

**STRUKTUR UND FUNKTION DES  
LIPOPROTEINS  
VON *NEREIS VIRENS*  
(ANNELIDA)**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades

**„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“**

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sven Schenk

Geboren am 07.10.1976 in Groß-Gerau

Mainz, im September 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2009

*„None but those who have experienced them can conceive the enticements of science. In other studies you go as far as others have gone before you, and there is nothing more to know; but in scientific pursuit there is continual food for discovery and wonder’*

*-Victor Frankenstein (Frankenstein, Shelley 1818)-*

## Veröffentlichungen

**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

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

## Tagungsbeiträge

**Schenk S**, Hoeger U (2004) Characterization of a lipoprotein in the polychaete annelid *Nereis virens*. 97. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Rostock.

Hoeger U, Felber B, **Schenk S** (2007) Lipoprotein-mediated lipid transport during gametogenesis in Nereidid polychaetes. 11. Tagung der International Society of Invertebrate Reproduction & Development, Ciudad de Panamá.

**Schenk S**, Hoeger U (2008) Lipoprotein receptors in the polychaete *Nereis virens*. 101. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Jena.

Hoeger U, Felber B, **Schenk S** (2008) Lipoprotein mediated lipid uptake in oocytes of *Platynereis dumerilii* (Polychaeta). 101. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, Jena.

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.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>EINLEITUNG</b>	<b>2</b>
1 Lipide	2
1.1 Definition und Klassen	2
1.2 Biologische Funktionen	4
2 Lipoproteine	4
2.1 Apolipoproteine	8
2.2 Strukturelle Eigenschaften	11
2.3 Lipidmatrix	12
2.4 Lipoproteine und das Immunsystem	12
3 Lipoproteinrezeptoren	13
4 Glycoproteine	15
5 Lipidtransport	16
5.1 Lipidtransport während der Geschlechtsreifung	17
6 Ziele der Arbeit	19
<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>21</b>
1 Tiere	21
1.1 <i>Nereis virens</i>	21
1.2 <i>Platynereis dumerilii</i>	21
2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
3 Standardlösungen/-substanzen	24
3.1 Puffer	24
3.2 Antikörper	25
3.2.1 Primäre Antikörper	25
3.2.2 Sekundäre Antikörper	25
3.3 Enzyme	25
3.4 Lektine/Avidin	25
4 Experimentelles Vorgehen	26
4.1 Lipoprotein-Isolierung	26
4.1.1 Gewinnung von Coelomflüssigkeit aus <i>Nereis virens</i>	26

4.1.2	Lipoprotein-Isolierung durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	26
4.1.3	Dichtebestimmung	28
4.1.4	Entsalzen der Lipoproteine durch Dialyse	28
4.2	Lipoproteinrezeptor-Isolierung	29
4.2.1	Isolierung von Coelomocyten aus <i>Nereis virens</i>	29
4.2.2	Membran-Isolierung	30
4.2.3	Lipoproteinrezeptor-Isolierung durch Affinitätschromatographie	31
4.3	Proteinbestimmung mit dem BCA-Test	33
4.4	Gelelektrophoresen	34
4.4.1	Reduzierende SDS-PAGE	34
4.4.2	Nicht-reduzierende SDS-PAGE	36
4.4.3	Färbung von Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blue	36
4.5	Blots	37
4.5.1	Western-Blots	39
4.5.2	Liganden-Blots	40
4.5.3	Lektin-Blots	41
4.6	Analytische Ultrazentrifugation	42
4.6.1	Sedimentationslauf	42
4.6.2	Gleichgewichtslauf	44
4.7	Lipidanalytik	45
4.7.1	Lipidextraktion	45
4.7.2	Bestimmung des Totallipidgehaltes nach der Phospho-Sulpho-Vanillin-Methode	46
4.7.3	Bestimmung des Phospholipidgehaltes mit 8-Anilin-1-naphthalinsulfonsäure (ANS)	46
4.7.4	Dünnschichtchromatographie (DC) von Lipiden	47
4.7.5	Lipidklassenquantifizierung mittels HPLC-ELSD	48
4.8	Spektroskopie	50
4.8.1	Absorptionsspektroskopie	50
4.8.2	Circular Dichroismus-Spektroskopie	50
4.9	Chemisches Crosslinking	51
4.10	Limitierte Proteolyse	51

4.11	Kohlenhydratanalytik	52
4.11.1	Oligosaccharidanalyse	52
4.11.2	Monosaccharidanalyse	54
4.12	Gelfiltration (SEC)	55
4.13	Proteinpräzipitationen	56
4.13.1	Chloroform-Methanol-Fällung	56
4.13.2	Acetonfällung	57
4.14	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	57
4.14.1	Beschichtung der Kupfernetzchen mit Kohlenstoff	57
4.14.2	Probenvorbereitung für die TEM auf Continuous-Carbon	58
4.15	Aufnahmestudien	59
4.15.1	Zellisolierung	59
4.15.2	Fluoreszenzmarkierung von Lipoproteinen	60
4.15.3	Zellinkubation	62
<b>ERGEBNISSE</b>		<b>63</b>
1	Lipoproteine	63
1.1	Lipoprotein-Isolierungen	63
1.2	KBr-Flotation	63
1.2.1	Selbstgenerierender KBr-Dichtegradient	64
1.3	Dichtebestimmungen	64
1.4	Natives Molekulargewicht	65
1.4.1	Analytische Ultrazentrifugation	65
1.4.2	Gelfiltration	68
1.5	Sedimentationskoeffizient	69
1.6	Molarer Extinktionskoeffizient	70
1.7	Charakterisierung der Apolipoproteine	71
1.7.1	Sekundärstrukturen der Apolipoproteine	71
1.7.2	Stöchiometrie	72
1.7.3	Disulfidbrücken	73
1.7.4	Limitierte Proteolyse	74
1.7.5	Kohlenhydratzusammensetzung der Apoproteine	75
1.8	Lipidzusammensetzung	78

1.8.1	Dünnschichtchromatographie	78
1.8.2	HPLC-ELSD	79
1.8.3	Totallipidgehalt	81
1.8.4	Phospholipidgehalt	81
2	Lipoproteinrezeptoren	82
2.1	Lipoproteinrezeptorisolierung	82
2.2	Charakterisierung des <i>Nereis</i> -Lipoproteinrezeptors	83
2.2.1	Gewebespezifität	83
2.2.2	Bindungseigenschaften	84
2.2.3	Glycosylierung	84
3	<i>In vitro</i> Aufnahmestudien des isolierten Lipoproteins	86
3.1	DiI-markiertes Lipoprotein	86
3.2	FITC-markiertes Lipoprotein	88
3.3	Doppelinkubation mit FITC- und DiI-markiertem Lipoprotein	89
3.4	Spermatogonien und Elaeocyten	91
3.4.1	Elaeocyten	91
3.4.2	Spermatogonien	92
4	Nachweis des <i>Nereis</i> -Lipoproteins in verschiedenen Zelltypen	94
4.1	Reisolation und Charakterisierung der Fraktionen	94
4.2	Elektronenmikroskopie	96
<b>DISKUSSION</b>		<b>98</b>
1	Lipoproteine	98
1.1	Isolationen	98
1.2	Dichte	98
1.3	Natives Molekulargewicht	99
1.4	Sedimentationskoeffizient	101
1.5	Molarer Extinktionskoeffizient	103
1.6	Charakterisierung der Apolipoproteine	103
1.6.1	Sekundärstrukturen der Apolipoproteine	103
1.6.2	Stöchiometrie	106
1.6.3	Disulfidbrücken	106
1.6.4	Limitierte Proteolyse	107



1.6.5	Kohlenhydratzusammensetzung der Apoproteine	108
1.7	Lipidzusammensetzung	110
2	Lipoproteinrezeptoren	116
2.1	Lipoproteinrezeptorisolierung	116
2.2	Charakterisierung	117
2.2.1	Gewebespezifität	117
2.2.2	Bindungseigenschaften	120
2.2.3	Glycosylierung	121
3	Aufnahmestudien	123
3.1	Aufnahme des <i>Nereis</i> -Lipoproteins in Eizellen verschiedener Größe	123
3.1.1	Die Aufnahme von DiI- und FITC-Lipoprotein im Vergleich	124
3.1.2	Lokalisation der Lipoprotein-Lipide und der Apolipoproteine nach der Aufnahme in die Zellen	126
3.2	Spermatogonien und Elaeocyten	127
4	Nachweis des <i>Nereis</i> -Lipoproteins in verschiedenen Zelltypen	129
5	Fazit und Ausblick	133
5.1	Fazit	133
5.2	Ausblick	136
	<b>LITERATUR</b>	<b>139</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>158</b>
1	Verwendete Abkürzungen	158
2	Umrechnung der Skalenteile des Krüss HR 900 in den Brechungsindex	159
3	Schema der Lipoproteinisolierung	160
4	Schema der Lipoproteinrezeptor-Isolierung	161
5	Dichten der <i>Nereis</i> -Lipoprotein-Komponenten (Lipide und Kohlenhydrate)	162
5.1	Lipide	162
5.2	Kohlenhydrate	163
6	Berechnung des Hydratwassergehaltes	164
7	Berechnung des Lipid-, beziehungsweise des Kohlenhydratgehaltes des <i>Nereis</i> -Lipoproteins	165
7.1	Kohlenhydratgehalt	165
7.2	Lipidgehalt	166

8	ANS-Fluoreszenz	167
9	Fluoreszenzspektren von FITC und DiI	168
10	Physikalisch-chemische Parameter des <i>Nereis</i> -Lipoproteins	169
11	Lebenslauf	170
12	Veröffentlichungen	171
	<b>ERKLÄRUNG</b>	<b>190</b>
	<b>DANKE</b>	<b>191</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

Ein discoidales Lipoprotein aus dem Polychaeten *Nereis virens* (Annelida) wurde eingehend charakterisiert. Im Vordergrund standen dabei die transportierten Lipide, sowie die Ultrastruktur des Partikels. Das *Nereis*-Lipoprotein besitzt eine für Invertebraten atypische Lipidzusammensetzung: Außer den Phospholipiden gibt es keine klar dominierende Lipidklasse. Die Charakterisierung der Apolipoproteine zeigt Gemeinsamkeiten mit den Apolipoporphinen der Insekten: Wie diese besitzt das *Nereis*-Lipoprotein zwei Apolipoproteine, die in einer 1:1-Stöchiometrie angeordnet sind. Das größere Protein (ApoNvLp I) ist dabei stärker zum wässrigen Medium exponiert als das kleinere (ApoNvLp II). Beide Proteinuntereinheiten sind N-glycosyliert. ApoNvLp II ist zusätzlich noch O-glycosyliert. Bei den Sekundärstrukturen dominieren  $\beta$ -Strukturen (35%) gegenüber  $\alpha$ -Helices (14%); 28% waren ungeordnete Strukturen. Die Masse wurde mit verschiedenen Methoden bestimmt: sie liegt zwischen  $\sim 800$  kDa (Gelfiltration) und  $\sim 860$  kDa (Analytische Ultrazentrifugation). Der Sedimentationskoeffizient beträgt 9,7 S.

Der zelluläre Lipoproteinrezeptor wurde aus einer großen Anzahl von Zellen und Geweben isoliert. Die biochemische Charakterisierung des Rezeptormoleküls zeigte es als ein monomeres, integrales, N- und O-glycosyliertes Membranprotein mit einer Masse von  $\sim 114$  kDa. Die Bindungscharakteristika (Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ , Disulfidbrücken) weisen es als Mitglied der LDLR-Superfamilie aus.

*In vitro*-Inkubationsversuche mit fluoreszenzmarkierten Lipoproteinen zeigten die Aufnahme sowohl in Oocyten als auch in freie Coelomzellen (Elaeocyten) sowie in Spermatoгонien- und Tetradenstadien. Auffällig war, dass die Lipide zusammen mit den Apolipoproteinen in die Dottergranula der Eizellen eingelagert wurden und nicht direkt in die Lipidtropfen. Auch bei den Elaeocyten wurden die Lipide nicht direkt in den Lipidtropfen eingelagert.

Intakte Lipoproteine konnten per Dichtegradienten-Ultrazentrifugation nur aus Spermatoгонien isoliert werden. Die isolierten Lipoproteine hatten die gleiche ‚Morphologie‘ wie die aus der Coelomflüssigkeit isolierten, zeigten jedoch sehr viele Peptidfragmente im SDS-Gel, was auf eine beginnende Degradation hinweist.

Es wird ein Modell für den Lipidtransport in *Nereis virens* vorgeschlagen, bei dem den Elaeocyten eine entscheidende Rolle im Lipidstoffwechsel zufällt.

# EINLEITUNG

## 1 LIPIDE

### 1.1 DEFINITION UND KLASSEN

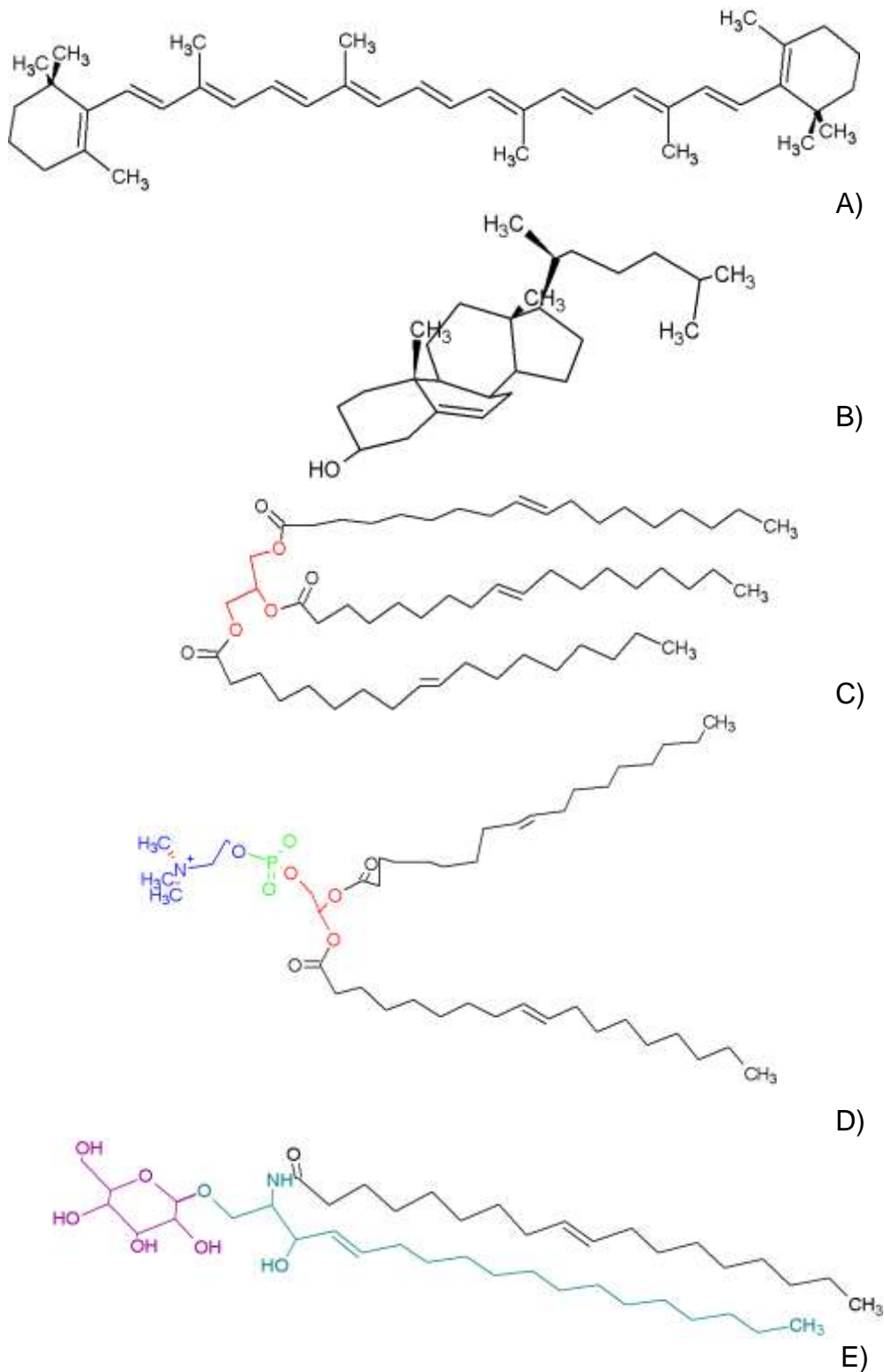
Lipide stellen eine sehr heterogene, nur durch ihre physikalischen und nicht durch ihre chemischen Eigenschaften charakterisierte Stoffklasse dar, deren Mitglieder keinerlei strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen. Im Allgemeinen sind Lipide nur durch ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln wie z.B. Hexan, Ether, Chloroform oder Benzol definiert (z.B. Christen und Jaussi 2004).

Die Lipide als solche lassen sich anhand ihrer physikalischen Eigenschaften in verschiedene Klassen unterteilen. So unterscheidet man zum Einen die **Neutrallipide**, die sich nur in extrem hydrophoben Lösungsmitteln (z.B. Hexan oder Chloroform) lösen und aus einer oder zwei chemischen Substanzen bestehen, zum Anderen die **Komplexlipide**, die sich aus drei oder mehr chemischen Substanzklassen zusammensetzen und eine gewisse Polarität zeigen. Zu der ersten Klasse gehören z.B. Triacylglyceride und Sterolester, zur zweiten Klasse die sogenannten Phospholipide und Glycolipide, deren charakteristisches Merkmal der Phosphorsäure- bzw. der Kohlenhydratrest des Moleküls ist (<http://www.cyberlipid.org/cyberlip/desc0004.htm#top>). Weiter lassen sich die Lipide auch aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften unterteilen. Laut Latscha und Klein (1993) sind dies (siehe auch Abb. 1 nächste Seite):

1. nicht-hydrolysierbare Lipide wie z.B.  $\beta$ -Carotin, Cholesterin oder Stearinsäure
2. Ester wie Triacylglyceride, Wachse oder Cholesterinester
3. Phospholipide
4. Glycolipide

Während innerhalb der Stoffklasse der Lipide keine einheitliche Struktur zu beobachten ist, so kann man innerhalb der Unterklassen durchaus strukturelle Gemeinsamkeiten erkennen. Die Grundstruktur der meisten Speicher- und Phospholipide ist sehr einheitlich gehalten. Das Gerüst besteht aus Glycerin, einem dreiwertigen Alkohol, mit dessen Hydroxylgruppen entweder zwei (Diacylglyceride) oder drei (Triacylglyceride) Fettsäuren verestert sind. Bei den Phospholipiden ist eine Hydroxylgruppe des Glycerins mit einem Phosphorsäurerest verestert. Dieser wiederum ist meistens mit einem Alkohol, z.B.

Ethanolamin, Serin oder Cholin, verknüpft. Die beiden anderen freien Hydroxylgruppen des Glycerins stehen dann für die Bindung von Fettsäuren zur Verfügung (Stryer et al. 2003).



**Abb. 1:** Strukturen von repräsentativen Vertretern der verschiedenen Lipidklassen. A)  $\beta$ -Carotin. B) Cholesterin: beides Vertreter der nicht-hydrolysierbaren Lipide. C) Triolein, ein Ester. D) Dioleoylphosphatidylcholin, ein Phospholipid. E) Cerebroside, ein Glycolipid. Hydrophobe Anteile sind schwarz, Glycerinreste rot, Phosphate hellgrün, Aminoalkohole blau, Sphingosin blau-grün und Kohlenhydrate lila dargestellt. Nach Stryer et. al. (2003).

## 1.2 BIOLOGISCHE FUNKTIONEN

Lipide, vor allem die Komplexlipide (Phospholipide und Glycolipide), stellen zusammen mit Cholesterin und den Membranproteinen essentielle Bestandteile der Zellmembranen dar. Dabei bilden die Phospholipide die Lipiddoppelschicht und können somit als Hauptbestandteil von Biomembranen gelten. In die Doppelschicht sind, abhängig von Organismus und Zelltyp, verschiedene Membranproteine, Cholesterin sowie Glycolipide eingelassen (Stryer et al. 2003).

Eine weitere wichtige Bedeutung haben die Lipide im Energiehaushalt der Lebewesen. Lipide können aufgrund ihres apolaren Charakters ohne Einlagerung von Hydratwasser gespeichert und somit wesentlich dichter gepackt werden als andere Speicherstoffe wie z.B. Kohlenhydrate. Des Weiteren sind Lipide höher reduziert als Kohlenhydrate und Proteine und liefern dadurch mehr Reduktionsäquivalente in der biologischen Oxidation. Somit übersteigen sie mit ihrem Brennwert von 39,3 kJ/g denjenigen von Kohlenhydraten (17,6 kJ/g) und von Proteinen (18 kJ/g, Wehner und Gehring 1995, Stryer et al. 2003) erheblich. Als Speicherlipide kommen hauptsächlich Triacylglyceride vor (Hauerland und Bowers 1987, Cunningham et al. 1994, Stryer et al. 2003). In einigen marinen Invertebraten sind jedoch auch Wachsester weit verbreitet (Benson und Lee 1975).

Neben der Bildung von Zellkompartimenten und als Energiereserven spielen Lipide auch als Pigmente (z.B.  $\beta$ -Carotin), Vitamine (A, E und D) und als Hormone eine Rolle, wie z.B. die Prostaglandine der Wirbeltiere, die sich von Arachidonsäure (einer C<sub>20</sub>-Fettsäure) ableiten. Aber auch Sexualhormone wie die Östradiole und Testosterone sind als Abkömmlinge des Cholesterins ebenfalls Lipide (Stryer et al. 2003).

## 2 LIPOPROTEINE

Da Lipide per Definition hydrophobe Moleküle sind, stellt ihre Mobilisierung den Organismus mit seinem hydrophilen Milieu vor erhebliche Probleme. Aus diesem Grund sind in der Evolution Carrier-Proteine mit amphiphilen Charakter für diese hydrophoben Substanzen entstanden, die **Lipoproteine**. Lipoproteine bestehen zum Einen aus der Lipidmatrix und zum Anderen aus den die Lipide bindenden Apolipoproteinen.

Lipoproteine sind dynamische, makromolekulare Komplexe, die sich je nach Organismus und dessen physiologischen Zustand hinsichtlich Struktur und Zusammensetzung

unterscheiden. Bei den sehr gut untersuchten Wirbeltieren, insbesondere bei den Säugern, kennt man verschiedene Lipoproteinklassen. Deren Einschichtung im KBr-Dichtegradienten dient als universelle Klassifizierung (Havel et al. 1955). Man unterscheidet hierbei fünf Klassen (Tab. 1).

**TAB. 1:** Schwebdichte der verschiedenen Lipoproteinklassen in KBr (Havel et al. 1955, Chapman 1980).

Lipoprotein	Dichte in KBr [g/ml]
Very-low-density lipoproteins ( <b>VLDL</b> )	<1,006
Intermediate-density lipoproteins ( <b>IDL</b> )	1,006-1,019
Low-density lipoproteins ( <b>LDL</b> )	1,020-1,063
High-density lipoproteins ( <b>HDL</b> )	1,064-1,210
Very-high-density lipoproteins ( <b>VHDL</b> )	>1,211

Aus Tabelle 1 geht hervor, dass die Dichten der verschiedenen Lipoproteine von fast nur Lipid ( $\rho = 0,9$  g/ml) bis fast nur Protein ( $\rho = 1,35-1,40$  g/ml) (Carraway et al. 2000, Fischer et al. 2004) reichen. Es ist anzumerken, dass im Wirbeltierblut zusätzlich noch sogenannte Chylomikronen vorkommen, die von ihrer Dichte her als VLDL zu klassifizieren sind.

Da Lipoproteine, insbesondere VLDL und seine metabolischen Produkte, IDL und vor allem LDL, bei vielen Krankheiten, so z.B. der Arteriosklerose, eine entscheidende Rolle spielen, sind sie besonders im Säugersystem hervorragend charakterisiert (Havel et al. 1955, Mayes 1990, Hevonoja et al. 2000, Khovidhunkit et al. 2004, Shelness und Ledford 2005). Aber auch HDL ist im Säugersystem bestens untersucht, da es den sogenannten reversen Cholesterintransport, dem eine anti-arteriosklerotische Wirkung nachgesagt wird, bewerkstelligt (Fielding und Fielding 1994, Yokoyama 1998).

Lipoproteine sind nicht nur bei Wirbeltieren, sondern auch bei zahlreichen Wirbellosen gut erforscht. Eine herausragende Position nehmen die fliegenden Insekten ein, da deren Flugmetabolismus äußerst energieaufwendig ist und sie in erhöhtem Maße Lipide verbrennen. Bei den Insekten werden die Lipoproteine **Lipophorine** genannt, um sie von den Lipoproteinen der Wirbeltiere abzugrenzen. Letztere werden im Gegensatz zu den Lipophorinen in den Zielzellen degradiert (Chino et al. 1981, Rodenburg und van der Horst 2005), Lipophorine hingegen funktionieren nach dem sogenannten ‚reusable-shuttle‘-Prinzip (Van der Horst 1990, Van der Horst et al. 2002, Van Hoof et al. 2002, Rodenburg und van der Horst 2005). Die Lipophorine liegen meist in Form von HDL-

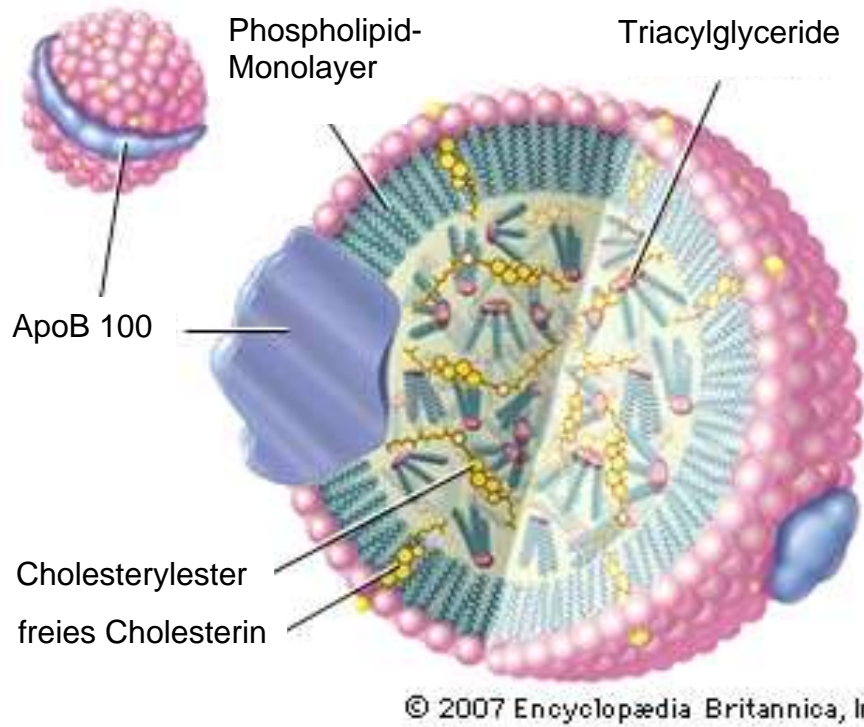
Partikeln (HDLp) vor. Starten die Insekten zum Flug, nehmen diese Partikel durch die Einwirkung von adipokinetischen Hormonen Lipide auf und werden zu LDLp (Low-density lipophorin, Van der Horst 2003).

Weiterhin gut untersucht sind verschiedene Crustaceenarten, besonders die wirtschaftlich interessanten Garnelen (Yepiz-Plascencia et al. 1995, Lubzens et al. 1997, Yepiz-Plascencia et al. 1998). Aber auch zu Krabben und einigen marinen Langschwanzkrebsen sowie Flusskrebsen sind Studien vorhanden (Lee und Puppione 1978, Puppione et al. 1986, Spaziani et al. 1986, Hall et al. 1995, Stieb 2007, Stieb et al. 2008). Auffällig ist, dass es (jedenfalls bisher) nur HDL zu geben scheint (auf die zu den VHDL gehörenden ‚Clotting-Proteine‘ wird hier nicht näher eingegangen).

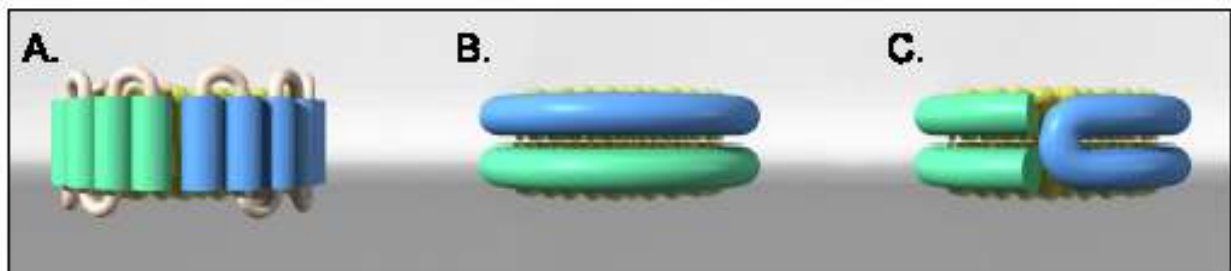
Untersuchungen bei anderen Invertebraten sind bei weitem nicht so zahlreich durchgeführt worden wie bei den eingehend beschriebenen Gruppen. Die Lipoproteine der Cheliceraten scheinen generell denen der Insekten zu ähneln (Haunerland und Bowers 1987, Cunningham et al. 1994, Rehn und Lee 1994, Cunningham et al. 2007), während die Lipoproteine der Mollusken bezüglich ihrer Apolipoproteine sehr uneinheitlich zu sein scheinen (Heras und Pollero 1992, Pollero et al. 1992, Garín und Pollero 1995, Heras und Pollero 2002). Das HDL des Polychaeten *Nereis virens* hingegen weist wiederum Ähnlichkeiten mit den Lipoproteinen von Insekten und Crustaceen auf (Schenk 2003, Schenk et al. 2006).

Die meisten Lipoproteine haben eine globuläre Form (Mayes 1990, Chatterton et al. 1991, Soulages und Brenner 1991, Hevonoja et al. 2000, Stryer et al. 2003), d.h. man kann sie sich als ‚Lipidtröpfchen‘ umgeben von einem Protein vorstellen (Abb. 2 nächste Seite). Das humane HDL liegt zumindest im naszierenden Zustand als discoidales Protein vor (Abb. 3 nächste Seite), welches dann durch den Einfluss der Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase (LCAT; EC 2.3.1.43) zu einem sphärischen Partikel reift (Fielding und Fielding 1994, Yokoyama 1998), dessen Form durch die kontinuierliche Einlagerung von Cholesterylestern bestimmt wird. Lipoproteine, die auch in ihrer ‚reifen‘ Form discoidal sind, scheinen jedoch auf Wirbellose beschränkt zu sein. So sind die Lipoproteine der meisten Crustaceen discoidal und auch die Lipoproteine des Polychaeten *Nereis virens* scheinen einen Diskus darzustellen (Lee und Puppione 1978, Spaziani et al. 1986, Harris et al. 2001, Schenk 2003, Schenk et al. 2006, Stieb 2007, Stieb et al. 2008).





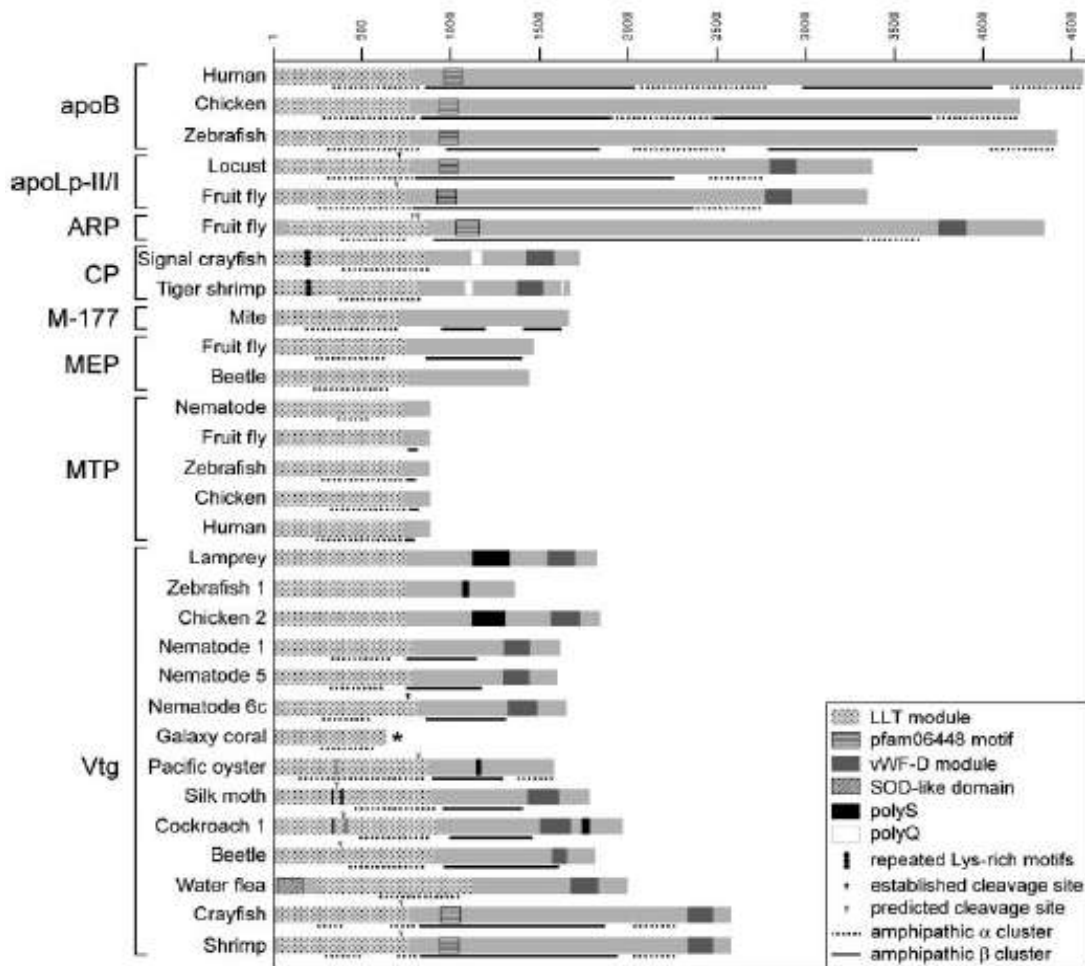
**Abb. 2:** Schematische Struktur eines humanen LDL. Verändert nach <http://concise.britannica.com/ebc/art-92254/Cutaway-view-of-a-low-density-lipoprotein-complex-The-LDL>.



**Abb. 3:** Humanes discoidales HDL. Möglichkeiten der Apoproteinanordnung. A) ‚Picket-fence‘-Modell. B) ‚Double-Belt‘-Modell. C) ‚Hair-Pin‘-Modell. Die Apolipoproteine sind grün und blau dargestellt, die Lipide im Inneren gelb. Aus Martin et al. (2006).

