-glykosyliert, wie die Lektin-Blot-Analyse zeigt. Dabei ist die kleine Untereinheit etwas stärker glykosyliert als die Große. Der Kohlenhydratgehalt von dHDL wurde per Monosaccharid-Analyse auf 1,47% bestimmt (Stieb, 2007). Dies stimmt mit den Ergebnissen für die Insekten-Lipophorine überein; auch diese sind nur N-glykosyliert und haben einen Zuckergehalt von 1-2% (Kunkel *et al.*, 1985). Das strukturell dem *Astacus leptodactylus*-dHDL sonst so ähnliche *Nereis virens*-dHDL hingegen weist neben einer N- auch eine O-Glykosylierung auf. Der Kohlenhydratgehalt wurde hier auf nur 0,66% bestimmt (Schenk, 2008). Warum die ansonsten so ähnlichen Proteine ausgerechnet in ihrem Glykosylierungsmuster solche Unterschiede aufweisen, ist unklar. Eventuell ist die Glykosylierung bei den basaleren Anneliden generell etwas anders, mit mehr O-glykosidisch verknüpften Kohlenhydraten, unabhängig vom jeweiligen Protein.

Abgesehen von der Tatsache, dass sezernierte Proteine in aller Regel glykosyliert sind, könnte die Glykosylierung speziell bei Lipoproteinen unter anderem für die Rezeptor-Erkennung von Bedeutung sein. Außerdem verbessert eine Glykosylierung die Löslichkeit eines Proteins, was eben gerade bei den amphiphilen Lipoproteinen eine Rolle spielen könnte.

### **Lipide / natives Molekulargewicht**

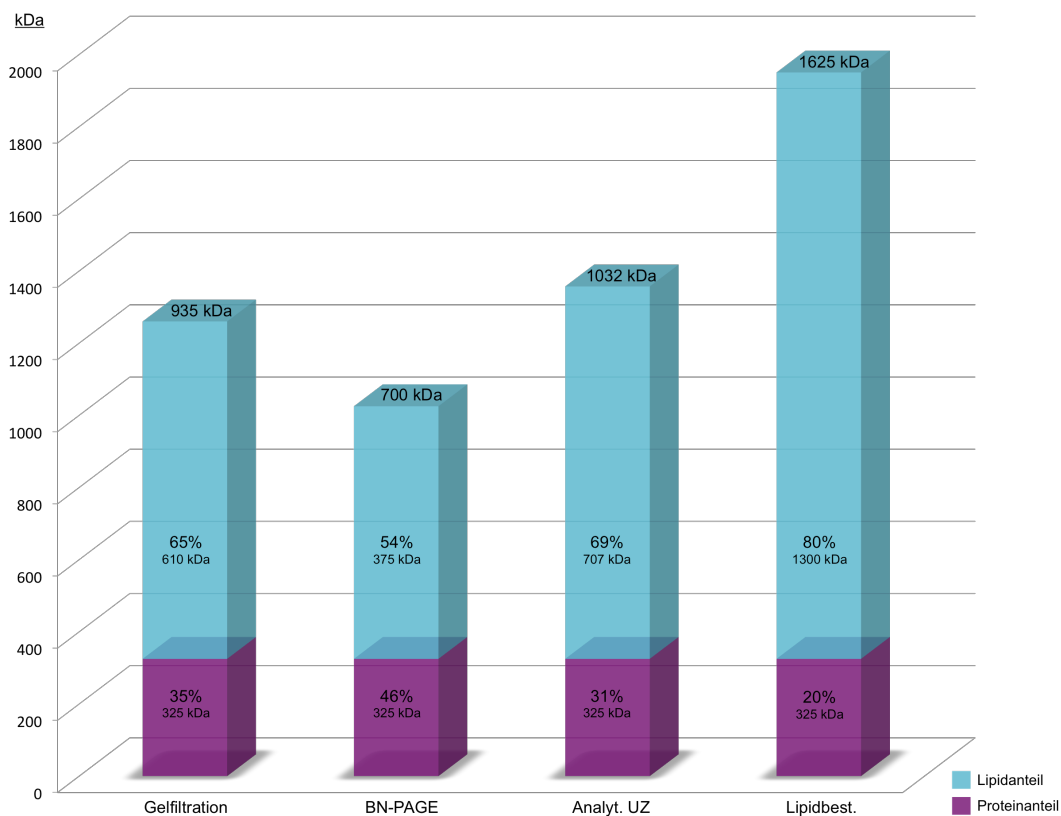
#### **dHDL**

Die native molekulare Masse von dHDL, welche sich aus Apolipoproteinen, angehefteten Kohlenhydraten und Lipiden zusammensetzt, wurde mit drei verschiedenen Methoden bestimmt, und zwar durch Gelfiltration, durch BN-PAGE und durch Analytische Ultrazentrifugation. Die verschiedenen Methoden kommen zu leicht abweichenden Ergebnissen bzgl. der molekularen Masse, was wiederum zu unterschiedlichen berechneten Lipidgehalten führt, da die molekulare Masse der Apolipoproteine per SDS-PAGE genau bestimmt wurde ( $240 + 85 \text{ kDa} = 325 \text{ kDa}$ ). Laut Gelfiltration hat dHDL eine native

molekulare Masse von 935 kDa (Stieb *et al.*, 2008). Demnach besteht es zu 35% aus Apolipoproteinen und zu 65% aus Lipiden (935 kDa - 325 kDa = 610 kDa). Diese Methode birgt allerdings Probleme bei der Massenbestimmung nicht-globulärer Proteine. Schon kleine Abweichungen von der optimalen Kugelform verzerren das Ergebnis, da die Säule mit globulären Proteinen kalibriert wird. Dies wurde für das kleine, asymmetrische Protein Lysozym gezeigt (Meredith *et al.*, 1982), bei großen Proteinen wie dHDL könnte die Abweichung erheblich sein. Eventuell stimmt auch die Angleichung der molekularen Masse an das discoidale Protein mit den elektronenmikroskopisch ermittelten Abmessungen (42 nm Durchmesser, 7 nm Dicke), wie sie in Stieb *et al.* (2008) vorgenommen wurde, nicht. In dieser Publikation wurde nämlich von einer starren Form ausgegangen. Neue elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen aber eine enorme Flexibilität des Proteins; offensichtlich können große Bereiche des Diskus umklappen, so dass das Protein eventuell auch in kleinere Poren der Silikamatrix eindringen kann als angenommen. In diesem Fall könnte es zu einer Unterschätzung des Molekulargewichts gekommen sein. Mittels *Blue native*-PAGE wurde die native molekulare Masse nur auf ca. 700 kDa bestimmt, was einen Lipidgehalt von 54% (325 kDa Proteinanteil und 375 kDa Lipidanteil = 700 kDa Gesamt-Protein) ergeben würde. Der negativ geladene Farbstoff Coomassie Brilliant Blue lagert sich an die basischen Seitenketten der Apolipoproteine an. Ein Großteil der Oberfläche des nativen Proteins besteht allerdings aus Phospholipiden (siehe Abbildung 2). *Coomassie Brilliant Blue* bindet aber auch quantitativ an Phospholipide (Nakamura *et al.*, 1984), vermutlich an die positive Ladung des Stickstoffatoms des Aminoalkohols. Trotzdem ist es bei diesem Wert (700 kDa) vermutlich zu einer Unterschätzung des Molekulargewichts gekommen. Ein möglicher Grund könnte sein, dass Lipoproteine nicht gleich-verteilte Aminosäuren haben, sondern das Verhältnis zu den neutralen Aminosäuren hin verschoben ist (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998). So befinden sich relativ gesehen weniger geladene Aminosäuren in der Aminosäurekette, die Summe der negativen Reste und der durch Coomassie Brilliant Blue gebundenen positiven Reste ist kleiner als in einem Standardprotein, was die Wanderung im Gel verlangsamt.

Analytische Ultrazentrifugation (Sedimentations-Analyse) liefert eine native molekulare Masse von 1032 kDa (Schenk *et al.*, in Vorbereitung). Diese Methode liefert wahrscheinlich die genauesten Daten, nur dass zur Berechnung der molekularen Masse aus dem

Sedimentations-Koeffizient die Dichte des Proteins mit einbezogen werden muss. Hier ist also auch eine mögliche Fehlerquelle. Dennoch kann man davon ausgehen, dass dieser Wert (1032 kDa) der tatsächlichen nativen molekularen Masse am nächsten kommt, was einen theoretischen Lipidgehalt von 69% ergeben würde ( $1032 \text{ kDa} - 325 \text{ kDa} = 707 \text{ kDa} \hat{=} 69\%$ ) (siehe Abbildung 48). *Vice versa* wurde der absolute Lipidgehalt pro  $\mu\text{g}$  Protein bestimmt. Mittels der Sulfo-Phospho-Vanillin-Methode wurde ein Lipidgehalt von ca. 80% gemessen (Stieb, 2007 und mündliche Information, Ulrich Hoeger). Der Gesamt-Phospholipidgehalt wurde mit der ANS-Methode (Stieb *et al.*, in Vorbereitung) auf 66,5% bestimmt (Stieb, 2007). Die Diskrepanz von 13,5% ist wahrscheinlich dem Cholesterin zuzuordnen, welches mit der ANS-Methode nicht erfasst wird, wohl aber mit der Sulfo-Phospho-Vanillin-Methode.



**Abbildung 48. Berechnung des Lipid- und Proteinanteils von dHDL.** Ausgangswert für diese Berechnung ist die durch Gelfiltration, BN-PAGE und Analytische Ultrazentrifugation ermittelte native molekulare Masse eines dHDL-Partikels, bzw. der Gesamtlipidgehalt. Die molekulare Masse der Apolipoproteine wurde per SDS-PAGE auf 325 kDa bestimmt. Je nachdem, welche Methode zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts man annimmt, ergeben sich unterschiedliche Lipid- und Proteinanteile. Der errechnete Lipidgehalt nach Gelfiltration liegt bei 65%, nach BN-PAGE bei 54% und nach Analytischer Ultrazentrifugation bei 69%. Die Analytische Ultrazentrifugation ist als die Methode mit der kleinsten Fehlerquelle anzusehen, weil Form, Flexibilität und Oberflächenstruktur des Proteins im Gegensatz zu den anderen beiden Methoden eine geringe Rolle spielen. Die Gesamtlipidbestimmung liefert einen sehr hohen Lipidanteil von ca. 80%. (BN-PAGE: *Blue native*-PAGE, Analyt. UZ: Analytische Ultrazentrifugation, Lipidbest.: Lipidbestimmung durch die Sulfo-Phospho-Vanillin-Methode).

Ein Gesamt-Lipidanteil von ca. 70% ist für ein *High density*-Lipoprotein als sehr hoch anzusehen. Humanes HDL hat nur einen Lipidanteil von 44% (<http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/lipoprot/index.htm>). Aber auch alle anderen untersuchten HDL's haben Lipidanteile unter 50%. Bekannt sind die Lipidanteile der Insekten-Lipophorine (40 - 50%; Ryan *et al.*, 1986, Canavoso *et al.*, 2001), der Crustaceen-BGBP's (25 - 50%, Vargas-Requena *et al.*, 2002, Stieb *et al.*, 2008), einiger Cheliceraten-HDL's (30 - 45%; Haunerland *et al.*, 1989, Cunningham *et al.*, 1994, Cunningham *et al.*, 2007), von Mollusken-HDL (35%; Pollero *et al.*, 1992) und vom Anneliden *Nereis virens* (48%; Schenk *et al.*, 2006). Lipidgehalte von über 50% sind in der Regel bei *Low density*-Lipoproteinen zu finden (z.B. humanes LDL: 80%; <http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/lipoprot/index.htm>). Durch die andere Lipidzusammensetzung (zum überwiegenden Teil Phospholipide (Krebse) im Gegensatz zu Cholesterinestern (Vertebraten)) ist die klassische Lipoprotein-Klassifizierung anhand ihrer Dichte (Chapman, 1982) eventuell nicht auf Krebse anwendbar. In der Tat haben Phospholipide eine höhere Dichte als Cholesterinester (Phospholipide:  $\delta = 1,032$  g/ml (Budavari *et al.*, 1989), Cholesterinester:  $\delta = 0,997$  g/ml (Schenk, 2008)). Durch die unterschiedliche Dichte der transportierten Lipide kann es bei gleichem absoluten Lipidgehalt der Partikel zu einer anderen Gesamtdichte kommen. Die Lipidzusammensetzung des dHDL unterscheidet sich nämlich in der Tat von der Zusammensetzung der Vertebraten-Lipoproteine. Diese transportieren hauptsächlich Cholesterinester (Hevonoja *et al.*, 2000), während dHDL zu 66,5% Phospholipide (Stieb *et al.*, in Vorbereitung) transportiert. Vertebraten-Lipoproteine sind aber auch in aller Regel globulär, haben also ein kleineres Oberflächen-Volumen-Verhältnis als discoidale Lipoproteine. Phospholipide befinden sich aufgrund ihrer Polarität an der Oberfläche der Partikel, während Cholesterinester aufgrund ihrer Apolarität im Inneren der Partikel lokalisiert sind. Theoretisch sollte das Oberflächen-Volumen-Verhältnis also genau dem Phospholipid-Neutrallipid-Verhältnis entsprechen. Tatsächlich wurden für discoidale Lipoproteine hohe Anteile an Phospholipiden gemessen (Hamilton *et al.*, 1976, Spaziani *et al.*, 1986). Ob der hohe Anteil an Phospholipiden nun wegen der discoidalen Form der dHDL-Partikel transportiert wird, oder ob dHDL aus verschiedenen Gründen hohe Mengen an Phospholipiden transportieren muss und die Form der Partikel die Konsequenz daraus ist, ist ungewiss. Phospholipide könnten, neben ihrer klassischen Rolle beim Aufbau

von Biomembranen, auch als Energielieferant dienen. Zumindest in den Spermien bestimmter Seeigel wurde dies beobachtet (Mita *et al.*, 1993).

Neben dem hohen Gehalt an Phospholipiden ist beim dHDL aber auch der hohe Gehalt an Cholesterin (~ 13%) auffällig. Die  $\beta$ -Glukan-Bindeproteine der Krebse transportieren nur < 5% Cholesterin (Ruiz-Verdugo *et al.*, 1997). Cholesterin ist ein Steroidhormon-Vorläufer und kann von Crustaceen nicht selbst synthetisiert werden (Yepiz-Plascencia *et al.*, 1998, Babin *et al.*, 2009). Von da her sind Krebse darauf angewiesen, Cholesterin durch die Nahrung aufzunehmen und mit Hilfe von Lipoproteinen zu transportieren.