## 2.1 APOLIPOPROTEINE

Die Proteinanteile der Lipoproteine, die Apolipoproteine, sind definiert durch ihre Lipidbindedomäne (das LLT-Modul) und bilden die Familie der ‚large lipid transfer proteins‘ (LLTP). Die Lipidbindedomäne stellt eine hochkonservierte Region am N-Terminus des jeweiligen Proteins dar und umfasst ca. 900 Aminosäuren (Abb. 4).

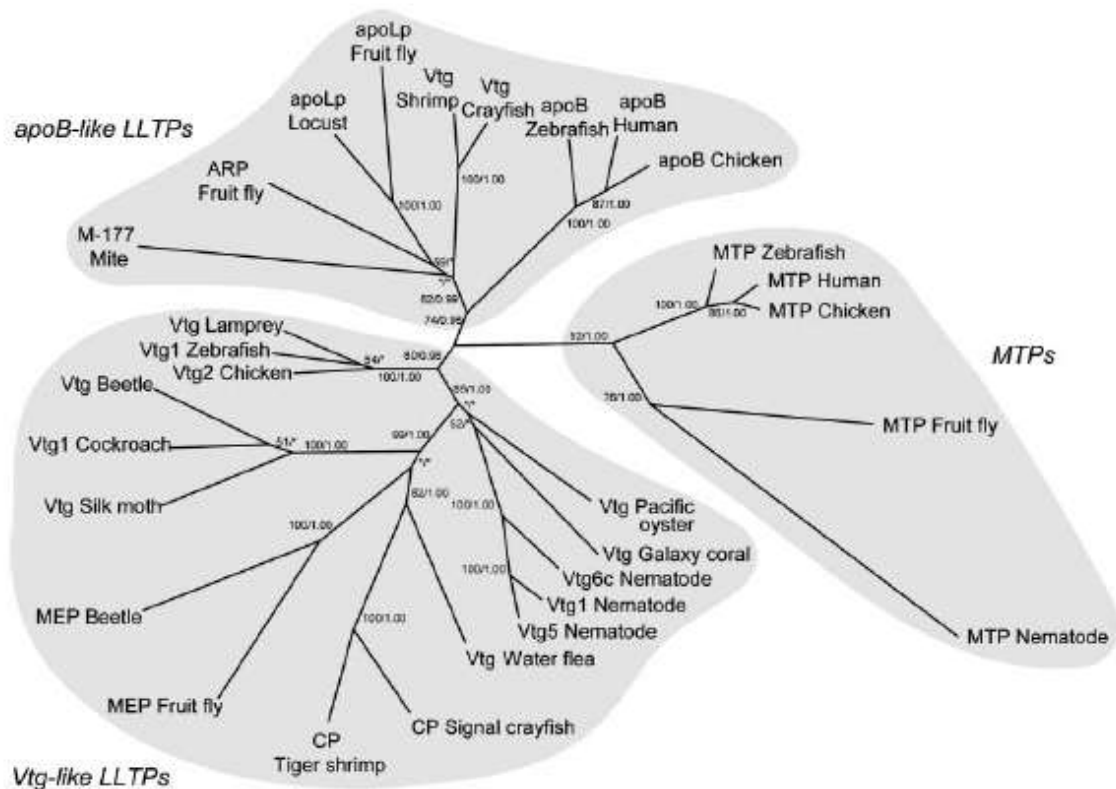


**Abb. 4:** Molekulare Architektur der LLTP. Aus Smolenaars et al. (2007b).

Anhand ihrer Sequenz kann man die LLTP nach Smolenaars et al. (2007b) in drei Gruppen unterteilen (Abb. 5, nächste Seite):

1. apoB-ähnliche LLTPs
2. Vitellogenin-ähnliche LLTPs
3. MTP-ähnliche LLTPs

Die Gemeinsamkeiten der LLTP liegen in ihren Lipidbindeeigenschaften, in ihren Funktionen unterscheiden sie sich jedoch erheblich. So spielen die apoB-ähnlichen LLTPs beim Lipidtransport eine Rolle, wohingegen die MTP-ähnlichen LLTP für



**Abb. 5:** Stammbaum der LLTP Superfamilie. Aus Smolenaars et al. (2007b).

die initiale Bereitstellung von Lipiden und hydrophoben Interaktionsflächen bei der Biosynthese von apoB-ähnlichen LLTP verantwortlich sind. Die Vitellogenin-ähnlichen LLTP wiederum stellen im Allgemeinen die Dotterproteine dar und sind somit meist auf das weibliche Geschlecht beschränkt. Eine Ausnahme sind die geschlechtsunabhängigen ‚Clotting-Proteine‘ der Crustaceen, die in Stammbäumen mit Vitellogenin-ähnlichen LLTP gruppiert werden (Hall et al. 1999, Smolenaars et al. 2007b).

Der Prototyp der apoB-ähnlichen LLTP, das Apolipoprotein B 100, ist ein Polypeptid mit einer molekularen Masse von ~540 kDa (Segrest et al. 2001). Die Apolipophorine der Insekten hingegen setzen sich aus zwei verschiedenen Apolipoproteinen, Apolipophorin I und II, zusammen. Diese beiden Peptide werden als ein Propeptid, Apolipophorin II/I, synthetisiert und anschließend von einer Furin-Protease in die Apolipophorine II und I gespalten (Smolenaars et al. 2005). Die beiden ‚reifen‘ Apolipophorine I und II besitzen molekulare Massen von 220-250 kDa und 70-85 kDa. Bei manchen Insekten findet sich noch ein drittes Apolipophorin, Apolipophorin III, welches eine Masse von 17-20 kDa besitzt und starke strukturelle und sequenzbasierte Ähnlichkeiten zum (humanen) Apolipoprotein E aufweist (Rodenburg und van der Horst 2005, Leon et al. 2006, Weers und Ryan 2006). Während die Anzahl von Apolipophorin III-Molekülen pro Lipophorin

mit zunehmender Lipidbeladung steigt, ist die Anzahl der Apolipoporphine I und II immer jeweils eins (Ryan et al. 1986, Ryan et al. 1990).

Bei den ebenfalls gut untersuchten Crustaceen ist die Situation bei den Apolipoproteinen sehr unübersichtlich. Während in den meisten Arbeiten von einem Apolipoprotein die Rede ist (Lee und Puppione 1978, Puppione et al. 1986, Haunerland und Bowers 1989, Hall et al. 1995, Yepiz-Plascencia et al. 1995, Lubzens et al. 1997, Yepiz-Plascencia et al. 1998, Vargas-Requena et al. 2002), findet sich auch eine Studie, in der von zwei Apolipoproteinen in Süßwasserkrebsen und drei Apolipoproteinen in marinen Crustaceen berichtet wird (Komatsu et al. 1993). Es gibt auch einige widersprüchliche Befunde. So finden Spaziani und Mitarbeiter in der Krabbe *Cancer antennarius* drei Apolipoproteine (Spaziani et al. 1986, Spaziani et al. 1995), wohingegen Puppione et al. (1986) in der gleichen Art lediglich ein Apolipoprotein beschreiben. Geht man von der überwiegenden Mehrheit der Studien aus, so besitzen Crustaceen ein Apolipoprotein mit einer molekularen Masse von 100-110 kDa (Lee und Puppione 1978, Puppione et al. 1986, Haunerland und Bowers 1989, Hall et al. 1995, Yepiz-Plascencia et al. 1995, Lubzens et al. 1997, Yepiz-Plascencia et al. 1998, Vargas-Requena et al. 2002). Eine Ausnahme scheint der Galizische Sumpfkrebs *Astacus leptodactylus* darzustellen, da es hier zwei unterschiedliche HDL in der Hämolymphe gibt, von denen eines das bekannte Apolipoproteinmuster mit einer 110 kDa Untereinheit zeigt und das andere zwei Apolipoproteine mit Massen von 240 und 85 kDa besitzt (Stieb et al. 2008).

Die Apoproteinstruktur anderer Invertebraten ist weniger gut untersucht. Bei den Cheliceraten scheinen sich wie bei den Insekten ebenfalls zwei Apolipoproteine zu finden, die molekulare Massen von 250 und 85 kDa aufweisen, wobei es auch hier Ausnahmen gibt (Haunerland und Bowers 1989, Rehn und Lee 1994, Cunningham et al. 2007). Ein ähnliches Muster findet sich bei dem einzigen bislang untersuchten Lipoprotein eines Polychaeten (*Nereis virens*) (Schenk 2003, Schenk et al. 2006). Bei den bisher erforschten Molluskenarten finden sich wesentlich kleinere Apolipoproteine. Ihre Massen liegen im Bereich von 15-20 kDa für das LDL und bei 70 kDa für das HDL der Apfelschnecke *Pomacea canaliculata* (Heras und Pollero 2002). Die Apolipoproteine der Cephalopoden-Lipoproteine hingegen scheinen hinsichtlich ihrer Größe sehr uneinheitlich zu sein. So wurden im Octopus *Octopus tehuacanus* drei verschiedene Apolipoproteine mit molekularen

Massen von 129, 230 und 340 kDa entdeckt, von denen zumindest das letztgenannte eine Hämocyaninuntereinheit zu sein scheint (Heras und Pollero 1992).

## 2.2 STRUKTURELLE EIGENSCHAFTEN

Charakteristisch für alle Mitglieder der apoB-ähnlichen LLTP ist der sogenannte amphiphile  $\beta$ -Cluster, der C-terminal des LLT-Motives liegt (Segrest et al. 2001, Smolenaars et al. 2007a) und irreversibel mit der Lipidmatrix interagiert.

Beim Prototyp Apolipoprotein B 100 unterscheidet man generell fünf strukturelle Abschnitte:  $\text{NH}_2\text{-}\beta\alpha_1\text{-}\beta_1\text{-}\alpha_2\text{-}\beta_2\text{-}\alpha_3\text{-COOH}$  (Segrest et al. 2001). Hierbei bilden  $\beta_1$  und  $\beta_2$  den oben erwähnten amphiphilen  $\beta$ -Cluster. Aufgrund der unterschiedlichen Längen dieses Clusters in den verschiedenen Tiergruppen (siehe Abb. 4) lassen sich die zum Teil erheblichen Unterschiede in den Sekundärstrukturen der unterschiedlichen Lipoproteine erklären.

So besitzt z.B. das humane Apolipoprotein B 100 37%  $\alpha$ -Helices, 17%  $\beta$ -Faltblätter, 20% Turns und 23% Coil-Strukturen (Johs et al. 2006), d.h. es überwiegen  $\alpha$ -Helices, wohingegen bei den HDLp der Insekten  $\beta$ -Faltblätter vorherrschen (Kawooya et al. 1989, Ryan et al. 1992). Auch bei den Crustaceen scheinen die  $\beta$ -Strukturen zu dominieren (Vargas-Requena et al. 2002). Erstaunlich ist in diesem Zusammenhang, dass solubilisiertes, d.h. entfettetes und in Detergenzien aufgenommenes Apolipoprotein B 100, eine nahezu gleiche Verteilung an Sekundärstrukturen aufweist (Johs et al. 2006). Eine Übersicht befindet sich in Tabelle 2.

**TAB. 2:** Übersicht über die verschiedenen Anteile an Sekundärstrukturen bei ausgewählten Lipoproteinen.

Organismus/Protein	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Schleifen	ungeordnet	Referenz
Mensch/LDL	37%	17%	20%	23%	(Johs et al. 2006)
Mensch/apoB 100 experimentell	40%	21%	19%	16%	(Johs et al. 2006)
Mensch/apoB 100 theoretisch	36%	23%	41%*		(Johs et al. 2006)
<i>M. sexta</i> /HDLp	34-36%	47-49%	15%*		(Ryan et al. 1992)
<i>L. migratoria</i> /HDLp	30%	58%	12%*		(Kawooya et al. 1989)
<i>P. vannamei</i> /HDL	20%	53%	27%*		(Vargas-Requena et al. 2002)

\*: Diese Werte wurden nicht weiter aufgeschlüsselt.

### 2.3 LIPIDMATRIX

So groß die Gemeinsamkeiten im Bezug auf die Apoproteine sind, so groß ist die Variabilität bezüglich der transportierten Lipide. Während bei allen Lipoproteinen die äußere Lipidschicht von Phospholipiden (aufgrund ihrer polaren Eigenschaften) und gegebenenfalls Cholesterin gebildet wird, unterscheiden sich die im Inneren der Lipidmatrix transportierten Lipide erheblich. Während es bei humanem LDL vorrangig Cholesterinester sind (Hevonoja et al. 2000), stellen Triacylglyceride die Majorität bei Cheliceraten, einigen Dipteren und blutsaugenden Insekten sowie in den LDL der Apfelschnecke (Cunningham et al. 1994, Rehn und Lee 1994, Heras und Pollero 2002, Pennington und Wells 2002) dar. Diacylglyceride repräsentieren die Mehrheit der Lipide bei fliegenden Insekten, bei Crustaceen und beim Polychaeten *Nereis virens* (Hall et al. 1995, Yepiz-Plascencia et al. 1995, Lubzens et al. 1997, Ryan und van der Horst 2000, Schenk et al. 2006, Stieb 2007).

### 2.4 LIPOPROTEINE UND DAS IMMUNSYSTEM

Vor allem bei Crustaceen spielen die Lipoproteine neben ihrer primären Funktion im Lipidstoffwechsel auch eine entscheidende Rolle in der Immunantwort und bei der Blutgerinnung (Hall et al. 1995). So wird das in der Hämolymphe gefundene HDL gleichzeitig auch als  $\beta$ -Glucan-Bindeprotein (BGBP) bezeichnet, welches für die ‚Freund-Feind-Erkennung‘ zuständig ist (Duvic und Söderhäll 1990, Thörnqvist et al. 1994), während das ebenfalls in der Hämolymphe vorliegende VHDL als ‚Clotting-Protein‘ fungiert und durch seine Substratfunktion für die Hämocyten-Transglutaminase für Wundverschluss und Pathogen-Einkapselung zuständig ist. Aus diesem Grund wird es auch manchmal als ‚Fibrinogen‘ bezeichnet (Kopáček et al. 1993, Hall et al. 1995, Hall et al. 1999).

Aber nicht nur bei Crustaceen haben die Hämolymphe-Lipoproteine eine Funktion in der innate Immunantwort. So konnte auch bei Insekten eine direkte Verbindung zur Hämolymphe-Koagulation gezeigt werden. Ähnlich wie bei den Crustaceen spielt hier auch die  $\beta$ -Glucan-Bindestelle eine Rolle (Duvic und Brehélin 1998, Chung und Ourth 2002). Selbst bei Vertebraten ist diese  $\beta$ -Glucan-Bindestelle noch vorhanden (Olsson et al. 2001), mit der die (V)LDL an Proteoglycane binden können. Dies dient zum Einen ihrem Katabolismus durch die Lipoprotein-Lipasen, zum Anderen der Regulation ihrer Sekretion aus der Leber (Williams et al. 1992, Fisher et al. 2001). Eben diese Bindestelle

ist aber auch ein Grund für die Entstehung arteriosklerotischer Plaques; die Lipoproteine interagieren mit der extrazellulären Matrix von geschädigten Blutgefäßendothelzellen und lagern sich dort an (Stryer et al. 2003, Khovidhunkit et al. 2004).

### 3 LIPOPROTEINREZEPTOREN

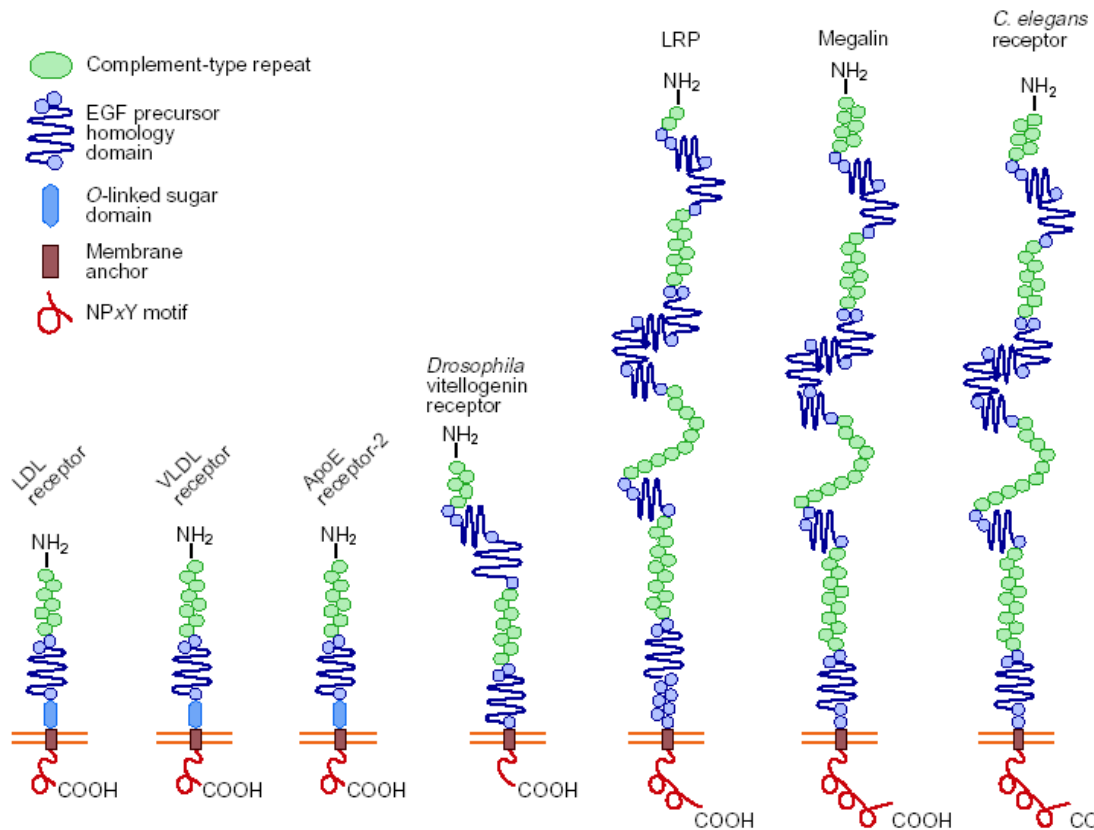
Lipoproteinrezeptoren vermitteln durch Endocytose die Aufnahme der Lipoproteine in ihre jeweiligen Zielzellen (Schneider 1989). Sie sind evolutiv hochkonservierte Membranproteine, die sich durch ihren modularen Aufbau auszeichnen. Zu diesen Modulen gehören nach Willnow (1999) von N-terminal (extrazellulär) nach C-terminal (intrazellulär):

- |               |   |   |
|---------------|---|---|
| extrazellulär | { | <ol style="list-style-type: none"> <li>1. die Ligandenbindedomäne</li> <li>2. die EGF-Vorläuferdomäne</li> <li>3. die O-glycosidisch gebundene Zuckerdomäne</li> <li>4. die Transmembrandomäne</li> <li>5. die cytoplasmatische Domäne</li> </ol> |
|---------------|---|---|

Während den extrazellulären Domänen der Rezeptoren entscheidende Funktionen bei der Ligandenerkennung zukommen, spielt die cytoplasmatische Domäne eine fundamentale Rolle für das weitere Schicksal des internalisierten Rezeptor-Lipoprotein-Komplexes. Bei Säugern fusionieren die endocytotischen Vesikel mit primären Lysosomen, in denen das Lipoprotein dann degradiert wird, wohingegen die endocytotischen Vesikel der Insekten einer Transferrin-ähnlichen Transcytose folgen (Rodenburg und van der Horst 2005, Van Hoof et al. 2005). Das Schicksal des Rezeptor-Lipoprotein-Komplexes, d.h. Fusion mit einem primären Lysosom oder Transcytose, hängt im entscheidenden Maße vom C-Terminus ab (Rodenburg et al. 2006). Außer bei der Endocytose von Lipoproteinen scheinen die Mitglieder der Lipoproteinrezeptor-Familie jedoch auch bei verschiedenen Signaltransduktionsprozessen beteiligt zu sein (Willnow et al. 1999, Schneider und Nimpf 2003).

Die Lipoproteinrezeptor-Familie umfasst die verschiedensten Proteintypen, so z.B. Megalin oder das ‚lipoprotein receptor related protein‘ (LRP), die alle dieselben strukturellen Ähnlichkeiten aufweisen und auch, aufgrund ihrer einzelnen membran-spannenden Domäne, als Typ I-Membranprotein zu charakterisieren sind (Willnow 1999). Die ‚eigentlichen‘ Lipoproteinrezeptoren stellen nur eine relativ kleine Subgruppe dar, die sich durch das einmalige Vorhandensein der einzelnen strukturellen Charakteristika

auszeichnet (Abb. 6). Sie sind mittelgroße Membranproteine, deren molekulare Massen meist zwischen 100 und 200 kDa liegen (Schneider et al. 1982, Cummings et al. 1983, Röhrkasten und Ferez 1986b, Schneider 1989, Tsuchida und Wells 1990, Hafer und Ferez 1991, Hafer et al. 1992, Lee et al. 2003b).



**Abb. 6:** Modularer Aufbau verschiedener Lipoproteinrezeptoren. Erkennbar sind die fünf Domänen. Die mehrmalige Wiederholung der strukturellen Merkmale bei Megalin und LRP ist sichtbar. Das NPxY-Motiv (-Asn-Pro-X-Tyr-) bewirkt das ‚Clustering‘ der Rezeptoren in Coated Pits. Aus Willnow et al. (1999).



## 4 GLYCOPROTEINE

Eine wichtige posttranslationale Modifikation von Proteinen ist die Glycosylierung. Wie nahezu alle extrazellulären Proteine und Membranproteine, sind auch Lipoproteine glycosyliert. Intrazelluläre Proteine hingegen, sind in der Regel nur schwach bzw. gar nicht glycosyliert (Kashiwazaki und Ikai 1985, Chan 1992, Weers et al. 1993, Helenius und Aebi 2001, Stryer et al. 2003, Trombetta 2003, Christen und Jaussi 2004). Je nach Art der Bindung der Kohlenhydrate an das Proteinrückgrat sind zwei verschiedene Typen von Proteinglycosylierungen zu unterscheiden (Stryer et al. 2003, Christen und Jaussi 2004):

1. N-glycosidisch gebundene Kohlenhydrate
2. O-glycosidisch gebundene Kohlenhydrate

Während letztere strukturell sehr heterogen und an Threonin bzw. Serin gebunden sind, lassen sich die N-glycosidisch gebundenen Kohlenhydrate in 3 Gruppen einteilen (Lodish et al. 1996):

1. den High-Mannose-Typ
2. den komplexen Typ
3. den Hybridtyp

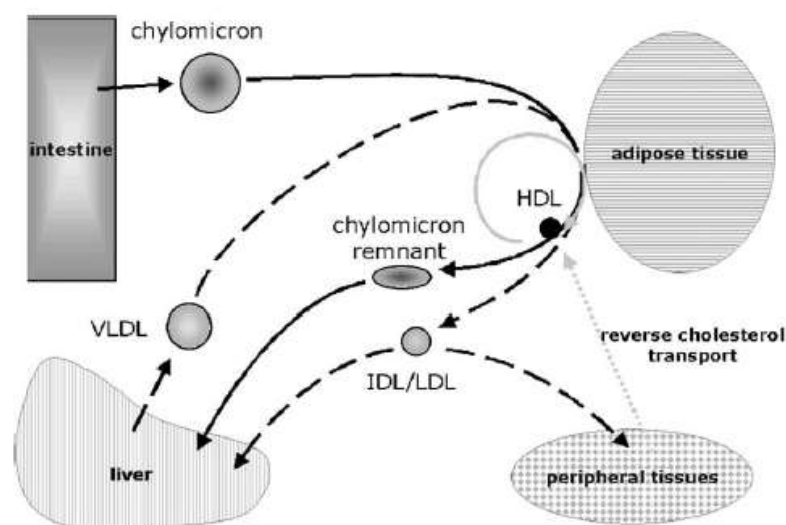
Ihrer Glycosylierung liegt im Gegensatz zu den O-glycosidisch gebundenen Kohlenhydraten eine Konsensussequenz, Asn-X-Ser/Thr, zugrunde, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht (Helenius und Aebi 2001, Stryer et al. 2003). Ein weiterer Unterschied liegt im Syntheseort der Modifikation. Während die O-Glycosylierung ausschließlich im Golgi-Apparat stattfindet, beginnt die N-Glycosylierung bereits im Endoplasmatischen Reticulum und wird im Golgi-Apparat fortgesetzt (Stryer et al. 2003).

Die Funktionen der Proteinglycosylierungen sind vielfältig, sie reichen von der Erhöhung der Löslichkeit der Proteine, der korrekten Proteinfaltung über den Schutz vor Proteasen und der Zell-Zell-Erkennung bis hin zur ‚Verankerung‘ von Proteinen in der Zellmembran (Liao und Chan 2001, Tsuboi und Fukuda 2001, Vukmirica et al. 2002, Stryer et al. 2003, Trombetta 2003, Christen und Jaussi 2004).

## 5 LIPIDTRANSPORT

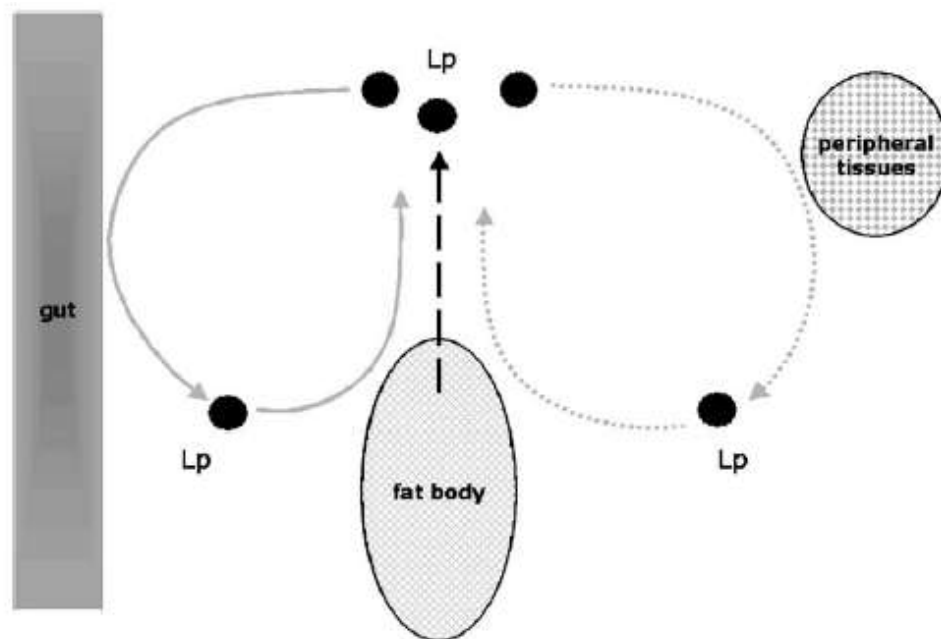
Generell sind zwei verschiedene Wege des Lipidtransportes zu unterscheiden. Zum Einen der Weg, wie er bei den Wirbeltieren beschriftet wird und zum Anderen der Weg, wie er bei den Insekten vorherrscht.

Bei den Wirbeltieren sind die beteiligten Proteine sehr vielfältig und die Aufgaben klar verteilt. So werden die Nahrungslipide vom Dünndarmgewebe durch sogenannte Chylomikronen und deren Katabolite, den Chylomikronen-Remnants, zur Leber transportiert. Dort wird ein Teil der Lipide verstoffwechselt und die restlichen Lipide zu Triacylglyceriden umgebaut. Aus der Leber werden die Triacylglyceride dann mittels VLDL ausgeschleust. Die VLDL reifen durch schrittweise Hydrolyse ihrer Triacylglyceride, vermittelt durch Lipoprotein-Lipasen, zu IDL und schließlich zu LDL, die dann durch den LDL-Rezeptor in die peripheren Zielgewebe oder die Leber aufgenommen werden. Dort wird das Apoprotein hydrolysiert und die Lipide in Fetttropfchen eingelagert (Mayes 1990, Gillian-Daniel et al. 2002). Der Transport der Lipide vom Speichergewebe zum Verbrauchsort erfolgt über die Serumalbumine, die die Lipide in Form von freien Fettsäuren transportieren (Stryer et al. 2003, Christen und Jaussi 2004). Andererseits dienen die HDL dazu, Cholesterin aus den peripheren Geweben zurück zur Leber zu transportieren, sie sind also für den ‚reversen Cholesterintransport‘ zuständig (Abb. 7) (Mayes 1990, Fielding und Fielding 1994, Yokoyama 1998).



**Abb. 7:** Schematische Übersicht über den Lipidtransport bei Wirbeltieren. Der Weg des Fettsäuretransportes mittels Albumin, sowie der Weg der HDL zurück zu Leber sind nicht dargestellt. Abkürzungen wie in Tabelle 1. Aus Rodenburg und van der Horst (2005).

Bei den Insekten hingegen fungieren die Lipophorine als sogenannte ‚reusable-shuttles‘, d.h. sie werden (im Normalfall) nicht in die Zielzellen aufgenommen und degradiert, sondern sie werden durch einen Lipidtransferpartikel und Lipoprotein-Lipasen mit Lipiden be- und entladen (Abb. 8). Ein weiterer wichtiger Unterschied ist, dass es bei Insekten nur einen Typ von Lipoprotein, das Lipophorin, gibt, während bei den Wirbeltieren verschiedene Lipoproteine vorhanden sind, die sich in ihrer Lipid- und Apoproteinzusammensetzung unterscheiden. Zwar können Lipophorine als HDLp oder LDLp vorliegen, sie sind jedoch immer nur metabolische Produkte desselben Lipoproteins (Tsuchida et al. 1997, Ryan und van der Horst 2000, Arrese et al. 2001, Canavoso und Wells 2001, Canavoso et al. 2001, Van der Horst et al. 2002, Rodenburg und van der Horst 2005).

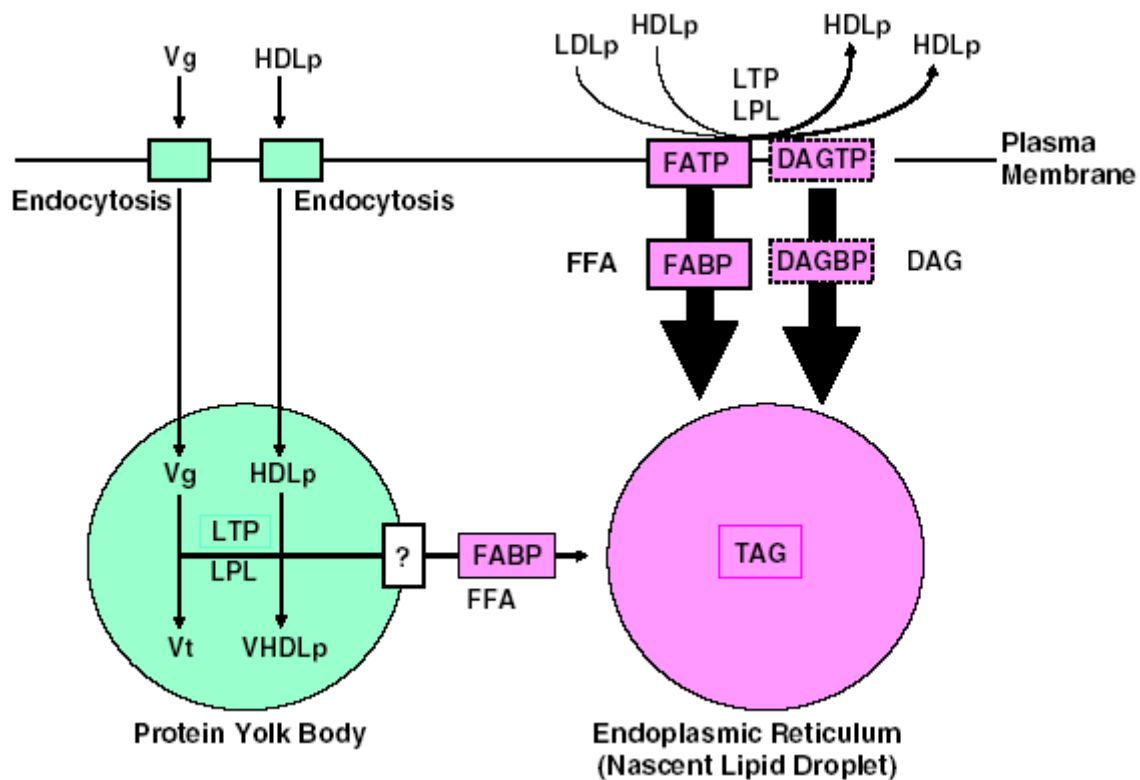


**Abb. 8:** Schematische Übersicht über den Lipidtransport bei Insekten. Abkürzungen: Lp: HD-/LD-Lipophorin. Aus Rodenburg und van der Horst (2005).

## 5.1 LIPIDTRANSPORT WÄHREND DER GESCHLECHTSREIFUNG

Die dominierenden Proteine in den Eizellen oviparer Organismen sind die Dotterproteine. Diese weibchenspezifischen Lipoproteine dienen in erster Linie dazu, dem sich entwickelnden Embryo Reservestoffe in Form von Aminosäuren und Lipiden zur Verfügung zu stellen (Ferenz 1990, Fischer et al. 1991, Komatsu und Ando 1992, Ferenz 1993, Hagedorn et al. 1998, Abousalham und Verger 2000, García-Alonso et al. 2006). Bei vielen oviparen Organismen nehmen die Eizellen jedoch zusätzlich auch

geschlechtsunabhängige Lipoproteine oder zumindest deren Lipide auf. Allerdings sind hierbei viele Prozesse noch nicht geklärt (Kawooya et al. 1988, Hayashi et al. 1989, Atella et al. 2006, Ziegler und van Antwerpen 2006). Ein hypothetisches Modell zur Aufnahme von Lipiden in die Insekten-Oocyte (Ziegler und van Antwerpen 2006) ist in Abb. 9 dargestellt.



**Abb. 9:** Hypothetisches Modell der Lipidaufnahme in Insekten-Eizellen. Hierbei werden die Lipide (Fettsäuren und Diacylglyceride) nach ihrer Entladung von den Lipophorinen durch intrazelluläre Bindeproteine der Neusynthese von Triacylglyceriden zugeführt (rosa dargestellt). Alternativ werden die Lipoproteinpartikel nach ihrer Endocytose zunächst in die Dottergranula aufgenommen, dort hydrolysiert, exportiert und dann erst zu neuen Lipiden aufgebaut (grün dargestellt). Die verwendeten Abkürzungen sind: DAG: Diacylglycerid, DAGBP: hypothetisches DAG-Bindeprotein, DAGTP: hypothetisches DAG-Transportprotein, FFA: Freie Fettsäure, FABP: Fettsäurebindeprotein, FATP: Fettsäuretransportprotein, HDLp: High-density lipophorin, LDLp: Low-density lipophorin, LPL: Lipoprotein-Lipase, LTP: Lipidtransferpartikel, TAG: Triacylglycerid, Vg: Vitellogenin, VHDLp: Very-high-density lipophorin, Vt: Vitellogenin. Aus Ziegler und van Antwerpen (2006).

Die bei vielen Tieren, z.B. bei pazifischen Lachsen oder Cephalopoden, vorkommende Monotelie, d.h. die nur einmalige Fortpflanzung, ist meist mit dem Aufbau einer großen Menge an Keimzellen verbunden. Beim Polychaeten *Nereis virens* z.B. machen die Keimzellen eines laichreifen Tieres ca. 30% der Körpermasse aus (Hoeger et al. 1999). Eine derartig große Menge an Keimzellen muss natürlich entsprechend versorgt werden. Die Eizellen werden hierbei von einem weibchenspezifischen Lipoprotein, dem

Vitellogenin, versorgt. Das Vitellogenin wird den Eizellen von spezialisierten Coelomzellen, den Elaeocyten, zur Verfügung gestellt (Fischer und Hoeger 1993, García-Alonso et al. 2006). Da sowohl der Lipidgehalt des Vitellogenins mit 16% (Baert et al. 1984) als auch der Titer in der Coelomflüssigkeit mit 0,1-0,6 mg/ml sehr gering sind (Fischer und Hoeger 1993) kann der enorme Anteil an Lipid in den Eizellen nicht ausschließlich über die Aufnahme von Vitellogenin erfolgen. Bei den ebenfalls sehr lipidreichen männlichen Keimzellen (U. Hoeger, persönliche Mitteilung) ist der Mechanismus der Lipideinlagerung nicht geklärt, da diese nicht über Vitellogenin mit Lipid versorgt werden können. Vitellogenine sind naturgemäß auf Weibchen beschränkt. Da jedoch zumindest bei Säugern die Nährzellen der männlichen Keimzellen (Sertolizellen) von HDL mit Cholesterin versorgt werden (Fofana et al. 1996), ist diese Möglichkeit auch für Invertebraten nicht auszuschließen.

## 6 ZIELE DER ARBEIT

Die Untersuchung des Lipidtransportsystems von ursprünglichen Wirbellosen wie den Polychaeten bietet die Möglichkeit, durch Vergleiche mit bereits bekannten Lipidtransportsystemen (Insekten, Säuger) die Evolution des als ursprünglich betrachteten Vitellogenin-Vitellogeninrezeptor-Systems (Mann et al. 1999) zu untersuchen. Dabei kann dessen Entwicklung in die unterschiedlichen, zum Teil hochkomplexen Lipoprotein-Lipoproteinrezeptor-Systeme untersucht werden. Auch im Hinblick auf die Struktur und Funktion der Lipoproteine sind Studien bei ursprünglichen Lipidtransportsystemen von Interesse. Es können Fragen der Evolution der Energieversorgung erforscht werden: Sind bei ursprünglichen Tieren mit niedrigen Stoffwechselraten ähnliche oder gleiche Wege der Lipid- bzw. Energiebereitstellung vorhanden wie bei Tieren mit hohem Stoffumsatz?

Ausgangspunkt ist nach der erstmaligen Beschreibung des *Nereis*-Lipoproteins die Aufklärung der Struktur dieses Proteins. Dabei sollte die Stöchiometrie und die Lage der Apoproteine des *Nereis*-Lipoproteins genauer erfasst werden: Es galt zu klären, ob die beiden mit dem Lipoprotein assoziierten Proteinuntereinheiten wie bei Insekten in einer 1:1-Verteilung vorliegen (Weers et al. 1992), oder ob es eine andere Stöchiometrie ist. Auch die Lage der beiden Apoproteine im nativen Lipoprotein sollte charakterisiert werden: Liegen sie am Rand des Diskus, wie für discoidales humanes HDL beschrieben (Koppaka 2001)? Oder liegt nur Eines außen und das Andere eher im Innern des Partikels, wie bei den Insekten-Lipophorinen (Ryan 1996)? Die „nicht-austauschbaren

Apolipoproteine', aber auch Wirbellosen-Lipoproteine generell zeichnen sich durch ihren hohen Anteil an  $\beta$ -Strukturen aus. Deshalb sollten auch die Sekundärstrukturen der Apolipoproteine bestimmt werden.

Da das *Nereis*-Lipoprotein glycosyliert ist, sollten die Glycanstrukturen der Apolipoproteine genauer analysiert werden. Dabei stand die Gesamtglycosylierung im Fokus. Der Typ der gebundenen N-Glycane sollte anhand der Monosaccharid-Bausteine der Glycane untersucht werden: Liegen High-Mannose-, Komplexe- oder Hybridtypen vor? Auch sollten die N-Glycane hinsichtlich ihrer Größe untersucht werden.

Neben den Arbeiten auf Proteinebene sollte eine quantitative Analyse der transportierten Lipide erfolgen. Aus der Art der transportierten Lipide kann auf die Funktion geschlossen werden. Dadurch sollte das *Nereis*-Lipoprotein in die bisher beschriebenen Lipoproteine eingeordnet werden: Dominieren wie bei Vertebraten Cholesterinester und Triglyceride, oder überwiegen wie bei den meisten beschriebenen Invertebraten Diglyceride? Zwar liegen Hinweise vor, dass im *Nereis*-Lipoprotein Diacylglyceride überwiegen, dennoch stellt sich die Frage, wie bei einem ursprünglichen Coelomaten die Lipidphase zusammengesetzt ist, da bislang keine quantitativen Studien durchgeführt wurden.

Durch hydrodynamische Studien sollte das native Molekulargewicht genauer bestimmt werden. Dies war bislang per Gelfiltration geschehen, die mit nicht-sphärischen Proteinen jedoch unverlässlich ist (Meredith und Nathans 1982, Schenk et al. 2006). Zusätzlich sollte der Sedimentationskoeffizient bestimmt werden.

Funktionelle Aspekte sollten anhand der Frage nach dem Zielgewebe des *Nereis*-Lipoproteins und der Art der Lipidaufnahme in diese Zielgewebe geklärt werden.

Zur Ermittlung der Zielgewebe des *Nereis*-Lipoproteins sollte der zu postulierende Lipoproteinrezeptor isoliert und biochemisch charakterisiert werden. Anhand dieser Charakteristika sollte ermittelt werden, ob es sich bei diesem, bislang hypothetischen, Protein um ein Mitglied der LDLR-Superfamilie handelt. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf den Gameten, und speziell den Oocyten liegen. Die Lipidversorgung der Oocyten während der Oogenese ist bei Wirbellosen bisher nur bei Insekten und Crustaceen untersucht worden, wobei jedoch vieles noch hypothetisch bleibt (siehe 5.1). Bei der Art der Lipidaufnahme galt es zu klären, ob ein Weg wie bei den Säugern vorliegt bei dem die Lipoproteine nach Aufnahme in die Zielzelle degradiert werden, oder ob ein ‚reusable-shuttle‘ wie bei den Insekten existiert.

# MATERIAL UND METHODEN

## 1 TIERE

### 1.1 *NEREIS VIRENS*

*Nereis virens* wird von einer Angelköderfirma (Seabait, Ltd.) in Ashington, Northumberland, Großbritannien, bezogen und per Expresslieferung innerhalb von 24 Stunden zugestellt. Zunächst werden die Tiere für 24 Stunden in antibiotikahaltigem (Streptomycin, Penicillin je 0,2 g/l) künstlichem Seewasser (TropicMarin®; 33 ‰ w/v) gehalten. Nach der 24-stündigen Antibiotikabehandlung werden die Tiere einzeln in Plastikschaalen gesetzt, deren Boden mit Sand bedeckt ist. Die Schalen werden in 40 l Plastikwannen gestellt, die über ein 400 l Reservoir im Umlauf mit künstlichem Seewasser versorgt werden. Die Tiere werden in einem klimatisierten Raum bei 12°C gehältert.

### 1.2 *PLATYNEREIS DUMERILII*

*Platynereis dumerilii* wird seit 1969 in einer kontinuierlichen Laborkultur nach Hauenschild und Fischer (1969) gehältert.

## 2 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

### Chromatographiemedien/-säulen

- CNBr-Sepharose 4B, Pharmacia
- Diolphasen-Extraktionssäulchen (1 mg Sorbent in einer 1 ml Kartusche), Alltech

### Dialyseschläuche

- Visking Typ 8/32, Roth
- Visking Typ 20/32, Roth

### Dünnschichtchromatographie-Platten

- Polygram®SIL G Kieselgel, 50 x 100 mm, Schichtdicke 0,2 mm, Machery-Nagel

### Elektronenmikroskopie

- Technai 12, Philips
- Vakuum-Beschichter/Glowdischarge, Edwards

## Elektrophorese- und Blotapparaturen

- Vertikalelektrophoresekammer, MiniProtean® 3 (8 x 7,3 cm, Gelstärke 0,75 mm), BioRad
- Blotapparatur (semi-dry), Biotec-Fischer
- GENIE® Electrophoretic Transfer: Genie Blotter, Idea Scientific

## Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Binäres Niederdruck-Gradientensystem:

- Anlage 1:
  - Pumpe 420, Kontron Instruments
  - HPLC Detektor 430, Kontron Instruments
  - Gradientenformer 425, Kontron Instruments
  - Autosampler 465, Kontron Instruments
- Anlage 2:
  - Pumpe 422, Kontron Instruments
  - HPLC Detektor 430, Kontron Instruments
  - Gradientenformer 425, Kontron Instruments
  - Autosampler 360, Kontron Instruments
- Anlage 3:
  - Pumpe 422S, Kontron Instruments
  - Gradientenformer 425, Kontron Instruments
  - Autosampler 465, Kontron Instruments
- Fluoreszenzphotometer:
  - Fluorescence Spectrophotometer F-1050, Merck Hitachi
- Verdampfungslichtstreuendetektor:
  - Sedex 85, Sedere
- Steuer- und Auswertungssoftware:
  - Chromeleon V. 6.80, Dionex GmbH



▪ Säulen:

- Superose® 6B 16 x 300 mm, Pharmacia
- PVA-Sil, 5 µm, 3 x 250 mm, MZ-Analysentechnik
- Nucleosil 120 C18, 3 µm, 3 x 150 mm, MZ-Analysentechnik
- Kromasil NH<sub>2</sub>, 5 µm, 4 x 250 mm, MZ-Analysentechnik

**Homogenisatoren**

- Potter Homogenisator, B. Braun
- Ultra Turrax, IKA

**Fluoreszenzmikroskop**

- Axioskop, Zeiss mit Kamera Colorview 12, Olympus

**Photometer**

- Uvikon 860, Kontron Instruments
- Luminescence Spectrometer LS 50B, Perkin Elmer
- MR 5000, Dynatech
- CD-Spektropolarimeter J-810-S, Jasco

**Refraktometer**

- HR 900 Handrefraktometer, A. Krüss Optronic

**Ultraschallbad und -spitze**

- SONOREX RK 156, Bandelin
- LABSONIC 1510, B. Braun

**Vakuumkonzentrator**

- Vacuum Concentrator, Bachofer

**Waagen**

- XT 6200C-FR, Precisa
- Sartorius research L610, Sartorius

## Zentrifugen

- Biofuge Pico, Heraeus
- Centrifuge 5804 R, Eppendorf  
Rotoren: AA 4-44 (Ausschwing), 34-6-38 (Festwinkel)
- Optima Max<sup>®</sup>, Beckman Coulter  
Rotoren: TLA 110.1, TLA 120.1 (beide Festwinkel), MLS-50 (Ausschwing)
- Optima L70<sup>®</sup>, Beckman Coulter  
Rotor: SW28 (Ausschwing)
- ProteomeLab<sup>®</sup> XL-I, Beckman Coulter  
Rotor: AN-50 Ti
- Sorvall<sup>®</sup> RC-5B, DuPont Instruments  
Rotoren: HB-4 (Ausschwing), SS-34 (Festwinkel)

## 3 STANDARDLÖSUNGEN/-SUBSTANZEN

### 3.1 PUFFER

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• HBS (Hepes buffered saline)<br/>150 mM NaCl<br/>20 mM Hepes, pH 7,8<br/>2 mM CaCl<sub>2</sub><br/>in dH<sub>2</sub>O.</li> <li>• NBSS (Nereis balanced salt solution, Heacox et al. 1983)<br/>110 mM NaCl<br/>1,2 mM CaCl<sub>2</sub><br/>4,5 mM KCl<br/>12 mM NaHCO<sub>3</sub><br/>in 74% (v/v) Seewasser in dH<sub>2</sub>O.<br/>Osmolarität auf 920–960 mOsmol und pH auf 7,6 einstellen.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• PBS (Phosphate buffered saline)<br/>137 mM NaCl<br/>8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><br/>2,7 mM KCl<br/>1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4<br/>in dH<sub>2</sub>O.</li> <li>• PBT (Phosphate buffered saline plus Tween)<br/>137 mM NaCl<br/>8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub><br/>2,7 mM KCl<br/>1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4<br/>0,1% (v/v) Tween 20<br/>in dH<sub>2</sub>O.</li> </ul> |
|---|---|

## 3.2 ANTIKÖRPER

### 3.2.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

Rabbit- $\alpha$ -*Nereis*-Lipoprotein, Pineda Antikörperservice

### 3.2.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Goat- $\alpha$ -rabbit-Alkalische Phosphatase-Konjugat, Sigma (A3687)

## 3.3 ENZYME

*Staphylococcus aureus* Endoproteinase Glu-C (V8) sequencing grade, Roche (Artikelnummer: 11420399001)

Trypsin sequencing grade, modifiziert, Roche (Artikelnummer: 11418475001)

PNGase F, rekombinant, Roche (Artikelnummer: 11365193001)

## 3.4 LEKTINE/AVIDIN

Concanavalin A-Biotinyliert (ConA), Sigma (C2272)

Erdnusslektin-Biotinyliert (PNA), Sigma (L6135)

Avidin-Peroxidase-Konjugat, Fluka (11371)

## 4 EXPERIMENTELLES VORGEHEN

### 4.1 LIPOPROTEIN-ISOLIERUNG

#### 4.1.1 GEWINNUNG VON COELOMFLÜSSIGKEIT AUS *NEREIS VIRENS*

##### **Betäubung der Tiere**

Zur Betäubung der Tiere werden diese in einem Wägeschälchen mit ein wenig Seewasser für ca. 20 Minuten in der Tiefkühltruhe abgekühlt, bis das Wasser anfriert. Dabei darf das Wasser auf keinen Fall völlig durchfrieren, da dies den Tod der Tiere zur Folge hätte.

##### **Gewinnung von Coelomflüssigkeit**

Die betäubten Tiere werden auf einen auf Eis vorgekühlten Metallblock gelegt. Mit einer feinen Glaskapillare wird vorsichtig zwischen die Parapodien gestochen. Dies sollte möglichst weit vorne am Tier geschehen, um den Darm nicht zu verletzen und so die Freisetzung von Proteasen zu vermeiden. Die gewonnene Coelomflüssigkeit wird in einem eisgekühlten Corex-Zentrifugenglas gesammelt und anschließend mit je 10 µl/ml Protease-Inhibitorcocktail (Sigma, P8340) und Na<sub>2</sub>-EDTA (0,5 M in 1 M NaOH) versetzt. Anschließend wird für 5 min bei 170xg und 4°C zentrifugiert, um die Coelomzellen (Elaecyten, Granulocyten und vor allem Oocyten) zu entfernen. Der Überstand wird abgenommen und anschließend zwei weitere Male für 5 min bei 4°C und 15.000xg zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zelltrümmer zu entfernen.

Die so gereinigte Coelomflüssigkeit wird anschließend durch Zugabe einer 200 mM PMSF-Stammlösung in DMSO auf eine Endkonzentration von 0,1 mM eingestellt und entweder sofort weiter verwendet oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 4.1.2 LIPOPROTEIN-ISOLIERUNG DURCH DICHTEGRADIENTEN-ULTRA-ZENTRIFUGATION

Lipoproteine besitzen aufgrund ihres hohen Lipidgehaltes eine geringere Dichte als andere Proteine und lassen sich deshalb durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation spezifisch anreichern.

Zur Dichtegradienten-Zentrifugation werden verschiedene Medien benutzt. Zum Einen Iodixanol, ein Polymer, zum Anderen KBr, ein Salz. Eine schematische Darstellung der Lipoprotein-Isolierung ist in Anhang 3 (Abb. 53) gegeben.

### **Selbstgenerierender Iodixanol-Dichtegradient (Schenk et al. 2006)**

Zunächst wird aus der 60%igen (w/v) Iodixanol-Stammlösung (OptiPrep<sup>®</sup>, Axis Shield Artikelnummer: 1114542) eine 30%ige (w/v) Lösung hergestellt. Dazu wird ein Teil Iodixanol mit einem Teil Probe vermischt und in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zentrifugation findet im TLA 120.1- oder TLA 110-Rotor bei 16°C und 355.000xg<sub>avg</sub> für 3 Stunden statt. Anschließend werden die Lipoproteinbanden in Eppendorfgefäßen gesammelt.

### **KBr-Flottationszentrifugation**

Die Proben werden zunächst mit festem KBr auf eine Dichte von 1,160 g/ml (entspricht ca. 2 M) eingestellt und anschließend für 3 Stunden bei 4°C und 417.000xg<sub>avg</sub> im TLA 110-Rotor zentrifugiert. Dies ist die Standardmethode in dieser Arbeit.

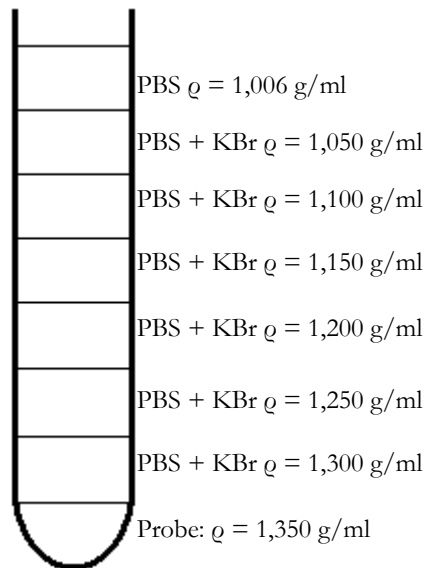
### **Selbstgenerierender KBr-Dichtegradient (verändert nach Chung et al. 1980 und Stieb et al. 2008)**

Bei der Dichtegradienten-Zentrifugation in KBr können zwei unterschiedliche Zentrifugationstypen unterschieden werden:

- ein zweistufiger Gradient
- ein mehrstufiger Gradient

Beim zweistufigen Gradienten wird die Probe durch Zugabe von festem KBr auf eine Dichte von 1,350 g/ml eingestellt und vorsichtig mit dem gleichen Volumen PBS überschichtet. Die Zentrifugation findet anschließend für 3 Stunden bei 417.000xg<sub>avg</sub> und 4°C im Festwinkelrotor statt.

Für den mehrstufigen Gradienten wird die Probe mit KBr ebenfalls auf eine Dichte von 1,350 g/ml eingestellt und durch dreistündige Ultrazentrifugation bei 4°C und 417.00xg<sub>avg</sub> konzentriert. Die Lipoproteine werden abgenommen, mit KBr wieder auf eine Dichte von 1,350 g/ml gebracht und auf den Boden eines Zentrifugenröhrchens pipettiert. Anschließend wird die Probe mit jeweils gleichen Volumina (für MLS-50: je 500 µl) PBS, dessen Dichte mit KBr auf 1,300-1,050 g/ml gebracht wurde, sowie abschließend mit PBS ohne KBr-Zusatz ( $\rho = 1,006$  g/ml) überschichtet (Abb. 10 nächste Seite). Zentrifugiert wird für 16 Stunden bei 4°C und 216.000xg<sub>avg</sub> mit langsamer Beschleunigung und ohne Bremse.



**Abb. 10:** Pipettierschema für den mehrstufigen KBr-Dichtegradienten.

#### 4.1.3 DICHTEBESTIMMUNG

Die Dichte der isolierten Lipoproteine wird an Hand ihres refraktiven Index mit einem Handrefraktometer bestimmt. Nachdem das Handrefraktometer mit dH<sub>2</sub>O geeicht worden ist, werden 20 µl der zu analysierenden Probe auf das Prisma pipettiert, das Refraktometer gegen eine starke Lichtquelle gehalten und die Skalenteile abgelesen. Diese können dann mit Hilfe einer Tabelle (siehe Anhang 2) in den Brechungsindex umgerechnet werden.

Aus dem Brechungsindex kann nun die Dichte ( $\rho$ ) der Lipoproteine bestimmt werden. Für Iodixanol gilt folgender Zusammenhang (Graham et al. 1996):

$$\rho = 3,2984 \times n - 3,3967 \quad (1)$$

während für KBr diese Gleichung gilt (Weast 1974):

$$\rho = 6,2871 \times n - 7,3842 \quad (2)$$

$n$  ist gleich dem ermittelten Brechungsindex.

#### 4.1.4 ENTSALZEN DER LIPOPROTEINE DURCH DIALYSE

Um das zur Isolierung verwendete KBr wieder aus den Lipoproteinfraktionen zu entfernen, werden diese über Nacht bei 4°C gegen mindestens 2 x 1 l PBS + 1 mM EDTA dialysiert und bei 1°C unter Zusatz von 0,1% (w/v) Natriumazid gelagert.

## 4.2 LIPOPROTEINREZEPTOR-ISOLIERUNG

### 4.2.1 ISOLIERUNG VON COELOMOCYTEN AUS *NEREIS VIRENS*

Die Tiere werden wie beschrieben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  betäubt. Anschließend wird das Tier in eine große Plastikwägeschale gelegt und mit dieser auf einen eisgekühlten Aluminiumblock gestellt. Das Tier wird mit 15 ml eisgekühltem HBS übergossen und beidseitig lateral mit einer flachen Schere aufgeschnitten; dabei sollte der Darm möglichst wenig beschädigt werden. Die Elaeocyten und andere Coelomzellen werden ausgeschwemmt, in dem der Wurm mit den Fingern leicht ausgedrückt wird. Bei weiblichen Tieren mit großen Eizellen ( $>150\ \mu\text{m}$ ) wird die Coelomocyten-Suspension mit HBS auf ungefähr 50 ml verdünnt und auf Eis gestellt. Die schwereren Oocyten setzen sich ab, während die leichteren Elaeocyten zunächst im Überstand verbleiben. Bei männlichen Tieren, die noch Spermatogonien enthalten, wird ebenso verfahren wie bei den Weibchen, da sich auch hier die schwereren Spermatogonien absetzen. Enthalten die Tiere allerdings voll ausdifferenzierte Spermien, wird die Zellsuspension mit HBS auf 50 ml verdünnt und für 5 Minuten bei  $350\times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die Elaeocyten bilden ein grünes Pellet, während die leichteren Spermien im Überstand bleiben. Das Pellet wird mit HBS resuspendiert.

Bei Tieren beiderlei Geschlechts werden die so isolierten Elaeocyten durch ein  $150\ \mu\text{m}$  Sieb gefiltert und in einem Zentrifugen-Röhrchen gesammelt. Die eisgekühlte Suspension wird schließlich bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 2 Minuten bei  $150\times g$  zentrifugiert und das Elaeocyten-Pellet wieder mit HBS resuspendiert. Die Suspension wird nun durch ein  $75\ \mu\text{m}$  Sieb gegossen um weitere Zellaggregate (und eventuell auch Oocyten) zu entfernen. Die Präparation wird unter dem Mikroskop kontrolliert, gegebenenfalls wird nochmals durch ein  $40\ \mu\text{m}$  Netz gesiebt. Zum Schluss wird die Lösung nochmals zentrifugiert (2 Minuten  $150\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ), gewaschen und ein letztes Mal wie zuvor abzentrifugiert. Das Pellet wird jetzt in dem Zweifachen seines Volumens in HBS aufgenommen.

#### **Bestimmung des gepackten Zellvolumens**

Um den prozentualen Anteil der Elaeocyten in der Lösung zu bestimmen, wird das gepackte Zellvolumen analog einer Mikro-Hämatokritbestimmung ermittelt.

Dazu wird die Elaeocyten-Suspension in eine Kapillare gebracht, deren Ende mit ein wenig Knetmasse verschlossen ist. Die Kapillare wird nun 3 Minuten bei  $5040\times g$  ( $7000$

rpm) im Mikro-Hämatokrit-Rotor in der Biofuge zentrifugiert. Anschließend wird das gepackte Zellvolumen an einer Tabelle abgelesen.

#### 4.2.2 MEMBRAN-ISOLIERUNG

Die Zellen und Gewebe werden zunächst 5:1 (v/w) mit HBS verdünnt (Oocyten 20:1) und mit einer entsprechenden Menge 100 x Protease-Inhibitorcocktail (Sigma, P8340) versetzt. Die Zellen werden mit der Ultraschallsonde für 10 x 30'' mit je 15'' Pause im Eisbad homogenisiert. Oocyten werden im Potter zunächst ‚vorhomogenisiert‘.

Zur Entfernung von Zelltrümmern, -kernen, Mitochondrien und Lipiden wird das Homogenat 15 min bei 15.000xg und 4°C abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wird ggf. nochmals mit Puffer versetzt und wie beschrieben behandelt. Der erhaltene Rohextrakt wird nun für 60 Minuten bei 100.000xg und 4°C zentrifugiert, um die Membranen zu pelletieren.

Aufgrund ihrer Festigkeit sind Muskeln nicht so leicht zu aufzuschließen wie andere Gewebe. Die Muskeln werden zunächst 5:1 mit HBS verdünnt, mit Protease-Inhibitorcocktail versetzt und mit einer Ultra Turrax im Eisbad homogenisiert. Die erhaltene Suspension wird für 15 Minuten bei 15.000xg und 4°C abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wird noch dreimal wie beschrieben homogenisiert und zentrifugiert.

Anschließend wird das Membranpellet in einer geeigneten Menge HBS + 40 mM Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid (OGP) aufgenommen (i. d. Regel das gleiche Volumen wie das des Rohhomogenats) und gut suspendiert. Die Suspension wird für 30 Minuten auf Eis gerührt und anschließend 2 x 30'' mit Ultraschall auf Eis suspendiert. Zur Entfernung unlöslicher Bestandteile wird die Membranfraktion schließlich wieder für 60 Minuten bei 100.000xg zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und der Überstand wird zur Entfernung überschüssigen OGP über Nacht bei 4°C gegen HBS dialysiert. Eine Übersicht über die einzelnen Schritte ist im Anhang 4 (Abb. 54) gegeben.



### 4.2.3 LIPOPROTEINREZEPTOR-ISOLIERUNG DURCH AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE (VERÄNDERT NACH SCHNEIDER ET AL. 1982, RÖHRKASTEN UND FERENZ 1986A, 1986B)

#### Benötigte Lösungen

- 1 mM HCl
- Kopplungspuffer:  
0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3  
0,5 M NaCl  
in dH<sub>2</sub>O.
- Blockpuffer:  
1 M Ethanolamin, pH 8,0  
in dH<sub>2</sub>O.
- Waschpuffer A:  
0,1 M Essigsäure/Na-Acetat, pH 4,0  
0,5 M NaCl  
in dH<sub>2</sub>O.
- Waschpuffer B:  
0,1 M Tris-HCl, pH 8,0  
0,5 M NaCl  
in dH<sub>2</sub>O.
- Elutionspuffer A:  
50 mM Tris-Maleinsäure, pH 6,0  
150 mM NaCl  
8 mM CHAPS  
5 mM EDTA  
in dH<sub>2</sub>O.
- Elutionspuffer B:  
5 mM Suramin  
in Elutionspuffer A.

#### Herstellung der Affinitätssäule

Es wird wie vom Hersteller beschrieben vorgegangen. Dazu werden zunächst ca. 150 mg (entspricht ca. 0,5 ml im gequollenen Zustand) lyophilisierte CNBr-Sepharose abgewogen, in ca. 30 ml 1 mM HCl suspendiert und für 15 Minuten darin gewaschen. Anschließend wird das Medium in Kopplungspuffer äquilibriert und in ein verschließbares Zentrifugenröhrchen überführt. Zu dem vorbereiteten Medium werden 500 µg Lipoprotein in 1 ml Kopplungspuffer gegeben und die Suspension für 60 Minuten bei Raumtemperatur über Kopf rotiert. Danach wird für 2 Minuten bei 4500xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 10 ml Kopplungspuffer resuspendiert. Das ganze wird zweimal wiederholt. Nun werden die noch vorhandenen freien Bindungsstellen der

CNBr-Sepharose blockiert. Dazu wird das Chromatographiemedium in 5 ml Blockpuffer resuspendiert und für 2 Stunden unter gelegentlichem Schütteln inkubiert, anschließend wird wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 10 ml Waschpuffer A aufgenommen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 ml Waschpuffer B aufgenommen. Dieser Prozess wird zwei Mal wiederholt.

Abschließend wird die CNBr-Sepharose in HBS äquilibriert und in eine leere Säulenkartusche (40 x 0,8 mm; BioRad Artikelnummer: 731-1550) gefüllt.

### **Rezeptor-Isolierung**

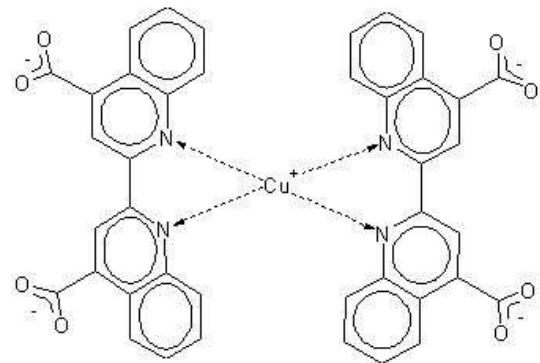
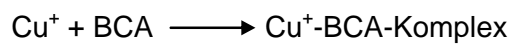
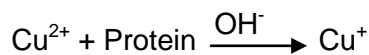
Die dialysierte Membranfraktion (Material und Methoden 4.2.2) wird mit Hilfe einer Peristaltikpumpe aus einem auf Eis stehenden Zentrifugenröhrchen für 60 Minuten über die Lipoprotein-gekoppelte CNBr-Sepharose im Rückfluss gepumpt und anschließend in einem neuen Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Säule wird anschließend mit 20 ml HBS gewaschen. Zur Elution der gebundenen Rezeptorproteine werden 2 ml Elutionspuffer B aufgetragen und sofort die ersten 500 µl Eluat auf Eis gesammelt. Danach wird die Säule verschlossen und 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach 30 Minuten wird die Säule geöffnet und zwei weitere 500 µl Fraktionen werden gesammelt, dann wird die Säule mit Elutionspuffer A gefüllt und eine weitere 500 µl Fraktion gesammelt. Nach dem Durchlaufen des Elutionspuffers wird die Säule in HBS reäquilibriert und anschließend in HBS + 0,1% NaN<sub>3</sub> gelagert.

Die auf Eis gesammelten Fraktionen werden nun 1:1 mit -20°C kaltem Aceton versetzt und für 20 Minuten bei -20°C gefällt. Die Präzipitate werden durch Zentrifugation (20.000xg, 0°C, 20 Minuten) gesammelt. Die Überstände werden verworfen, die Pellets unter einem leichten N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und mit 50 µl HBS aufgenommen.

Der Reinigungserfolg wird per SDS-PAGE (siehe 4.4) überprüft.

### 4.3 PROTEINBESTIMMUNG MIT DEM BCA-TEST (SMITH ET AL. 1985)

Die Proteinbestimmung mit dem BCA-Test basiert auf der Komplexbildung von Kupfer(I)-Ionen durch Proteine in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Die in der Lösung enthaltenen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen werden dabei zunächst durch die Proteine zu  $\text{Cu}^+$  reduziert und bilden anschließend mit dem Metallchelator Bicinchonsäure (BCA) einen violettfarbigen Komplex, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 550 nm proportional zur eingesetzten Proteinmenge ist (Abb. 11).



**Abb. 11:** Prinzip der Proteinbestimmung mit BCA. Nach Smith et al. (1985).

#### Benötigte Lösungen

- 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)  $\text{NaHCO}_3$   
in  $\text{dH}_2\text{O}$ .
- Lösung B:  
1% (w/v) BCA  
in Lösung A.
- Lösung C:  
4% (w/v)  $\text{CuSO}_4$   
in  $\text{dH}_2\text{O}$ .
- Gebrauchsreagenz:  
50 Teile Lösung B  
1 Teil Lösung C

#### Durchführung

Eine BSA-Standardreihe (0, 2, 4, 6, 8, 10  $\mu\text{g}$  BSA in 10  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ) und die Proben (1  $\mu\text{l}$  + 9  $\mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ ) werden im Dreifachansatz in eine 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert. Es werden jeweils 200  $\mu\text{l}$  Gebrauchsreagenz hinzugegeben, die Wells mit Tesafilm verschlossen und

der Ansatz für 30-60 Minuten bei 55°C inkubiert. Im Mikrotiterplattenphotometer wird die Absorption bei 550 nm (MR 5000, Dynatech) bestimmt. Aus den Absorptionswerten der BSA-Standards wird eine Eichkurve erstellt anhand derer die Konzentration der Proben ermittelt wird.

#### 4.4 GELELEKTROPHORESEN

Proteine und Peptide können in einer entsprechenden Matrix im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei unterscheidet man zwei grundsätzliche Verfahren. Zum Einen die native Elektrophorese, bei der die Proteine ausschließlich aufgrund ihrer Eigenladung wandern und zum Anderen die denaturierende Elektrophorese, bei der die Proteine mit einem Detergenz (meistens SDS) behandelt werden, welches an die Peptidketten bindet, diese streckt und ihnen eine einheitliche negative Ladung verleiht. Bei dieser Methode erhält jedes Peptid ein definiertes Ladungs-Größen-Verhältnis ( $\approx 1,4:1$ ). Dadurch wird es möglich die Peptide nach ihrer Größe auf zu trennen.

##### 4.4.1 REDUZIERENDE SDS-PAGE (LAEMMLI 1970)

###### Benötigte Lösungen

- Elektrodenpuffer:
  - 25 mM Tris
  - 192 mM Glycin, pH 8,4
  - in dH<sub>2</sub>O, pH nicht einstellen.
- 4 x Sammelgelpuffer:
  - 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
  - 0,4% (w/v) SDS
  - in dH<sub>2</sub>O.
- 4 x Trenngelpuffer
  - 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
  - 0,4% (w/v) SDS
  - in dH<sub>2</sub>O, für Gradienten Gele
  - enthält der Puffer 50% (v/v)
  - Glycerin.
- 30%ige Acrylamid-Stammlösung
- 2%ige Bisacrylamid-Stammlösung
- Reduzierender 2 x SDS-Probenpuffer
  - 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
  - 100 mM DTT (frisch zugeben!)
  - 2 mM EDTA
  - 20% (w/v) Glycerin
  - 4% (w/v) SDS
  - 0,04% (w/v) Bromphenolblau
  - in dH<sub>2</sub>O.