### BGBP

Die native molekulare Masse des  $\beta$ -Glukan-Bindeproteins wurde per *Blue native*-PAGE auf ca. 200 kDa bestimmt. Diese Masse liegt deutlich unter der durch Gelfiltration bestimmten Masse von 317 kDa und der errechneten molekularen Masse von ~ 300 kDa (Apolipoprotein-Dimer:  $2 \times 105 \text{ kDa} + 30\% \text{ Lipide (90 kDa)} = \sim 300 \text{ kDa}$ ) (Stieb *et al.*, 2008). Da es sich bei BGBP um ein globuläres Protein handelt, sollte der durch Gelfiltration bestimmte Wert sehr genau sein. Dass es durch BN-PAGE zu einer Unterschätzung des Molekulargewichts gekommen ist, kann, ähnlich wie beim dHDL, daran liegen, dass Lipoproteine weniger geladene Aminosäuren haben, da sie zur Lipidkomplexierung viele neutrale Aminosäuren brauchen (siehe oben).

### **5.2.3. Antikörper-Spezifität / Co-Immunpräzipitation**

Die Antikörper gegen die beiden Proteine dHDL und BGBP ( $\alpha$ -dHDL und  $\alpha$ -BGBP) erkennen sehr spezifisch ihr jeweiliges Protein. Sie sind zwar gegen das native Protein hergestellt worden, erkennen aber auch die denaturierten Untereinheiten im SDS-Gel (Abbildung 26).  $\alpha$ -dHDL erkennt die große dHDL-Untereinheit wesentlich besser als die kleine. Dies könnte daran liegen, dass die kleine Untereinheit weniger Epitope hat als die große, und das Kaninchen deshalb weniger Antikörper gegen diese generiert. Der  $\alpha$ -BGBP-Antikörper erkennt zu einem kleinen Teil die große Untereinheit des dHDL. Die MALDI-*de-novo*-Sequenzierung von dHDL hat ergeben, dass Abschnitte der BGBP-Sequenz auch in der dHDL-Aminosäurekette vorkommen (4.2.8.). Ein geringer Prozentsatz des  $\alpha$ -BGBP-Antikörpers ist

sicher gegen genau jene Sequenzabschnitte gerichtet. Deshalb erkennen einige  $\alpha$ -BGBP-Antikörper das dHDL.

#### **dHDL in der *Astacus astacus*-Hämolymphe?**

Während dHDL im  $\alpha$ -dHDL-Immunpräzipitat der *Astacus leptodactylus*-Hämolymphe zu erwarten war, so ist es doch eine große Überraschung, ein dHDL-Analogon auch in der Hämolymphe von *Astacus astacus* zu finden. Schließlich konnte das discoidale Lipoprotein bislang einzig in *Astacus leptodactylus* nachgewiesen werden. Dass dieses discoidale Lipoprotein, was sehr ähnlich auch in *Nereis virens* und *Limulus polyphemus* (Schenk, 2008, bzw. Sven Schenk, mündliche Information) gefunden wurde, nur in *Astacus leptodactylus* und sonst keinem anderen Krebs vorkommen sollte, war evolutiv gesehen unwahrscheinlich. Allerdings handelt es sich bei dem dHDL-Analogon in *Astacus astacus* evtl. nicht um ein Lipoprotein, denn sonst hätte man es aufgrund seiner Dichte per Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isolieren können. Auch kann man noch nicht sagen, ob es sich in diesem Fall um ein discoidales Protein handelt. Welche anderen Funktionen das *Astacus astacus*-dHDL in der Hämolymphe wahrnehmen könnte, kann im Moment nur spekuliert werden. Weitere Untersuchungen bzgl. der Funktion und Struktur müssen angestellt werden. Bisher ist nur gewiss, dass in der Hämolymphe von *Astacus astacus* ein Protein vorkommt, dass die gleiche Größe wie die kleine dHDL-Untereinheit hat, und außerdem eine hohe Epitop-Ähnlichkeit, denn sonst hätte der dHDL-Antikörper es nicht erkannt. Zum Vergleich sollten MALDI-TOF-Analysen durchgeführt werden.

Natürlich kann es sein, dass nicht nur *Astacus leptodactylus* und *Astacus astacus* ein solches Protein in ihrer Hämolymphe haben. Wahrscheinlicher ist es, dass alle Astacidae, wenn nicht alle Decapoden oder vielleicht sogar alle Crustaceen ein solches Protein besitzen. Nur um ein Lipoprotein handelt es sich wahrscheinlich in den wenigsten Fällen, denn ein breit gefächertes *Screening* mittels Dichtegradienten-Ultrazentrifugation ergab bisher keine Treffer (Sven Schenk und Ulrich Hoeger, unveröffentlicht).



#### 5.2.4. ELISA

##### BGBP und HDL in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus*

Die Konzentrationen von BGBP und dHDL in der Hämolymphe von *Astacus leptodactylus* wurden mittels ELISA bestimmt. BGBP erreicht bei Männchen und Weibchen ähnliche Werte etwa zwischen 1 und 3 mg pro ml Hämolymphe. Das liegt eine Zehnerpotenz über den Werten, die für den nahen Verwandten *Pacifastacus leniusculus* bestimmt wurden (0,2 - 0,4 mg/ml; Cerenius *et al.*, 1994). Dass die HDL-Titer selbst zwischen nah verwandten Arten stark variieren können, zeigt ein Vergleich von Chapman (1980). Die HDL-Serum-Konzentrationen verschiedener Fische und Zyklostomen liegen zwischen 0,23 und 33 mg/ml, also sogar zwei Zehner-Potenzen auseinander. Noch stärker variieren die Vitellogenin-Konzentrationen in der Hämolymphe des Krebses *Cherax quadricarinatus*. Je nachdem, in welcher Fortpflanzungsphase sich weibliche Tiere befinden, ergeben sich Werte zwischen 11 µg/ml und 35 mg/ml (Sagi *et al.*, 1999). Starke Schwankungen der Lipoprotein-Titer sind also zwischen nah verwandten Arten, zwischen verschiedenen Individuen der gleichen Art und sogar innerhalb eines Tieres normal und können mehrere Zehner-Potenzen betragen. In jedem Fall handelt es sich um ein Protein, dass in der Hämolymphe der Crustaceen reichlich vorhanden ist. Ähnliche Größendimensionen erreicht zum Beispiel das Sauerstoff-transportierende Hämocyanin in der Hämolymphe der Krabbe *Calappa granulata* mit 25 mg/ml (Olianas *et al.*, 2006).

Der dHDL-Titer in der *Astacus leptodactylus*-Hämolymphe liegt mit ca. 4 mg/ml etwas höher als der BGBP-Wert. Insbesondere bei den Weibchen schwanken die Konzentrationen stärker, zwischen 3 und 11 mg/ml. Da auch die Lipidbeladung einzelner dHDL-Partikel mit 67% deutlich über dem Lipidanteil von BGBP (30%) liegt (Stieb *et al.*, 2008), kann man sagen, dass es sich bei dHDL um das Lipoprotein handelt, welches die meisten Lipide in der Hämolymphe transportiert. Der Nachweis von dHDL in den Follikelzellen der Ovarien (siehe Abbildung 36) könnte die höheren Werte bei weiblichen Tieren erklären; eventuell spielt dHDL bei der Fortpflanzung eine Rolle und wird nach der Aufnahme durch die Follikelzellen an die Eizellen weitergegeben und dort gespeichert. Dieser wichtige Prozess in der Oogenese müsste eigentlich für alle Krebse gelten. Es ist also wiederum verwunderlich, dass dHDL nur bei dieser Crustaceen-Spezies vorkommt.

### dHDL-Nachweis in anderen Spezies

Andere Crustaceen und der Polychaet *Nereis virens* wurden auf das Vorhandensein eines dHDL-ähnlichen Proteins in ihrer Hämolymphe / Coelomflüssigkeit hin untersucht. In allen Spezies war mit dem dHDL-Antikörper ein solches Protein nachweisbar. Den geringsten Wert hat dabei *Nereis virens*; in seiner Coelomflüssigkeit detektiert der Antikörper nur 1,49% der Konzentration, wie sie in *Astacus leptodactylus* vorkommt. Alle Werte sind mit Vorsicht zu genießen. Der dHDL-Antikörper wurde gegen das *Astacus leptodactylus*-dHDL generiert. dHDL's anderer Spezies, wenn sie denn vorkommen, reagieren unterschiedlich stark mit diesem Antikörper, je nachdem, wie groß die immunologische Identität ist. Zur Quantifizierung eignen sich die gemessenen Werte demnach nicht. Man kann lediglich nachweisen, ob ein Protein in der Probe vorhanden ist, welches mit dem dHDL-Antikörper reagiert. Die Stärke der Reaktion sagt nichts über die Konzentration in der Probe aus; die Konzentration in der Probe muss deutlich über den Äquivalentwerten für *Astacus leptodactylus* liegen. Insbesondere im Fall von *Nereis virens* ist bekannt, dass ein discoidales Lipoprotein in dessen Coelomflüssigkeit vorkommt, welches dem *Astacus leptodactylus*-dHDL strukturell stark ähnelt und vermutlich einen gemeinsamen phylogenetischen Vorfahren hat (Stieb *et al.*, 2008). Wenn zwischen dem *Nereis virens*-dHDL und dem *Astacus leptodactylus*-dHDL eine so geringe immunologische Identität vorliegt, dass ein so geringer Wert von 1,49% herauskommt, sind die anderen Werte als besonders signifikant anzusehen. In der Seespinne *Hyas araneus* wurden fast 20% der dHDL-Konzentration gemessen, wie sie in *Astacus leptodactylus* vorkommt. Trotzdem konnte aus der Hämolymphe von *Hyas araneus* kein discoidales Lipoprotein mittels Ultrazentrifugation isoliert werden (mündliche Information von Sven Schenk). Dasselbe trifft auch für die anderen untersuchten Krebse und Krabben zu. In der Hämolymphe der meisten Crustaceen befindet sich also ein Protein, welches mit dem dHDL-Antikörper reagiert, aber offensichtlich kein Lipoprotein ist. Diese Proteine können per Immunopräzipitation aus der Hämolymphe gefällt werden (siehe oben (5.2.3.)), im Fall von *Astacus astacus*) und durch Immunhistochemie in Hämocyten nachgewiesen werden.

### 5.2.5. Proteolyse / Massenspektroskopie

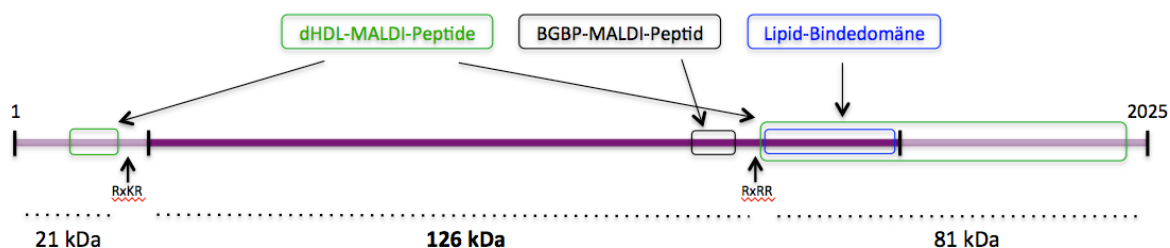
dHDL wurde mit den beiden Proteasen V8 und Trypsin verdaut. Ziel war es zum Einen, eine geeignete Protease für massenspektroskopische Analysen auszumachen. Zum Anderen kann man anhand des evtl. unterschiedlich starken Abbaus der beiden Untereinheiten Aussagen über die Lage der Untereinheiten innerhalb des nativen Proteins, bzw. deren Exposition zum Medium treffen. Nach 30-minütiger Inkubationszeit hydrolysiert V8 beide Untereinheiten des dHDL komplett. Es bleibt lediglich eine Abbaubande bei ca. 50 kDa, die bei vorheriger Denaturierung des Proteins auch verschwindet. V8 schneidet C-terminal von Glutaminsäure (Stennicke *et al.*, 2004). Offensichtlich sind in der dHDL-Aminosäurekette sehr viele Glutaminsäurereste vorhanden, die zum wässrigen Medium hin orientiert sind (deshalb der ähnlich starke Abbau im nativen und entfetteten Zustand). Außerdem sind die V8-Schnittstellen offensichtlich nicht durch Lipid geschützt. Es sind wenige weitere Glutaminsäurereste vorhanden, die im Inneren des gefalteten Proteins liegen und erst nach Denaturierung für V8 frei zugänglich sind (völlige Hydrolyse von denaturierten Proteinen). Die Protease Trypsin greift hauptsächlich die große Untereinheit des dHDL an, die Bande der kleinen Untereinheit ist auch nach 30-minütigem Verdau noch ähnlich stark wie die Positivkontrolle im Gel zu erkennen. Bezüglich der kleinen Untereinheit macht es keinen Unterschied, ob die Proteine nativ, entfettet oder denaturiert vorliegen. Daraus kann geschlossen werden, dass in der kleinen Untereinheit keine (oder sehr wenige) Arginin- oder Lysinreste vorkommen. Die große Untereinheit hingegen wird von Trypsin hydrolysiert, allerdings erst nach vorheriger Entfettung und noch besser nach vorheriger Denaturierung des Apoproteins. Demnach hat auch die große Untereinheit sehr wenige Arginin- oder Lysinreste an der Partikel-Außenseite lokalisiert. Zur Lipidmatrix hin orientiert befinden sich aber offensichtlich Trypsin-Schnittstellen, die durch die Lipide geschützt werden. Die große Untereinheit ist also im Gegensatz zur kleinen Untereinheit an der Lipidkomplexierung beteiligt. Auch im Innern der großen Untereinheit müssen sich Trypsin-Schnittstellen befinden.

Auch das discoideale *Nereis virens*-Lipoprotein wird von der Protease V8 deutlich stärker abgebaut als von Trypsin (Schenk, 2008). Vorherige Entfettung oder Denaturierung begünstigen den Verdau. Trypsin greift, ähnlich wie beim *Astacus leptodactylus*-dHDL,

hauptsächlich die große Untereinheit an. Der strukturelle Aufbau und die Lokalisation der Untereinheiten der beiden discoidalen Proteine aus *Nereis virens* und *Astacus leptodactylus* scheinen sehr ähnlich zu sein. Ebenso verhalten sich die Insekten-Lipophorine. Die kleine Untereinheit (ApoLp-II) scheint wesentlich weniger für eine Proteolyse zugänglich als die große Untereinheit (ApoLp-I) (Soulages *et al.*, 1994).