## Durchführung

Die Proben werden 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend 5 Minuten bei 95°C im Heizblock inkubiert. Danach werden sie in der Biofuge kurz anzentrifugiert, um das Kondenswasser der Probe wieder zu zuführen. Die so behandelten Proben können nun auf das Gel aufgetragen werden.

## Lineare Gele

Die PAGE wird in einer MiniProtean® 3 Elektrophoresekammer (Bio Rad) durchgeführt. Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel werden je nach Bedarf gemäß Rezept (Tab. 3) zusammenpipettiert und anschließend zwischen die Glasplatten gebracht. Dabei wird zunächst das Trenngel gegossen und mit 1 ml 60% (v/v) Isopropanol überschichtet. Anschließend polymerisiert das Trenngel für ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur aus. Das Isopropanol wird dann entfernt, die Geloberfläche mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Der Kamm wird eingesteckt und das Sammelgel polymerisiert für 15 Minuten aus. Nach dem Polymerisieren des Gels wird die Elektrophoresekammer zusammengesetzt und das Gel mit den vorbereiteten Proteinproben beschickt. Die Elektrophorese erfolgt bei 200 V.

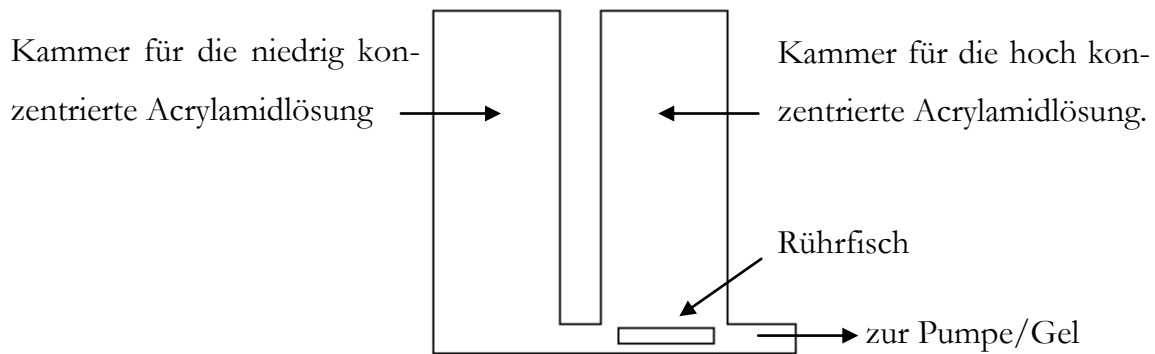
**TAB. 3:** Pipettierschema PAGE. TG = Trenngel; SG = Sammelgel. Acrylamid : Bisacrylamid = 85 : 1

Reagenz	TG 6%	TG 12%	SG 3,5%	SG 6%
Acrylamid 30%ig	808 µl	1616 µl	233 µl	400 µl
Bisacrylamid 2%ig	142 µl	284 µl	41 µl	70 µl
Trenngelpuffer	1000 µl	1000 µl	-----	-----
Sammelgelpuffer	-----	-----	500 µl	500 µl
dH <sub>2</sub> O	2050 µl	1100 µl	1225 µl	1030 µl
TEMED	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
APS (10%ig)	20 µl	20 µl	10 µl	10 µl

## Gradientengele

Gradientengele bieten gegenüber linearen Gelen den Vorteil, dass sie einen wesentlich größeren Trennbereich besitzen. Dies liegt darin begründet, dass sie nicht nur eine bestimmte Konzentration an Acrylamid aufweisen, und somit eine bestimmte Restriktivität, sondern den zu trennenden Proteinen einen Bereich von niedriger bis hoher Acrylamidkonzentration entgegensetzen. Um Gradientengele herzustellen, wird ein Gradi-

entenmischer benötigt (Abb. 12). Dabei ist zu beachten, dass die höher konzentrierte Acrylamidlösung in die dem Ausfluss nächst gelegene Kammer pipettiert wird und die niedrig konzentrierte in die dem Ausfluss ferne. Ebenso ist zu beachten, dass die Kammer mit der ‚schweren Acrylamidlösung‘ den Trenngelpuffer mit Glycerin enthält. Ansonsten erfolgt die Durchführung wie oben.



**Abb. 12:** Schema eines Gradientenmischers zu Herstellung von Gradientengelen.

**TAB. 4:** Pippetierschema Gradientengele. TG: Trenngel; SG: Sammelgel. Acrylamid : Bisacrylamid = 85 : 1

Reagenz	TG 4%	TG 20%	SG 3,5%
Acrylamid 30%ig	260 µl	1280 µl	233 µl
Bisacrylamid 2%ig	46 µl	190 µl	41 µl
Trenngelpuffer	488 µl	488 µl	-----
Sammelgelpuffer	-----	-----	500 µl
dH <sub>2</sub> O	1145 µl	-----	1225 µl
TEMED	1,5 µl	1,5 µl	3 µl
APS (10%ig)	10 µl	10 µl	10 µl

#### 4.4.2 NICHT-REDUZIERENDE SDS-PAGE

Die Proben werden analog zu jenen für die reduzierende SDS-PAGE behandelt, jedoch wird SDS-Probenpuffer ohne DTT verwendet. Auch auf das Erhitzen wird verzichtet.

#### 4.4.3 FÄRBUNG VON PROTEINGELEN MIT COOMASSIE BRILLANT BLUE

Die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine müssen zur weiteren Analyse sichtbar gemacht werden. Hierzu gibt es verschiedene Methoden. Die Standardmethode ist die Coomassiefärbung. Dabei macht man sich die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue zu nutze, an kationische Aminosäuren-Seitenreste (vor allem Lysin und Arginin) zu binden.

### Benötigte Lösungen

- Färbelösung:
  - 1,1 g Coomassie Brilliant Blue R250
  - 20 ml Eisessig
  - 200 ml Isopropanol
  - 210 ml dH<sub>2</sub>O.
- Entfärbelösung:
  - 7,5% (v/v) Eisessig
  - 20% (v/v) Isopropanol
  - in dH<sub>2</sub>O.

### Durchführung

Nach der Elektrophorese wird das Gel für 30 Minuten auf dem Schüttler mit der Färbelösung gefärbt. Anschließend wird es solange entfärbt, bis der Gelhintergrund wieder klar ist.

### 4.5 BLOTS

Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine können zur weiteren Analyse in einem weiteren elektrophoretischen Prozess aus dem Gel auf eine immobilisierende Matrix (z.B. Nitrocellulose oder PVDF) gebracht werden. Dabei werden je nach Methodik des Blotverfahrens zwei Typen unterschieden: der Tank- (Nass-) Blot und der Semi-dry-Blot.

Zur Analyse der geblotteten Proteine stehen nun mehrere Detektionssysteme zur Verfügung (z.B. Western-Blot, Lektin-Blot oder Liganden-Blots).

#### Semi-dry-Blot (Kyhse-Andersen 1984)

### Benötigte Lösungen

- Puffer 1:
  - 25 mM Tris, pH 10,4
  - 200 ml Methanol
  - in dH<sub>2</sub>O.
- Puffer 2:
  - 300 mM Tris, pH 10,4
  - 200 ml Methanol
  - in dH<sub>2</sub>O.
- Puffer 3:
  - 40 mM Norleucin
  - 25 mM Tris, pH 9,4
  - in dH<sub>2</sub>O.

## Durchführung

Zunächst wird das zu blottende Gel in Puffer 3 äquilibriert. In der Zwischenzeit wird die Blotapparatur vorbereitet:

Kathode (-)  
5 Filterpapiere in Puffer 3  
Gel in Puffer 3  
Blotmembran in Puffer 1  
2 Filterpapiere in Puffer 1  
4 Filterpapiere in Puffer 2  
Anode (+)

Nach dem Zusammenbau des „Blot-Sandwichs“ wird der Blot gestartet. Dabei werden 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> angelegt, was einer Stromstärke von 45 mA pro Minigel entspricht. Geblottet wird für 2 Stunden. Die Weiterbehandlung der Blots erfolgt je nach Versuchsart wie unten beschrieben.

## Tank-Blot (Bolt und Mahoney 1997)

### Benötigte Lösungen

- Blotpuffer:
  - 40 mM Tris-Essigsäure, pH 7,4
  - 20 mM Natriumacetat
  - 2 mM EDTA
  - 20% (v/v) Methanol
  - 0,05% (w/v) SDS
  - in dH<sub>2</sub>O.



## Durchführung

Zunächst wird das zu blottende Gel in Blotpuffer äquilibriert. In der Zwischenzeit wird die Blotapparatur vorbereitet:

Kathode (-)  
 Rahmen  
 Schwamm in Puffer  
 2 Filterpapiere in Puffer  
 Gel in Puffer  
 Blotmembran in Puffer  
 2 Filterpapiere in Puffer  
 Schwamm in Puffer  
 Rahmen  
 Anode (+)

Die Blotkammer wird mit Blotpuffer befüllt in einem Eisbad in den Kühlraum gestellt und für 3 Stunden bei 10 V geblottet.

### 4.5.1 WESTERN-BLOTS (BLAKE ET AL. 1984)

Das Prinzip des ‚klassischen‘ Western-Blots ist der spezifische Nachweis des zu untersuchenden Proteins oder Peptids durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion.

#### Benötigte Lösungen

- Äquilibrierungspuffer (AP-Puffer):
  - 100 mM Tris-HCl, pH 9
  - 100 mM NaCl
  - 50 mM MgCl<sub>2</sub>
  - in dH<sub>2</sub>O
- BCIP-Stammlösung:
  - 2% (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
  - in Dimethylformamid.
- NBT-Stammlösung:
  - 3% (w/v) Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
  - in 75% (v/v) Dimethylformamid.
- Ponceau S:
  - 0,2% (w/v) Ponceau S
  - 3% (w/v) Trichloressigsäure
  - 3% (w/v) Sulfosalicylsäure
  - in dH<sub>2</sub>O.

## Durchführung

Nach dem Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Blotmembran wird die Blotmembran kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen und dann für etwa 10 Minuten in Ponceau S gefärbt. Der Blot wird mit dH<sub>2</sub>O differenziert und die Markerbanden werden mit einem weichen Bleistift vorsichtig markiert. Die Membran wird für 1 Stunde in 3% (w/v) BSA/PBT inkubiert um freie Bindestellen abzusättigen, anschließend wird für 5 Minuten mit PBT gewaschen und die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur (oder über Nacht bei 4°C) mit dem primären Antikörper inkubiert (Verdünnung für den rabbit- $\alpha$ -Nereis-Lipoprotein-Antikörper: 1:7.500 in 0,75% BSA/PBT). Die Membran wird für 25 Minuten mit PBT gewaschen (3-4 maliger Pufferwechsel), und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert (goat- $\alpha$ -rabbit-Antikörper 1:20.000 in 0,75% BSA/PBT verdünnt). Dann wird für 4 x 5 Minuten mit PBT und für 5 Minuten mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Blotmembran wird für eine Minute in AP-Puffer äquilibriert, dann werden pro 10 ml 75  $\mu$ l BCIP und 100  $\mu$ l NBT hinzu gegeben. Die Reaktion wird abgestoppt, wenn die Banden deutlich zu erkennen sind, dazu wird der Blot in dH<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet.

### 4.5.2 LIGANDEN-BLOTS (VERÄNDERT NACH DANIEL ET AL. 1983)

#### Benötigte Lösungen

- |                        |                        |
|------------------------|------------------------|
| • Inkubationspuffer A: | • Inkubationspuffer B: |
| 90 mM NaCl             | 90 mM NaCl             |
| 50 mM Tris-HCl, pH 8   | 50 mM Tris-HCl, pH 8   |
| 2 mM CaCl <sub>2</sub> | 2 mM CaCl <sub>2</sub> |
| 5% (w/v) BSA           | 0,5% (w/v) BSA         |
| in dH <sub>2</sub> O.  | in dH <sub>2</sub> O.  |

## Durchführung

Da die Bildung des Lipoprotein-Lipoproteinrezeptor-Komplexes vom Vorhandensein von Ca<sup>2+</sup> und intramolekularen Disulfidbrücken abhängt, dürfen keinerlei reduzierenden Agenzien oder Metallchelatoren verwendet werden. Das bedeutet, dass die Proben vor der SDS-PAGE mit einem Probenpuffer ohne EDTA und DTT versetzt und nicht erhitzt werden.

Nach dem Elektrotransfer wird die Membran zunächst wie oben beschrieben gewaschen und gefärbt und dann für 30 Minuten in Inkubationspuffer A gelegt, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Anschließend wird der Blot für eine Stunde bei Raumtemperatur in Inkubationspuffer B inkubiert, welcher den entsprechenden Liganden (das Lipoprotein) enthält (20 µg/ml). Nach der Bindung des Liganden wird der Blot für 40 Minuten in Inkubationspuffer B (diesmal ohne den Liganden) unter viermaligem Pufferwechsel gewaschen. Nach dem Waschen wird der Blot mit dem gegen den Liganden gerichteten primären Antikörper (rabbit- $\alpha$ -*Nereis*-Lipoprotein-Antikörper 1:7.500 in 0,75% BSA/HBS verdünnt) für 2 Stunden behandelt. Die nachfolgenden Schritte sind dieselben wie beim ‚normalen‘ Western-Blot, außer dass in diesem Fall kein PBT verwandt wird, da Detergenzien (hier: Tween 20) den Rezeptor-Ligand-Komplex zerstören würden.

#### 4.5.3 LEKTIN-BLOTS (SCHENK ET AL. 2006)

##### Benötigte Lösungen

- |  |   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• TBS 1:<br/>50 mM Tris-HCl, pH 7,5<br/>150 mM NaCl<br/>in dH<sub>2</sub>O.</li> <li>• TBS 2:<br/>1 mM MgCl<sub>2</sub><br/>1 mM CaCl<sub>2</sub><br/>1 mM MnCl<sub>2</sub> (vorlösen, da sonst<br/>Mn(OH)<sub>2</sub> ausfällt)<br/>in TBS 1.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• TBS 3:<br/>50 mM Tris-HCl, pH 7,5<br/>347 mM NaCl<br/>in dH<sub>2</sub>O.</li> <li>• Färbelösung:<br/>2,8 mM 4-Chloro-1-naphthol (in<br/>Methanol vorlösen)<br/>0,005% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><br/>in TBS 1.</li> </ul> |
|--|---|

##### Durchführung

Zunächst wird die Nitrocellulosemembran für eine Stunde mit 5% BSA in TBS 1 geblockt, anschließend zweimal für 10 Minuten mit TBS 1 gewaschen und für 60 Minuten bei 37°C mit dem gewünschten biotinylierten Lektin inkubiert (10 µg/ml in TBS 2). Nach der Inkubation wird für 10 Minuten mit TBS 2 gewaschen und für weitere 60 Minuten bei 37°C mit Peroxidase-konjugiertem Avidin (0,05 µg/ml in TBS 3) inkubiert. Nach einem

Waschschritt (10 Minuten in TBS 1) wird der Blot mit Hilfe der Färbelösung entwickelt. Nachdem die Banden deutlich sichtbar sind, wird der Blot in dH<sub>2</sub>O gewaschen und getrocknet. PVDF-Membranen ergeben in diesem System einen sehr starken Hintergrund und werden deshalb nicht verwendet.

#### 4.6 ANALYTISCHE ULTRAZENTRIFUGATION

Bei der Analytischen Ultrazentrifugation handelt es sich um ein hydrodynamisches Verfahren, um Molekulargewichte, Homogenität oder den Sedimentationskoeffizienten eines Makromoleküls zu bestimmen. Die zu analysierende Probe wird dabei einem großen Schwerefeld ausgesetzt und die Bewegung des Analyten entlang der Küvettenachse optisch erfasst.

Prinzipiell sind zwei verschiedene Experimenttypen zu unterscheiden:

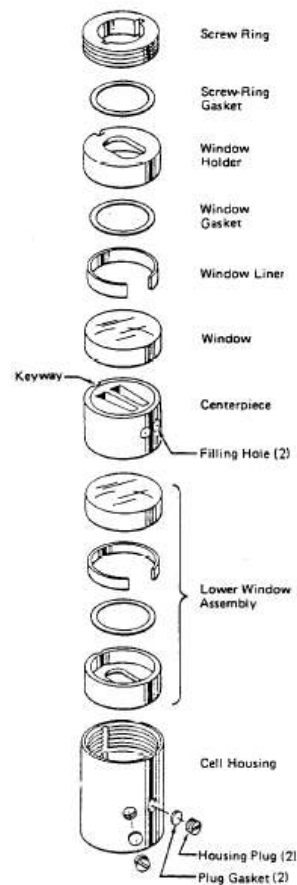
- der Sedimentationslauf
- der Gleichgewichtslauf

##### 4.6.1 SEDIMENTATIONS LAUF

Beim Sedimentationslauf wird die Probe bei hoher Zentrifugalbeschleunigung zentrifugiert (die genaue g-Zahl wird abhängig von der Art des Moleküls gewählt). Aus der Veränderung der Probenkonzentration entlang der Küvette zu jedem Zeitpunkt des Laufes lässt sich der Sedimentationskoeffizient  $S$  ermitteln.

#### Durchführung

Zunächst wird die Doppelsektormesszelle nach Abbildung 13 (nächste Seite) zusammengesetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Glasstücke absolut fett- und staubfrei sind, da dies zu Messartefakten führen kann. Die Messzelle wird mit Hilfe eines Drehmomentschlüssels mit 120 Nm verschlossen und mit den Einfüllöffnungen nach oben so auf den Tisch gesetzt, dass die Zahlen lesbar sind. Nun werden in die linke Kammer 400 µl Probe pipettiert und in die rechte 420 µl des Puffers in dem die Probe vorliegt. Ein Stückchen ausgestanzte Plastikfolie wird als Dichtung auf das Loch gelegt und die Messingschraube leicht angezogen.



**Abb. 13:** Explosionszeichnung für den Zusammenbau einer Doppelsektormesszelle (<http://www.biophys.uni-frankfurt.de/~hauser/prakt/Ultrazentrifugation.pdf>).

Die Messzelle wird bei nur einer Probe gegen die ‚Counterbalance‘ austariert. Dabei ist darauf zu achten, dass die ‚Counterbalance‘ immer leichter ist als die Probe, um einen eventuellen Probenverlust auszugleichen. Wird mehr als eine Probe gemessen, so ist zu beachten, dass die Gesamtanzahl an Proben ungerade ist, da eine Probe immer gegen die ‚Counterbalance‘ tariert werden muss. Diese dient nämlich nicht nur als Gegengewicht, sondern auch zur Synchronisation des Messsystems. Die Toleranz der Zentrifuge gegenüber einem Ungleichgewicht liegt bei 0,5 g. Die Messzellen und die ‚Counterbalance‘ werden nun in die Rotorbohrungen gesetzt, wobei die ‚Counterbalance‘ immer in Bohrung 8 kommt. Die Messzellen werden nun ausgerichtet, d.h. der Strich auf der Unterseite des Rotors und die Einkerbung auf der Unterseite der Messzelle werden aufeinander ausgerichtet. Nach Einsetzen des Rotors in die Zentrifuge wird vorsichtig die Optik angebracht und, nachdem das Vakuum größer als 300 Mikron ist, mittels des Programms ‚Optima XL-I‘ gestartet. Zunächst wird bei 3.000 rpm zentrifugiert und dabei ein Spektrum der Probe(n) gemessen. Dies dient dazu, um die ‚richtige‘ Wellenlänge für

die eigentliche Messung zu ermitteln. Die Absorption bei der gewünschten Wellenlänge (im Normalfall wird bei 280 nm gemessen) sollte dabei nicht größer als 0,5 sein. Bei zu hoher Absorption kann jedoch auch bei Wellenlängen größer als 280 nm, z.B. bei 290 nm, gemessen werden.

Wenn die Solltemperatur (20°C) erreicht ist und das Vakuum auf 0 Mikron gesunken ist, wird der Sedimentationslauf bei 30.000 rpm durchgeführt. Die erste Messung erfolgt nach fünf Minuten, dann wird jede weitere Minute gemessen. In der Regel werden 50 Messungen pro Probe durchgeführt.

Die Daten werden nun mit Hilfe des Programms UltraScan 9.0 ausgewertet. Dabei wird der sogenannte erweiterte van Holde-Weischet-Algorithmus verwendet, der den auf 20°C und Wasser korrigierten Sedimentationskoeffizienten liefert (Van Holde und Weischet 1978, Jaenicke et al. 2003).

#### 4.6.2 GLEICHGEWICHTSLAUF

Der Gleichgewichtslauf ist im Vergleich zum Sedimentationslauf wesentlich aufwändiger. Beim Gleichgewichtslauf wird die Probe bei verschiedenen Geschwindigkeiten, beginnend bei der niedrigsten, für jeweils 24 Stunden oder länger zentrifugiert. Die Geschwindigkeit wird dabei so lange gesteigert, bis die Probe langsam zu sedimentieren beginnt. Durch die langsame Sedimentation konzentrieren sich die Analyten am Boden der Messzelle auf, was zu einer verstärkten, der Sedimentation entgegenwirkenden, Diffusion führt. Dadurch stellt sich nach ausreichender Laufzeit ein stationärer Zustand ein. In diesem Gleichgewichtszustand stellt die Konzentrationsänderung der Probe entlang der Küvettenachse eine exponentielle Kurve dar (<http://www.kolloidanalytik.de>), aus der sich nach mathematischen Umformungen direkt das Molekulargewicht errechnen lässt.

#### Durchführung

Zunächst wird eine 6-Sektor-Messzelle analog zur Doppelsektormesszelle des Sedimentationslaufes zusammengesetzt. Es wird jedoch, bevor der obere Fensterhalter auf das ‚Centerpiece‘ gesetzt wird, die Probe und der Puffer (dreimal 100 µl Probe und dreimal 115 µl Puffer) in das ‚Centerpiece‘ pipettiert. Auch hier wird die Probe auf die linke Seite und der Puffer auf die Rechte pipettiert. Der obere Fensterhalter wird vorsichtig auf das ‚Centerpiece‘ gesetzt, und die Zelle mit dem Drehmomentschlüssel mit 120 Nm ver-

geschlossen. Die Messzelle(n) werden nun wie für den Sedimentationslauf beschrieben in den Rotor gesetzt, und bei 3000 rpm wird zunächst ein Spektrum gefahren (siehe oben). Sobald die Solltemperatur (hier: 10°C) erreicht ist und das Vakuum auf 0 Mikron gefallen ist wird der Gleichgewichtslauf nach folgendem Programm gestartet:

Schritt	Geschwindigkeit [rpm]	Messen nach [h]	Temp. [°C]	Anzahl der Scans
1	6.000	1:00	10	1
2	6.000	23:00	10	1
3	6.000	24:00	10	1
4	8.000	47:00	10	1
5	8.000	48:00	10	1
6	10.000	71:00	10	1
7	10.000	72:00	10	1

Die Auswertung der Rohdaten erfolgt mit dem Programm UltraScan 9.0. Dabei wird der ‚Global Fit‘-Algorithmus angewendet, welcher die molare Masse liefert.

## 4.7 LIPIDANALYTIK

### 4.7.1 LIPIDEXTRAKTION (VERÄNDERT NACH FOLCH ET AL. 1957)

Um biologische Lipide analysieren zu können, müssen diese zunächst aus den Zellen, Geweben oder Lipoproteinen extrahiert werden. Dabei macht man sich ihre gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln zu Nutze.

#### Benötigte Lösungen

- Extraktionslösung:  
2 Teile Chloroform  
1 Teil Methanol
- Waschlösung:  
0,9% (w/v) NaCl  
in dH<sub>2</sub>O.

#### Durchführung

Die zu extrahierenden Proben werden 2:1 mit der Extraktionslösung vermischt. Sollen die Lipide aus Zellen extrahiert werden, werden die Zellen in einem Glas-Zentrifugenglas mit Ultraschall homogenisiert. Das Gemisch wird stehen gelassen, damit sich die Phasen trennen können; gegebenenfalls wird kurz anzentrifugiert. Die untere Chloroform-Phase wird aufbewahrt, während die obere, wässrige Methanol-Phase erneut mit zwei Volumenteil Extraktionslösung versetzt und der obige Vorgang wiederholt wird. Nach einer erneuten Ruhephase (~5 Minuten) wird mit der Waschlösung gewaschen (solange

bis eine deutliche Phasentrennung eintritt). Die obere, wässrige Phase wird verworfen, die Chloroform-Phasen werden vereinigt und danach im Vakuum getrocknet. Die Lipide werden nun mit einer definierten Menge Extraktionslösung wieder aufgelöst und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Im Fall von kleinen Probenmengen werden diese im Vakuum getrocknet und zweimal für 5 Minuten mit jeweils 100 µl Extraktionslösung extrahiert. Die beiden Extrakte werden vereinigt, anschließend wieder getrocknet und in einer definierten Menge Extraktionslösung aufgenommen.

#### **4.7.2 BESTIMMUNG DES TOTALLIPIDGEHALTES NACH DER PHOSPHO-SULPHO-VANILLIN-METHODE (BARNES UND BLACKSTOCK 1973)**

##### **Benötigte Lösungen**

- Vanillin-Reagenz:  
13,15 mM Vanillin  
in 68%iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

##### **Durchführung**

Die in einem Glasgefäß getrockneten Lipide werden mit 50 µl Schwefelsäure versetzt und für genau zehn Minuten bei 95°C im Heizblock oxidiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur werden die Proben mit 750 µl Vanillin-Reagenz versetzt und unter stetem Rühren für 30-60 Minuten inkubiert. Von den Proben werden jetzt je 200 µl in 96-well Mikrotiterplatten pipettiert und die Extinktion bei 550 nm im Mikrotiterplattenphotometer bestimmt. Jede Probe wird im Doppelansatz gemessen. Anhand der gleich behandelten Phosphatidylcholin-Standards kann nun der Lipidgehalt der Probe errechnet werden.

#### **4.7.3 BESTIMMUNG DES PHOSPHOLIPIDGEHALTES MIT 8-ANILIN-1-NAPHTHALINSULFONSÄURE (ANS)**

Aufgrund ihres amphiphilen Charakters können Phospholipide in wässrigen Lösungen Mizellen bilden. Werden z.B. getrocknete Phospholipidfilme mit Ultraschall suspendiert bilden sich sogenannte ‚small unilaminar vesicles‘ (SUV, Newman und Huang 1975, Weers et al. 2000). Der Fluoreszenzfarbstoff ANS fluoresziert in wässriger Lösung nur sehr schwach. Befindet er sich jedoch in einem hydrophoben Milieu, z.B. im Inneren von



Mizellen oder an hydrophobe Aminosäurereste gebunden, so erfährt er eine enorme Verstärkung seiner Fluoreszenz (Stryer 1965). Wird ANS zu einer Lösung von Phospholipid-Mizellen gegeben, ist die Fluoreszenzverstärkung eine (fast) lineare Funktion der Phospholipidkonzentration (siehe Anhang 8).

### Benötigte Lösungen

- 100 x ANS-Stammlösung:  
10 mM ANS (Sigma 10419)  
3% (v/v) DMSO  
in PBS.

### Durchführung

Die getrockneten Lipide werden mit 500 µl 0,1 mM ANS in PBS (hergestellt aus der ANS-Stammlösung) versetzt und jeweils dreimal 10 Sekunden mit der Ultraschallspitze emulgiert. Die Fluoreszenz der Proben wird im Fluoreszenzphotometer (LS 50B) gemessen. Die Excitation der Proben erfolgt bei 395 nm, die Fluoreszenzemission wird zwischen 430 und 530 nm gemessen. Die Scangeschwindigkeit beträgt 350 nm/min, die Spaltöffnungen für Excitation und Emission stehen auf  $\pm 0$  bzw.  $\pm 5$  nm. Jede Probe wird im Doppelsatz gemessen: pro Ansatz werden 5 Emissionsspektren aufgezeichnet und gemittelt.

Für die Ermittlung des Phospholipidgehaltes wird die Fluoreszenzemission bei 490 nm herangezogen. Anhand einer aus Phosphatidylcholin erstellten Standardkurve kann nun die absolute Menge an Phospholipid in der Probe ermittelt werden.

#### 4.7.4 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE (DC) VON LIPIDEN (SCHENK ET AL. 2006)

Die Dünnschichtchromatographie dient der qualitativen Lipidbestimmung, d.h. man kann mit ihrer Hilfe eine Aussage über die in der Probe vorhandenen Lipidklassen treffen. Eine Quantifizierung der unterschiedlichen Klassen ist mit der hier angewendeten Iodfärbung nicht möglich.

### Benötigte Lösungen

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Laufmittel Neutrallipide:</li> <li>60 Teile Hexan</li> <li>45 Teile Diethylether</li> <li>1 Teil Essigsäure</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Laufmittel Phospholipide:</li> <li>85 Teile Chloroform</li> <li>15 Teile Methanol</li> <li>10 Teile Essigsäure</li> <li>3,5 Teile dH<sub>2</sub>O</li> </ul> |
|---|---|

### Durchführung

Die DC-Platten werden zunächst vorchromatographiert, um sie von eventuellen Verunreinigungen zu befreien. Dazu werden sie im entsprechenden Laufmittel ohne Auftragung der Proben chromatographiert. Danach werden sie getrocknet und die zu untersuchenden Lipide werden ca. 1 cm vom unteren Rand entfernt auf die DC-Platte aufgetragen. Nach dem Trocknen der Lipide werden die Platten in die Chromatographiekammern mit dem entsprechenden Laufmittel gestellt und bis ca. 1 cm unter den Plattenrand chromatographiert. Danach werden die Platten getrocknet und gefärbt.

### Iodfärbung (Palumbo und Zullo 1987)

Die nach dem Lauf getrocknete DC-Platte wird zum Färben in einen Chromatographie-Tank gestellt, in dem eine gesättigte Iodatmosphäre herrscht. Nach einiger Zeit werden die aufgetrennten Lipide als dunkle Flecken sichtbar.

### 4.7.5 LIPIDKLASSENQUANTIFIZIERUNG MITTELS HPLC-ELSD (VERÄNDERT NACH CHRISTIE UND URWIN 1995)

Während mit den oben beschriebenen Methoden entweder die Gesamtmenge an Lipid bzw. Phospholipid einer Probe betrachtet oder aber die einzelnen Lipidklassen ohne Aussagen über ihre relative Verteilung analysiert werden, werden bei dieser Methode sowohl die Lipidklassen getrennt als auch quantifiziert.

Das Prinzip dieser Methode ist zunächst die Trennung der unterschiedlichen Lipidklassen auf einer ‚Normalphasen‘-Säule, die ähnlich wie die Dünnschichtchromatographie die Lipidklassen nach ihrer Polarität trennt. Die so getrennten Lipide werden in einen Verdampfungslichtstreuendetektor geleitet und quantifiziert. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass die Eluenten mit Hilfe eines Gases (hier N<sub>2</sub>) zerstäubt werden, und das entstandene Aerosol in einer Heizkammer verdampft wird. Die nicht verdampfenden

Analyten werden von einem Lichtstredetektor detektiert und können anhand von geeigneten Standards quantifiziert werden. Da die Lichtstreuung, und somit die Detektorantwort, von der Art des Analyten abhängt, und die Signalstärke in keinem linearen Zusammenhang mit der detektierten Menge steht, muss für jede Lipidklasse eine eigene Konzentrationsreihe erstellt werden.

### Benötigte Lösungen

- Laufmittel A:  
98,5 Teile Hexan  
1,5 Teile Isopropanol
- Laufmittel B:  
8 Teile Isopropanol  
2 Teile Chloroform  
0,05 Teile Essigsäure
- Laufmittel C:  
50% (v/v) Isopropanol  
in ddH<sub>2</sub>O

### Durchführung

Zunächst werden die Proben mit Laufmittel A auf eine Konzentration von ca. 0,1 mg/ml Proteinäquivalent verdünnt und in ein Autosamplergefäß pipettiert. Anschließend werden 20-50 µl (~2-5 µg) der Probe injiziert. Die Trennung erfolgt auf einer PVA-Sil-Säule bei einem Fluss von 0,8 ml/min nach folgendem Gradienten:

Zeit [min]	LM A [%]	LM B [%]	LM C [%]
0	100	0	0
4	100	0	0
8,5	75	25	0
9	46	52	2
14	32	52	16
19	32	52	16
22	30	70	0
27	75	25	0
32	95	5	0
36	100	0	0

Die Detektion erfolgt im Lichtstredetektor bei einem ‚Vernebelungsdruck‘ von 3,5 bar und einer Detektionstemperatur von 40°C. Die Signalverstärkung des Gerätes (Gain) wird auf 6 gestellt.

## 4.8 SPEKTROSKOPIE

### 4.8.1 ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE

Die Aufnahme des Absorptionsspektrums des *Nereis*-Lipoproteins erfolgt im Bereich von 700-200 nm in 1 nm Schritten bei einer Scangeschwindigkeit von 100 nm/min. Hierzu wird das *Nereis*-Lipoprotein in einer Halbmikroküvette gegen den entsprechenden Puffer (PBS + 1 mM EDTA) gemessen.

### 4.8.2 CIRCULAR DICHROISMUS-SPEKTROSKOPIE

Bei der Circular Dichroismus-Spektroskopie handelt es sich um eine spektroskopische Methode zur Strukturbestimmung von Biopolymeren, v.a. von Proteinen. Hintergrund dieser Methode ist die Tatsache, dass Peptidbindungen und andere Chromophore in Abhängigkeit von ihrer unmittelbaren Umgebung links- und rechtspolarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Dieser Unterschied in der Absorption von links- und rechtspolarisiertem Licht wird gemessen und als Elliptizität ( $\Theta$ ) bezeichnet.

Die so erhaltenen Spektren können nun in Datenbanken mit den Spektren von Proteinen, deren Struktur durch z.B. Röntgenstrukturanalyse bekannt ist, verglichen werden.

### Durchführung

Die Messung wird mit einem Jasco 810 CD-Spektropolarimeter im Wellenlängenbereich von 250-190 nm in 0,5 nm Schritten mit einer Scangeschwindigkeit von 100 nm/min bei 16°C und einer Integrationszeit von 1 Sekunde durchgeführt. Jeweils 5 Messungen werden gemittelt.

Zunächst wird der Puffer, in dem sich die zu messende Probe befindet, gemessen. Anhand der ermittelten Hochspannung des Photomultipliers (HT-Diagramm) wird die entsprechende Verdünnung ermittelt, d.h. der Puffer wird solange verdünnt, bis die Hochspannung am Ende der Messung unter 800 V liegt. Beim verwendeten PBS + 1 mM EDTA war in der verwendeten 0,1 cm Küvette eine Verdünnung von 40:1 ausreichend. Die Probe wird genauso verdünnt und unter denselben Bedingungen gemessen. Die Proteinkonzentration des *Nereis*-Lipoproteins lag so meist zwischen 0,02 und 0,03 g/ml. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Dichroweb-Servers (<http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/>) nach dem CDSSTR-Algorithmus (Sreerama und Woody 2000)

unter Annahme einer durchschnittlichen Aminosäuremasse von 115 Da (Ryan et al. 1992). Das Ergebnis wird als ‚mean residue ellipticity‘ ( $\Theta$ ) ausgedrückt:

$$\Theta = \text{grad} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1} \quad (3)$$

#### 4.9 CHEMISCHES CROSSLINKING (STIEB ET AL. 2008)

Um die Stöchiometrie der konstituierenden Apoproteine eines Proteins zu ermitteln, bieten sich verschiedene Möglichkeiten wie z.B. native Gelelektrophorese, Analytische Ultrazentrifugation, Gelfiltration und auch chemisches Crosslinken, an. Der Vorteil des chemischen Crosslinkings gegenüber den anderen Methoden ist seine relative Einfachheit und seine schnelle Durchführbarkeit, sowie die Elimination nichtkovalenter Modifikatoren bei der späteren Analyse durch SDS-PAGE.

##### Benötigte Lösungen

- |   |   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Crosslinker:<br/>2,5% (v/v) Glutaraldehyd<br/>in PBS.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stopplösung:<br/>1 M Tris-HCl, pH 7,5<br/>in dH<sub>2</sub>O.</li> </ul> |
|---|---|

##### Durchführung

Die Proteinlösung wird zunächst mit soviel Crosslinker versetzt, dass die Endkonzentration an Glutaraldehyd 0,025% (v/v) beträgt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Probe durch Zugabe der Stopplösung auf eine Endkonzentration von 100 mM Tris gebracht und auf Eis gestellt, um die Reaktion zu beenden. Die Reaktionsprodukte werden durch eine SDS-PAGE in einem 6%igen Trenngel analysiert. Die optimale Glutaraldehydkonzentration muss für jedes Protein überprüft und unter Umständen angepasst werden.

#### 4.10 LIMITIERTE PROTEOLYSE

Um eine Aussage über die Lage der Apoproteine im nativen Protein zu treffen, wird dieses einer limitierenden Proteolyse unterzogen, bei der die Bedingungen so gewählt sind, dass die einzelnen Untereinheiten nur geringfügig verdaut werden. Dabei macht man sich die unterschiedliche Exposition unterschiedlicher Proteindomänen zum wässrigen Medium hin zu nutze. Während die Domänen an der Oberfläche den Proteasen zugänglich sind, sind die im Inneren des Proteins liegenden Teile vor der proteolytischen Aktivität geschützt.

### Benötigte Lösungen

- CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung  
50 mM CaCl<sub>2</sub>  
in dH<sub>2</sub>O.
- 200 x PMSF-Stammlösung  
20 mM PMSF  
in DMSO.

### Durchführung

Die Proteinproben werden zunächst mit der CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung versetzt sodass eine Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 5 mM vorliegt. Die Proben werden nun entweder für fünf Minuten erhitzt, ‚nativ‘ belassen oder durch die Zugabe von 1/3 Volumenanteilen Isobutanol entfettet. Dazu wird, nach Zugabe des Butanols, die Probe gemischt (Vortex) und kurz zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die entstandene Isobutanolphase (oben) wird verworfen und die untere Phase weiter verwendet. Nach der entsprechenden Vorbehandlung wird 1/100 (w/w) Protease (Trypsin oder V8) hinzugegeben. Der Ansatz wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wird der Ansatz auf eine Konzentration von 0,1 mM PMSF gebracht (aus der 200 x Stammlösung) und für fünf Minuten erhitzt. Das Fragmentmuster des Verdaus wird schließlich per SDS-PAGE (4-20% Gradientengel) analysiert.

## 4.11 KOHLENHYDRATANALYTIK

Nahezu alle extrazellulären Proteine tragen Kohlenhydrate als kovalente Modifikatoren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Stabilität und Struktur der Proteine.

### 4.11.1 OLIGOSACCHARIDANALYSE (VERÄNDERT NACH ANUMULA UND DU 1999)

Da die N-glycosidisch an Proteine gebundenen Kohlenhydrate im Gegensatz zu den O-glycosidisch gebundenen geringere strukturelle Variationen zeigen und zudem häufiger auftreten, werden diese untersucht. So kann eine Aussage über den Typ der Kohlenhydratstruktur getroffen werden. Hierfür werden die kompletten N-Glycane enzymatisch vom Protein abgespalten und mit dem Fluorophor Anthranilsäure derivatisiert. Die Analyse erfolgt per HPLC.

### Benötigte Lösungen

- Inkubationspuffer:  
20 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,5  
0,5% (v/v) NP-40  
0,1% (w/v) SDS  
in dH<sub>2</sub>O.
- Derivatisierungspuffer A:  
218,8 mM Anthranilsäure  
4% (w/v) Na-Acetat x 3 H<sub>2</sub>O  
2% (w/v) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
in Methanol.
- Derivatisierungspuffer B:  
318,3 mM NaBH<sub>3</sub>CN  
4% (w/v) Na-Acetat x 3 H<sub>2</sub>O  
2% (w/v) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
in Methanol.
- 95% (v/v) Acetonitril
- 20% (v/v) Acetonitril
- Laufmittel A:  
2% (v/v) Essigsäure  
1% (v/v) Tetrahydrofuran  
in Acetonitril.
- Laufmittel B:  
5% (v/v) Essigsäure  
3% (v/v) Triethylamin  
1% (v/v) Tetrahydrofuran  
in ddH<sub>2</sub>O.

### Durchführung

Das Protein wird zur Aufkonzentrierung mit 50% Aceton gefällt (siehe Material und Methoden 4.13.2), anschließend in einer geeigneten Menge Inkubationspuffer aufgenommen (in der Regel 24 µl) und für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Nach dem Abkühlen der Probe wird 1 U (1 µl) PNGase F hinzugegeben und der Ansatz bei 37°C für 16 Stunden verdaut. Zum Beenden des Verdaus wird der Ansatz wiederum fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Zu je 25 µl Probe werden nun 25 µl Derivatisierungslösung A und 25 µl Derivatisierungslösung B gegeben, der Ansatz wird für 60 Minuten bei 80°C derivatisiert. Die Probe wird nun mit der 95%igen Acetonitrillösung auf 1 ml gebracht und auf die mit 95% Acetonitril äquilibrierten Diolsäulchen (Alltech) gegeben. Die Säulen werden nach der Auftragung der Probe zweimal mit 95% Acetonitril gewaschen und anschließend mit zweimal 125 µl 20% Acetonitril eluiert. Die so vorbereiteten Proben werden mittels HPLC auf der Kromasil NH<sub>2</sub>-Säule getrennt und im Fluoreszenzphotometer detektiert. Dabei wird folgender Gradient (siehe nächste Seite) bei einem Fluss von 1 ml/min angelegt:

Zeit [min]	LM A [%]	LM B [%]
0	80	20
2	80	20
20	65	35
30	65	35
60	10	90
65	10	90
70	80	20
80	80	20

Die Detektion im Fluoreszenzphotometer erfolgt bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm.

#### 4.11.2 MONOSACCHARIDANALYSE (STRYDOM 1994)

Um eine Aussage über die verschiedenen Zuckerkomponenten, die an ein Protein gebunden sind, treffen zu können, müssen diese komplett vom Protein entfernt werden. Dies geschieht meistens mit Hilfe starker Säuren wie z.B. TFA oder HCl. Um die hydrolysierten Kohlenhydrate zu analysieren, werden diese nach einer Derivatisierung mit einem Chromophor durch RP-HPLC getrennt. Da diese Methode quantitativ ist, kann so auch eine Aussage über den Totalkohlenhydratgehalt des Proteins getroffen werden.

#### Benötigte Lösungen

- 30% (v/v) TFA
- Derivatisierungsreagenz:  
0,5 M PMP (aus Methanol  
rekristallisiert)  
in Methanol.
- Interner Standard:  
10 mM Digitoxose  
in dH<sub>2</sub>O.
- 0,3 M NaOH
- 0,3 M HCl
- Laufmittel A:  
0,4% (v/v) Triethylamin, pH ~4,8  
10% (v/v) Acetonitril  
in ddH<sub>2</sub>O.
- Laufmittel B:  
60% (v/v) Acetonitril  
in ddH<sub>2</sub>O.

#### Durchführung

Zunächst wird das Protein mit 50% Aceton gefällt (Material und Methoden 4.13.2) und mit 100% Aceton gewaschen, um eventuelle Verunreinigungen und v.a. Glycolipide zu entfernen. Das entstandene Pellet wird getrocknet, mit 50 µl 30%iger TFA versetzt und



für 5 Stunden bei 95°C hydrolysiert. Der Ansatz wird sofort im Vakuum getrocknet und in 50 µl 0,3 M NaOH aufgenommen. Nach Zugabe von 50 µl Derivatisierungsreagenz und 20 µl des internen Standards wird das Ganze für 2 Stunden bei 70°C derivatisiert, mit 52 µl 0,3 M HCl neutralisiert und im Vakuum getrocknet. Die getrockneten Monosaccharide werden in einer definierten Menge ddH<sub>2</sub>O aufgenommen (1 µl/µg eingesetztes Protein) und schließlich dreimal mit der 2,5-fachen Menge Chloroform ausgeschüttelt. Dabei ist darauf zu achten, dass sich alles löst, ggf. wird kurz im Ultraschallbad beschallt. Die Chloroform-Phase wird verworfen und der wässrige Überstand für die Chromatographie verwendet.

Die chromatographische Trennung erfolgt auf einer Nucleosil 120 C18 Säule bei einem Fluss von 0,5 ml/min und einer Säulentemperatur von 22°C mit folgendem Gradienten:

Zeit [min]	LM A [%]	LM B [%]
0	90	10
9	86	14
13	75	25
30	60	40
32	60	40
33	90	10
43	90	10

Die Detektion erfolgt im Durchflussphotometer bei 254 nm.

#### 4.12 GELFILTRATION (SEC)

##### Benötigte Lösungen

- Laufmittel für die Superose<sup>®</sup> 6B-Säule:
  - 150 mM NaCl
  - 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
  - 1 mM EDTA
  - 0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub>
  - in ddH<sub>2</sub>O.

## Durchführung

Die SEC wird zur Bestimmung des Molekulargewichtes der nativen Lipoproteine eingesetzt. Dazu wird zunächst die zu untersuchende Probe auf 150 µl (~50 µg) mit Laufmittel aufgefüllt. Die Proben werden mit 0,5 ml/min chromatographiert und über ein angeschlossenes Photometer detektiert. Die Detektion der Lipoproteine erfolgt bei der für Proteine typischen Absorption von 280 nm (Tryptophan und Tyrosin). Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wird mit Proteinen bekannter Größe eine Eichkurve erstellt.

**TAB. 5:** Für die Eichgerade verwendete Proteine.

<b>Protein</b>	<b>Molekulare Masse [kDa]</b>	<b>Referenz</b>
<i>Nereis</i> -Hämoglobin	3500	(Harris et al. 2001)
Thyroglobulin	669	Herstellerangabe
Ferritin	440	Herstellerangabe
Aldolase	158	Herstellerangabe
BSA (Dimer)	134	Herstellerangabe
DNase I	31	(Knippers 1997)
Lysozym	14,3	Herstellerangabe

### 4.13 PROTEINPRÄZIPITATIONEN

Um Proteinproben zu konzentrieren oder von störenden Verunreinigungen zu reinigen, können diese aus Lösungen ausgefällt werden. Dabei gibt es verschiedene Methoden. Zum Einen spezifische Fällungsmethoden, die nur bestimmte Proteine aus der Lösung fällen wie z.B. (Co-)Immunopräzipitationen zum Anderen unspezifische Verfahren, die alle in Lösung befindlichen Proteine fällen. Zu Letzteren gehören Fällungen mit Säuren (v. a. TCA), Salzen (Ammoniumsulfat) oder organischen Lösungsmitteln wie z.B. Aceton und Ethanol.

#### 4.13.1 CHLOROFORM-METHANOL-FÄLLUNG (WESSEL UND FLÜGGE 1984)

Diese Methode ist speziell für sehr kleine Probenmengen konzipiert - mit ihr lassen sich auch Mikrogramm-Mengen Protein fällen. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Proteine durch das Chloroform vollständig entfettet werden.

## **Durchführung**

Die Probe wird mit dem Vierfachen ihres Volumens Methanol versetzt, gemischt (Vortex) und anschließend kurz anzentrifugiert, um die Flüssigkeit zu sammeln. Es wird ein Probenvolumen Chloroform hinzugegeben, gründlich gemischt, abzentrifugiert und schließlich drei Ausgangsvolumina dH<sub>2</sub>O hinzugegeben, um die Phasen zu trennen. Es wird dann für eine Minute bei 13.000 rpm in der Biofuge zentrifugiert und der wässrige Überstand abgenommen und verworfen. Zur unteren Chloroformphase werden jetzt drei Probenvolumen Methanol gegeben, wodurch sich die Dichte der Chloroformphase reduziert und die Proteine durch Zentrifugation (5 Minuten 13.000 rpm) gesammelt werden können. Der Überstand wird verworfen und das Pellet getrocknet.

### **4.13.2 ACETONFÄLLUNG**

Im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Methode ist die Fällung mit Aceton ein sehr schonendes Verfahren, wenn sie bei Temperaturen <0°C ausgeführt wird.

## **Durchführung**

Die Proben werden 1:1 mit eiskaltem (-20°C) Aceton versetzt, gemischt und für mindestens 20 Minuten bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 20.000xg und 0°C gesammelt, der Überstand wird verworfen und die Pellets getrocknet.

## **4.14 TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE (TEM)**

### **4.14.1 BESCHICHTUNG DER KUPFERNETZCHEN MIT KOHLENSTOFF (HARRIS UND HORNE 1991, HARRIS 1999, HARRIS UND SCHEFFLER 2002)**

Um die Kupfernetzchen mit Kohlenstoff beschichten zu können, muss zunächst im Vakuum ein Kohlenstofffilm auf Glimmer aufgebracht werden. Der Glimmer befindet sich auf Objektträgern im Edwards Vakuum-Beschichter. Nach dem Bedampfen wird der Kohlenstofffilm durch Eintauchen des Glimmers in Wasser von diesem abgehoben und schwimmt auf der Wasseroberfläche, unter der sich die Kupfernetzchen befinden. Das Wasser wird dann langsam abgelassen und der Kohlenstoff so auf die Netzchen gebracht.

#### 4.14.2 PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE TEM AUF CONTINUOUS-CARBON (HARRIS UND HORNE 1991)

##### Benötigte Lösungen

- Kontrastierungslösung:  
2% (w/v) Uranylacetat  
in dH<sub>2</sub>O.

##### Durchführung

Zu Beginn der Präparation wird ein Stück Parafilm® auf die Arbeitsfläche geklebt. Anschließend werden pro Proteinprobe 4 Tropfen à 20 µl dH<sub>2</sub>O in einer Reihe auf den Parafilm® pipettiert. 20 µl der Proteinproben (ca. 0,05 mg/ml Protein) werden unterhalb der 4 Wassertropfen auf den Parafilm® pipettiert; anschließend wird für jede Proteinprobe 10 µl der Kontrastierungslösung aufgetragen.

Um die Proben auf die Kupfernetzchen zu übertragen, werden diese vorsichtig mit einer Pinzette am Rand angefasst und mit der mit Kohlenstoff beschichteten (matten) Seite in die Proteinlösung getaucht. Dabei ist zu beachten, dass der Tropfen nur die mit Kohlenstoff beschichtete Seite benetzt und nicht die andere Seite. Nach 30 Sekunden wird der Probentropfen vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt. Das Netzchen wird nacheinander in die Wassertropfen getaucht, um Puffersalze auszuwaschen.

Zum Abschluss wird die Probe mit der Uranylacetat-Lösung benetzt und für 30-60 Sekunden inkubiert. Dann wird vorsichtig der Uranylacetat-Tropfen mit einem Filterpapier entfernt. Das so vorbereitete Netzchen wird noch für eine Minute getrocknet.

## 4.15 AUFNAHMESTUDIEN

### 4.15.1 ZELLISOLIERUNG

#### Benötigte Lösungen

- Kulturmedium (verändert nach Taki und Dhainaut 1988b):  
500 µl 10 x Medium 199 mit Hanks Salzen (Sigma M9163)  
100 µl Hühnereiultrafiltrat  
50 µl 4,5 M NaCl-Lösung  
50 µl 100 x Penicillin-Stamm-lösung (0,125 mg/ml)  
50 µl 100 x Streptomycin-Stammlösung (0,5 mg/ml)  
ad 5 ml mit NBSS.
- MgCl<sub>2</sub>-Lösung:  
7,5% (w/v) MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
in dH<sub>2</sub>O.

#### Durchführung

Die Eizellen aus *Nereis virens* werden isoliert wie unter 4.2.1 beschrieben, allerdings werden die Zellen nicht mit HBS, sondern mit NBSS ausgespült und anschließend in Kulturmedium überführt.

Werden Eizellen aus *Platynereis dumerilii* verwendet, werden die Tiere in MgCl<sub>2</sub>-Lösung/Seewasser (1:1) für 5 Minuten betäubt. Die betäubten Tiere werden dann in eine Petrischale mit ein wenig Seewasser gesetzt. Mit einer Schere werden einige Parapodien entfernt und die Tiere leicht ausgedrückt. Die relativ rasch sedimentierten Eizellen (andere Coelomzellen bleiben im Überstand) werden in Kulturmedium gewaschen und stehen für die Inkubation bereit.

Werden Elaeocyten oder Spermatogonien für die Inkubationen verwendet, so werden die sich im Überstand befindlichen Zellen verwendet. Die Suspension wird zweimal durch Gaze (zunächst 150 µm Maschenweite und dann 60 µm Maschenweite) filtriert um größere Gewebsreste und Zellaggregate abzutrennen und können anschließend für die Inkubationen verwendet werden.

#### 4.15.2 FLUORESZENZMARKIERUNG VON LIPOPROTEINEN

Um die aufgenommenen Proteine in den Zellen und Zellkompartimenten zu detektieren, müssen die Lipoproteine fluoreszenzmarkiert werden. Dazu stehen zum Einen mehrere Fluorophore, wie z.B. FITC, DiI oder Oregon Green, zum Anderen verschiedene Formen der Markierung, kovalent am Protein bzw. nicht-kovalent in der Lipidmatrix, zur Verfügung. Auch die Möglichkeit einer Doppelmarkierung von Lipidmatrix und Proteinanteil besteht, wobei darauf zu achten ist, dass sich die verwendeten Farbstoffe in ihrer Anregungs- und Emissionswellenlänge unterscheiden.

##### **Markierung mit 1,1'-Diiodoctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat (DiI)**

DiI ist ein Membranfarbstoff, der mit seinen Acylresten (hier: C<sub>18</sub>) nicht-kovalent mit der Lipidmatrix von Lipoproteinen interagiert.

##### **Benötigte Lösungen**

- DiI-Stammlösung:  
3 mg/ml DiI (Invitogen, MolecularProbes D282)  
in DMSO.

##### **Durchführung**

Zur Lipoproteinlösung wird 1/10 so viel DiI hinzu pipettiert, wie Protein in der Lösung ist, d.h. 1/10 der Proteinkonzentration entspricht der DiI-Konzentration. Der Ansatz wird für 3 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren im Dunklen inkubiert. Um ungebundenen Farbstoff aus der Probe zu entfernen, wird die gefärbte Probe mit gequollenem Sephadex G25 fine versetzt (ca. 20 µl Sephadex-Bettvolumen pro 100 µl Probe) und gründlich gemischt. Danach werden die Sephadexperlen abzentrifugiert (2 Minuten 13.000 rpm, Biofuge) der klare Überstand wird weiter verwendet. Falls nötig kann der Ansatz auch durch einen Glasfaserfilter filtriert werden.

##### **Markierung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)**

FITC ist ein aminreaktiver Fluoreszenzfarbstoff, der unter alkalischen Bedingungen kovalent an Proteine bindet, und dabei den N-Terminus, aber auch die ε-Aminogruppe von Lysin und die Guanidinogruppe von Arginin markiert.

### Benötigte Lösungen

- Kopplungspuffer:  
100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,5  
in dH<sub>2</sub>O.
- 10 x Neutralisierungspuffer:  
1 M Tris-HCl, pH 7,5  
in dH<sub>2</sub>O.

### Durchführung

Die Lipoproteine werden über Nacht gegen den Kopplungspuffer dialysiert. Zur Entfernung eventuell vorhandener Präzipitate wird die Probe für eine Minute bei 13.000 rpm in der Biofuge zentrifugiert und zum Überstand 1 mg pro mg Protein Celite-gekoppeltes FITC (Sigma F1628) gegeben. Die FITC-Kopplung findet für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen statt. Der Ansatz wird wieder eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand mit Neutralisationspuffer neutralisiert. Abschließend wird, um überschüssiges FITC zu entfernen und um das markierte Lipoprotein umzusalzen, das fluoreszenzmarkierte Protein über eine Sephadex G-25 Säule nach dem Protokoll von Helmerhorst und Stokes (1980) in NBSS überführt. Dazu wird Sephadex G-25 fine in seiner 4-5 fachen Menge NBSS für 1 Stunde bei 90°C oder über Nacht bei Raumtemperatur vorgequollen. Anschließend wird das benötigte Bettvolumen an Sephadex G-25 (siehe Tab. 6) in ein Micro-Bio-Spin®-Sälchen (1 ml, BioRad Artikelnummer 732-6204) eingefüllt. Dieses wird auf ein Eppendorfgefäß gesteckt und für 2 Minuten bei 1.200xg trocken zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen. Danach wird das Gel mit der 2-3 fachen Menge des Bettvolumens an NBSS + 0,1% BSA versetzt um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Wieder wird 2 Minuten lang mit 1.200xg zentrifugiert. Jetzt wird die Säule mit dem 2-3 fachen ihres Bettvolumens NBSS gewaschen um freies, nicht gebundenes BSA zu entfernen und wie beschrieben zentrifugiert. Das markierte Lipoprotein wird auf das Gel pipettiert und wie oben zentrifugiert. Um eine möglichst effiziente Entsalzung zu erreichen und um den Probenverlust möglichst gering zu halten muss das Sephadex-Bettvolumen an das Probenvolumen angepasst werden (Tab. 6).

**TAB. 6:** Verhältnis der Volumina der zu entsalzenden Probe zu Sephadex-Bettvolumen

Probenvolumen [µl]	Sephadex-Bettvolumen [µl]
25	125
50	250
100	500
200	1000

#### 4.15.3 ZELLINKUBATION

Die isolierten Zellen werden für die Inkubation in 96-Well Mikrotiterplatten (*Platynereis*) oder in 24-Well Zellkulturschalen (*Nereis*) überführt, die, um unspezifische Bindungen zu verhindern, zuvor für 1 Stunde bei 37°C mit 1 mg/ml BSA in NBSS geblockt wurden. Zur Aufnahme des Lipoproteins wird das markierte Lipoprotein in einer Endkonzentration von 25-50 µg/ml hinzupipettiert und für 24 Stunden bei 18°C inkubiert, *Platynereis* Oocyten werden für 3 Stunden mit dem fluoreszenzmarkierten Protein inkubiert (Pulse) und nach 19 weiteren Stunden (Chase) analysiert. Bei FITC-markierten Proteinen wird ein 19-stündiger Pulse und ein 3-stündiger Chase durchgeführt. Das Kulturmedium im Überstand wird entfernt und die Zellen mit frischem Kulturmedium gewaschen. Die Analyse erfolgt durch Fluoreszenzmikroskopie unter der Verwendung der entsprechenden Filter (Anhang 9).



# ERGEBNISSE

## 1 LIPOPROTEINE

### 1.1 LIPOPROTEIN-ISOLIERUNGEN

Nachdem in meiner Diplomarbeit (Schenk 2003) und bei Schenk et al. (2006) das Lipoprotein von *Nereis virens* in einem selbstgenerierenden Iodixanol-Gradienten isoliert wurde, wurden in der vorliegenden Arbeit auch andere Isolationsmethoden getestet. Diese Methoden dienten dazu, die Aufreinigungen zu optimieren und vergleichbarer mit der Literatur zu machen, in der hauptsächlich in KBr isoliert wird.

### 1.2 KBR-FLOTATION

Der Vorteil dieser Methode ist ihre relativ einfache Durchführung, ein Nachteil ist die nicht bestimmbare Dichte des Lipoproteins, da kein Gradient gebildet wird. Ausgehend von der für das *Nereis*-Lipoprotein in Iodixanol ermittelten Dichte ( $\rho = 1,054\text{-}1,093\text{ g/ml}$ , Schenk et al. 2006) wurde die Coelomflüssigkeit vor der Ultrazentrifugation auf eine Dichte von  $1,16\text{ g/ml}$  eingestellt. Nach der Zentrifugation fand sich das Lipoprotein wie erwartet ganz oben im Zentrifugenglas (Abb. 14).



**Abb. 14:** Lipoprotein-Isolierung durch Flotation in KBr. Die Lipoproteine sind deutlich als gelbe Bande dicht unter dem Meniskus zu erkennen. Unten ist pelletiertes Hämoglobin erkennbar.

### 1.2.1 SELBSTGENERIERENDER KBr-DICHTEGRADIENT

Zur Ermittlung der Dichte in KBr wurden selbstgenerierende KBr-Dichtegradienten erzeugt. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: ein zweistufiger Gradient mit kurzer Zentrifugationsdauer (3 Stunden) und hoher Zentrifugalbeschleunigung ( $\sim 417.000xg$ ), und ein mehrstufiger Gradient mit langer Zentrifugationsdauer (16 Stunden) und ‚mittlerer‘ Zentrifugalbeschleunigung ( $\sim 200.000xg$ ).

#### Zweistufiger KBr-Dichtegradient

Die Isolierung im zweistufigen Gradienten vereint den Vorteil eines Gradienten gepaart mit einer zügigen Durchführung. Die Nachteile sind das geringere einsetzbare Probenvolumen und die etwas kompliziertere Durchführung im Vergleich zur Flotationszentrifugation. Weiterhin stellt sich die Frage, inwiefern die getrennten Lipoproteine und das KBr ihre Gleichgewichtskonzentration, eine wichtige Voraussetzung für die akkurate Bestimmung der Dichte, nach drei Stunden erreicht haben.

#### Mehrstufiger KBr-Dichtegradient

Die genauesten Resultate im Bezug auf die Dichte der analysierten Lipoproteine lieferte der mehrstufige KBr-Dichtegradient. Bedingt durch seine lange Zentrifugationsdauer (16 Stunden) zusammen mit einer Zentrifugalbeschleunigung von  $\sim 200.000xg$  befinden sich die Lipoproteine am Ende der Zentrifugation mutmaßlich im Gleichgewicht mit dem sie umgebenden Medium, d.h. sie schweben am Ort ihrer Dichte im Gradienten. Die Nachteile dieser Zentrifugationsmethode sind der komplexe Aufbau, die lange Dauer (mit Vorkonzentrationsschritt insgesamt 19 Stunden) und das geringe Probenvolumen (maximal 500  $\mu l$  für den verwendeten MLS-50-Rotor).

### 1.3 DICHTEBESTIMMUNGEN

Die Dichte des *Nereis*-Lipoproteins wurde zum Einen nach der Isolierung in Iodixanol bestimmt, und zum Anderen nach der Isolierung in KBr. In beiden Fällen konnte das *Nereis*-Lipoprotein als HDL klassifiziert werden. Die Dichte betrug  $1,069 \pm 0,014$  g/ml (zwei individuelle Messungen, jeweils in Fünffachbestimmung, siehe auch Schenk et al. 2006) in Iodixanol und  $1,09-1,10$  g/ml (zwei unabhängige Messungen, jeweils Dreifachbestimmung) in KBr.

## 1.4 NATIVES MOLEKULARGEWICHT

### 1.4.1 ANALYTISCHE ULTRAZENTRIFUGATION

Der mit dem *Nereis*-Lipoprotein durchgeführte Gleichgewichtslauf lieferte eindeutige Ergebnisse. Es zeigte sich, dass die gewählten Geschwindigkeiten (6.000, 8.000 und 10.000 rpm) ideal waren, da bei keiner Geschwindigkeit nach 24-stündiger Zentrifugation eine Sedimentation festgestellt werden konnte (Abb. 15, nächste Seite).

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm UltraScan durch den GlobalFit-Algorithmus (Abb. 16 und 17, übernächste Seite). Eine entscheidende Größe bei der Berechnung von Molekülmassen aus AUZ-Läufen ist das partialspezifische Volumen des untersuchten Moleküls, welches den Kehrwert der Dichte darstellt. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass es sich um die **unhydratisierte** Dichte handeln muss. Aus diesem Grund konnte nicht die in KBr ermittelte Schwebdichte verwendet werden, da diese noch zu viel Hydratwasser beinhaltet (~ 79%, Anhang 6). Deswegen wurde das partialspezifische Volumen,  $v$ , mit Hilfe von Literaturwerten und den folgenden Annahmen errechnet:

1. Die Dichte der Apoproteine basiert auf einer von der molekularen Masse ( $M = 365$  kDa, siehe 1.7.2) abhängigen Funktion (Fischer et al. 2004), d.h.:

$$\rho(M) = \left[ 1,41 + 0,145 \times \exp\left(-\frac{M(kDa)}{13}\right) \right] g/ml \quad (4)$$

Woraus für die *Nereis*-Apolipoproteine eine Dichte von 1,41 g/ml resultiert.

2. Die Gesamtdichte der Lipidmatrix und der Kohlenhydrate (KH) entspricht der Summe der Dichten der relativen Anteile ihrer Einzelbestandteile. Damit wäre die Dichte der Lipidmatrix 1,004 g/ml und die der Kohlenhydrate 1,547 g/ml (siehe 1.7. und 1.8, Anhang 5 und Chino et al. 1969).
3. Das Lipoprotein besteht zu gleiche Teilen aus Lipid und Protein (je 49,67%, d.h. 1:1-Massenverhältnis) sowie aus 0,66% Kohlenhydrat (1.7 und 1.8). Auch hier gilt die Annahme, dass die Gesamtdichte die Summe der einzelnen Teildichten ist. Für die unhydratisierte Dichte gilt also:

$$\rho(NvLp) = \rho(Apoprotein) \times 49,67\% + \rho(Lipid) \times 49,67\% + \rho(KH) \times 0,66\% \quad (5)$$

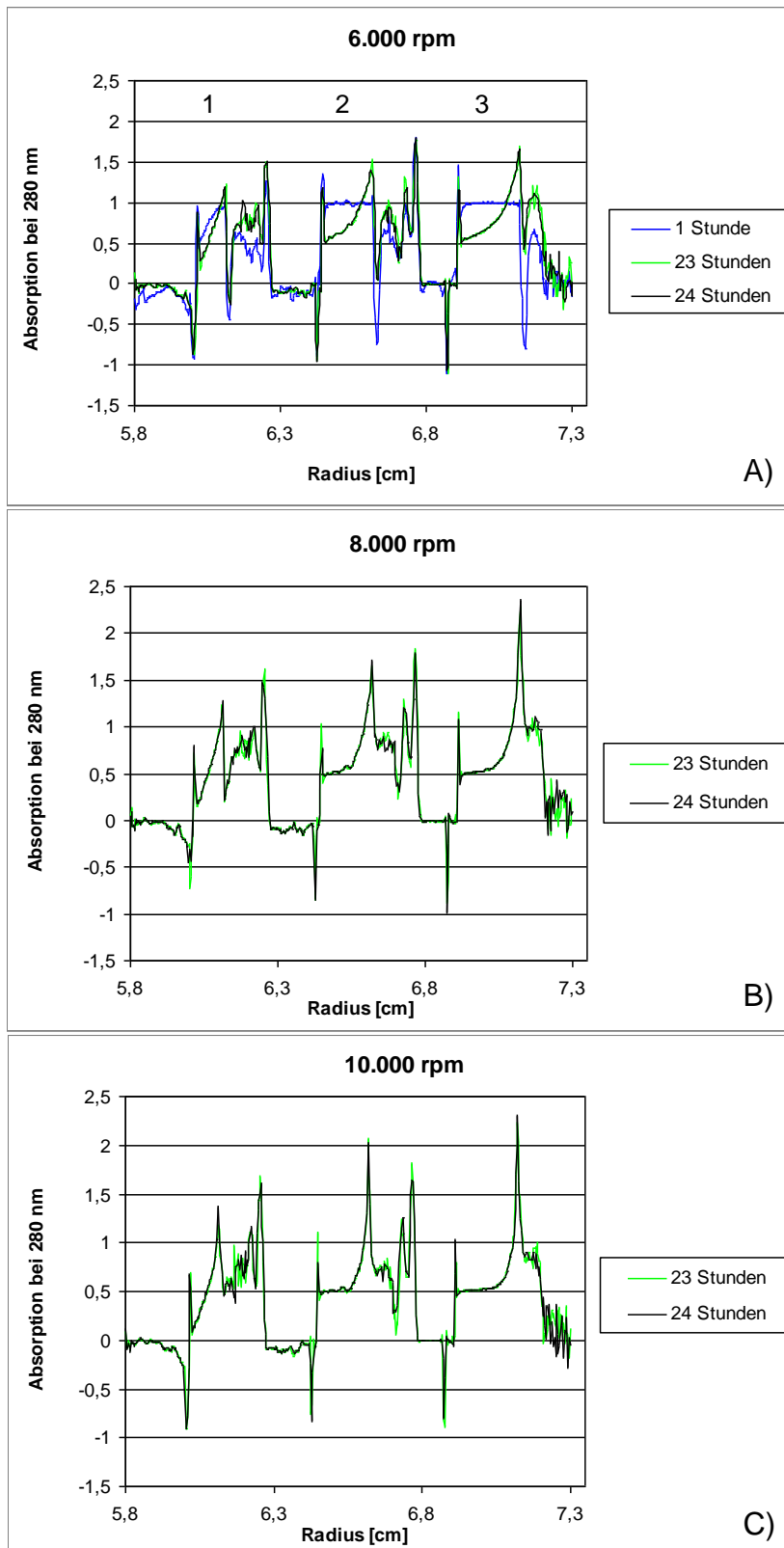
Nach Einsetzen ergibt sich:

$$\rho(NvLp) = 1,41 g/ml \times 49,67\% + 1,004 g/ml \times 49,67\% + 1,547 g/ml \times 0,66\% = 1,209 g/ml \quad (6)$$

Daraus folgt für das partialspezifische Volumen  $v$ :

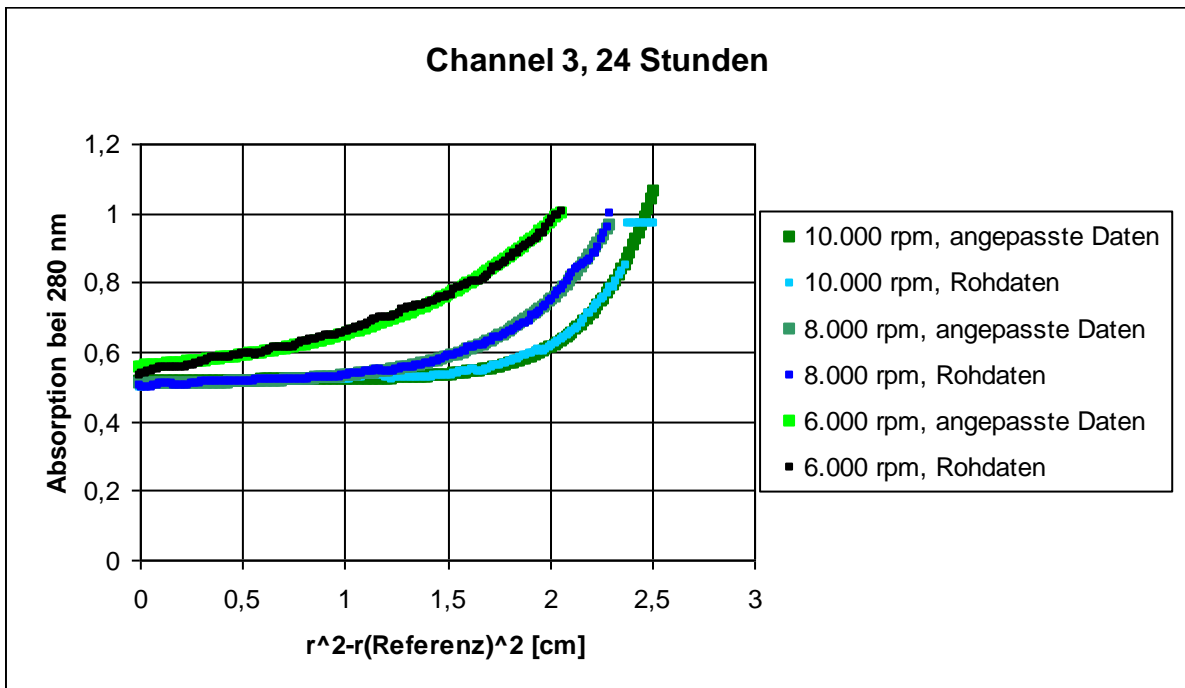
$$v = \frac{1}{\rho(NvLp)} = \frac{1}{1,209 \text{ g/ml}} = 0,827 \text{ ml/g} \quad (7)$$

Wenn das so ermittelte partialspezifische Volumen zur Massenberechnung herangezogen wird, ergibt sich für das *Nereis*-Lipoprotein ein natives Molekulargewicht von  $\sim 857.000$ .