#### LC-MS/MS-Analysen von dHDL

Als Protease für die dHDL-Fragmentierung vor LC-MS/MS-Analysen wurde Trypsin gewählt. Bei der Analyse der beiden Untereinheiten konnten insgesamt 18 Peptide identifiziert werden. Alle 18 Peptide befinden sich überraschenderweise in der Sequenz des  $\beta$ -Glukan-Bindeproteins. Hierbei kann es sich allerdings nicht um eine Kontamination handeln, denn einige dieser Peptide wurden in drei unabhängigen Analysen nachgewiesen. Außerdem wurden die untersuchten Proteine aus SDS-Gelen extrahiert, was eine sehr sichere Methode zur Trennung von Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts ist. Zumindest teilweise entspricht die Aminosäure-Sequenz des dHDL demnach der von der Nukleotid-Sequenz abgeleiteten Aminosäure-Sequenz des BGBP. Vier der 18 Peptide *clustern* am N-Terminus der abgeleiteten BGBP-Sequenz, die restlichen 14 am C-Terminus (siehe Abbildungen 30 und 49).



**Abbildung 49. Schema der abgeleiteten BGBP-Aminosäuresequenz.** Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist am N- und am C-Terminus länger als das reife BGBP-Protein und wird vermutlich an Furin-Schnittstellen (RxKR, RxRR) prozessiert, so dass ein 126 kDa großes BGBP-Protein entsteht. Die Peptide, welche durch massenspektroskopische Analysen der beiden dHDL-Untereinheiten ermittelt wurden, liegen außerhalb der reifen BGBP-Sequenz (grün umrandet).

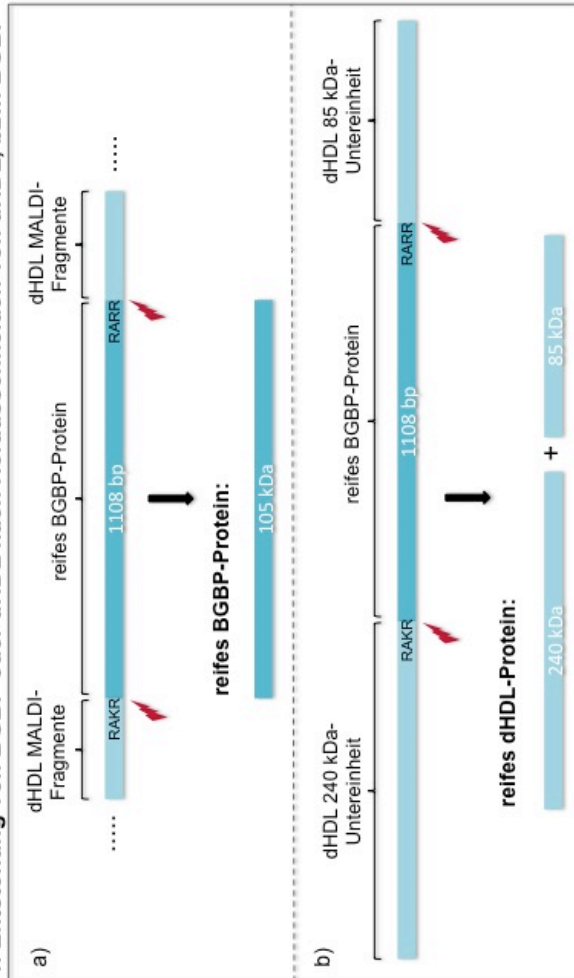
Hierbei handelt es sich ausgerechnet um die Bereiche, von denen für das BGBP angenommen wird, dass sie nicht im reifen Protein vorkommen, sondern durch eine Furin-ähnliche Protease abgeschnitten werden (siehe oben). Dies ist ein sehr interessanter Befund, bedeutet eine wenigstens zum Teil gleiche Aminosäure-Sequenz doch eine phylogenetische Verwandtschaft dieser beiden Proteine. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten. Erstens könnten

zwei sehr ähnliche Kopien des BGBP-Gens vorliegen, welche durch Genduplikation entstanden sind. Genduplikationen können durch ungleiches *Crossing Over* während der ersten meiotischen Teilung, durch *Exon shuffling* oder aber durch Reintegration von in DNA umgeschriebener RNA zustande kommen (Übersicht siehe Abbildung 50). Als zweite Möglichkeit muss eine Hypothese zur ‚Alternativen Protein-Prozessierung‘ entwickelt werden. Die Annahme hierbei ist, dass es nur ein Gen für beide Lipoproteine gibt, welches in nur eine mRNA transkribiert wird. Diese mRNA wird in eine Aminosäurekette translatiert. Erst durch die Prozessierung dieser Aminosäurekette durch Proteasen entsteht entweder BGBP (wenn die beiden ‚Randbereiche‘ abgeschnitten werden) oder dHDL (wenn der mittlere Bereich heraus geschnitten wird) (Abbildung 50). Eine solche Art der post-translationalen Prozessierung, bei der aus einem Vorläuferprotein zwei völlig verschiedene reife Proteine entstehen, ist meines Wissens nach bisher noch nicht in der Literatur beschrieben. Allerdings werden einige Proteohormone zusammen mit ihren Trägerproteinen als ein ‚*Multiprecursor*‘ translatiert. Dieser ‚*Multiprecursor*‘ wird bei Bedarf proteolytisch geschnitten und das Proteohormon (zum Beispiel Vasopressin) und dessen Trägerprotein (zum Beispiel Neurophysin) werden frei (Acher *et al.*, 1988).

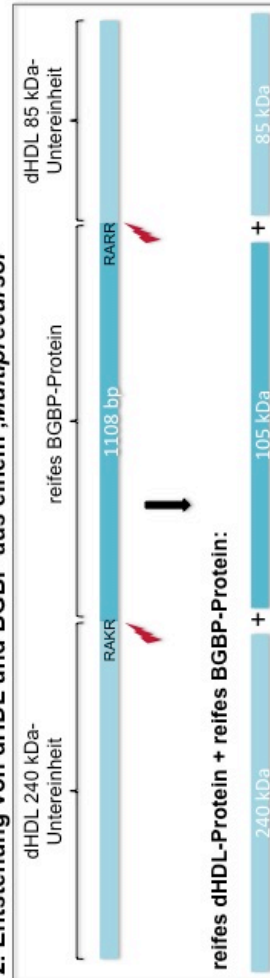
Da sich am N-Terminus des Vorläuferproteins ausschließlich Peptide befinden, die der großen Untereinheit zuzuordnen sind, ist der Aufbau des Vorläuferproteins wahrscheinlich folgender: N-terminal befindet sich die große dHDL-Untereinheit, mittig liegt die Sequenz des reifen BGBP, und C-terminal befindet sich die kleine dHDL-Untereinheit. Nach dieser Hypothese würde sich die putative Lipidbindedomäne des dHDL am N-Terminus der kleinen Untereinheit befinden, genau wie bei den Insekten-Lipophorinen (Smolenaars *et al.*, 2007). Alle Lipoproteine der LLTP-Superfamilie besitzen eine N-terminal gelegene Lipidbindedomäne (Smolenaars *et al.*, 2007). Dieses Erkenntnis deckt sich allerdings nicht mit dem Ergebnis der limitierenden Proteolyse, durch das der großen dHDL-Untereinheit die Lipidbindeeeigenschaft zugeschrieben werden konnte (siehe oben).

**Alternative Prozessierung**  
(2 Möglichkeiten)

**1. Entstehung von BGBP oder dHDL nach Herausschneiden von dHDL, bzw. BGBP**

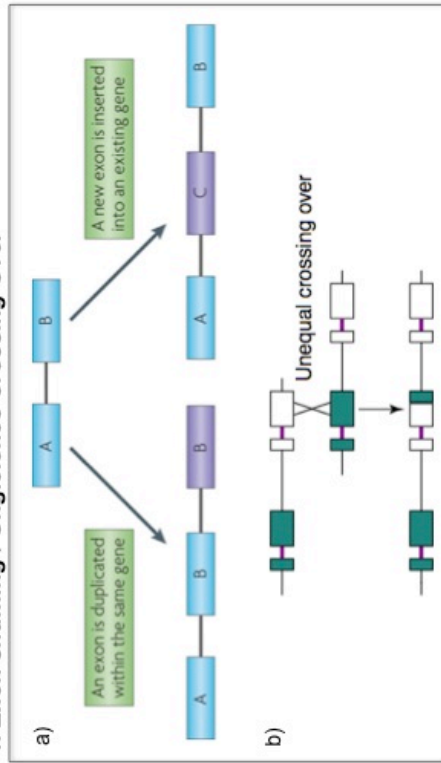


**2. Entstehung von dHDL und BGBP aus einem ,Multiprecursor'**

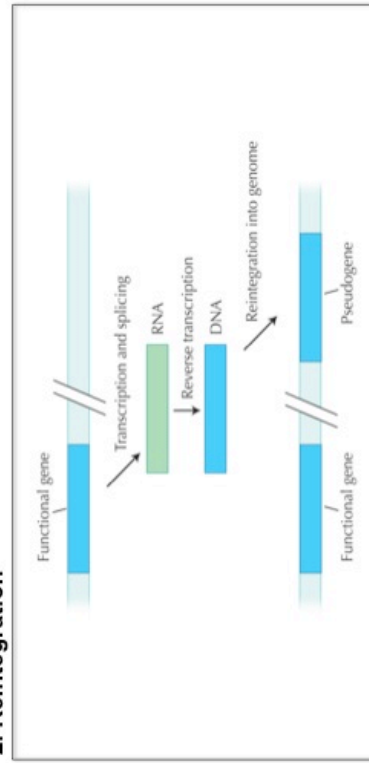


**Genduplikation**  
(2 Möglichkeiten)

**1. Exon shuffling / Ungleiches Crossing Over**



**2. Reintegration**



**Abbildung 50. Übersicht über die verschiedenen Hypothesen zur dHDL-Entstehung.** dHDL und BGBP könnten durch ‚Alternative Protein-Prozessierung‘ aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein („*Multiprecursor*“) gebildet werden, oder aber es ist durch Genduplikation zu einer Verdopplung des BGBP-Gens gekommen. ‚**Alternative Prozessierung**‘: BGBP und dHDL haben ein gemeinsames hypothetisches Vorläuferprotein. N-terminal befindet sich wahrscheinlich die große dHDL-Untereinheit, mittig die BGBP-Aminosäurekette, und am C-Terminus die kleine dHDL-Untereinheit. Dazwischen befinden sich Furin-Schnittstellen (RAKR, bzw. RARR). Durch eine Furin-ähnliche Protease (roter Blitz) kann jetzt entweder das reife BGBP aus diesem Vorläuferprotein herausgeschnitten werden (1a), oder aber die beiden dHDL-Untereinheiten (1b). Eventuell entstehen aber auch aus ein und demselben „*Multiprecursor*“ beide Lipoproteine (2.). **Genduplikation:** Beim *Exon shuffling* (1a), das eine Folge Ungleichen *Crossing Overs* ist (1b), können entweder Exons innerhalb eines Gens verdoppelt werden, oder neue Exons werden in ein vorhandenes Gen integriert. Diese Form der Rekombination geschieht während der ersten meiotischen Teilung. Genduplikationen können auch durch Reintegration (2.) von RNA, welche durch Retroviren oder durch Reverse Transkription in DNA zurückgeschrieben wurde, in das Genom entstehen. In diesem Fall hat das ‚neue‘ Gen keine Introns, da diese ja aus der RNA heraus gespleißt wurden. (Abbildung rechts oben aus Keren *et al.*, 2010, rechts mittig aus Zhang *et al.*, 2003, rechts unten aus Barton *et al.*, 2007)

Um diese Hypothesen zu bestätigen, ist es notwendig, noch mehr Informationen über die reifen Termini des BGBP-Proteins und vor Allem mehr Informationen über die dHDL-Sequenz zu erhalten. Bei vollständigem Verdau mit einer Protease, in diesem Fall Trypsin, entstehen keine überlappenden Fragmente, so dass eine Anordnung der Peptide in der Aminosäurekette ohne weitere Kenntnisse unmöglich ist. Sinnvoll wäre es, zusätzliche MALDI-Analysen mit einer anderen Protease durchzuführen, so dass überlappende Bereiche entstehen und man die Fragmente ‚sortieren‘ kann. Bei extensiven Analysen könnte man auf diese Weise sogar die gesamte Aminosäuresequenz inkl. reifem C- und N-Terminus entziffern. Rückschlüsse auf die DNA-Sequenz sind davon ausgehend aufgrund des degenerierten Codes leider nicht möglich.

#### MALDI-TOF/TOF-Analysen von BGBP

Das aus der Hämolymphe isolierte BGBP von *Astacus leptodactylus* konnte mittels MALDI-TOF/TOF-Analysen sicher als solches identifiziert werden (Stieb *et al.*, 2008). Ein 1.784 Da-großes Peptid (IESTLTPLPALVFGIGR) findet sich in den BGBP-Sequenzen von *Pacifastacus leniusculus*, *Fenneropenaeus chinensis* und *Litopenaeus vannamei* wieder. Dieses ‚Fingerprinting‘ gilt als sichere Methode zur Identifizierung von Proteinen.

### 5.2.6. Ligandenblots

#### Auf der Suche nach dem BGBP-Rezeptor

Die erste und bisher einzige Studie, die sich mit dem Rezeptor für das  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein bei Crustaceen befasst hat, ist 1992 von Duvic und Söderhäll publiziert worden. Aus den Hämocyten von *Pacifastacus leniusculus* haben die Autoren einen Rezeptor isoliert, welcher

spezifisch BGBP bindet und ein natives Molekulargewicht von 320 kDa hat. Er besteht aus zwei Untereinheiten (230 und 90 kDa), welche nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Die Bindung des BGBP an den putativen Rezeptor kann nach Duvic nur erfolgen, wenn das BGBP zuvor mit dem  $\beta$ -Glukan Laminarin aktiviert wurde.

Dieser strukturelle Aufbau ist für einen Lipoprotein-Rezeptor eher ungewöhnlich. Zum Einen ist das Molekulargewicht zu schwer, um ein typischer LDL- oder VLDL-ähnlicher Rezeptor zu sein (ca. 100 kDa<sup>\*1</sup>), und zu leicht, um ein LRP oder Megalin zu sein (ca. 530<sup>\*2</sup> - 600<sup>\*3</sup> kDa). Zum Anderen ist es bisher nicht bekannt, dass ein LDL-ähnlicher Rezeptor aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist. LRP-Rezeptoren bestehen wiederum aus einer großen und einer kleinen Untereinheit; im Falle von murinem LRP 1 aus einer 515 und einer 85 kDa großen Untereinheit (Reekmans *et al.*, 2010). Diese beiden Untereinheiten werden als eine mRNA transkribiert und erst nach Translation im *trans*-Golgi-Apparat durch Furin geschnitten, wobei die beiden Untereinheiten nicht-kovalent miteinander verknüpft bleiben. Der in *Pacifastacus leniusculus* entdeckte 320 kDa-BGBP-Rezeptor lässt sich also keiner der bekannten Lipoprotein-Rezeptor-Familien zuordnen. Duvic *et al.* war 1992 allerdings noch nicht die Doppelrolle des BGBP bekannt. Dass BGBP in hohem Maße Lipide komplexiert und transportiert, wussten die Autoren zu diesem Zeitpunkt nicht. Sie sind also lediglich auf der Suche nach einem Rezeptor gewesen, der in der Immun-Kaskade (proPO-System) eine Rolle spielt und nicht notwendigerweise ein Lipoprotein-Rezeptor ist. Demnach haben sie nur in Hämocyten-Membranen nach einem Rezeptor gesucht, der vermutlich sogar nicht einmal eine endocytotische Funktion haben muss, sondern stattdessen der Signaltransduktion dient. Offensichtlich gibt es zwei Formen von BGBP, das Laminarin-aktivierte und das Laminarin-unaktivierte. Duvic *et al.* haben ein Bindeprotein für Laminarin-aktiviertes BGBP in Hämocyten-Membranen gefunden; wir sind auf der Suche nach einem hypothetischen zweiten Rezeptor für nicht-Laminarin-aktiviertes BGBP. Dabei sollte es sich um einen typischen Lipoprotein-Rezeptor handeln, der in den Membranen aller Fett-akkumulierenden und -verbrauchenden Geweben und Organen vorkommt. Tatsächlich konnte ein solcher Rezeptor in der Membranpräparation von Hämocyten gefunden werden. Er hat ein

---

\*<sup>1</sup>: Beispiel LDL-Rezeptor aus *Homo sapiens* (Genbank-Nr.: NP\_000518)

\*<sup>2</sup>: Beispiel LRP aus *Mus musculus* (Reekmans *et al.*, 2010)

\*<sup>3</sup>: Beispiel Megalin aus *Drosophila melanogaster* (Genbank-Nr.: ABW09371)



Molekulargewicht von 100 kDa und eine Calcium-abhängige Bindeeigenschaft, was beides einem typischen LDL-ähnlichen Rezeptor entspricht. Zuvorige Inkubtion des Liganden BGBP mit Laminarin schwächt die Bindung eher ab (Abbildung 34). Eine Laminarin-Aktivierung des BGBP scheint also nicht, wie bei Duvic *et al.* (1992), essentiell für die Rezeptor-Bindung zu sein. Nach diesen Ergebnissen gibt es also vermutlich zwei verschiedene Rezeptoren für BGBP in den Hämocyten von Astaciden. Einer ist ein typischer Lipoprotein-Rezeptor mit einer molekularen Masse von 100 kDa und Laminarin-unabhängiger, aber Calcium-abhängiger Liganden-Bindung, der andere hat ein Molekulargewicht von 320 kDa, ist kein Lipoprotein-Rezeptor im eigentlichen Sinne, und spielt eine Rolle bei der Aktivierung des proPO-Systems. Der 100 kDa-Rezeptor wird im Übrigen wahrscheinlich auch von dHDL erkannt (siehe Abbildungen 32 und 33).

In allen anderen Organen und Geweben konnte leider kein BGBP-Rezeptor identifiziert werden. Dies kann mehrere Gründe haben. Zum Einen kann die Rezeptor-Bande im allgemeinen ‚Rauschen‘ der Ligandenblots untergegangen sein (zum Teil wurde eine ganze Reihe von Banden ohne charakteristisches Muster gefunden). Oder die Expressionsrate des Rezeptors ist zu gering oder nur in bestimmten Verdauungsstadien ausgeprägt, die bei unserer Präparation gerade nicht erwischt wurden. Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass es entweder Probleme während der Membranproteinpräparation gegeben hat oder die angewandte Methode für die Isolierung dieses Rezeptor schlichtweg nicht taugt. Alternative Präparationsmöglichkeiten wären eine Immunopräzipitation mit BGBP/ $\alpha$ -BGBP oder die Aufreinigung der Membranpräparation über eine BGBP-Affinitätssäule.

#### **Auf der Suche nach dem dHDL-Rezeptor**

Durchgeführte Ligandenblots zur Identifizierung des dHDL-Rezeptors in verschiedenen Geweben ergeben ein einheitliches Bild. In allen untersuchten Zellen und Geweben (Hämocyten, Oocyten, Muskel, Darm, Hepatopankreas, Kiemen und Samenleiter) findet sich ein Signal bei circa 160 kDa, welches dem putativen dHDL-Rezeptor entsprechen sollte. Bezüglich der Größenordnung könnte es sich also um einen LDL-ähnlichen Rezeptor handeln. Bei dieser Familie handelt es sich um die eher kleinen Vertreter der Lipoprotein-Rezeptoren, welche Calcium als Cofaktor benötigen.

Laut der vorliegenden Arbeit wird der dHDL-Rezeptor ubiquitär in allen Geweben exprimiert. Durch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Präparationen von Tieren, die sich in unterschiedlichen Fütterungs- und Häutungsstadien befanden, kann man außerdem darauf schließen, dass der Rezeptor unabhängig vom jeweiligen Fütterungs- und Häutungszustand der Tiere vorhanden ist. Es muss sich also um einen Rezeptor handeln, der konstitutionelle Aufgaben in allen Organen übernimmt. Da es sich in allen Fällen um Organe handelt, die viel Energie verbrauchen (im Falle des Samenleiters benötigen wohl sind die darin enthaltenen Spermien und Spermatogonien viel Energie), scheint eine Energieversorgung mit Lipiden wie im Falle der Flugmuskulatur der Insekten (Rodenburg *et al.*, 2005) wahrscheinlich. Eine reine Lipid-/ Protein-speichernde Rolle, wie sie ähnlich dem Vitellogenin für die Oocyten denkbar wäre, scheint ausgeschlossen, da die meisten der genannten Organe keine Lipidspeicher aufweisen. Man kann also zusammenfassen, dass es a) einen dHDL-Rezeptor gibt, und b) dieser nicht derselbe wie der BGBP-Rezeptor zu sein scheint. Im Gegenteil, offensichtlich gibt es in *Astacus leptodactylus* nicht nur ein zusätzliches Lipoprotein (dHDL), sondern auch einen passenden, zusätzlichen Rezeptor. Ob dieser Rezeptor in anderen Krebsen, in denen dHDL nicht nachgewiesen werden konnte, vorhanden ist, sollte durch Ligandenbindungsstudien mit Membranpräparationen dieser Krebse und der Inkubation mit *Astacus leptodactylus*-dHDL geklärt werden. Der Polychaet *Nereis virens*, der ein ähnliches discoidales Lipoprotein wie *Astacus leptodactylus* aufweist, hat zumindest auch einen ähnlichen Rezeptor für dieses Lipoprotein. Der Rezeptor hat eine molekulare Masse von 120 kDa und gehört auch dem LDL-ähnlichen Rezeptor-Typ an (Schenk *et al.*, 2009). Zur besseren Charakterisierung müssen diese Rezeptoren in Zukunft besser aufgereinigt werden und mit weiteren Methoden, zum Beispiel 2D-PAGE oder MALDI, charakterisiert werden.

### **5.3. Histologie**

#### **Dil-Aufnahmestudien**

Dil-markiertes dHDL wird von allen untersuchten Geweben und Organen eines jungen Flusskrebse aufgenommen. Dabei zeigen sowohl metabolisch sehr aktive Gewebe als auch metabolisch eher weniger aktive Gewebe Signale. Die metabolisch aktiven Organe zeigen so starke Signale, dass man keine einzelnen Zellen ausmachen kann die leuchten (Mitteldarmdrüse, grüne Drüse, Darm). Im Gegensatz dazu kann man bei den metabolisch eher weniger

aktiven Organen sehr wohl einzelne Zellen erkennen (Epidermis). Eine Ausnahme stellen die stoffwechselaktiven Kiemen dar, die trotzdem nur vereinzelt Signale zeigen. Da dHDL auch in den Hämocyten von *Astacus leptodactylus* nachgewiesen werden konnte (Abbildung 38), wäre es möglich, dass die innerhalb der Organe als vereinzelt sichtbaren Zellen auf die Blutzellen zurückzuführen sind. Bei der Präparation der von Hämolymphe umspülten Gewebe ist es sehr wahrscheinlich, dass einige Hämocyten mit-präpariert wurden. Eventuell handelt es sich bei den vereinzelt Signalen in Kieme und Epidermis also nicht um Kiemen- und Epidermiszellen, sondern um Hämocyten. Von einer sicheren dHDL-Aufnahme in die Organzellen kann man vermutlich nur bei den sehr stark leuchtenden Organen Darm, Mitteldarmdrüse und grüne Drüse ausgehen. Um endgültig klären zu können, ob die Signale nun aus den Zellen der Organe oder aus den mitpräparierten Hämocyten stammen, sind weitere Untersuchungen notwendig. Zur Unterscheidung von Hämocyten und anderen Zelltypen könnten spezielle Marker eingesetzt werden. Denkbar wären Antikörper gegen Proteine, die ausschließlich in Hämocyten vorkommen, nicht aber in den anderen Geweben, wie zum Beispiel Peroxinektin (Liu *et al.*, 2005).

Die Aufnahme von dHDL in die Zellen erfolgt vermutlich über rezeptorvermittelte Endocytose. In Abbildung 35g kann man deutlich einzelne Granula erkennen, die nahe der Zellmembran lokalisiert sind. Eine rezeptorvermittelte Endocytose wurde bereits für das ebenfalls discoidale Lipoprotein von *Nereis virens* (Nv-dHDL) gezeigt (Schenk *et al.*, 2009); Nv-dHDL wurde in die Oocyten von *Nereis virens* und *Platynereis dumerilii* aufgenommen. dHDL-Rezeptoren befinden sich in den Membranen von Darm-, Hepatopankreas und Kiemen-Zellen (Ergebnisse der Ligandenblots - siehe Abbildung 32), bisher nicht untersucht wurden grüne Drüse und Epidermis. Das Vorhandensein von entsprechenden Rezeptoren stärkt die Annahme, dass es sich bei den Signalen in Darm, Hepatopankreas und Kieme tatsächlich um ‚echte‘ Signale handelt, und nicht um Hämocyten-Signale. Die sehr stoffwechselaktiven Organe Darm und Kieme sind keine Lipid-speichernden Organe, deshalb liegt die Vermutung nahe, dass sie womöglich die durch dHDL transportierten Lipide als Energiequelle nutzen. In weiteren Ligandenblot-Studien sollte geklärt werden, ob grüne Drüse und Epidermis dHDL-Rezeptoren exprimieren.

In einem weiteren Experiment wurde ein ganzes Ovarium aus *Astacus leptodactylus* mit Dil-markiertem dHDL für 6 Stunden perfundiert. Dabei wurden ausschließlich die die Oocyten umgebenden Follikelzellen superfizial markiert. dHDL wurde also von den Follikelzellen aufgenommen und innerhalb der 6 Stunden nicht weiter transportiert. Generell sind die Follikelzellen für die Versorgung der Eizelle mit Nährstoffen zuständig. So gelangen alle Nährstoffe durch die Follikelzellen hindurch in die Oocyte, welche durch ihre apikalen Mikrovilli miteinander verzahnt sind (Vogt *et al.*, 2004). Bei intakten Eizellen ist dieser Transport einseitig (Follikelzellen → Oocyten), sind die Oocyten jedoch beschädigt, so übernehmen die Follikelzellen den Abbau der Eizellen und transportieren die Stoffe in entgegengesetzter Richtung (Oocyten → Follikelzellen). In unserem Experiment ist davon auszugehen, dass sich ein Weitertransport des markierten dHDL in die Oocyten angeschlossen hätte. In einer ausgedehnten *Pulse and Chase*-Zeitserie hätte man sicherlich die verschiedenen Stufen der superfizialen endocytotischen dHDL-Aufnahme durch die Follikelzellen, einer Transzytose quer durch die Follikelzellen, eine Abgabe des dHDL in den intermikrovilliären Raum, eine pinocytotische Aufnahme des dHDL durch die Oocyte, die Bildung von Endocytose-Vesikeln in der Oocyte, und die abschließende Speicherung des dHDL in Granula erkennen können. In welchem Zeitraum sich all diese Vorgänge abspielen, ist nicht abschätzbar. Offenbar haben wir es hier mit sehr langsamen Prozessen zu tun, denn allein die Aufnahme durch die Follikelzellen braucht 6 Stunden. Interessant wäre es zu überprüfen, wie lange die Aufnahme von Vitellogenin bei *Astacus leptodactylus* dauert (bei *Nereis virens* dauert es 20 Stunden bis zur endgültigen Einlagerung von Nv-dHDL in die Oocyten (Schenk *et al.*, 2009), allerdings findet hier kein ‚Umweg‘ über Follikelzellen statt). Eventuell dauert die dHDL-Aufnahme nämlich nur so lange, weil dHDL nicht der primäre Ligand und Energieversorger für die Follikel- und Eizellen ist, sondern das Vitellogenin. Steht, wie in unserem Experiment, nicht genügend Vitellogenin zur Verfügung, weichen die Follikelzellen eventuell auf dHDL aus. Die Rezeptoren zur dHDL-Aufnahme sind aber in diesem Fall eventuell noch nicht exprimiert, oder dHDL bindet (wesentlich schlechter) an den Vitellogenin-Rezeptor, was beides die Aufnahme so erheblich verzögern könnte. Bei Insekten konnte gezeigt werden, dass Vitellogenin und geschlechtsunabhängiges Lipophorin über denselben Rezeptor aufgenommen werden; dieser Rezeptor hat allerdings eine höhere Affinität für Vitellogenin, so dass Vitellogenin primär als Dotterprotein aufgenommen wird (Kulakosky *et al.*, 1990).