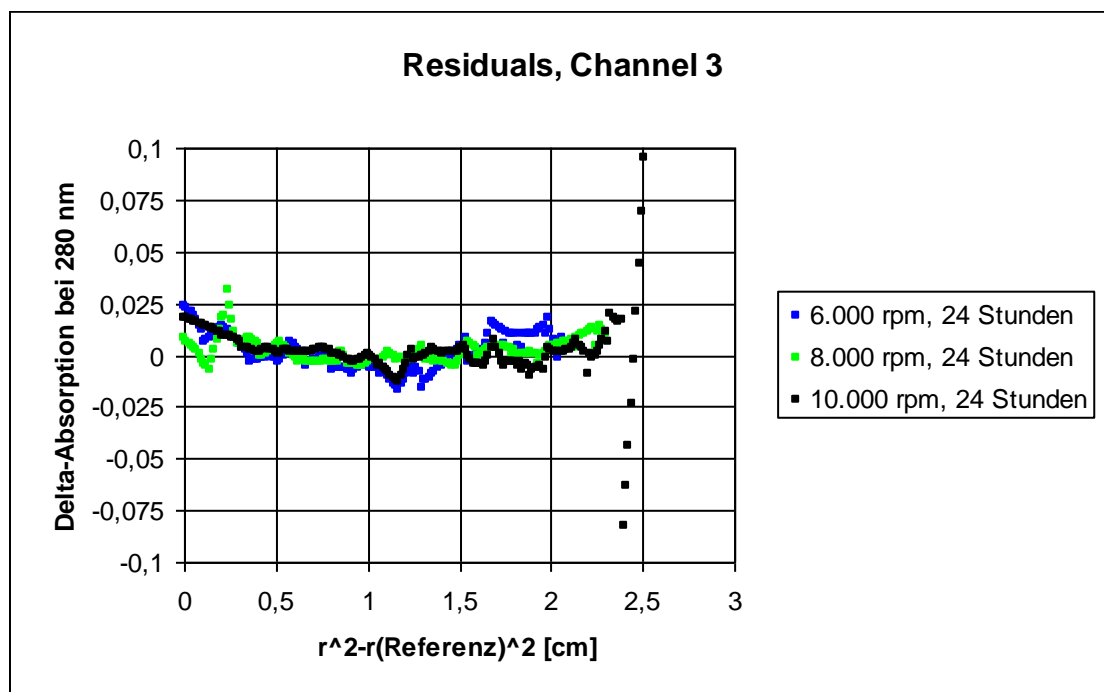


**Abb. 15:** Gleichgewichtslauf in der Analytischen Ultrazentrifuge mit *Nereis*-Lipoproteinen. Absorptionsprofile. Es sind die drei Messzellen (Channels) zu erkennen. Channel 1, der zentripetalste der drei zeigt durchweg unbefriedigende Daten, Channel 2 und 3 hingegen zeigen auswertbare Profile. Auffällig ist die generell erhöhte Grundlinie, die durch ein bei diesen Geschwindigkeiten nicht-sedimentierendes bei 280 nm absorbierendes Teilchen in der Probe erzeugt worden sein könnte.

- A) Messungen bei 6.000 rpm.
- B) Messungen bei 8.000 rpm.
- C) Messungen bei 10.000 rpm.



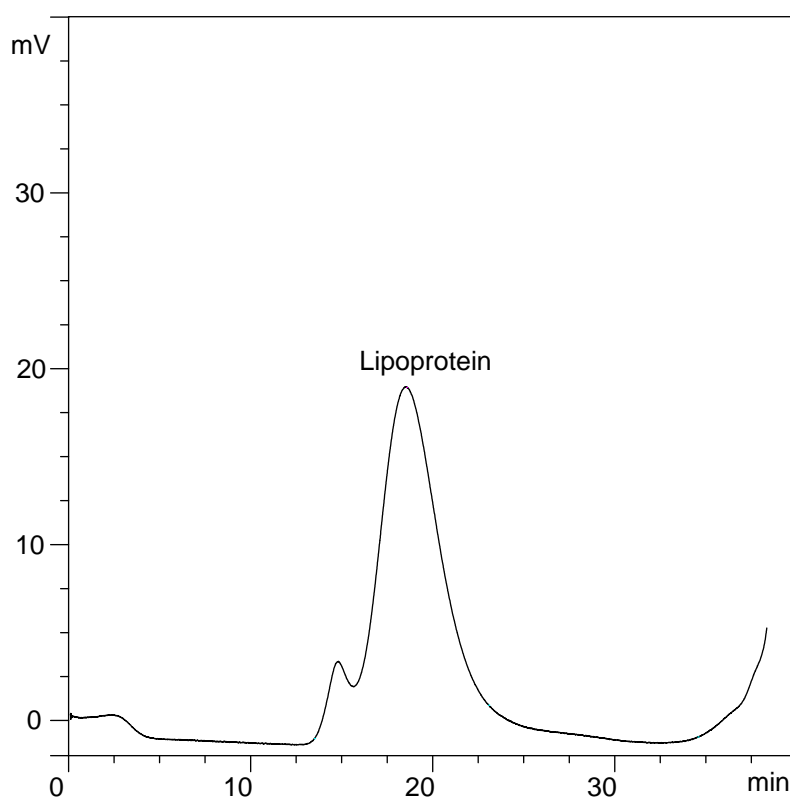
**Abb. 16:** GlobalFit-Analyse des Gleichgewichtslaufes vom *Nereis*-Lipoprotein. Abgebildet sind die Kurvenbereiche, die für die Berechnung des Molekulargewichtes herangezogen wurden. Aufgetragen ist die Absorption bei 280 nm gegen den relativen Radius. Der Klarheit wegen sind nur die Daten von Channel 3 nach 24-stündiger Zentrifugation dargestellt. Die Rohdaten liegen nahezu deckungsgleich über den gefitteten Werten, was für ein gutes Modell spricht.



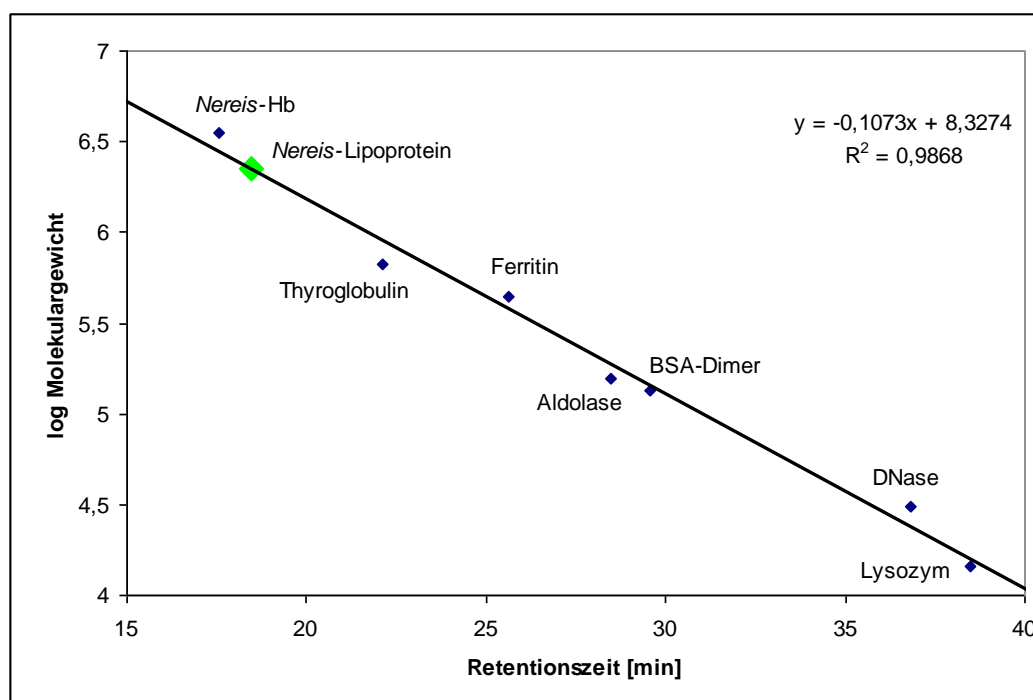
**Abb. 17:** Residuals. Abweichung der Rohdaten aus Abb. 16 von den angepassten Werten. Gute Fits liegen parallel und sollten um nicht mehr als 0,05 streuen. Zu sehen ist der Absorptionsunterschied gegen den relativen Radius. Bis auf die letzten Messpunkte bei 10.000 rpm ist der Fit sehr gut. Auch hier sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Werte für Channel 3 und 24-stündiger Zentrifugation angegeben.

### 1.4.2 GELFILTRATION

Neben der Analytischen Ultrazentrifugation wurde auch versucht, das native Molekulargewicht per Gelfiltration zu ermitteln. Dazu wurden die Lipoproteine über eine Superose 6-Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min chromatographiert. Das Eluat wurde bei 280 nm detektiert. Die isolierten Lipoproteine zeigten einen einzelnen Peak bei einer Retentionszeit von  $\sim 18,46 \pm 1,1$  Minuten ( $n = 3$ ) (Abb. 18). Anhand der aus den Retentionszeiten der Standardproteine ermittelten Eichgrade und der dazu gehörigen Gradengleichung (Abb. 19, nächste Seite) lässt sich das native Molekulargewicht errechnen. Das so bestimmte Molekulargewicht beträgt  $\sim 2.221.500$ , da das *Nereis*-Lipoprotein ein discoidales Protein ist (Schenk et al. 2006), die Eichgrade jedoch mit globulären Proteinen erstellt wurde, ist dieser Wert als zu groß anzusehen. Da eine Scheibe mit einem Durchmesser von 42 nm und einer Dicke von 10 nm (wie für das *Nereis*-Lipoprotein durch elektronenmikroskopische Studien gezeigt, Schenk et al. 2006) lediglich 35,7% des Volumens einer Kugel mit 42 nm Durchmesser hat, ergibt sich ein korrigiertes natives Molekulargewicht von  $\sim 793.000$ .



**Abb. 18:** Elutionsprofil des *Nereis*-Lipoproteins auf der Superose 6-Säule. Die Detektion erfolgte bei 280 nm, die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Das Lipoprotein eluiert hier bei 18,5 Minuten. Der kleine Peak vor dem Lipoprotein stellt ein Aggregat dar, der Anstieg bei >34 Minuten das Gradientenmedium Iodixanol.



**Abb. 19:** Eichgrade für die Gelfiltration. Die Standardproteine sind als blaue und das *Nereis*-Lipoprotein als grüner Rhombus dargestellt. Aufgetragen ist die Abhängigkeit der Retentionszeit vom Logarithmus des Molekulargewichtes.

### 1.5 SEDIMENTATIONSKOEFFIZIENT

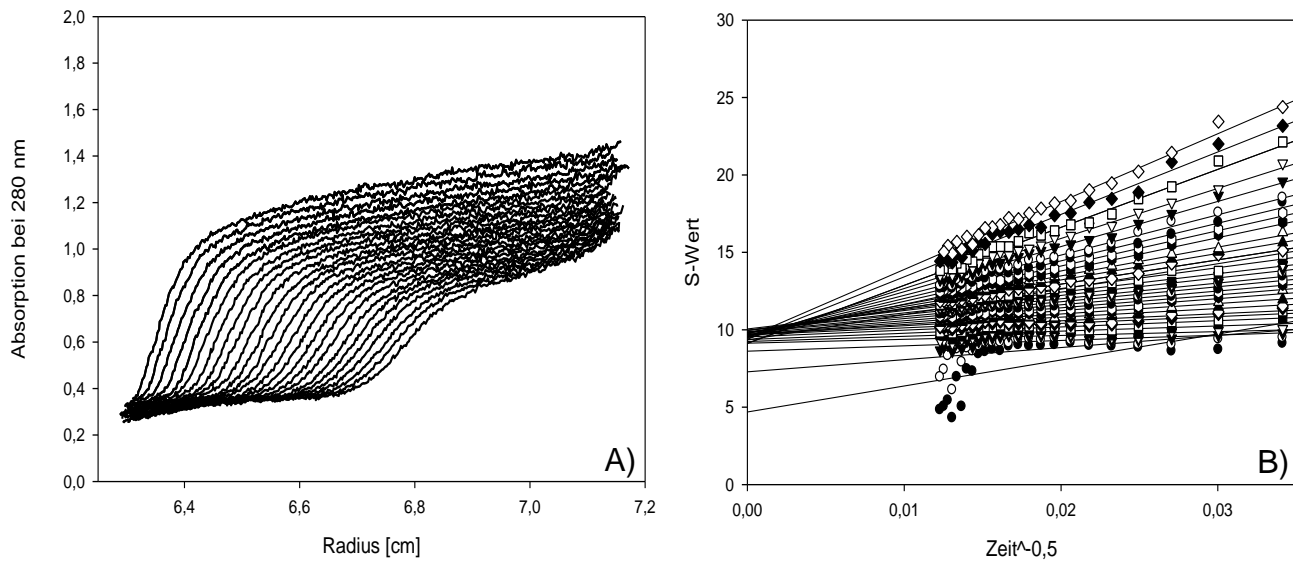
Die mit dem *Nereis*-Lipoprotein durchgeführten Sedimentationsläufe zeigten eine einheitliche Sedimentation der Lipoproteine, was sich zum Einen an der Konzentrationsverteilung während des Laufs (Abb. 20 A, nächste Seite) und zum Anderen am van Holde-Weisheit-Extrapolationsplot (Abb. 20 B, nächste Seite) erkennen lässt. Der aus den Sedimentationsläufen ermittelte, auf Wasser und 20°C korrigierte Sedimentationskoeffizient  $S_{20,w}$  betrug 9,7 S.

Aus dem Sedimentationskoeffizienten lässt sich mit Hilfe der Svedberg-Gleichung näherungsweise das Molekulargewicht (M) errechnen:

$$M = \frac{R \times T \times S}{D \times (1 - v \times c)} \quad (8)$$

R entspricht der universellen Gaskonstante ( $8,315 \times 10^7$  erg/Grad und Mol), T der absoluten Temperatur in K (293,15), S dem Sedimentationskoeffizienten in  $10^{-13}s^{-1}$ , D dem Diffusionskoeffizienten ( $1,38 \times 10^{-7}cm^2/s$ , Gellissen und Emmerich 1980) und c der Dichte von Wasser bei 20°C (0,998 g/ml, Weast 1974). Als partialspezifisches Volumen v wird der in Gleichung 7 ermittelte Wert (0,827 ml/g) benutzt.

Es ergibt sich nach Einsetzen der entsprechenden Werte in (8) ein Molekulargewicht von  $\sim 981.000$ .



**Abb. 20:** Sedimentationslauf in der Analytischen Ultrazentrifuge von *Nereis*-Lipoproteinen. A) Sedimentationsprofil. Jede Linie entspricht einer Messung. Die Messungen wurden im Abstand von 1 Minute aufgenommen. Deutlich ist die Wanderung der Sedimentationsfront entlang der Rotorachse (X-Achse) zu erkennen. B) Linearisierung und Extrapolation des Sedimentationsprofils (siehe links) auf unendliche Zeit mit Hilfe des erweiterten van Holde-Weischet-Algorithmus. Auf der y-Achse kann im Schnittpunkt der extrapolierten Geraden mit der Achse der Sedimentationskoeffizient abgelesen werden.

### 1.6 MOLARER EXTINKTIONSKOEFFIZIENT

Um den molaren Extinktionskoeffizienten des *Nereis*-Lipoproteins zu bestimmen, wurde zunächst die Absorption des Lipoproteins bei 280 nm ermittelt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration in der Probe mit Hilfe des BCA-Assays bestimmt. Nach dem Gesetz von Lambert-Beer ist die Extinktion (E) direkt proportional zur Konzentration und der Schichtdicke der Probe:

$$E = \varepsilon \times c \times d \quad (9)$$

Wobei c der Konzentration in mol/l (M) entspricht, d der Schichtdicke in cm und  $\varepsilon$  dem molaren Extinktionskoeffizienten in  $M^{-1}cm^{-1}$ . Nach Umstellen und Einsetzen ergibt sich für eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml:

$$\varepsilon = \frac{1,571}{2,74 \times 10^{-6} M \times 1 cm} = 573.358 \frac{1}{M \times cm} \quad (10)$$



## 1.7 CHARAKTERISIERUNG DER APOLIPOPTEINE

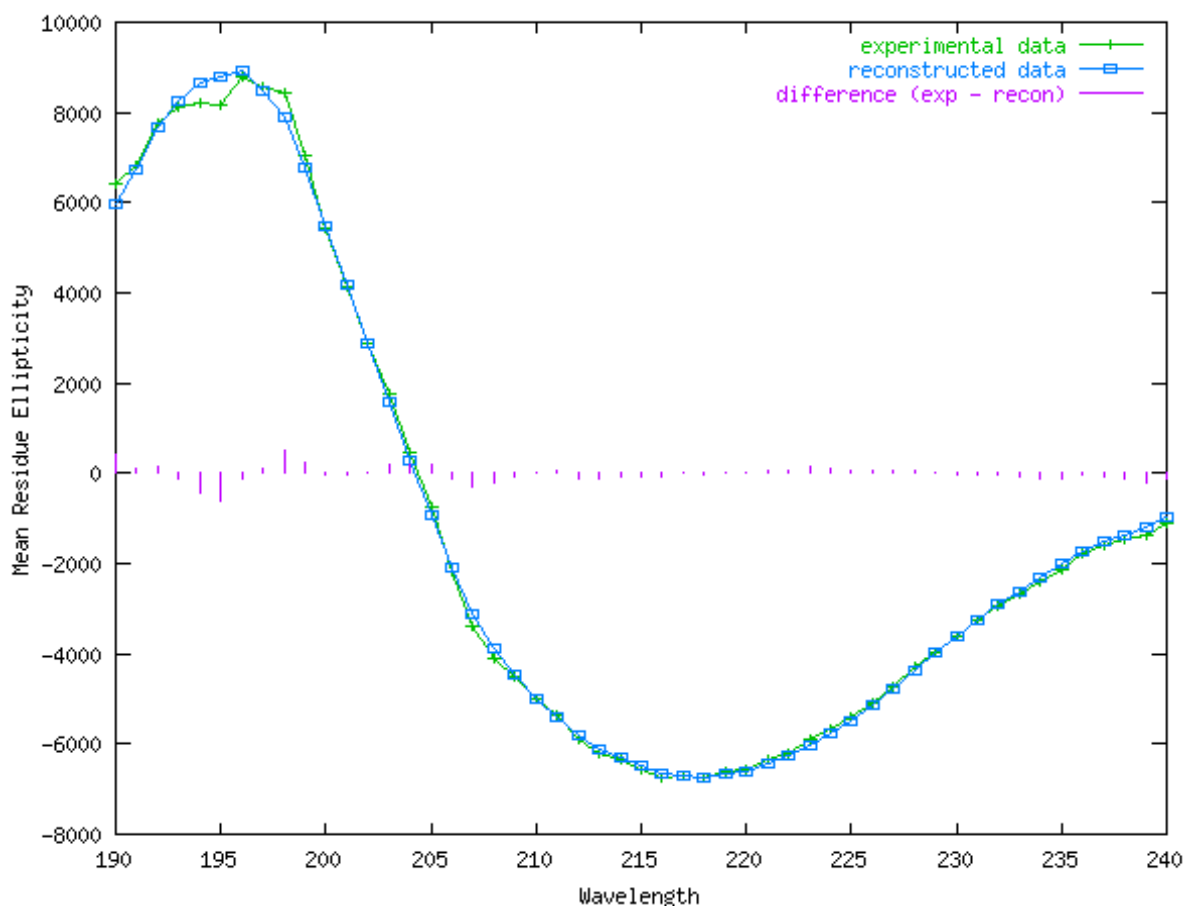
Das *Nereis*-Lipoprotein enthält zwei Untereinheiten, eine hoch molekularer (ApoNvLp I) und eine mittlerer Masse (ApoNvLp II, Schenk 2003, Schenk et al. 2006). Im Laufe dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass die berichtete Masse der großen Untereinheit von 247 kDa (Schenk et al. 2006) nach oben korrigiert werden musste. Durch die Verwendung geeigneterer Standardproteine in der SDS-PAGE stellte sich heraus, dass eine Masse von ~280 kDa anzunehmen ist.

### 1.7.1 SEKUNDÄRSTRUKTUREN DER APOLIPOPTEINE

Mit Hilfe der Circular Dichroismus- (CD-) Spektroskopie sollte die relative Verteilung der einzelnen Sekundärstrukturen im *Nereis*-Lipoprotein analysiert werden. Zunächst war es wichtig, die geeignete Verdünnung der Probe zu ermitteln. Hierzu wurde zuerst der Puffer (PBS + 1 mM EDTA) in verschiedenen Verdünnungen gemessen (siehe Material und Methoden). Die eigentlichen Proben wurden in entsprechender Verdünnung (1:30-1:40, die Proteinkonzentration betrug somit meist 0,02-0,03 mg/ml) gemessen. Aus den erhaltenen Spektren (Abb. 21, nächste Seite) und dem dazugehörigen Circular Dichroismus bei jeder Wellenlänge konnte nun mit Hilfe des Dichroweb-Servers (<http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/>) der relative Anteil der einzelnen Sekundärstrukturen errechnet werden. Legt man eine durchschnittliche Aminosäuremasse von 115 Da zugrunde (Ryan et al. 1992), so zeigt sich, dass das *Nereis*-Lipoprotein durch einen sehr hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblättern charakterisiert ist;  $\alpha$ -Helices sind bei weitem nicht so häufig vertreten (Tab. 7).

**TAB. 7:** Prozentuale Anteile der einzelnen Sekundärstrukturen des *Nereis*-Lipoproteins. Ermittelt mit Hilfe des CDSSTR-Algorithmus aus den CD-Spektren unter Annahme einer durchschnittlichen Aminosäuremasse von 115 Da. Mittelwerte aus 4 unabhängigen Messungen.

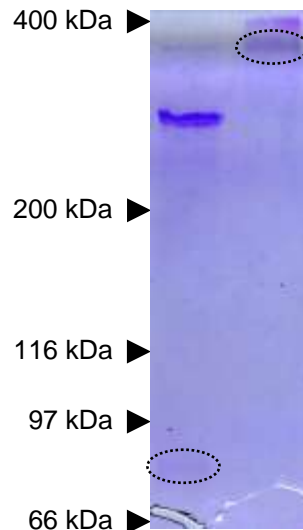
$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	Schleifen	Ungeordnet
14%	35%	22%	28%



**Abb. 21:** CD-Spektrum des *Nereis*-Lipoproteins im Bereich von 240-190 nm. Gemessen wurde im Spektralbereich von 250–185 nm bei 50 nm/min in 0,5 nm Schritten mit einer Integrationszeit von einer Sekunde. Die Schichtdicke war 0,1 cm und die Proteinkonzentration betrug 0,029 mg/ml. Die grüne Linie stellt die experimentell ermittelten und die blaue Linie die aus der Datenbank rekonstruierten Werte dar. Die violetten Balken geben die Differenz zwischen experimentellen und theoretischen Werten an.

### 1.7.2 STÖCHIOMETRIE

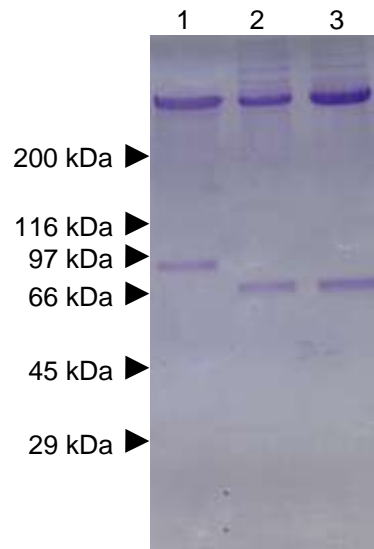
Um die Stöchiometrie der beiden Apoproteinuntereinheiten zu bestimmen, wurden diese mit Hilfe von Glutaraldehyd chemisch miteinander verbunden. Das entstandene Produkt wurde anschließend auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Es war deutlich eine Proteinbande im Bereich von ~365 kDa zu erkennen, während die beiden Untereinheiten mit 280 und 85 kDa verschwunden waren (Abb. 22 nächste Seite). Dies lässt auf eine 1:1-Stöchiometrie der beiden Apolipoproteine im nativen Lipoprotein schließen ( $280 \text{ kDa} + 85 \text{ kDa} = 365 \text{ kDa}$ ). Ein ebenfalls beobachtetes höhermolekulares Aggregat stellt wahrscheinlich eine Multimerbildung dar.



**Abb. 22:** SDS-PAGE (6%) der mit Glutaraldehyd gecrosslinkten *Nereis*-Apolipoproteine. Linke Spur: Kontrolle. Die beiden Apoproteine mit molekularen Massen von 280 und 85 kDa (eingekreist) sind erkennbar. Rechte Spur: mit 0,025% Glutaraldehyd gecrosslinkte Apolipoproteine. Die beiden ursprünglichen Untereinheiten sind verschwunden, während ein prominentes Aggregat mit einer Masse von ~365 kDa auftaucht (eingekreist), das Aggregat über dem 365 kDa-Bande repräsentiert eine Multimerbildung. Die Pfeile geben die Positionen der Standardproteine an. Coomassie gefärbt.

### 1.7.3 DISULFIDBRÜCKEN

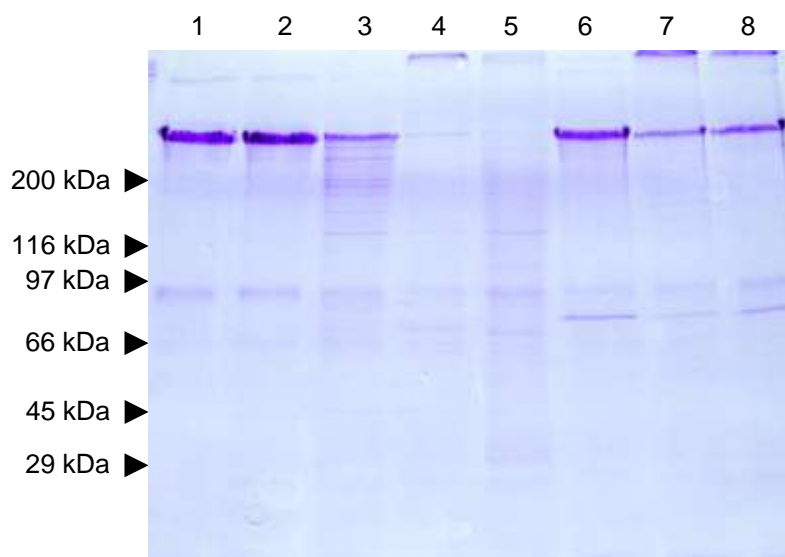
Die beiden in einer 1:1-Stöchiometrie vorliegenden Apolipoproteine (siehe 1.7.2) des Lipoproteinpartikels können entweder lose mit dem Partikel assoziiert oder durch intermolekulare Disulfidbrücken mit einander verknüpft sein. Um diese Frage zu beantworten wurden die Lipoproteine auf einer SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt. Dabei zeigte sich, dass die beiden Untereinheiten nicht durch *intermolekulare* Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Auch zeigte sich, dass *intramolekulare* Disulfidbrücken nur in ApoNvLp II vorkommen, was durch das geänderte Laufverhalten des Polypeptides deutlich wird. Es läuft unter nicht-reduzierenden Bedingungen nicht mehr bei 85 kDa, sondern bei ~66 kDa, was auf eine durch Disulfidbrücken stabilisierte kompaktere Form schließen lässt. ApoNvLp I hingegen ist in seinem Laufverhalten nicht betroffen. Auffällig ist jedoch die Aggregatbildung, die im nicht-reduzierten Zustand deutlich zu erkennen ist (Abb. 23, nächste Seite). Dies könnte durch wenige intermolekulare Disulfidbrücken hervorgerufen werden, die spontan durch Oxidation zweier im nativen Zustand reduzierter Sulfhydrylgruppen (-SH) entstanden sind.



**Abb. 23:** SDS-PAGE (4-20%) mit reduzierten und nicht-reduzierten Lipoproteinen. Spur 1: Reduzierte Lipoproteine. Spur 2: Lipoproteine ohne Reduktionsmittel, 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Spur 3: Lipoproteine ohne Reduktionsmittel, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Pfeile geben die Positionen der Molekulargewichtsstandards an. Coomassie gefärbt.

#### 1.7.4 LIMITIERTE PROTEOLYSE

Die Exposition der beiden Apolipoproteine des *Nereis*-Lipoproteins zum wässrigen Medium hin wurde anhand ihrer Zugänglichkeit für Proteasen durch eine limitierende Proteolyse ermittelt. Hierbei wurden die Serinproteasen Trypsin und V8 verwendet. Während Trypsin die 280 kDa Untereinheit im nativen Zustand nicht spalten konnte, war das 85 kDa Peptid einer Degradation zugänglich, was am Auftreten einer charakteristischen 72 kDa-Bande erkennbar war. Wurden die Proben entfettet oder durch Hitze denaturiert, blieb ebenfalls nur ApoNvLp II für Trypsin zugänglich und es bildete sich in jedem Fall das schon erwähnte 72 kDa Produkt. Bei der Verwendung von V8 hingegen waren beide Untereinheiten schon im nativen Zustand der Proteolyse zugänglich, was durch die charakteristische Peptid-,Leiter' unterhalb von ApoNvLp I gekennzeichnet ist, welche in einem Peptid mit einer Masse von ~125 kDa endet. Unterhalb der 85 kDa Untereinheit lässt sich eine schwache Bande mit einer Masse von ~65 kDa ausmachen. Wurden die entfetteten bzw. denaturierten Proteine verdaut so waren hauptsächlich die 85 kDa Untereinheit sowie die schon erwähnten Peptide mit Massen von ~125 bzw. 65 kDa zu erkennen (Abb. 24, nächste Seite).



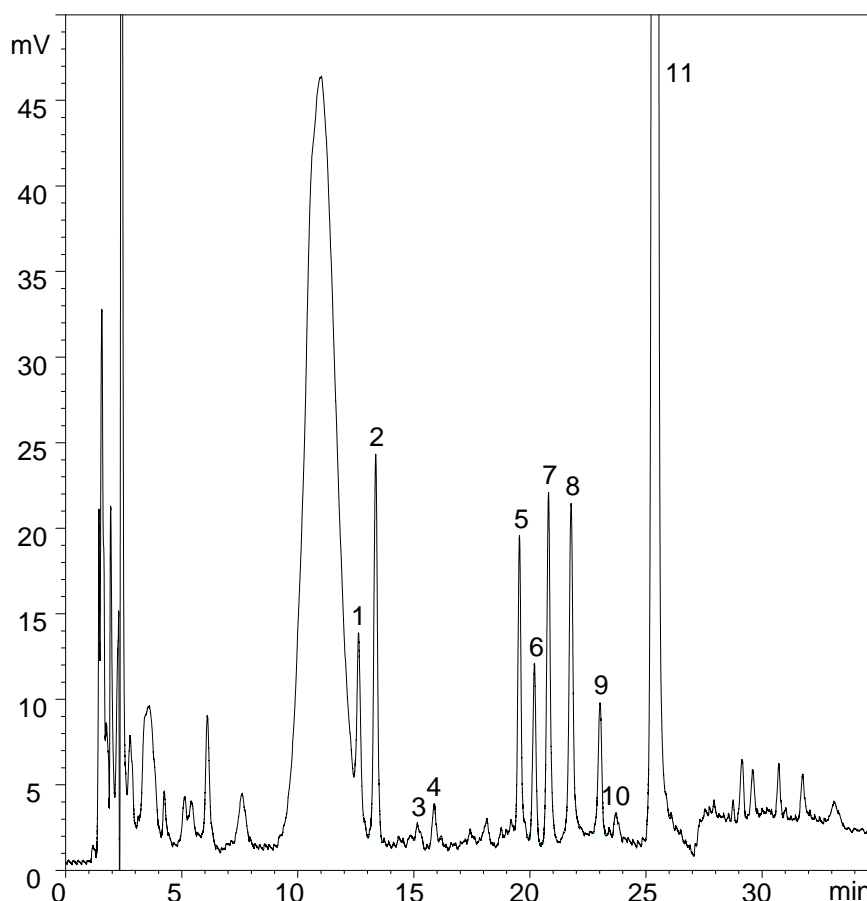
**Abb. 24:** SDS-PAGE (4-20%) mit Proteolyse-Produkten vom *Nereis* Lipoprotein. Spur 1: Kontrolle. Spur 2: 30 Minuten 37°C ohne Proteasen. Spur 3: nativ + V8. Spur 4: entfettet + V8. Spur 5: 5 Minuten 95°C + V8. Spur 6: nativ + Trypsin. Spur 7: entfettet + Trypsin. Spur 8: 5 Minuten 95°C + Trypsin. Die weniger intensiv gefärbten Proteinbanden in Spur 4, 7 und 8 sind auf beobachteten Aggregate zurück zuführen. Die Pfeile geben die Positionen der Molekulargewichtsstandards an. Coomassie gefärbt.