### **Immunhistochemie (IHC)**

dHDL konnte in den Organen Darm und Mitteldarmdrüse nachgewiesen werden. Dieser Nachweis war zu erwarten, wurde die Aufnahme von dHDL in Darm und Mitteldarmdrüse doch bereits durch die Dil-Aufnahmestudien gezeigt (siehe oben). Bloß durch Immunhistochemie kann man leider nicht sagen, ob ein Protein in den mit dem Antikörper reagierenden Zellen gebildet, aufgenommen, gespeichert oder abgebaut wird. In Verbindung mit den Dil-Aufnahmestudien kann man jedoch sagen, dass Darm und Mitteldarmdrüse dHDL endocytotisch aufnehmen. Vermutlich ist die Mitteldarmdrüse gleichzeitig auch ein Syntheseort von dHDL, denn die mRNA anderer Lipoproteine (BGBP - siehe oben) wurde hieraus extrahiert. Die Mitteldarmdrüse ist ein wichtiges Organ im Lipoprotein- und Lipid-Stoffwechsel. (Neben BGBP werden hier auch die Lipoproteine Vitellogenin und *Clotting*-Protein synthetisiert (Tiu *et al.*, 2009; Yeh *et al.*, 2007). Außerdem ist die Mitteldarmdrüse für die Lipidaufnahme aus der Nahrung zuständig und sie ist das Hauptspeicherorgan der Crustaceen für Lipide (Storch *et al.*, 2009). Nach Sezernierung der Lipoproteine in die Hämolymphe nimmt die Mitteldarmdrüse diese also wieder auf. Dies könnte geschehen, um die Mitteldarmdrüse mit Lipiden zu versorgen (bei ‚Hunger‘) und / oder um die Lipoproteine abzubauen.

Auch in den Hämocyten von *Astacus leptodactylus* lassen sich per Immunhistochemie dHDL-Signale nachweisen. Die Signale bilden deutliche Pünktchen innerhalb der Zellen, das heißt, vermutlich liegen sie in Vesikeln vor. Dabei handelt es sich höchstwahrscheinlich um Endocytose-Vesikel, schließlich konnte eine Aufnahme von dHDL in die Hämocyten nachgewiesen werden (siehe 4.3.1. - Dil-Aufnahmestudien). Theoretisch könnte es sich aber auch um Exocytose-Vesikel handeln; schließlich sind die Expressionsorte von dHDL bisher nicht bekannt. Andere Crustaceen-Lipoproteine, wie zum Beispiel das BGBP, werden unter anderem in den Hämocyten exprimiert und von dort wahrscheinlich in die Hämolymphe abgegeben (Wang *et al.*, 2007). Dieser Weg ist auch für dHDL denkbar. Ob es sich um Endo- oder Exocytose-Vesikel handelt, müsste durch Kolo-kalisation mit entsprechenden Markern (z.B. Clathrin-Antikörper für Endocytose-Vesikel und SNARE-Protein-Antikörper für Exocytose-Vesikel) nachgewiesen werden. Auch könnte man Dil-Aufnahmestudien mit gleichzeitiger Antikörper-Färbung verbinden, um zu sehen, ob die dHDL-Partikel, welche in

den Vesikeln vorliegen, zuvor endocytotisch aufgenommen wurden. Der Vergleich der Dil-Aufnahmestudien mit der Antikörper-Färbung kann auf jeden Fall Aussagen über Expressions- und Zielgewebe machen. Gewebe, die ausschließlich in den Dil-Aufnahmestudien Signale zeigen, sind Zielgewebe, aber ganz sicher keine Expressionsorte. Zeigen beide Versuchsansätze positive Signale, kann man keine klare Aussage treffen. Sollte demnächst die dHDL-Sequenz bekannt sein, kann man per reverser Transkriptase-PCR überprüfen, welche Gewebe dHDL exprimieren, und mit quantitativer PCR, in welchem Maße sie exprimieren.

Konnte dHDL per Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bisher nur aus *Astacus leptodactylus*-Hämolymphe isoliert werden, so ist es doch verwunderlich, dHDL-ähnliche Proteine per Antikörper-Färbung auch in den Hämocyten von Hummer und Marmorkrebs nachweisen zu können. Da der Antikörper beide Untereinheiten erkennt, kann man nicht sagen, ob dieses Hummer- / Marmorkrebs-dHDL-ähnliche Protein denselben Aufbau der Untereinheiten hat, oder ob womöglich nur eine der beiden Untereinheiten vorhanden ist, wie in der Co-Immunitätspräzipitation für *Astacus astacus* beobachtet (siehe Abbildung 27). Für diese Fragestellung müsste man die beiden dHDL-Untereinheiten per Gelfiltration trennen und die Antikörper-Lösung gegen die einzelnen Untereinheiten aufreinigen (siehe AK-Aufreinigung). Diese Differenzierung wäre auch für den dHDL-Nachweis mittels ELISA sinnvoll. ELISA-Tests konnten, wie oben beschrieben, ein dHDL-ähnliches Protein auch in der Hämolymphe vom Marmorkrebs nachweisen (der Hummer wurde mittels ELISA bisher nicht untersucht). Aus dieser Sicht war es dann nicht überraschend, ein dHDL-ähnliches Protein auch in den Hämocyten zu detektieren. Überraschend ist aber die Tatsache, dass es sich vermutlich nicht um ein Lipoprotein handelt, denn sonst hätte man es per Dichtegradienten-Ultrazentrifugation isolieren können.

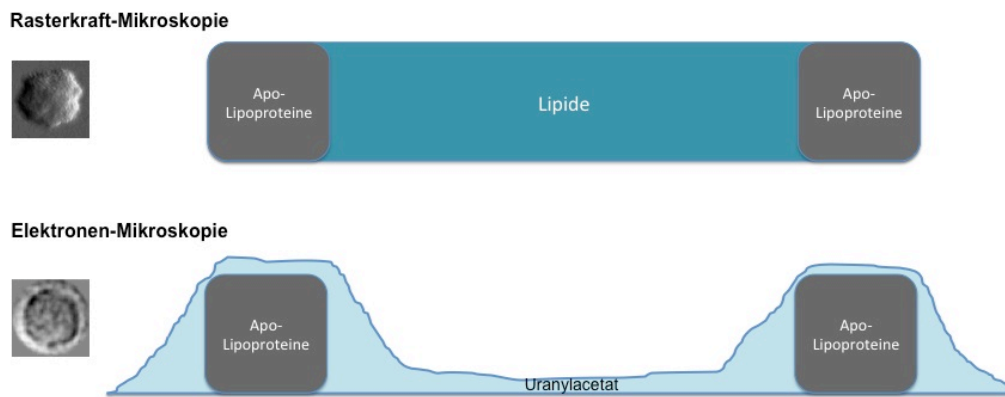
#### 5.4. Mikroskopische Struktur

Tabelle 9. Größenbestimmung der Lipoproteine dHDL und BGBP aus *Astacus leptodactylus* mittels Elektronen- und Rasterkraft-Mikroskopie.

	Form	Elektronen-Mikroskopie	Rasterkraft-Mikroskopie
<b>dHDL</b>	discoidal	42 x 7 nm (Stieb <i>et al.</i> , 2008)	46 x 4,5 nm
<b>BGBP</b>	discoidal	14,7 x ? nm	?

Mittels Elektronen- und Rasterkraft-Mikroskopie wurden die Größe, Form und Struktur der Lipoproteine untersucht (siehe auch Tabelle 9). Der Durchmesser von BGBP wurde anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen auf 14,7 nm bestimmt. Die einzelnen Partikel sehen von oben betrachtet rund aus. Allerdings gibt es auch drei Klassensummen, welche eine nierenförmige, gekrümmte Struktur aufweisen. Eventuell handelt es sich hierbei um Seitenansichten. Demnach würde es sich bei BGBP auch um ein discoidales Lipoprotein handeln, welches einen Durchmesser von 14,7 nm hat und dessen Höhe bisher unbekannt ist. Auch andere Crustaceen-BGBP's sind anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen als discoidal beschrieben worden und haben ähnliche Ausmaße. So zum Beispiel das *Litopenaeus vannamei*-BGBP, welches einen Durchmesser von 15 nm und eine Höhe von 5 nm hat (Morán-Palacio *et al.*, 2006), oder das *Cancer antennarius*-BGBP, welches einen Durchmesser von 13,7 nm und eine Höhe von 5,5 nm hat (Spaziani *et al.*, 1986). Eine Höhe von 5 - 10 nm entspricht einer Phospholipid-Doppelschicht (Stryer *et al.*, 2003). Lipidanalysen haben ergeben, dass sich der Lipidteil des BGBP hauptsächlich (79%) aus den beiden Phospholipiden Phosphoethanolamin und Phosphatidylcholin zusammensetzt (Ruiz-Verdugo *et al.*, 1997). Also kann man, ähnlich wie bei dHDL (Stieb *et al.*, 2008), auch davon ausgehen, dass die Apolipoproteine einen Ring bilden, in dessen Mitte sich die Lipide aufspannen, und zwar als Phospholipid-Doppelschicht. Die anderen Lipide integrieren sich entweder in die Phospholipid-Doppelschicht (Cholesterin), oder befinden sich im Inneren des Partikels (Cholesterinester und Neutrallipide). Eine solche Anordnung wurde bereits für discoidale Lipoproteine vorgeschlagen (siehe Abbildung 2). Somit handelt es sich beim BGBP ebenso um ein discoidales Lipoprotein wie beim dHDL, nur dass das dHDL wesentlich größer ist (42 x 7 nm, Vermessung anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen; Stieb *et al.*, 2008). Die dHDL-Größenbestimmung, die durch EM vorgenommen wurde, weicht nur unwesentlich von den durch AFM bestimmten Größen ab (46 x 4,5 nm). AFM ist dabei als die nativere Methode anzusehen, da auf negative Kontrastierung (wie beim EM) verzichtet werden kann. Die im EM erkennbare typische Ringstruktur ist in AFM-Aufnahmen nicht zu sehen. Die Apolipoproteine, welche die Ringstruktur bilden, sind offensichtlich sehr gut mit Uranylacetat kontrastiert (helle Bereiche, hohe Elektronendichte). Die innen liegenden Lipide scheinen jedoch durch die Behandlung verloren gegangen oder teilweise zerstört worden zu sein,

denn dieser Bereich weist kaum Kontrastierung auf (dunkle Bereiche, niedrige Elektronendichte) (siehe Abbildung 51).



**Abbildung 51. Schema (Querschnitt) des unterschiedlichen Verhaltens von dHDL-Partikeln im Rasterkraft- und im Elektronen (EM)-Mikroskop.** Bei der Rasterkraft-Mikroskopie werden die Partikel auf Glimmer aufgebracht und nicht kontrastiert. Die Lipide bleiben erhalten, die Form (oben rechts) entspricht vermutlich der nativen Struktur (oben links). Bei der Elektronen-Mikroskopie werden die Partikel mit Uranylacetat negativ kontrastiert. Durch diese Behandlung gehen vermutlich die Lipide verloren. Das Uranylacetat bedeckt die Apo-Lipoproteine wie ein ‚Zuckerguss‘ (unten rechts). Deshalb ergibt sich im EM-Bild (unten links) die verstärkte Randstruktur.

Die Vielzahl an Klassensummen (Abbildung 42), welche verschiedene Konformationen des dHDL widerspiegeln, verdeutlichen die extrem hohe Flexibilität dieser Lipoproteine. Nach Kumar *et al.* (2011) ist die Flexibilität des humanen LDL temperaturabhängig. LDL-Partikel, welche nach Inkubation bei 37°C in Eis eingebettet wurden, sind deutlich flexibler als Partikel, die nach Inkubation bei 6°C eingebettet wurden. Die Autoren führen diesen Effekt auf eine bessere Ordnung der Cholesterin-Moleküle bei niedrigeren Temperaturen zurück. Aus diesem Grund wäre es wichtig, die Krebs-Lipoproteine bei der Körpertemperatur dieser Tiere (in unserem Fall Hälterungstemperatur = 18°C) einzubetten. Außerdem wäre es bei wechselwarmen Tieren wie den Crustaceen natürlich interessant, die Lipoproteine in allen Temperaturbereichen zu betrachten, die für die Tiere physiologisch sind, und eventuelle Unterschiede im Ausmaß der Flexibilität zu entdecken.

Eine 3D-Rekonstruktion hat in beiden Fällen (dHDL und BGBP) leider nicht funktioniert. dHDL ist zu flexibel, was eine Rekonstruktion unmöglich macht. BGBP ist mit seinen ca. 15 nm relativ klein, auch hier gibt es Probleme mit einer Rekonstruktion.



## 6 AUSBLICK

---

Da die dHDL-Nukleotid-Sequenz im Rahmen dieser Dissertation nicht erhalten werden konnte, bleibt das Hauptziel weiterer Arbeiten an diesem Lipoprotein die Entschlüsselung dieser Sequenz. Gerade die bisher unbekannt Verbindung zum  $\beta$ -Glukan-Bindeprotein ist sehr interessant und muss unbedingt weiter verfolgt werden. 5'- und 3'-RACE-Analysen der BGBP-cDNA, oder aber ein ‚*Chromosome walking*‘ auf genomischer Ebene, führen zu einer vollständigen BGBP-Sequenz, aber evtl. auch zu Teilen der dHDL-Sequenz. Grundlage hierfür ist die Beobachtung, dass mehrere dHDL-Peptide in der 5'- und 3'-nahen Region der BGBP-cDNA wiedergefunden werden können. Daraus folgt als Hypothese, dass dHDL und BGBP durch dasselbe Gen kodiert werden (siehe Abbildung 50). Sollte die dHDL-Sequenz dann bekannt sein, können anhand der Daten phylogenetische Berechnungen durchgeführt werden, welche dHDL einer Proteinfamilie zuordnen und die Abstammung klären. Eventuell handelt es sich bei dHDL um einen ‚Prototyp‘ in der Lipoprotein-Evolution; sind solche discoidalen Lipoproteine doch hauptsächlich bei basalen Tieren oder in naszierenden Zuständen ‚höher entwickelter Lipoproteine‘ anzutreffen. *Primer*, welche man anhand der Sequenz entwickeln kann, müssen dann eingesetzt werden, um andere Tiere nach dHDL-ähnlichen Proteinen zu *screenen*. Diese *Screening*-Methode kann man aber auch einsetzen, um Organe und Gewebe oder sogar einzelne Zelltypen auf die Expression von dHDL hin zu untersuchen. Neben der phylogenetischen Abstammung ist nämlich auch die Funktion dieses Lipoproteins von zentralem Interesse. Ligandenblots und histologische Experimente konnten bereits erste Einblicke in den ‚Weg‘ des Lipoproteins geben (Zirkulation in der Hämolymphe → Aufnahme über Rezeptor-vermittelte Endocytose in diverse Organe → vermutlich Abbau der Partikel zur Energiegewinnung). Weiterhin müssen aber die exprimierenden Organe identifiziert werden, sowie die Expression in Abhängigkeit von verschiedenen Häutungs-, Fütterungs- oder Fortpflanzungszyklen und Entwicklungsstadien untersucht werden.

Auch die Doppelfunktion des BGBP sollte näher untersucht werden. Wie lassen sich eine Beteiligung an immunologischen Prozessen und eine Lipidversorgung verschiedener Organe von ein und demselben Protein bewerkstelligen? Ein Schlüssel hierfür scheint die ‚Aktivierung‘ des BGBP durch  $\beta$ -Glukane zu sein. Aber wie genau sieht diese Aktivierung aus und welche funktionellen und strukturellen Folgen hat sie? Bindungsstudien von ‚Laminarin-

aktiviertem' und ‚nicht-aktiviertem' BGBP an die beiden identifizierten BGBP-Rezeptoren (ca. 100 kDa, bzw. 320 kDa; diese Arbeit, bzw. Duvic *et al.*, 1992) könnten erste Anhaltspunkte liefern. Um die Hypothese der BGBP-Prozessierung durch Furin-ähnliche Proteasen zu bestätigen, muss die BGBP-cDNA heterolog exprimiert werden. Das Genprodukt müsste dann mit Furin verdaut und mindestens N-terminal ansequenziert werden. Entsteht aufgrund des Verdauens das reife BGBP, muss noch eine Co-Lokalisation von BGBP und Furin im Krebsgewebe gezeigt werden.

## 7 LITERATUR

---

Abascal F, Zardoya R, Posada, D (2005): PROTTEST: Selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21(9): 2104-2105.

Abdu U, Davis C, Khalaila I, Sagi A (2002): The vitellogenin cDNA of *Cherax quadricarinatus* encodes a lipoprotein with calcium binding ability, and its expression is induced following the removal of the androgenic gland in a sexually plastic system. *Gen Comp Endocrinol.* 127(3): 263-272.

Acher R, Chauvet J (1988): Structure, processing and evolution of the neurohypophysial hormone-neurophysin precursors. *Biochimie* 70(9): 1197-1207.

Agrawal BB, Goldstein IJ (1968): Protein-carbohydrate interaction. VII. Physical and chemical studies on concanavalin A, the hemagglutinin of the jack bean. *Arch Biochem Biophys.* 124(1): 218-229.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RZ, Moore DD, Seidman JG, Smith JG, Struhl K (1992): *Current protocols in molecular biology.* Greene Publishing Associates and Wiley- Intersciences, New York.

Avarre JC, Lubzens E, Babin PJ (2007): Apolipoprotein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evol. Biol.* 7: 3-13.

Babin PJ, Bogerd J, Kooiman FP, van Marrewijk WJA, van der Horst DJ (1999): Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *J. Mol. Evol.* 49: 150-160.

Babin PJ, Gibbons GF (2009): The evolution of plasma cholesterol: direct utility or a „spandrel“ of hepatic lipid metabolism? *Prog Lipid Res.* 48(2): 73-91.

Blake MS, Johnston KH, Russel-Jones GJ, Gotschlich EC (1984): A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. *Anal. Biochem.* 136: 175-179.

Barton NH, Briggs DEG, Eisen JA, Goldstein DB, Patel NH (2007): *Evolution.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.

Bolt MW, Mahoney PA (1997): High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 247: 185-192.

Borriss R, Manteuffel R, Hofemeister J (1988): Molecular cloning of a gene coding for thermostable beta-glucanase from *Bacillus macerans*. J Basic Microbiol. 28(1-2): 1-10.

Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckleman PE (1989): The Merck index, 11th Ed., Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey.

Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE, Wells MA (2001): Fat metabolism in insects. Ann. Rev. Nutr. 21: 23-46.

Canavoso LE, Kyung Yun H, Jouni ZE, Wells MA (2004): Lipid transfer particle mediates the delivery of diacylglycerol from lipophorin to fat body in larval *Manduca sexta*. J. Lipid Res. 45: 456-465.

Cao Y, Adachi J, Janke A, Paabo S, Hasegawa M (1994): Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: instability of a tree based on a single gene. J Mol Evol. 39: 519-527.

Cerenius L, Liang Z, Duvic B, Keyser P, Hellman U, Palva ET, Iwanaga S, Söderhäll K (1994): Structure and biological activity of a 1,3-beta-D-glucan-binding protein in crustacean blood. J Biol Chem 269: 29462-29467.

Chapman MJ (1980): Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. J Lipid Res 21: 789-853.

Cheng W, Liu CH, Tsai CH, Chen JC (2005): Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 18(4): 297-310.

Cheng W, Tsai IH, Huang CJ, Chiang PC, Cheng CH, Yeh MS (2008): Cloning and characterization of hemolymph clottable proteins of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Dev Comp Immunol. 32(3): 265-274.

Chino H, Kitazawa K (1981): Diacylglycerol-carrying lipoprotein of hemolymph of the locust and some insects. J Lipid Res 22: 1042-1052.

Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162(1): 156-159.

Ciudad L, Bellés X, Piulachs MD (2007): Structural and RNAi characterization of the German cockroach lipophorin receptor, and the evolutionary relationship of lipoprotein receptors. BMC Mol Biol. 8: 53.

Colbourne JK, Pfrender ME, Gilbert D, Thomas WK, Tucker A, Oakley TH, Tokishita S, Aerts A, Arnold GJ, Basu MK, Bauer DJ, Cáceres CE, Carmel L, Casola C, Choi JH, Detter JC, Dong Q, Dusheyko S, Eads BD, Fröhlich T, Geiler-Samerotte KA, Gerlach D, Hatcher P, Jogdeo S, Krijgsveld J, Kriventseva EV, Kültz D, Laforsch C, Lindquist E, Lopez J, Manak JR, Muller J, Pangilinan J, Patwardhan RP, Pitluck S, Pritham EJ, Rechtsteiner A, Rho M, Rogozin IB, Sakarya O, Salamov A, Schaack S, Shapiro H, Shiga Y, Skalitzky C, Smith Z, Souvorov A, Sung W, Tang Z, Tsuchiya D, Tu H, Vos H, Wang M, Wolf YI, Yamagata H, Yamada T, Ye Y, Shaw JR, Andrews J, Crease TJ, Tang H, Lucas SM, Robertson HM, Bork P, Koonin EV, Zdobnov EM, Grigoriev IV, Lynch M, Boore JL (2011): The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science* 331(6017): 555-561.

Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deléage G (2000): SOPMA-Software NPS@: Network Protein Sequence Analysis. *TIBS* 25 - 3(291): 147-150.

Cunningham M, Pollero R, Gonzalez A (1994): Lipid circulation in spiders. Transport of phospholipids, free acids and triacylglycerols as the major lipid classes by a high density lipoprotein fraction isolated from plasma of *Polybetes pythagoricus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 109: 333-338.

Cunningham M, Gómez C, Pollero R (1999): Lipid binding capacity of spider hemocyanin. *J Exp Zool.* 284(4): 368-373.

Cunningham M, Garcia F, Pollero RJ (2007): Arachnid lipoproteins: Comparative aspects. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146: 79-87.

Daniel TO, Schneider WJ, Goldstein JL, Brown MS (1983): Visualization of lipoprotein receptors by ligand blotting. *J. Biol. Chem.* 258: 4606-4611.

Dieckmann M, Dietrich MF, Herz J (2010): Lipoprotein receptors - an evolutionary ancient multifunctional receptor family. *Biol Chem.* 391(11): 1341-1363.

D'Souza SE, Ginsberg MH, Plow EF (1991): Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends Biochem Sci.* 16(7): 246-250.

Duvic B, Söderhäll K (1990): Purification and characterization of a  $\beta$ -1,3-glucan binding protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 265(16): 9327-9332.

Duvic B, Söderhäll K (1992): Purification and partial characterization of a  $\beta$ -1,3-glucan-binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 207: 223-228.

Duvic B, Söderhäll K (1993): Beta-1,3-glucan-binding proteins from plasma of the freshwater crayfishes *Astacus astacus* and *Procambarus clarkii*. *J. Crustacean Biol.* 13: 403-408.

Englard S, Seifter S (1990): Precipitation techniques. *Methods Enzymol.* 182: 285-300.

Farrell RE (2010): *RNA Methodologies - A laboratory guide for isolation and characterization*. Elsevier, Amsterdam.

Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005): Protein identification and analysis tools on the EXPASY server. *The Proteomics Protocols Handbook*: 571-607.

Gatsogiannis C, Markl J (2009): Keyhole limpet hemocyanin: 9-A CryoEM structure and molecular model of the KLH1 dodecamer reveal the interfaces and intricate topology of the 160 functional units. *J Mol Biol.* 385(3): 963-983.

Gent J, Braakman I (2004): Low-density lipoprotein receptor structure and folding. *Cell Mol Life Sci.* 61(19-20): 2461-2470.

Geyer CJ (1991): Markov chain Monte Carlo maximum likelihood. *Computing Science and Statistics: Proceedings of the 23rd Symposium on the Interface*: 156-163.

Goldstein IJ, Hollerman CE, Smith EE (1965): Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of Concanavalin A with polysaccharides. *Biochemistry* 4: 876-883.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010): SEAVIEW version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* 27(2): 221-224.

Gupta R, Brunak S (2002): Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput.* 7: 310-322.

Hall M, van Heusden MC, Söderhäll K (1995): Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 939-946.

Hall M, Wang R, van Antwerpen R, Sottrup-Jensen L, Söderhäll K (1999): The crayfish plasma clotting protein: a vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(5): 1965-1970.

Hamilton RL, Williams MC, Fielding CJ, Havel RJ (1976): Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J. Clin. Invest.* 58: 667-680.

Harris JR, Horne RW (1991): Negative staining. *Electron microscopy in biology: a practical approach.*, IRL/OUP, Oxford, 203-228.

Hauerland NH, Bowers WS (1987): Lipoproteins in the hemolymph of the tarantula, *Eurypelma californicum*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 86: 571-574.

Hauerland NH, Bowers WS (1989): Comparative studies on arthropod lipoproteins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 92: 137-141.

Hauton C, Hammond JA, Smith VJ (2005): Real-time PCR quantification of the in vitro effects of crustacean immunostimulants on gene expression in lobster (*Homarus gammarus*) granular haemocytes. *Dev Comp Immunol.* 29(1): 33-42.

Hayward A, Takahashi T, Bendena WG, Tobe SS, Hui JH (2010): Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans. *FEBS Lett.* 584(6): 1273-1278.

Heras H, Pollero RJ (2002): Lipoproteins from plasma and perivitelline fluid of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biocell* 26, 111-118.

Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M (2000): Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim. Biophys. Acta* 1488: 189-210.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.

Hurtado-Guerrero R, Dorfmüller HC, van Aalten DMF (2008): Molecular mechanisms of O-GlcNAcylation. *Curr Opin Struct Biol.* 18(5): 551-557.

Kashiwazaki Y, Ikai A (1985): Structure of apoproteins in insect lipophorin. *Arch Biochem Biophys* 237, 160-169.

Kato Y, Tokishita SI, Ohta T, Yamagata H (2004): A vitellogenin chain containing a superoxide dismutase-like domain is the major component of yolk proteins in cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Gene* 334: 157-165.

Keren H, Lev-Maor G, Ast G (2010): Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nat Rev Genet.* 11(5): 345-355.

Kibbe WA (2007): OLIGOCALC: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 35(Web Server issue): W43-46.

Kiefer F, Arnold K, Künzli M, Bordoli L, Schwede T (2009): The SWISS-MODEL repository and associated resources. *Nucleic Acids Research.* 37, D387-D392.

Komatsu M, Ando S (1998): A very-high-density lipoprotein with clotting ability from hemolymph of sand crayfish, *Ibacus ciliatus*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62(3): 459-463.

Kornfeld R, Kornfeld S (1985): Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 54: 631-664.

Kulakosky PC, Telfer WH (1990): Lipophorin as a yolk precursor in *Hyalophora cecropia*: uptake kinetics and competition with vitellogenin. *Arch. Biochem. Biophys.* 14: 269-285.

Kunkel JG, Nordin JH (1985): Yolk proteins. In: Kerkut GA, Gilbert LI, *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, New York, 83-111.

Kuranaga E (2011): Caspase signaling in animal development. *Develop. Growth Differ.* 53: 137-148.

Kyhse-Andersen J (1984): Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-209.

Kyte J, Doolittle RF (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157(1): 105-132.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lai X, Kong J, Wang Q, Wang W, Meng X (2011): Cloning and characterization of a  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein from shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Biol Rep.* 38(7): 4527-4535.

Larget B, Simon D (1999): Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 16: 750-759.



Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007): CLUSTAL W and CLUSTAL X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

Latscha HP, Kazmaier U, Klein HA (2002): *Chemie für Biologen*. Springer, Berlin.

Lee SY, Wang R, Söderhäll K (2000): A lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan-binding protein from hemocytes of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Purification, characterization, and cDNA cloning. *J Biol Chem*. 275(2): 1337-1343.

Lin YC, Vaseeharan B, Chen JC (2008): Identification and phylogenetic analysis on lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Dev Comp Immunol*. 32(11): 1260 - 1269.

Liu CH, Cheng W, Chen JC (2005): The peroxinectin of white shrimp *Litopenaeus vannamei* is synthesised in the semi-granular and granular cells, and its transcription is up-regulated with *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol*. 18(5): 431-444.

Lloberas J, Perez-Pons JA, Querol E (1991): Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the endo-beta-1,3-1,4-D-glucanase gene from *Bacillus licheniformis*. Predictive structural analyses of the encoded polypeptide. *Eur J Biochem*. 197(2): 337-343.

Lubzens E, Ravid T, Khayat M, Daube N, Tietz A (1997): Isolation and characterization of the high-density lipoproteins from the hemolymph and ovary of the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan): Apoproteins and lipids. *J. Exp. Zool*. 278: 339- 348.

Martin DDO, Budamagunta MS, Ryan RO, Voss JC, Oda MN (2006): Apolipoprotein A-I assumes a "looped belt" conformation on reconstituted high density lipoprotein. *J. Biol. Chem*. 281, 20418-20426.

Meredith SC, Nathans GR (1982): Gel permeation chromatography of asymmetric proteins. *Anal. Biochem*. 121: 234-243.