### 1.7.5 KOHLENHYDRATZUSAMMENSETZUNG DER APOPROTEINE

Bei den Kohlenhydratanalysen standen sowohl die Monosaccharidzusammensetzung und der Gesamtkohlenhydratanteil der Lipoproteine als auch die Struktur und die Zusammensetzung der N-Glycane im Fokus.

#### Monosaccharide

Nachdem die einzelnen Kohlenhydrate mittels Trifluoressigsäure (TFA) vom Peptidrückgrat hydrolytisch entfernt waren, wurden sie nach Derivatisierung mit einem Chromophor (PMP) per Umkehrphasen-HPLC getrennt (Abb. 25 nächste Seite) und anschließend quantifiziert. Dabei zeigte sich ein ungefähres 1:1-Verhältnis von Mannose zu N-Acetylglucosamin, den beiden maßgeblichen Monosacchariden in N-glycosidisch gebundenen Kohlenhydratstrukturen. Auch Fucose stellt eine wichtige Komponente von N-Glycanen dar. Die für O-glycosidisch gebundene Kohlenhydrate typischen Zucker, N-Acetylgalactosamin und Galactose, sind ebenfalls vertreten. Neben Rhamnose, Glucose und Xylose wurden auch einige nicht identifizierbare Zucker gefunden. Die beobachteten hohen Anteile an Glucose und Xylose (Tab. 8 nächste Seite) sind bei den hier verwendeten Proteinkonzentration als Kontamination zu betrachten (Strydom 1994). Sie werden deshalb bei der Berechnung der Glycosylierung nicht berücksichtigt.



**Abb. 25:** Chromatogramm der mit TFA hydrolysierten und PMP derivatisierten Monosaccharide. Peaks: 1: N-Acetylglucosamin 2: Mannose 3: N-Acetylgalactosamin 4: Rhamnose 5: unbekannt 6: Glucose 7: Galactose 8: Xylose 9: Fucose 10: unbekannt 11: Digitoxose (interner Standard). Glucose und Xylose (Peaks Nr. 6 und 8) werden als omnipräsente Verunreinigungen angesehen. Der große Peak bei 11 Minuten, sowie die kleineren, davor liegenden Peaks, sind Artefakte des Derivatisierungsreagenz, die relativen Peakflächen sind aufgrund unterschiedlicher Extinktionskoeffizienten der verschiedenen PMP-Zucker nicht miteinander vergleichbar.

Aus den absoluten Zuckeranteilen (Tab. 8) lässt sich die Gesamtglycosylierung der Apolipoproteine errechnen.

**TAB. 8:** Absolute Anteile der Monosaccharide pro 10 µg Apolipoprotein. Glucose und Xylose (rot dargestellt) werden als Kontaminationen betrachtet. Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

N-Acetylglucosamin [µg]	Mannose [µg]	N-Acetylgalactosamin [µg]	Rhamnose [µg]	Glucose [µg]	Galactose [µg]	Xylose [µg]	Fucose [µg]
0,033	0,029	0,008	0,006	0,112	0,042	0,019	0,015

Aus Tabelle 8 ergibt sich eine Gesamtmenge an Kohlenhydraten von 133 ng pro 10 µg Apolipoprotein, daraus ergibt sich ein Glycosylierungsanteil für die Apoproteine von 1,31% (siehe Anhang 7.1) und, unter Annahme eines 1:1-Massenverhältnis von Protein und Lipid (siehe 1.8), eine Glycosylierung des Lipoproteinpartikels von 0,66%.

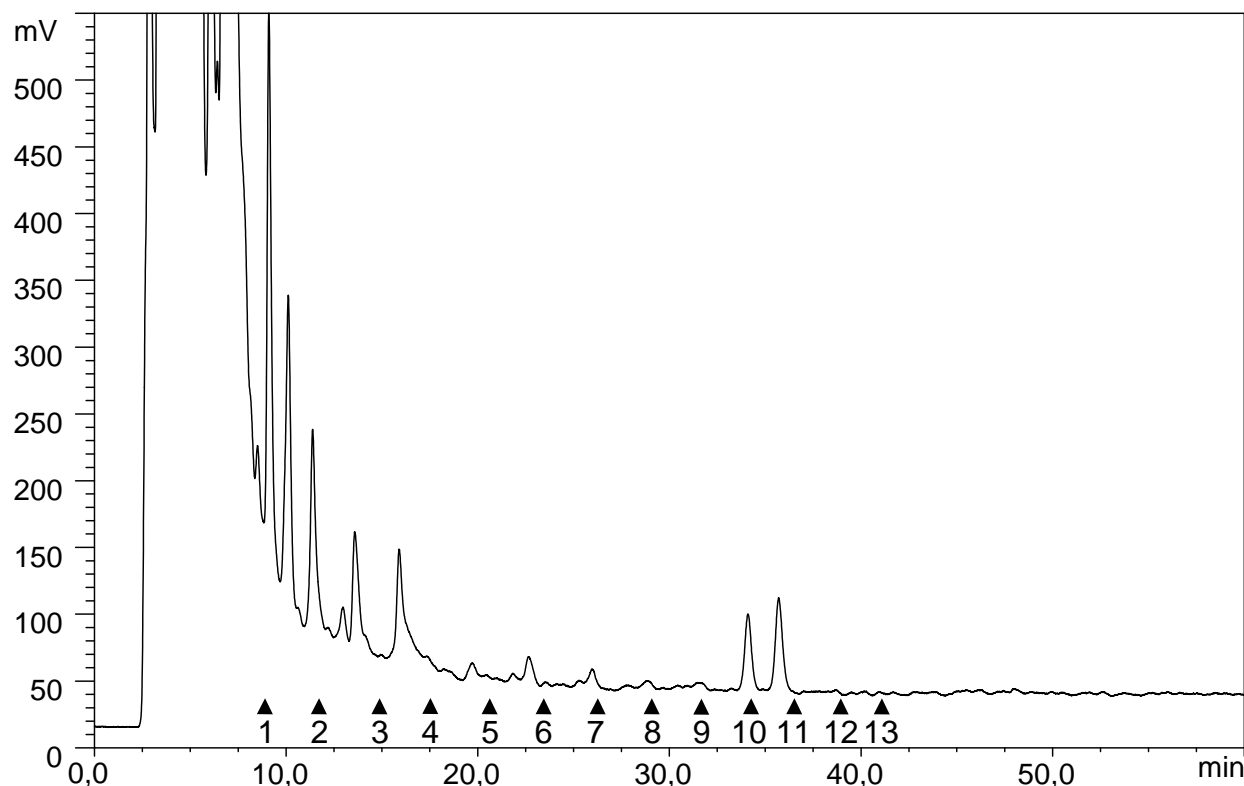
Legt man die entsprechenden Molaritäten zu Grunde (Tab. 9), so ergeben sich ~25 Mol Kohlenhydrat pro Mol Apoprotein.

**TAB. 9:** Absolute Anteile der Monosaccharide in Mol pro Mol Apolipoprotein. Glucose und Xylose (rot dargestellt) werden als Kontaminationen betrachtet. Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen.

N-Acetyl-glucosamin	Mannose	N-Acetyl-galactosamin	Rhamnose	Glucose	Galactose	Xylose	Fucose
5,29	5,72	1,28	1,31	22,15	8,16	4,50	3,23

### Oligosaccharide

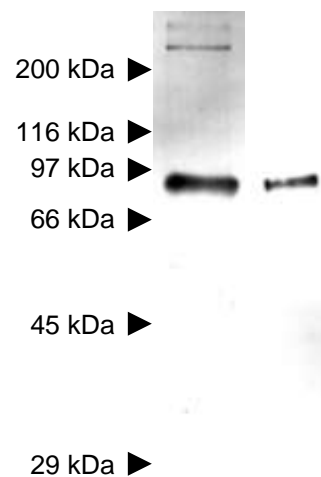
Die N-glycosidisch gebundenen Oligosaccharide des *Nereis*-Lipoproteins wurden mit dem Enzym PNGase F vom Protein entfernt. Nachdem die freigesetzten Kohlenhydrate unter reduzierenden Bedingungen an den Fluorophor Anthranilsäure gekoppelt wurden, konnten sie mittels Normalphasen-HPLC anhand ihrer Polarität (und somit Größe) aufgetrennt werden. Neben mehreren kurzkettingen Oligosaccharideinheiten zeigte sich auch ein charakteristischer Doppelpeak welcher einer Größe von ~9,9 und 10,75 Glucoseeinheiten entsprach (Abb. 26).



**Abb. 26:** Chromatogramm der mit PNGase F abgespaltenen und mit Anthranilsäure fluoreszenzmarkierten Oligosaccharide. Die Pfeilspitzen geben die Positionen der Glucose-Oligomere eines Dextranstandards an, die Ziffern die Anzahl der Glucoseeinheiten. Die Peaks mit einer Retentionszeit <8,5 Minuten sind Derivatisierungsartefakte. Deutlich sind die beiden Peaks mit ~9,9 und 10,75 Monomeren zu erkennen.

## Lektin-Blots

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Art der Glycosylierung für die beiden Proteinuntereinheiten des *Nereis*-Lipoproteins zutrifft, wurde in einer früheren Arbeit (Schenk et al. 2006) das Lipoprotein per Lektin-Blot analysiert. Dabei wurden das durch SDS-PAGE in seine Untereinheiten aufgetrennte und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragene Lipoprotein mit Lektinen unterschiedlicher Spezifität inkubiert. Es zeigte sich durch die Verwendung von Concanavalin A (ConA), dass beide Untereinheiten N-glycosyliert sind, während die 85 kDa-Untereinheit zusätzlich noch O-glycosyliert ist, was durch Reaktion dieser Untereinheit mit Erdnuss-Lektin (pna) demonstriert wurde (Abb. 27). Die Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden.



**Abb. 27:** Lektin-Blot des *Nereis*-Lipoproteins. Die Proteinuntereinheiten wurden auf einer 4-20%igen PAGE getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Linke Spur: ConA, deutlich sind beide Proteinuntereinheiten (280 kDa und 85 kDa) zu erkennen. Rechte Spur: Pna, nur die 85 kDa-Untereinheit hat reagiert. Die Pfeile geben die Positionen der Molekulargewichtsstandards an. Aus Schenk et al. (2006).

## 1.8 LIPIDZUSAMMENSETZUNG

Da die Art der von einem Lipoprotein transportierten Lipide auf seine physiologische Funktion schließen lässt, war es wichtig die vom *Nereis*-Lipoprotein transportierten Lipide sowohl quantitativ als auch qualitativ zu untersuchen.

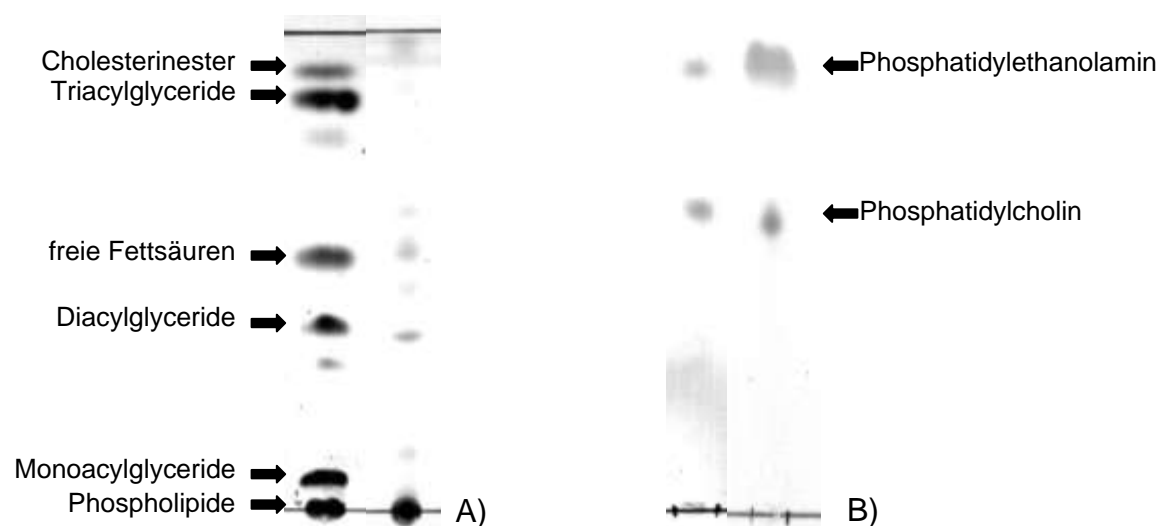
### 1.8.1 DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Die Dünnschichtchromatographie stellt eine einfache qualitative Methode in der Lipidanalytik dar. Die mit Chloroform/Methanol aus dem Lipoprotein extrahierten Lipide



wurden auf Kieselgelpplatten nach Lipidklassen getrennt. Die Phospholipide wurden in einem separaten Lauf getrennt betrachtet. Die Platten wurden anschließend in einer gesättigten Iod-Atmosphäre gefärbt.

Bei den in einer früheren Arbeit (Schenk et al. 2006) und dieser Arbeit durchgeführten dünnschichtchromatographischen Analysen zeigte sich bei den aufgetrennten Totallipiden die Prädominanz von Phospholipiden, während freie Fettsäuren, Mono-, Di- und Triacylglyceride in weitaus geringerem Maße vorlagen. Cholesterin und seine Fettsäureester konnten so gut wie gar nicht detektiert werden (Abb. 28 A). Unter den Phospholipiden dominierte Phosphatidylcholin über Phosphatidylethanolamin (Abb. 28 B).



**Abb. 28:** Dünnschichtchromatographie der *Nereis*-Lipoprotein-Lipide (A) und Phospholipide (B). A) Linke Spur: Lipidstandards. Rechte Spur: aus 10 µg Lipoprotein extrahierte Lipide. B) Linke Spur: aus 10 µg Lipoprotein extrahierte Lipide. Rechte Spur: Phospholipidstandards. Iodfärbung. Aus Schenk et al. (2006).

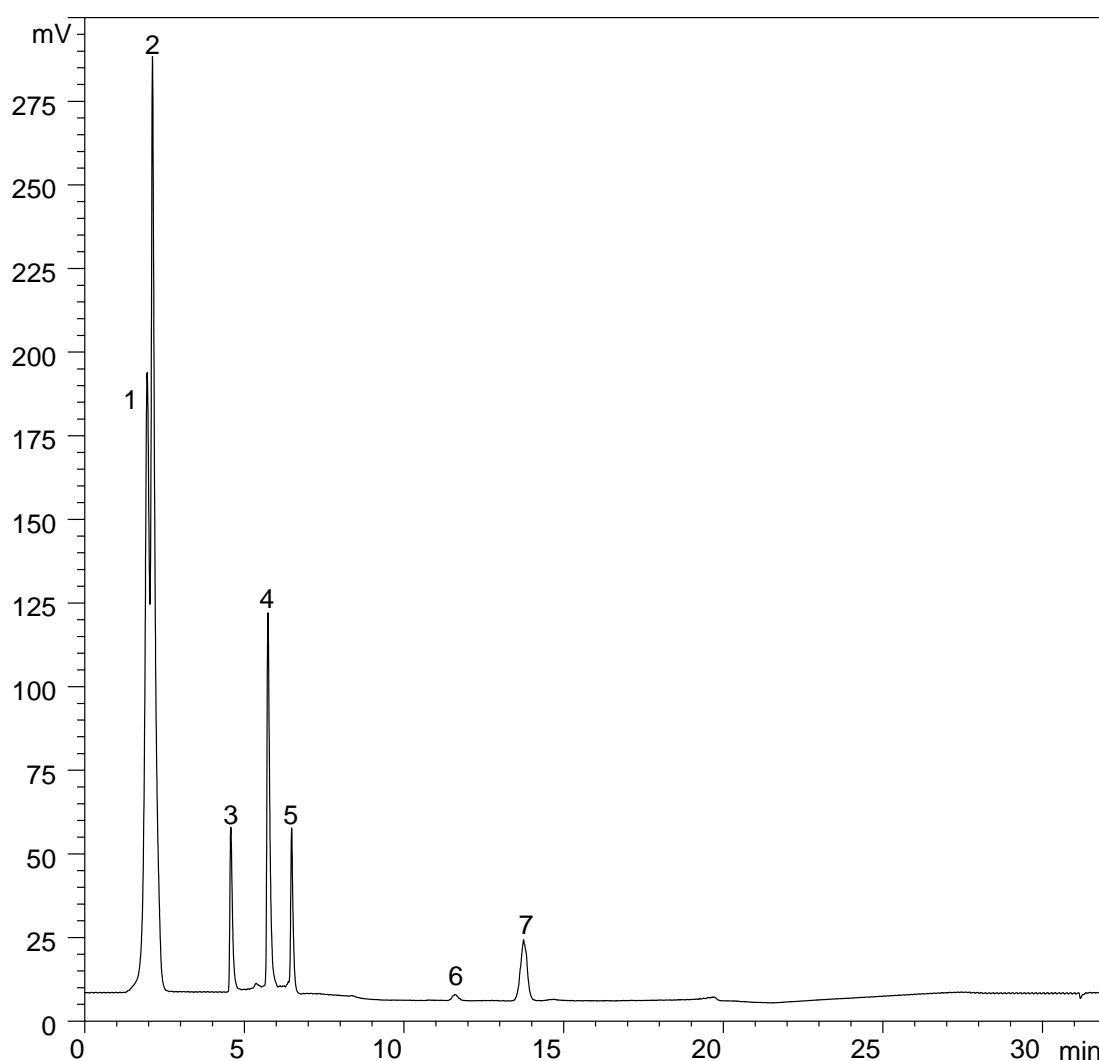
### 1.8.2 HPLC-ELSD

Um die zuvor nur qualitativ nachgewiesenen, vom *Nereis*-Lipoprotein transportierten Lipide in ihre Klassen zu trennen und diese Klassen zu quantifizieren, wurden die mit Chloroform/Methanol extrahierten Lipide per HPLC aufgetrennt und im Lichtstreuungsdetektor nachgewiesen und quantifiziert. Dabei bestätigte sich, dass Phospholipide die Majorität der Lipide stellen, sowie dass Phosphatidylcholin bei weitem das häufigste Phospholipid ist. Auch konnten größere Mengen an Mono-, Di- und Triacylglyceriden sowie Cholesterinester detektiert werden, die in der Dünnschichtchromatographie nicht oder kaum detektiert wurden (Abb. 29 und Tab. 10, beide nächste Seite).

**TAB. 10:** Absolute Mengen der einzelnen Lipidklassen des *Nereis*-Lipoproteins in  $\mu\text{g}$ . Injiziert wurden 2  $\mu\text{g}$  Proteinäquivalent. Quantifiziert wurde anhand von entsprechenden Oleylglyceriden, Cholesteryloleat und Cholesterin. Mittelwerte aus zwei Messungen.

Cholesterinester [ $\mu\text{g}$ ]	Triacylglyceride [ $\mu\text{g}$ ]	Diacylglyceride [ $\mu\text{g}$ ]	Cholesterin [ $\mu\text{g}$ ]	Monoacylglyceride [ $\mu\text{g}$ ]	Phosphatidylethanolamin [ $\mu\text{g}$ ]	Phosphatidylcholin [ $\mu\text{g}$ ]
0,179	0,182	0,172	0,043	0,280	0,078	1,718

Errechnet man nun aus den absoluten Lipidmengen die Gesamtmenge an Lipid, so erhält man 2,652  $\mu\text{g}$  Lipid für 2  $\mu\text{g}$  Apoprotein, was einem Totallipidgehalt von  $\sim 56,7\%$  entspricht (siehe Anhang 7.2).



**Abb. 29:** Chromatogramm der mit Chloroform/Methanol 2:1 vom *Nereis*-Lipoprotein extrahierten Lipide. Es wurden 2  $\mu\text{g}$  Proteinäquivalent aufgetrennt. Peaks: 1: Cholesterinester. 2: Triacylglyceride. 3: Diacylglyceride. 4: Cholesterin. 5: Monoacylglyceride. 6: Phosphatidylethanolamin. 7: Phosphatidylcholin. Zu beachten ist, dass die Peakhöhen der einzelnen Lipidklassen wegen unterschiedlicher Sensitivität gegenüber dem Detektor untereinander nicht vergleichbar sind.

Aus Tabelle 10 können nun die relativen Lipidanteile errechnet werden (Tab. 11):

**TAB. 11:** Relative Häufigkeiten der einzelnen Lipidklassen des *Nereis* Lipoproteins. Quantifiziert wurde anhand von entsprechenden Oleylglyceriden, Cholesteryloleat und Cholesterin.

Choles- terinester	Triacyl- glyceride	Diacyl- glyceride	Cholesterin	Monoacyl- glyceride	Phospha- tidyl- ethanol- amin	Phospha- tidylcholin
6,75%	6,86%	6,50%	1,62%	10,56%	2,94%	64,78%

Anhand dieser Tabelle kann ermittelt werden, dass der Phospholipidanteil 67,72% des Gesamtlipids ausmacht.

### 1.8.3 TOTALLIPIDGEHALT

Der Totallipidgehalt des *Nereis*-Lipoproteins wurde sowohl in dieser Arbeit als auch bei Schenk et al. (2006) mit der Phospho-Sulpho-Vanillin-Methode bestimmt. Aus sieben Einzelmessungen ergaben sich hier  $18,4 \pm 2,31$  µg Lipid pro 20 µg Apolipoprotein was anhand einer mit Phosphatidylcholin (0, 10, 25 und 80 µg) erstellten Eichgerade ermittelt wurde. Dies entspricht einem Totallipidgehalt von  $\sim 47,6\%$  (siehe Anhang 7.2) und stimmt mit den bei Schenk et al. (2006) publizierten  $\sim 48\%$  gut überein.

### 1.8.4 PHOSPHOLIPIDGEHALT

Die Bestimmung des Phospholipidgehaltes wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes ANS durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Fluoreszenzverstärkung und Emissionswellenlängenverschiebung von ANS in hydrophober Umgebung. Da durch die angewandte Methodik (siehe Material und Methoden) lediglich Phospholipide in Lösung gehen und Mizellen bilden, ist eine selektive Bestimmung des Phospholipidgehaltes im µg-Bereich möglich.

Der so ermittelte Phospholipidgehalt lag zwischen 37,75 und 43,6 µg Phospholipid pro 50 µg Protein. Aus diesem Wert lässt sich, mit Hilfe der Daten aus der Lichtstreuung (1.8.2), der Gesamtlipidanteil errechnen:

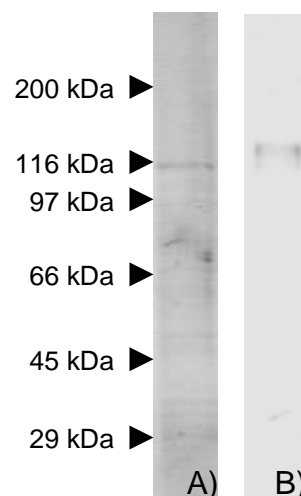
$$\text{Gesamtlipidanteil } [\mu\text{g}] = \frac{\text{ermittelte r Phospholipidgehalt } [\mu\text{g}]}{67,72\%} \quad (11)$$

Daraus ergeben sich 55,74 bis 64,38 µg Lipid pro 50 µg Apoprotein. Dies würde einem Lipidanteil von 55,37-55,96% entsprechen (siehe Anhang 7.2).

## 2 LIPOPROTEINREZEPTOREN

### 2.1 LIPOPROTEINREZEPTORISOLIERUNG

Ausgehend von der Hypothese, dass die Elaeocyten den Hauptsyntheseort des *Nereis*-Lipoproteins darstellen, wurde versucht, aus isolierten Elaeocytenmembranfraktionen das Rezeptorprotein zu isolieren. Dazu wurde zunächst eine Affinitätssäule hergestellt um den Rezeptor mittels Affinitätschromatographie zu reinigen. Die eluierten Fraktionen wurden mit Aceton gefällt und per SDS-PAGE analysiert. Da der Rezeptor bei allen Isolationen nur in den Fraktionen zwei und drei des Affinitätssäulen-Eluats zu finden war (nicht gezeigt), wurden diese durchweg gepoolt. Es konnte so ein Protein mit einer Masse von  $114 \pm 4$  kDa ( $n = 9$ ) isoliert werden (Abb. 30 A). Mit den den mutmaßlichen Rezeptor enthaltenden Fraktionen wurden Liganden-Blots durchgeführt. Dabei konnte das eluierte Polypeptid eindeutig als Lipoproteinrezeptor identifiziert werden. Im Liganden-Blot ist der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor durch das Auftreten einer Bande im Bereich von 110-120 kDa charakterisiert (Abb. 30 B).



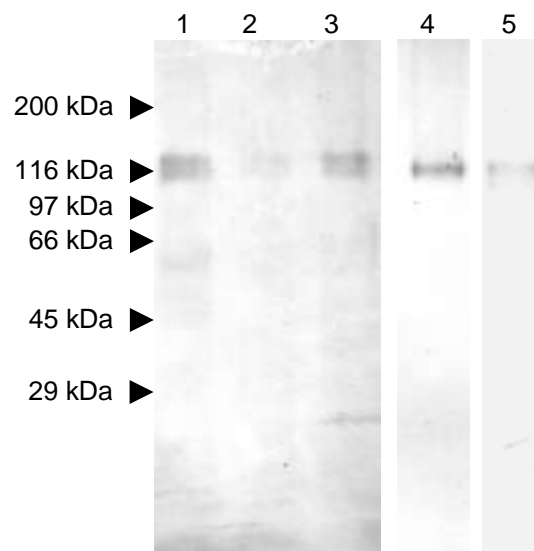
**Abb. 30:** SDS-PAGE (4-20%) und Liganden-Blot des Elaeocyten-Lipoproteinrezeptors. A) Es ist ein Peptid mit einer Masse von  $\sim 115$  kDa zu erkennen (Pool aus den Fraktionen zwei und drei). Coomassie gefärbt. B) Die Proteine wurden ohne Einsatz von Reduktionsmitteln und Metallchelatoren auf einer 4-20%igen PAGE getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte wie in Material und Methoden 4.5.2 beschrieben. Die Pfeile geben die Positionen der Molekulargewichtsstandards an.

## 2.2 CHARAKTERISIERUNG DES *NEREIS*-LIPOPROTEINREZEPTORS

Das Rezeptorprotein wurde als Polypeptid mit einer Masse von ~114 kDa im reduzierten und 110-120 kDa im nicht-reduzierten Zustand identifiziert.

### 2.2.1 GEWEBESPEZIFITÄT

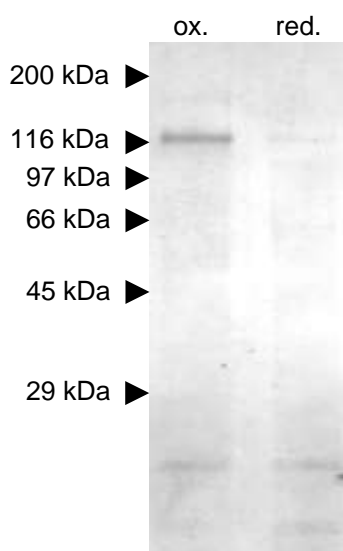
Da der Lipoproteinrezeptor zunächst aus Elaeocyten isoliert wurde, sollte das Protein auch in anderen Zellen und Geweben nachgewiesen werden. In Betracht kamen Keimzellen (Spermatogonien und Oocyten), sowie Muskel- und Darmgewebe. Es zeigte sich in den durchgeführten Liganden-Blots, dass der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor in allen untersuchten Zellen und Geweben vorkam. Er stellte sich in allen Geweben als monomeres Protein mit einer Masse von ~120 kDa im nicht-reduzierten Zustand dar. Auffällig war, dass der Rezeptor mit, Ausnahme der Eizellen und Elaeocyten, in allen hier untersuchten Geweben im Liganden-Blot eine charakteristische Doppelbande zeigte (Abb. 31).



**Abb. 31:** Liganden-Blot von *Nereis*-Lipoproteinrezeptoren aus verschiedenen Geweben. Die Proteine wurden ohne Einsatz von Reduktionsmitteln und Metallchelatoren auf einer 4-20%igen PAGE getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Spur 1: Lipoproteinrezeptor aus Spermatogonien. Spur 2: Lipoproteinrezeptor aus Darmepithel. Spur 3: Lipoproteinrezeptor aus Muskelgewebe. Spur 4: Lipoproteinrezeptor aus Oocyten. Spur 5: Lipoproteinrezeptor aus Elaeocyten. Die Pfeile geben die Positionen der Molekulargewichtsstandards an.

### 2.2.2 BINDUNGSEIGENSCHAFTEN

Da die bislang charakterisierten Lipoproteinrezeptoren  $\text{Ca}^{2+}$  für ihre Funktion benötigen, welches von der Ligandenbindedomäne durch saure Aminosäuren, unterstützt durch Disulfidbrücken, komplexiert wird (Brown et al. 1997), war es von Interesse zu überprüfen, ob auch die Funktionalität des *Nereis*-Lipoproteinrezeptor  $\text{Ca}^{2+}$ - und Disulfidbrücken-abhängig ist. Dazu wurde wiederum ein Liganden-Blot durchgeführt, bei dem eine der beiden Proben reduziert wurde und die andere nicht. Nach der Inkubation mit *Nereis*-Lipoprotein zeigte sich das erwartete Bild. Während der oxidierte Lipoproteinrezeptor seinen Liganden band und somit nachweisbar wurde, war der reduzierte Lipoproteinrezeptor dazu in weit geringerem Maße fähig (Abb. 32).

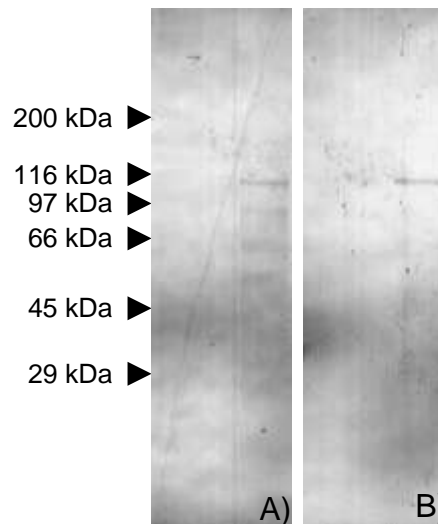


**Abb. 32:** Liganden-Blot von *Nereis*-Lipoproteinrezeptoren aus Oocyten. Die Proteine wurden auf einer 4-20%igen PAGE getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Linke Spur: Lipoproteinrezeptor nicht-reduziert. Rechte Spur: Lipoproteinrezeptor reduziert. Die Pfeile geben die Positionen der Molekulargewichtsstandards an.

### 2.2.3 GLYCOSYLIERUNG

Da der Lipoproteinrezeptor ein Membranprotein ist und die meisten extrazellulären und Membranproteine glycosyliert sind, sollte auch der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor auf seine Glycosylierung hin untersucht werden. Dazu wurden Lektin-Blots durchgeführt. Eine genauere Analyse per HPLC war im Fall der N-Glycane aufgrund der geringen Ausbeute und im Fall der Oligosaccharide aufgrund der verwendeten Detergenzien und Puffer sowie der geringen Ausbeute nicht möglich. Für die Lektin-Blots wurden die Proteine wieder auf einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit verschiedenen Lektinen

inkubiert. Es zeigte sich durch die Reaktion mit ConA und pna, dass das Rezeptorprotein sowohl N- als auch O-glycosyliert ist. Eine Besonderheit des Rezeptors scheint die Tatsache zu sein, dass die Glycane lediglich im reduzierten Zustand für die Interaktion mit den Lektinen zur Verfügung stehen (Abb. 33 A und B).



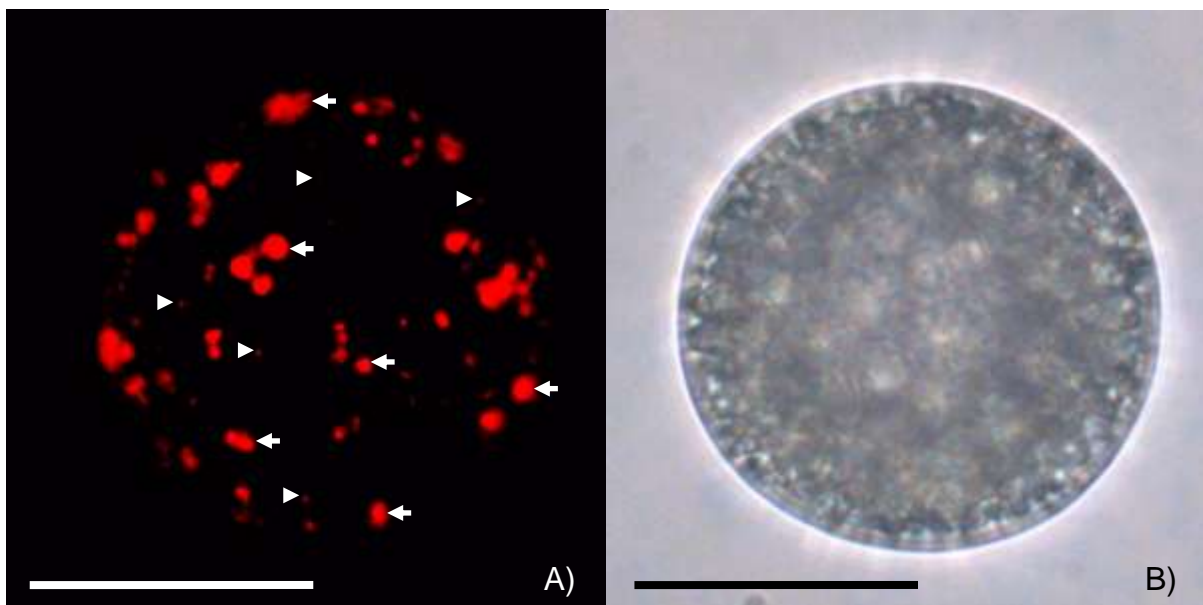
**Abb. 33:** Lektin-Blot von nicht-reduzierten und reduzierten Elaeocyten-Lipoproteinrezeptoren. Die Proteine wurden auf einer 4-20%igen PAGE getrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. A) ConA. Linke Spur: Lipoproteinrezeptor ohne DTT. Rechte Spur: Lipoproteinrezeptor mit DTT. B) Pna. Linke Spur: Lipoproteinrezeptor ohne DTT. Rechte Spur: Lipoproteinrezeptor mit DTT. Eine Kohlenhydrat-positive Markierung zeigt sich nur für die reduzierten Rezeptorproteine. Die Pfeile geben die Positionen der Molekulargewichtsstandards an.