Mita M, Nakamura M (1993): Phosphatidylcholine is an endogenous substrate for energy-metabolism in spermatozoa of sea-urchins of the order echinoidea. *Zool. Sci*. 10: 73-83.

Morán-Palacio EF, Tricerri MA, García-Orozco K, Romo-Figueroa MG, Yepiz-Plascencia G, Garda HA, Sotelo-Mundo RR (2006): Biophysical characterization of the non-fusogenic interaction between liposomes and the shrimp bifunctional lipoprotein- $\beta$ -Glucan binding protein HDL/BGBP. *Protein Pept Lett* 13(1): 71-75.

Mühlhardt C (2008): *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Muhlia-Almazán A, Sánchez-Paz A, García-Carreno F, Peregrino-Uriarte AB, Yepiz-Plascencia G (2005): Starvation and diet composition affect mRNA levels of the high density-lipoprotein- $\beta$  glucan binding protein in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 142: 209-216.

Muriana FJG, Ruiz-Gutierrez V, Bolufer J (1993): Phospholipids fatty acids compositions of hepatopancreas and muscle from the prawn, *Penaeus japonicus*. *J. Biochem*. 114: 404-407.

Nakamura K, Handa S (1984): Coomassie Brilliant Blue staining of lipids on thin-layer plates. *Anal. Chem*. 142: 406-410.

Nalivaeva NN, Turner AJ (2001): Post-translational modifications of proteins: acetylcholinesterase as a model system. *Proteomics* 1(6): 735-747.

Olianas A, Sanna MT, Messana I, Castagnola M, Masia D, Manconi B, Cau A, Giardina B, Pellegrini M (2006): The hemocyanin of the shamefaced crab *Calappa granulata*: Structural-functional characterization. *J Biochem*. 139(6): 957-966.

Page RDM (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *CABIOS* 12: 357-358.

Pan D, He N, Yang Z, Liu H, Xu X (2005): Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization. *Dev Comp Immunol*. 29(2): 103-112.

Papadopoulos JS, Agarwala R (2007): COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics* 23(9): 1073-1079.

Parodi AJ (2000): Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem*. 69: 69-93.

Pattnaik NM, Mundall EC, Trambusti BG, Law JH, Kézdy FJ (1979): Isolation and characterization of a larval lipoprotein from the hemolymph of *Manduca sexta*. *Comp Biochem Physiol B*. 63(4): 469-476.

Pauchet Y, Freitak D, Heidel-Fischer HM, Heckel DG, Vogel H (2009): Immunity or Digestion - Glucanase activity in a glucan-binding protein family from Lepidoptera. *J. Biol. Chem.* 284(4): 2214-2224.

Perazzolo LM, Lorenzini DM, Daffre S, Barracco MA (2005): Purification and partial characterization of the plasma clotting protein from the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis*. *Comp Biochem Physiol B* 142, 302-307.

Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20(18): 3551-3567.

Pesole G, Grillo G, Larizza A, Liuni S (2000): The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. *Brief Bioinform.* 1(3): 236-249.

Pohl T (1990): Concentration of proteins and removal of solutes. *Methods Enzymol.* 182: 68-83.

Pollero RJ, González-Baró MR, Garín C (1992): Lipid transport in snails. Partial characterization of a high-density lipoprotein isolated from *Ampullaria canaliculata* plasma. *Comp. Biochem. Physiol. B* 102: 717-720.

Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC (2006): *Biologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Rahman MM, Ma G, Roberts HLS, Schmidt O (2006): Cell-free immune reactions in insects. *J. Insect Physiol.* 52: 754 - 762.

Raviv S, Parnes S, Segall C, Davis C, Sagi A (2006): Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females. *Gen Comp Endocrinol.* 145(1): 39-50.

Reekmans SM, Pflanzner T, Gordts PLSM, Isbert S, Zimmermann P, Annaert W, Weggen S, Roebroek AJM, Pietrzik CU (2010): Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 135-145.

Reeves JH (1992): Heterogeneity in the substitution process of amino acid sites of proteins coded for by mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 35: 17-31.

Rehm H (2006): Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. Elsevier GmbH - Spektrum Akademischer Verlag, München.

Rehn KG, Lee RF (1994): Lipophorin as a lipid carrier in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. Braz. J. Med. Biol. Res. 27, 1135-1139.

Rodenburg KW, van der Horst DJ (2005): Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members. Biochim Biophys Acta 1736, 10-29.

Rodenburg KW, Smolenaars MM, van Hoof D, van der Horst DJ (2006): Sequence analysis of the non-recurring C-terminal domains shows that insect lipoprotein receptors constitute a distinct group of LDL receptor family members. Insect Biochem Mol Biol. 36(4): 250-263.

Romo-Figueroa MG, Vargas-Requena C, Sotelo-Mundo RR, Vargas-Albores F, Higuera-Ciapara I, Söderhäll K, Yepiz-Plascencia G (2004): Molecular cloning of a beta-glucan pattern-recognition lipoprotein from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: correlations between the deduced amino acid sequence and the native protein structure. Dev Comp Immunol. 28(7-8): 713-726.

Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003): MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.

Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemont JC, Ferrara P (1992): In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. Anal. Biochem. 203(1): 173-179.

Ruiz-Verdugo LM, García-Bañuelos ML, Vargas-Albores F, Inocencio HC, Yepiz-Plascencia GM (1997): Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Comp. Biochem. Physiol. B 118: 91-96.

Ryan RO, Prasad SV, Henriksen EJ, Wells MA, Law JH (1986): Lipoprotein interconversions in an insect, *Manduca sexta*. Evidence for a lipid transfer factor in the hemolymph. J. Biol. Chem. 261: 563-568.

Ryan RO, Kay CM, Oikawa K, Liu H, Bradley R, Scraba DG (1992): Effect of particle lipid content on the structure of insect lipophorins. J Lipid Res. 33(1): 55-63.

Ryan RO, van der Horst DJ (2000): Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 233-260.

Sagi A, Khalaila I, Abdu U, Shoukrun R, Weil S (1999): A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary-vitellogenic-specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Gen Comp Endocrinol.* 115(1): 37-45.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

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

Schägger H, Cramer WA, von Jagow G (1994): Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217: 220-230.

Schenk S, Harris JR, Hoeger U (2006): A discoidal lipoprotein from the coelomic fluid of the polychaete *Nereis virens*. *Comp Biochem Physiol B* 143: 236-243.

Schenk S (2008): Struktur und Funktion des Lipoproteins von *Nereis virens* (Annelida). In: Fachbereich Biologie, Institut für Zoologie, Abteilung I, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Schenk S, Gras H, Marksteiner D, Patasic L, Promnitz B, Hoeger U (2009): The *Pandinus imperator* haemolymph lipoprotein, an unusual phosphatidylserine carrying lipoprotein. *Insect Biochem Mol Biol.* 39(10): 735-744.

Schimming S, Schwarz WH, Staudenbauer WL (1992): Structure of the *Clostridium thermocellum* gene licB and the encoded beta-1,3-1,4-glucanase. A catalytic region homologous to *Bacillus lichenases* joined to the reiterated domain of clostridial cellulases. *Eur J Biochem.* 204(1): 13-19.

Schmidt O, Söderhäll K, Theopold U, Faye I (2010): Role of adhesion in arthropod immune recognition. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 485 - 504.

Segrest JP, Li L, Anantharamaiah GM, Harvey SC, Liadaki KN, Zannis V (2000): Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol.* 11(2): 105-115.

Shechter A, Glazer L, Cheled S, Mor E, Weil S, Berman A, Bentov S, Aflalo ED, Khalaila I, Sagi A (2008): A gastrolith protein serving a dual role in the formation of an amorphous mineral containing extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(20): 7129-7134.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.

Smolenaars MMW, Kasperaitis MAM, Richardson PE, Rodenburg KW, van der Horst DJ (2005): Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein: involvement of furin in cleavage of the apoB homolog, apolipoprotein-II/I. *J. Lipid Res.* 46: 412-421

Smolenaars MMW, Madsen O, Rodenburg KW, van der Horst DJ (2007): Molecular diversity of the large lipid transfer protein superfamily. *J. Lipid Res.* 48: 489-502.

Söderhäll K, Cerenius L (1992): Crustacean Immunity. *Annual Review Fish Diseases* 2: 3-23.

Soulages JL, Wells MA (1994): Lipophorin: The structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Adv. Prot. Chem.* 45: 371-415.

Spaziani E, Havel RJ, Hamilton RL, Hardman DA, Stoudemire JB, Watson RD (1986): Properties of serum high-density lipoproteins in the crab, *Cancer antennarius* Stimpson. *Comp Biochem Physiol B.* 85(2): 307-314.

Stennicke HR, Breddam K (2004): Glutamyl endopeptidase I. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, *Handbook of proteolytic enzymes.* Elsevier, 1449-1451.

Stieb S (2007): Charakterisierung von Lipoproteinen beim Flusskrebs. In: Fachbereich Biologie, Institut für Zoologie, Abteilung I, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

Stieb S, Hoeger U, Schenk S (2008): A large discoidal lipoprotein present in only one of two closely related crayfish. *J. Comp. Physiol. B* 178: 755-765.

Storch V, Welsch U (2009): Kükenthal - Zoologisches Praktikum. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Stratakis E, Fragkiadakis G, Tentes I (1993): Purification and properties of the fatty acid-binding VLDL from the hemolymph of the spider *Eurypelma californicum*. *J. Exp. Zool.* 267: 483-492.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003): Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- Taskinen MR (2005): Type 2 diabetes as a lipid disorder. *Curr Mol Med* 5: 297-308.
- Teather RM, Erfle JD (1990): DNA sequence of a *Fibrobacter succinogenes* mixed-linkage beta-glucanase (1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolase) gene. *J Bacteriol.* 172(7): 3837-3841.
- Thiele OW (1979): Lipide, Isoprenoide mit Steroiden. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Tiu, SHK, Hui JHL, Mak ASC, He JG, Chan SM (2006): Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVg1) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 254 (1-4): 666-674.
- Tiu SH, Hui HL, Tsukimura B, Tobe SS, He JG, Chan SM (2009): Cloning and expression study of the lobster (*Homarus americanus*) vitellogenin: Conservation in gene structure among decapods. *Gen Comp Endocrinol.* 160(1): 36-46.
- To TH, Brenner TL, Cavey MJ, Wilkens JL (2004): Histological organization of the intestine in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Acta Zool.* 85: 119-130.
- Tsutsui N, Kawazoe I, Ohira T, Jasmani S, Yang WJ, Wilder MN, Aida K (2000): Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Zoolog Sci.* 17(5): 651-660.
- Tsutsui N, Saido-Sakanaka H, Yang WJ, Jayasankar V, Jasmani S, Okuno A, Ohira T, Okumura T, Aida K, Wilder MN (2004): Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin in the coonstriped shrimp, *Pandalus hypsinotus* and site of vitellogenin mRNA expression. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 301(10): 802-814.
- Tuffley C, Steel M (1997): Links between maximum likelihood and maximum parsimony under a simple model of site substitution. *Bull. Math. Bio.* 59: 581-607.
- Van der Horst DJ (1990): Lipid transport functions of lipoproteins in flying insects. *Biochem. Biophys. Acta* 1047: 195-211.
- Van der Horst DJ, van Hoof D, van Marrewijk WJA, Rodenburg KW (2002): Alternative lipid mobilization: The insect shuttle system. *Mol. Cell. Biochem* 239: 113-119.
- Van Heusden MC, Thompson F, Dennis J (1998): Biosynthesis of *Aedes aegypti* lipophorin and gene expression of its apolipoproteins. *Insect Biochem Mol Biol.* 28(10): 733-738.

Vargas-Albores F, Jiménez-Vega F, Söderhäll K (1996): A plasma protein isolated from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) which enhances the activation of prophenoloxidase system by beta-1,3-glucan. *Dev Comp Immunol.* 20(5): 299-306.

Vargas-Requena CL, Hernández-Santoyo A, Yepiz-Plascencia GM, Vargas-Albores F, Higuera-Ciapara I, Rodríguez-Romero A, Soulages JL, Sotelo-Mundo RR (2002): Biophysical evidence of lipid and carbohydrate binding activities of shrimp high density lipoprotein/ $\beta$ -glucan binding protein. *Prot. Pept. Lett.* 9: 337-344.

Vogt G, Tolley L, Scholtz G (2004): Life stages and reproductive components of the Marmorkrebs (Marbled crayfish), the first parthenogenetic decapod crustacean. *J Morphol.* 261: 286-311.

Wang YC, Chang PS, Chen HY (2007): Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 6: 1161-1177.

Weber K, Osborn M (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem.* 244(16): 4406-4412.

Weers PMM, Ryan RO (2006): Apolipoprotein III: Role model apolipoprotein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 231-240.

Wheeler D, Bhagwat M (2007): BLAST QuickStart: example-driven web-based BLAST tutorial. *Methods Mol Biol.* 395: 149-176.

Willnow TE, Nykjaer A, Herz J (1999): Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nature Cell Biol.* 1: E157-E162.

Willnow TE, Hammes A, Eaton S (2007): Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Development* 134(18): 3239-3249.

Yang WJ, Ohira T, Tsutsui N, Subramoniam T, Huong DT, Aida K, Wilder MN (2000): Determination of amino acid sequence and site of mRNA expression of four vitellins in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *J Exp Zool.* 287(6): 413-422.

Yang Z (1993): Maximum likelihood estimation of phylogeny from DNA when substitution rates differ over sites. *MBE* 10: 1396-1401.

Yeh MS, Huang CJ, Leu JH, Lee YC, Tsai IH (1999): Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Eur J Biochem.* 266(2): 624-633.



- Yeh MS, Huang CJ, Cheng JH, Tsai IH (2007): Tissue-specific expression and regulation of the haemolymph clottable protein of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Shellfish Immunol.* 2: 272-279.
- Yehezkel G, Chayoth R, Abdu U, Khalaila I, Sagi A (2000): High-density lipoprotein associated with secondary vitellogenesis in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 127(3): 411-21.
- Yepiz-Plascencia GM, Sotelo-Mundo R, Vazquez-Moreno L, Ziegler R, Higuera-Ciapara I (1995): A non-sex-specific hemolymph lipoprotein from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. Isolation and partial characterization. *Comp. Biochem. Physiol. B* 111: 181-187.
- Yepiz-Plascencia G, Vargas-Albores F, Jimenez-Vega F, Ruiz-Verdugo LM, Romo-Figueroa G, (1998): Shrimp plasma HDL and beta-glucan binding protein (BGBP): comparison of biochemical characteristics. *Comp Biochem Physiol B* 121: 309-314.
- Yochem J, Greenwald I (1993): A gene for a low density lipoprotein receptor-related protein in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci* 90(10): 4572-4576.
- Yokoyama S (1998): Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochem. Biophys. Acta* 1392: 1-15.
- Zhang J (2003): Evolution by gene duplication: an update. *TREND Ecol. Evo* 18(6): 292-298.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7(1-2): 203-214.
- Zhao D, Chen L, Qin C, Zhang H, Wu P, Li E, Chen L, Qin J (2009): Molecular cloning and characterization of the lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 154(1): 17-24.
- Zheng LP, Hou L, Chang AK, Yu M, Ma J, Li X, Zou XY (2011): Expression pattern of a gram-negative bacteria-binding protein in early embryonic development of *Artemia sinica* and after bacterial challenge. *Dev Comp Immunol.* 35(1): 35-43.
- Zmora N, Trant J, Chan SM, Chung JS (2007): Vitellogenin and its messenger RNA during ovarian development in the female blue crab, *Callinectes sapidus*: gene expression, synthesis, transport, and cleavage. *Biol Reprod.* 77(1): 138-146.

Internetquellen:

- <http://lipidlibrary.aocs.org/lipids/lipoprot/index.htm> (Zugriff am 10.11.2011)
- [http://www.ambion.com/techlib/prot/bp\\_9738.pdf](http://www.ambion.com/techlib/prot/bp_9738.pdf) (Zugriff am 17.11.2010)
- <http://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200256.pdf> (Zugriff am 05.09.2011)
- <http://www.genomics.agilent.com/files/Manual/200401.pdf> (Zugriff am 20.06.2010)
- <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=6720> (Zugriff am 01.11.2011)
- [http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/859e4d359e35edd852575b7005e90a6/\\$FILE/PR02725.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/859e4d359e35edd852575b7005e90a6/$FILE/PR02725.pdf) (Zugriff am 26.08.2011)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/254587356> (Zugriff am 01.10.2011)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FN298411.2> (Zugriff am 07.11.2011)
- <http://www.neb.com/nebecomm/products/productP8077.asp> (Zugriff am 07.04.2011)
- [http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6634-01\\_m.pdf](http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6634-01_m.pdf) (Zugriff am 14.10.2011)
- [http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6942-00\\_m.pdf](http://www.peqlab.de/wcms/de/pdf/12-6942-00_m.pdf) (Zugriff am 25.02.2011)
- <http://www.promega.com/tbs/tm228/tm228.pdf> (Zugriff am 08.09.2011)
- <http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=201083> (Zugriff am 17.02.2011)

## 8 ANHANG

### 8.1. Revision der $\beta$ -1,3-Glukan-bindenden Proteine

**Tabelle T1. Revision der  $\beta$ -1,3-Glukan-bindenden Proteine.** Übersicht über alle  $\beta$ -1,3-Glukan-bindenden Proteine, die in der Datenbank inkorrekt benannt sind, inkl. ihrer Familienzugehörigkeit, GenBank-Nr. und einem Vorschlag für eine korrekte Bezeichnung.

Familie	Bezeichnung in der Datenbank	GenBank-Nr.	Vorschlag für eine korrekte Bezeichnung
LGBP	beta-1,3-glucan binding protein [Litopenaeus vannamei]	AAW5136 1	lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein
LGBP	pattern recognition protein LGBP [Marsupenaeus japonicus]	ABY89089	lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein
LGBP	RecName: Full=Beta-1,3-glucan-binding protein; Short=GBP; Flags: Precursor	Q8N0N3	lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein
LGBP	beta-1,3-glucan binding protein [Penaeus monodon]	AAM2121 3	lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein
LGBP	beta-1,3-glucan binding protein [Homarus gammarus]	CAE47485	lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein
BGBP	beta-1,3-D-glucan binding protein [Pacifastacus leniusculus]	CAA56703	HDL / beta-1,3-glucan-binding protein
BGBP	RecName: Full=Beta-1,3-glucan-binding protein; Short=BGBP; AltName: Full=Beta-1,3-glucan recognition protein; Short=BetaGRP; AltName: Full=BetaGBP-HDL; AltName: Full=High density lipoprotein; Flags: Precursor	P81182	HDL / beta-1,3-glucan-binding protein
BGBP	beta-1,3-glucan-binding protein [Fenneropenaeus chinensis]	ADW1072 0	HDL / beta-1,3-glucan-binding protein
BGBP	beta-1,3-glucan binding protein [Marsupenaeus japonicus]	BAD36807	HDL / beta-1,3-glucan-binding protein
BGBP	beta-1,3-D-glucan binding protein [Pacifastacus leniusculus]	CAA56703	HDL / beta-1,3-glucan-binding protein
BGBP	beta-1,3-glucan-binding protein [Pontastacus leptodactylus]	CAX65684	HDL / beta-1,3-glucan-binding protein

## 8.2. Primer-Sequenzen

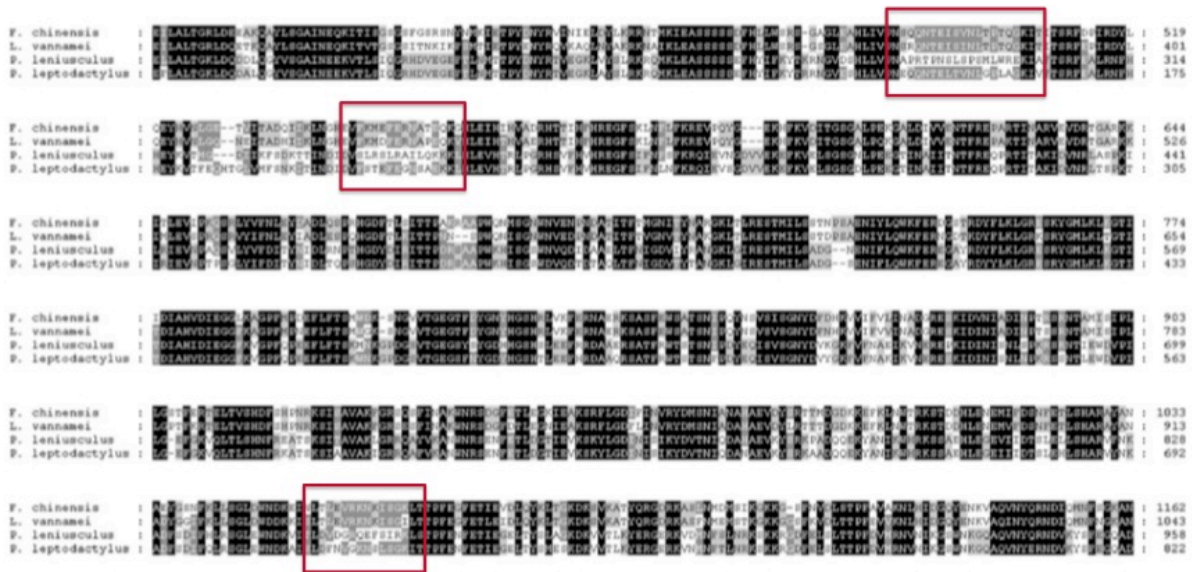
### Forward Primer:

BGBP for. 1	AAT GAC GCT GGA GAA GC
BGBP for. 2	GAT TCC AAG GTG ATG ATG AGC T
BGBP for. 3	CAC CTG GAA GTC CAC ACA
BGBP for. 4	CTT CAC AGA AAT TGG CCT CG
BGBP for. 5	GAA ATT TGA GAG GGA AGG CAC TTA C

### Reverse Primer:

BGBP rev. 1	CTC ATC ACG TCA AAG GGC G
BGBP rev. 2	GTG TGG ACT TCC AGG TG
BGBP rev. 3	GAG CAT TCC GTA CCT TGA CT
BGBP rev. 4	CGA GGC CAA TTT CTG TGA AG
BGBP rev. 5	CCT CCC TGA ATG CGA TTG TT

### 8.3. Korrektur der *Pacifastacus leniusculus*-BGBP-Sequenz



**Abbildung A1.** Auszug aus einem *Alignment* der vier bekannten BGBP-Sequenzen (verändert nach Lai *et al.*, 2011). Auffällig ist, dass die *Pacifastacus leniusculus*-BGBP-Sequenz (dritte Zeile) an mehreren Stellen deutlich von den drei anderen Sequenzen abweicht (rot umrandet). Eventuell ist es hier zu Sequenzierungsfehlern gekommen.

```

cgtgtccgactgtgggtcacagtacgtgtaagagctgccacttcagcattatcatgt[x]
R V R L W V T V R V K S C H F S I I M - 19
                                     M
T F Q A R T P F N G F Q N T F I E I K Y
aactcaacaccagggacgagctgctctcagcccacatgatccttggaaggacacctac
L N T R D E L L S A H M I L G K D T Y 39
          R D E L L S A H M I L G K D T Y
D I D N R E E L L A F R A T A D D H R Y
aacttcgtaacaagcacctacatcgaagacaaaattgcttatttcaaatgcagtcctatg
N F V T S T Y I E D K I A Y F K C S L M 59
N F V T S T Y I E D K I A Y F K C S L M
S F V V G G F I E D K L A T F K W N L N

```

**Abbildung A2.** N-Terminus der *Pacifastacus leniusculus*-BGBP-Sequenz. Schwarz dargestellt ist die von Cerenius *et al.* (1994) publizierte Sequenz (Q26048) mit ihrem putativen Start-Methionin (gelb). Fügt man in diese Sequenz ein einzelnes Nukleotid [x] ein, so kommt es zu einer Leseraster-Verschiebung und somit zu einem früher gelegenen Start-Codon (türkis). In diesem Abschnitt bleibt dies aber vermutlich nicht die einzige Leseraster-Verschiebung, denn auch dieser neu identifizierte N-Terminus stimmt nicht mit dem anderer BGBP's überein. (grün: N-Terminus der *Fenneropenaeus chinensis*-BGBP-Sequenz (ADW10720))

```

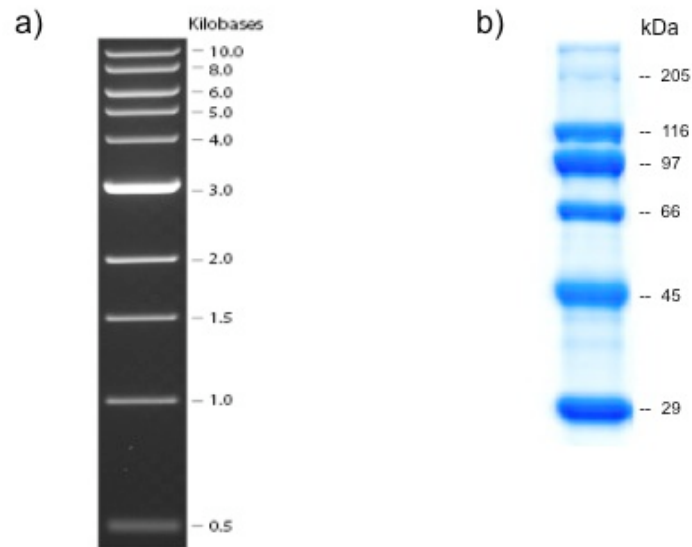
gCGGGTGAACAGTTTACTCTGAAGG[x]TAATCTAGTCGGTGCTTCCCTTAGCCAAGGAT
A G E Q F T L K      V I - - - - - - - - - - - - - - - - - -
      K D N L V G A S L S Q G
A G E Q F T L K S N L V G A S L S Q G
accaaggactgtcgaaatatacacctttccatgctctctcaagtgtcgtcattaatgaaa
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
Y Q G L S K Y T P F H A L S S V V I N E
Y Q G T L E I Y T P F H A L S S V V I N G
aaattaaaatggaagggtttgtcattcttagaagctgacctgaa[x]gtcgtcgaacctta
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
K I K M E G L S F L E A D L K V V E P Y
K I K M E G L S L L E A D L K V V E P S
tgttcagggtgtgcagggtca[x]gat[x]cagctctctcctgaaacactgacagccagtc
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
  V Q V L Q V K [X] Q L S P E T L T A S
  V H V L Q V K Y Q L S P E T L T A S
tcaatcttaactcaataaaaatccgaagatgaaaataaaaattagcttcatcttggaggc
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
L N L N S I K S E D E N K N S F I L E G
L N L N S I K S E D G I K I N F I M E G
ttcggtctt
- - -
F G S
F G S

```

1230

**Abbildung A3. C-Terminus der *Pacifastacus leniusculus*-BGBP-Sequenz.** Gegenüber gestellt sind die von Cerenius *et al.* (1994) publizierte Sequenz (schwarz) mit Übersetzung in die entsprechende Aminosäuresequenz und ein Verbesserungsvorschlag (rot). Außerdem ist in grün der entsprechende Sequenzabschnitt der *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz dargestellt. Relativ früh taucht in der ‚Cerenius-Sequenz‘ ein Stopp-Codon (-) auf. Vermutlich ist es in dieser Sequenz durch einen Sequenzierungsfehler zu einer Leserasterverschiebung gekommen. Fügt man ein einzelnes Nukleotid ein (in diesem Fall ein a, wie es auch in der *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz vorkommt), verschiebt sich das Leseraster, das Stopp-Codon an dieser Stelle verschwindet. Allein in diesem kurzen N-terminalen Bereich gibt es drei weitere Fehler, die Einschübe sind markiert [ ]. Die neu übersetzte Sequenz (rot) ist zu 86% identisch mit der *Astacus leptodactylus*-BGBP-Sequenz.

## 8.4. Molekulargewichtsstandards



**Abbildung A4. Verwendete Molekulargewichtsstandards.** a) 1kb-DNA-Ladder (New England Biolabs) für Agarose-Gele (nach Sambrook *et al.*, 1989); b) SDS-6H2 (Sigma-Aldrich) für SDS-PAGE (nach Weber *et al.*, 1969).

## 8.5. Drei- und Ein-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren

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

## 8.6. Eigene Publikation (Stieb *et al.*, 2008)

The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)



The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)

The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)

The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)

The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)

The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)

The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)

The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)

The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)



The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)

The original publication is available at [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com):

**<http://www.springerlink.com/content/a53372188256725x/>**

(Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, systemic, and environmental Physiology;  
Volume 178, Number 6, 755-765, DOI: 10.1007/s00360-008-0266-8)

## 9 DANKSAGUNG

---

**Mein Dank gilt:**

## 10 ERKLÄRUNG

---

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, Januar 2012

-----  
Stefanie Stieb

**11 CURRICULUM VITAE**

---