### 3 *IN VITRO* AUFNAHMESTUDIEN DES ISOLIERTEN LIPOPROTEINS

Um die physiologische Relevanz des zuvor biochemisch charakterisierten Lipoproteinrezeptors zu demonstrieren, wurden Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Lipoprotein inkubiert. Wegen der besseren Verfügbarkeit von *Platynereis*-Keimzellen - sind in der Laborkultur monatlich verfügbar - wurden diese Versuche fast ausschließlich mit *Platynereis*-Zellen durchgeführt. Die Eizellen wurden für eine bessere Bildqualität mit dem Deckglas leicht abgeflacht, daher sind die Zellgrößen anhand der Messbalken nur ungefähr abschätzbar.

#### 3.1 DiI-MARKIERTES LIPOPROTEIN

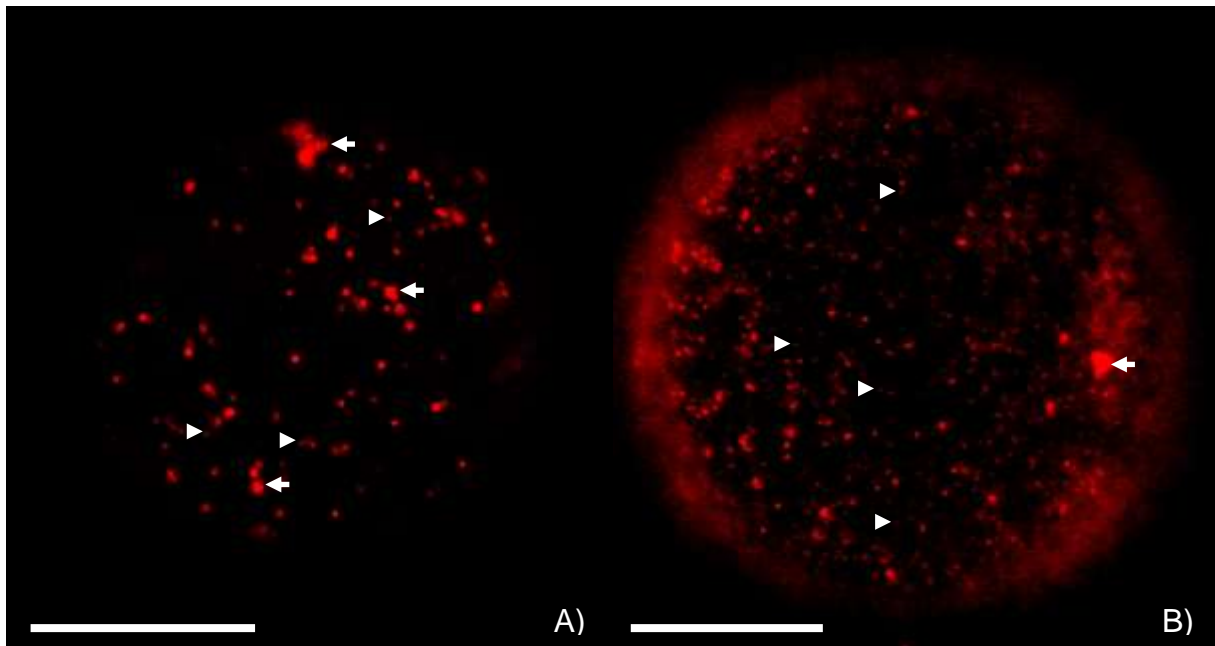
Die ersten Aufnahmestudien wurden mit DiI-markiertem *Nereis*-Lipoprotein in einer Konzentration von 25 µg/ml unter kontinuierlichem Schütteln bei 19°C für insgesamt 23 Stunden durchgeführt. Die Eizellen wurden für drei Stunden mit dem markierten Lipoprotein versetzt (Pulse) und nach 23 Stunden (Chase) unter dem Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des TRITC-Filters analysiert. Bei Eizellen die mit DiI-markiertem Lipoprotein inkubiert wurden konnten deutlich kleine endocytotische Vesikel und große Dottergranula ausgemacht werden (Abb.34 A).



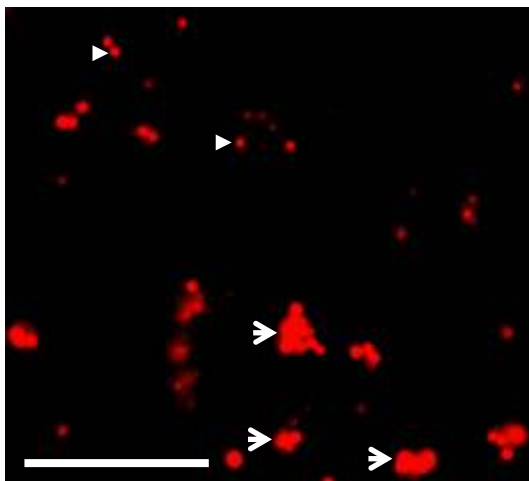
**Abb. 34:** *Platynereis*-Oocyte (Durchmesser: ~107 µm) für 3 Stunden mit 25 µg/ml DiI-markiertem *Nereis*-Lipoprotein inkubiert, Aufnahme nach 23 Stunden, Objektiv: 40 X. A) Fluoreszenzaufnahme. Deutlich sind die kleinen endocytotischen Vesikel (Pfeilspitzen) und die großen Dottergranula (Pfeile) zu erkennen. Serienaufnahme, 6 Einzelbilder aus unterschiedlichen Fokussierebenen digital übereinander gelegt, um möglichst viele Endocytose-Vesikel zu erfassen. Belichtungszeit: 250 ms. B) Durchlichtbild derselben Eizelle, auf den Zellrand fokussiert. Messbalken: 100 µm.



Wurden die Inkubationsversuche mit Eizellen aus reifen Weibchen gemacht, d.h. Tieren mit einem Eizelldurchmesser von  $\sim 160 \mu\text{m}$ , so ergab sich ein anderes Bild. Wurde bei kleinen Oocyten das fluoreszenzmarkierte Lipoprotein sowohl in endocytotischen Vesikeln als auch in den Dottergranula detektiert, so wurde das Lipoprotein bei den größeren Eizellen fast ausschließlich in endocytotischen Vesikeln gefunden (Abb. 35 A und B), die sich ggf. in großen Clustern organisieren (Abb. 36).



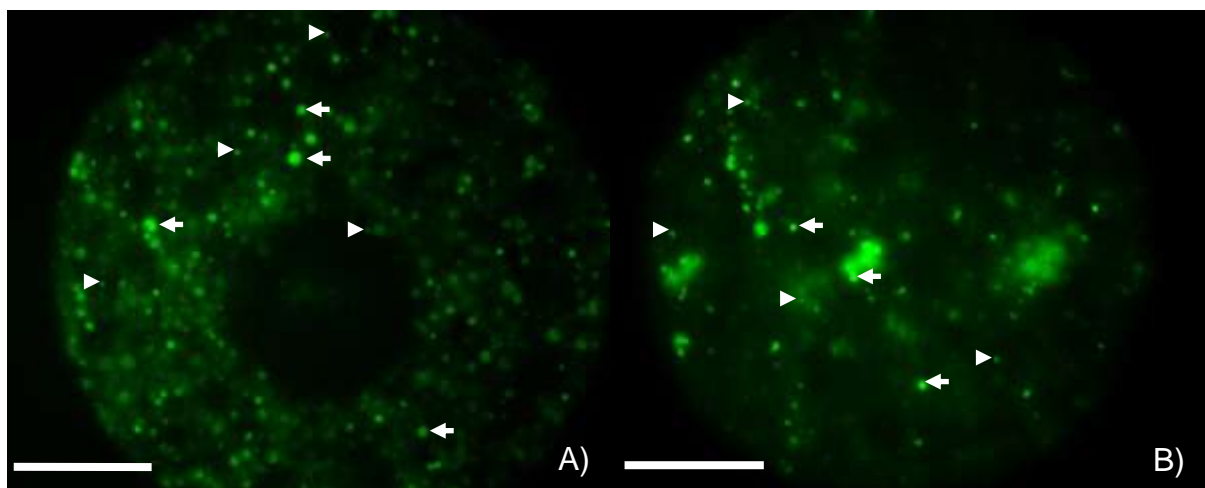
**Abb. 35:** Fluoreszenzaufnahmen von mit DiI-markiertem Lipoprotein inkubierten *Platynereis*-Oocyten, 3 Stunden Pulse, 20 Stunden Chase, Objektiv: 40 X. A) Kleine Eizelle, Durchmesser  $\sim 107 \mu\text{m}$  auf die Zelloberfläche fokussiert. Deutlich sind sowohl endocytotische Vesikel (Pfeilspitzen) als auch Dottergranula (Pfeile) zu erkennen. Belichtungszeit 250 ms. B) Große Eizelle, Durchmesser  $\sim 170 \mu\text{m}$  auf die Zelloberfläche fokussiert. Es sind fast ausschließlich endocytotische Vesikel (Pfeilspitzen) zu erkennen. Dottergranula (Pfeile) sind so gut wie nicht markiert. Belichtungszeit 250 ms. Messbalken:  $50 \mu\text{m}$ .



**Abb. 36:** Fluoreszenzaufnahme einer mit DiI-markiertem Lipoprotein inkubierten *Platynereis*-Eizelle (Durchmesser  $160 \mu\text{m}$ ), 3 Stunden Pulse, 20 Stunden Chase, Objektiv: 100 X. Es sind einzelne endocytotische Vesikel zu erkennen (Pfeilspitzen) und verschieden große Cluster (Pfeile) der Vesikel, jedoch keine Dottergranula. Belichtungszeit 100 ms. Messbalken:  $20 \mu\text{m}$ .

### 3.2 FITC-MARKIERTES LIPOPROTEIN

Zunächst wurden die Eizellen analog zu den Versuchen mit DiI-markiertem Lipoprotein behandelt. Es konnte jedoch im Gegensatz zu den Versuchen mit DiI-markiertem Lipoprotein (siehe oben) nach 3-stündigem Chase und 20-stündigem Pulse keine eindeutige Aufnahme des mit FITC-markiertem Lipoproteins festgestellt werden (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Oocyten für 20 Stunden mit dem FITC-markiertem Lipoprotein inkubiert (Pulse), das Medium gewechselt und für weitere 3 Stunden ohne Lipoprotein inkubiert (Chase). Bei den so behandelten Eizellen konnte eindeutig eine Aufnahme des markierten Proteins in die Eizellen festgestellt werden (Abb. 37 A). Da die Fluoreszenz des gekoppelten Farbstoffes FITC relativ schwach war, wurden einige Eizellen auch mit 50 µg/ml FITC-markiertem Lipoprotein inkubiert. In diesem Fall wurden deutlich bessere Ergebnisse erzielt (Abb. 37 B).

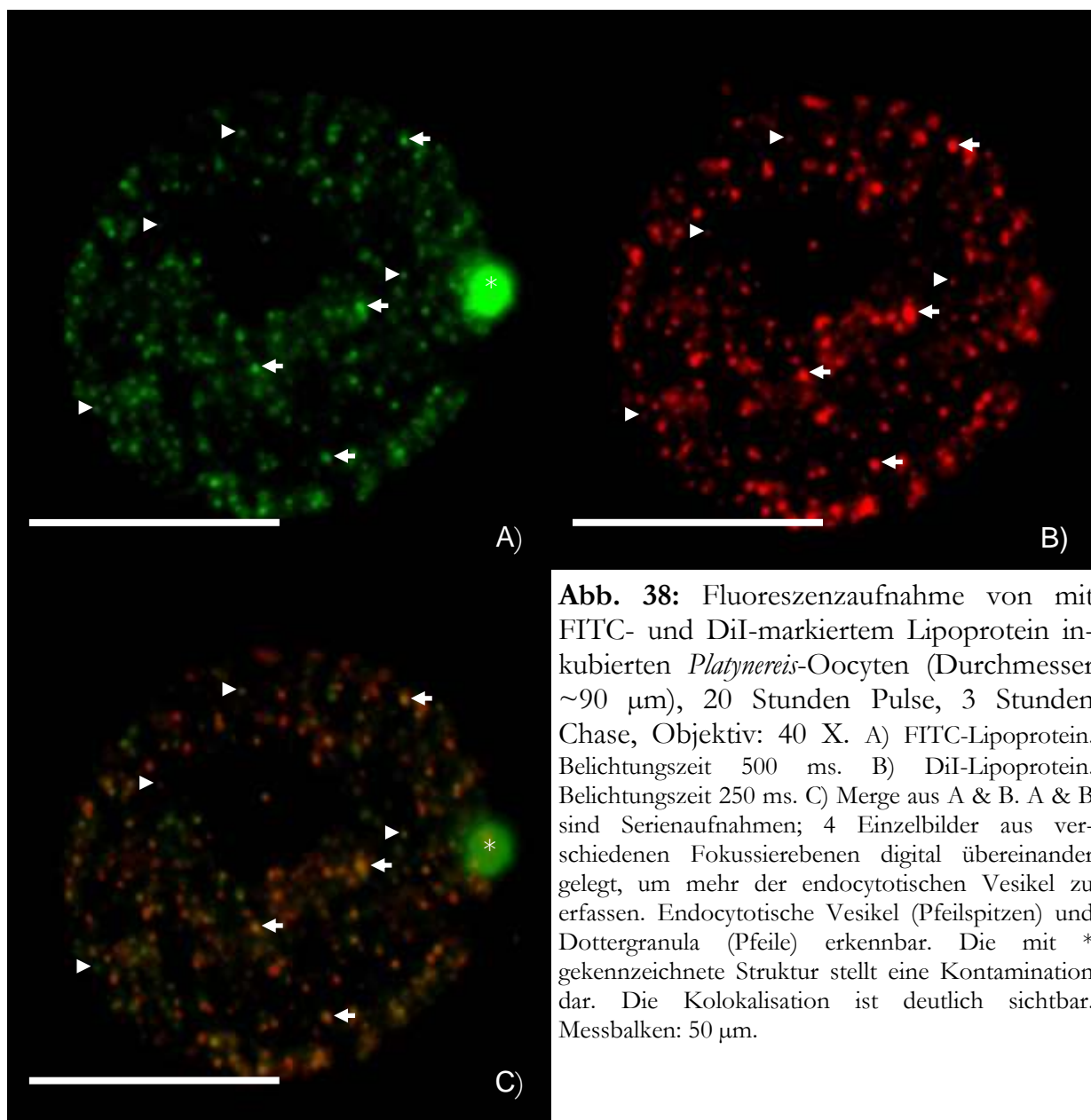


**Abb. 37:** Fluoreszenzaufnahmen von mit FITC-markiertem Lipoprotein inkubierten *Platynereis*-Oocyten (Durchmesser ~115 µm), 20 Stunden Pulse, 3 Stunden Chase, Objektiv: 40 X. Auch hier sind endocytotische Vesikel (Pfeilspitzen) und einige, wenige Dottergranula (Pfeile) zu erkennen. A) Oocyte mit 25 µg/ml FITC-markiertem Lipoprotein inkubiert. Serienaufnahme, 4 Einzelbilder aus verschiedenen Fokusebenen digital übereinander gelegt, um mehr der endocytotischen Vesikel zu erfassen. Belichtungszeit 500 ms. B) Oocyte mit 50 µg/ml FITC-markiertem Lipoprotein inkubiert. Serienaufnahme, 3 Einzelbilder aus verschiedenen Fokusebenen digital übereinander gelegt, um mehr der endocytotischen Vesikel zu erfassen. Belichtungszeit 500 ms. Messbalken: 50 µm.

Auch in diesen Versuchen konnten wieder die kleinen endocytotischen Vesikel und einige wenige Dottergranula unterschieden werden (Abb. 37 A & B).

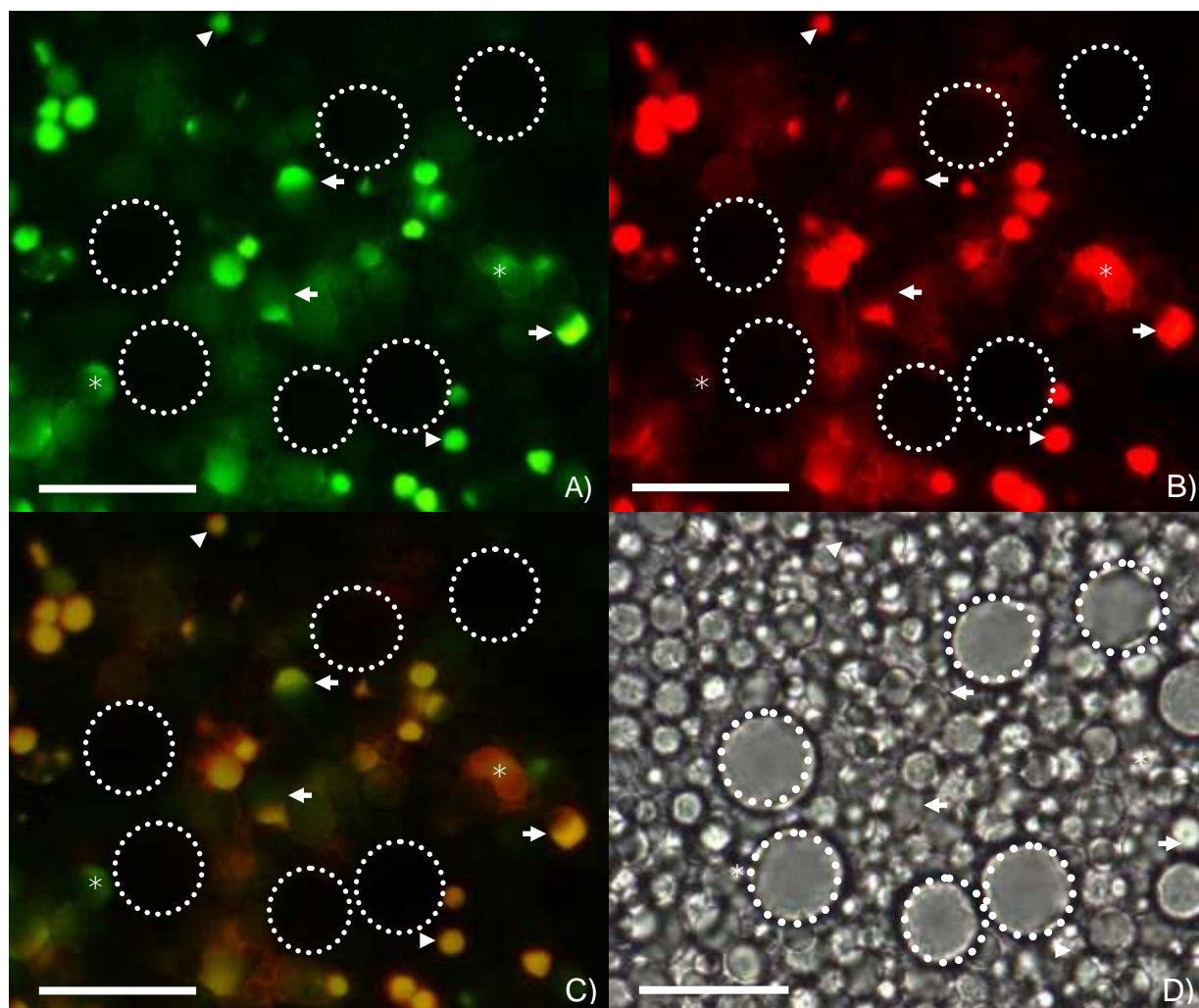
### 3.3 DOPPELINKUBATION MIT FITC- UND DiI-MARKIERTEM LIPOPROTEIN

Um die Frage zu klären ob die Komponenten des endocytierten Lipoproteins - Lipid und Protein - nach der Aufnahme in die Zelle getrennt werden, d.h. ob Apolipoproteine und Lipide an unterschiedlichen Stellen in der Zelle gelagert werden, wurden Oocyten mit 50 µg/ml FITC-markiertem und 50 µg/ml DiI-markiertem Lipoprotein für 20 Stunden bei 19°C inkubiert, gewaschen und nach drei weiteren Stunden unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Es zeigte sich folgendes Bild: Die Fluoreszenzen von DiI und FITC waren kolokalisiert, was an der deutlich auftretenden orangefarbenen Fluoreszenz in den ‚overlay‘-Bildern sichtbar ist (Abb. 38).



**Abb. 38:** Fluoreszenzaufnahme von mit FITC- und DiI-markiertem Lipoprotein inkubierten *Platynereis*-Oocyten (Durchmesser ~90 µm), 20 Stunden Pulse, 3 Stunden Chase, Objektiv: 40 X. A) FITC-Lipoprotein. Belichtungszeit 500 ms. B) DiI-Lipoprotein. Belichtungszeit 250 ms. C) Merge aus A & B. A & B sind Serienaufnahmen; 4 Einzelbilder aus verschiedenen Fokussierebenen digital übereinander gelegt, um mehr der endocytotischen Vesikel zu erfassen. Endocytotische Vesikel (Pfeilspitzen) und Dottergranula (Pfeile) erkennbar. Die mit \* gekennzeichnete Struktur stellt eine Kontamination dar. Die Kolokalisation ist deutlich sichtbar. Messbalken: 50 µm.

Bei stärkerer Vergrößerung konnten bei Eizellen, deren Durchmesser zwischen 110 und 150  $\mu\text{m}$  lag, kappenartige Strukturen an den Dottergranula sowohl mit FITC-markiertem als auch mit DiI-markiertem Lipoprotein festgestellt werden (Abb. 39).



**Abb. 39:** Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme von mit FITC- und DiI-markiertem Lipoprotein inkubierten *Platynereis*-Oocyten (Durchmesser  $\sim 115 \mu\text{m}$ ), 20 Stunden Pulse, 3 Stunden Chase, Objektiv: 100 X. A) FITC-Lipoprotein. Belichtungszeit 250 ms. B) DiI-Lipoprotein. Belichtungszeit 100 ms. C) Merge aus A & B. D) Durchlichtbild. Endocytotische Vesikel (Pfeilspitzen) und Dottergranula (Pfeile) sind erkennbar, die Lipidtropfen der Oocyte erscheinen als dunkle (Fluoreszenz) bzw. helle Kreise (Durchlicht) (●●). Die Kolokalisation ist deutlich sichtbar, wenn auch nicht bei allen Dottergranula (\*). Messbalken: 20  $\mu\text{m}$ .

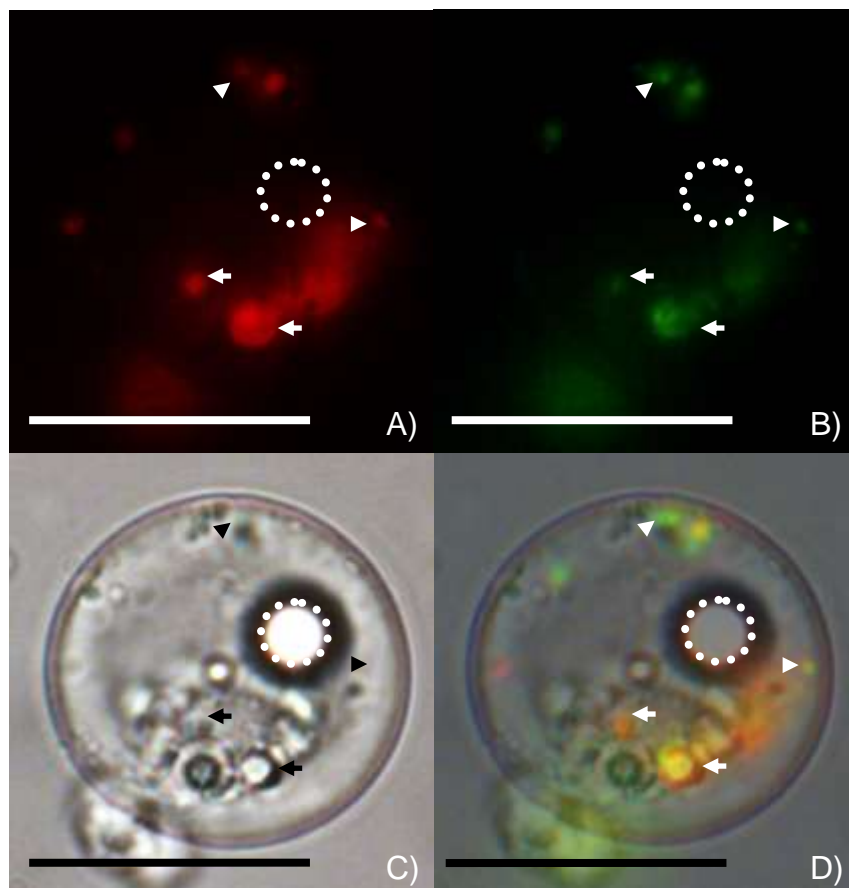
Auffällig ist, dass die großen intrazellulären Lipidtropfen der Oocyten weder FITC- noch DiI-Fluoreszenz zeigen, und somit nicht direkt vom Lipoprotein mit Lipid versorgt werden.

### 3.4 SPERMATOGONIEN UND ELAEOCYTEN

Nachdem die Aufnahme des *Nereis*-Lipoproteins in Oocyten *in vitro* gezeigt werden konnte, sollten noch weitere Coelomzellen auf ihre Aufnahmefähigkeit für das *Nereis*-Lipoprotein hin untersucht werden. Da der Lipoproteinrezeptor sowohl aus Spermato gonien als auch aus Elaeocyten isoliert werden konnte, sollten auch diese an der Fortpflanzung beteiligten Zellen untersucht werden.

#### 3.4.1 ELAEOCYTEN

Durch die Inkubation der Elaeocyten mit dem fluoreszenzmarkierten Lipoprotein *in vitro* konnte auch hier die physiologische Relevanz des zuvor biochemisch charakterisierten Lipoproteinrezeptors demonstriert werden. Auch hier fanden sich, wie schon bei den Oocyten gezeigt, die Lipoproteine, beziehungsweise deren Lipide, nicht in den Lipidtropfen der Zellen, sondern in eigenen Kompartimenten (Abb. 40).

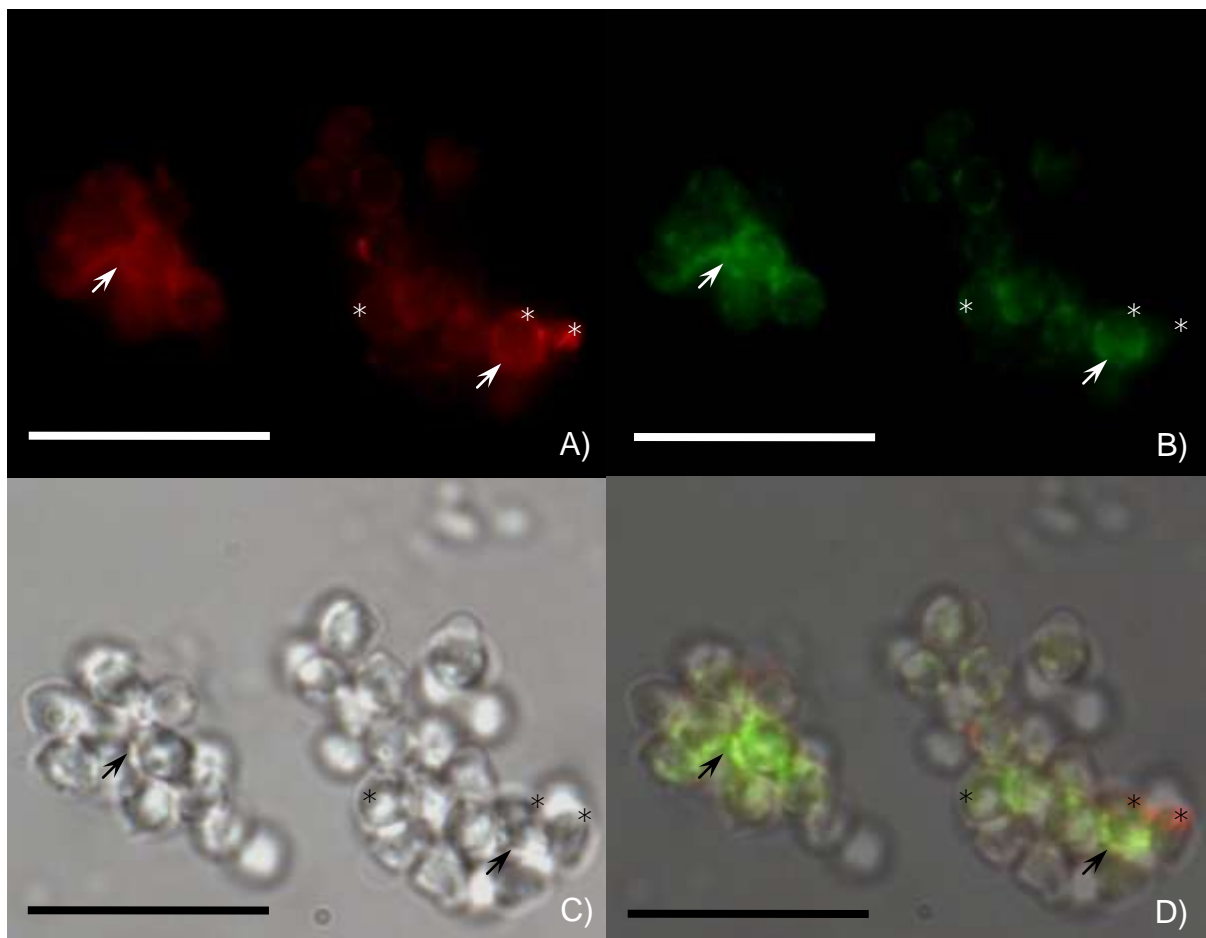


**Abb. 40:** Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme von mit jeweils 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FITC- und DiI-markiertem Lipoprotein inkubierten *Platynereis*-Elaeocyten, 22 Stunden Pulse, 3 Stunden Chase, Objektiv: 100 X. A) DiI-Lipoprotein. Belichtungszeit 250 ms. B) FITC-Lipoprotein. Belichtungszeit 500 ms. C) Durchlichtbild. D) Merge aus A, B & C. Endocytotische Vesikel (Pfeilspitzen), Speichergranula (Pfeile) und der Lipidtropfen (•) sind erkennbar. Messbalken: 20  $\mu\text{m}$ .

Auch bei den Elaeocyten zeigte sich die schon bei den Oocyten beobachtete Kolokalisation von FITC- und DiI-markierten Lipoproteinen, sowohl in den Transportvesikeln als auch in den Speichergranula.

### 3.4.2 SPERMATOGONIEN

Bei den Spermatogonien zeigte sich das gleiche Bild wie bei den Elaeocyten. Die fluoreszenzmarkierten Lipoproteine wurden in die Zellen aufgenommen, und die Fluoreszenzen des Proteinmarkers FITC und die des Lipidmarkers DiI kolokalisieren (Abb. 41).



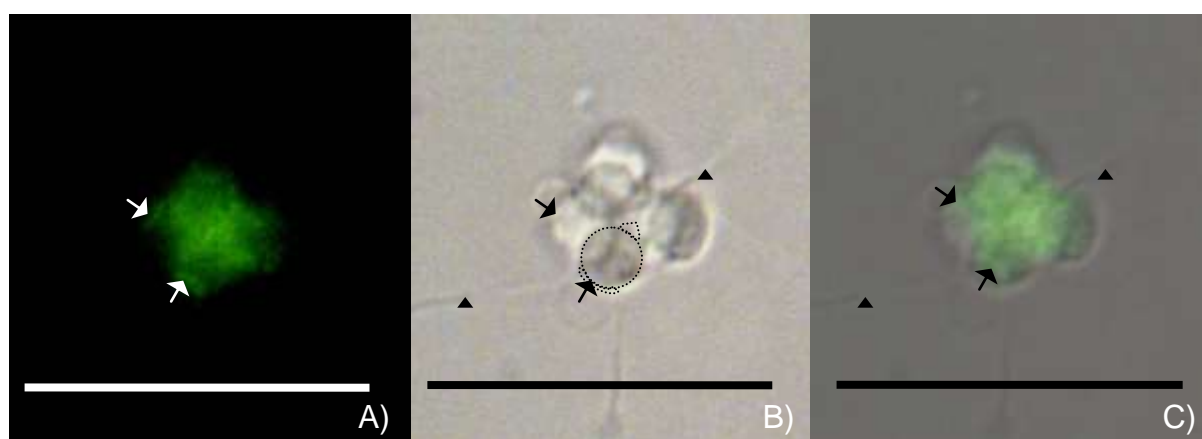
**Abb. 41:** Inkubation von *Platynereis*-Spermatogonien (II) mit je 50 µg/ml DiI- und FITC-markiertem *Nereis*-Lipoprotein, 22 Stunden Pulse, 3 Stunden Chase, Objektiv: 100 X. A) DiI-markiertes Lipoprotein. Belichtungszeit 250 ms. B) FITC-markiertes Lipoprotein. Belichtungszeit 500 ms. C) Durchlichtbild. D) Merge aus A, B & C. Die Kolokalisation ist erkennbar (Pfeile), auch wenn einige Bereiche nur einfach markiert sind (\*). Messbalken: 20 µm.

Auffällig ist, dass zwar eine Kolokalisation erkennbar war, die jedoch nicht überall auftrat. Während bei den Elaeocyten so gut wie alle endocytotischen Vesikel und Speichergranula doppelt markiert waren, konnten bei den Spermatogonien ganze Bereiche mit nur einem Typ von Markierung ausgemacht werden (Abb. 41). Auffällig war auch, im Vergleich zu

den Elaeocyten, dass die Spermatogonien eine höhere Konzentration an Lipoprotein zur Aufnahme brauchten (50 µg/ml) als die Elaeocyten (25 µg/ml), auch nahmen nicht alle kultivierten Spermatogonien die fluoreszenzmarkierten Lipoproteine auf.

### Tetraden

Da in Kultur genommene Spermatogonien prinzipiell in der Lage waren das Lipoprotein aufzunehmen, dies jedoch nur bei einem Teil der Spermatogonien der Fall war, kam die Überlegung auf, dass die Fähigkeit zur Aufnahme des Lipoproteins mit dem Grad der Differenzierung der Spermatogonien beziehungsweise der männlichen Keimzellen zusammenhängen könnte. Aus diesem Grunde wurden die nachfolgenden Differenzierungsstadien der männlichen Keimzellen, namentlich die Tetraden, mit FITC-markiertem Lipoprotein inkubiert. Es zeigte sich auch hier, dass die angebotenen Lipoproteine von den Zellen aufgenommen wurden (Abb. 42).



**Abb. 42:** Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme von mit 25 µg/ml FITC-markiertem Lipoprotein inkubierten Tetraden, 22 Stunden Pulse, 2 Stunden Chase, Objektiv: 100 X. A) Fluoreszenzaufnahme. Belichtungszeit 500 ms. B) Durchlichtbild. Die Umriss eines Spermiums mit Akrosom, Spermienkopf und dem die Mitochondrien enthaltenden Mittelstück sind schematisch markiert. C) Merge aus A & B. Deutlich ist eine kappenartige Struktur zu erkennen, die den Mittelteil des künftigen Spermiums mit den darin enthaltenden Mitochondrien darstellt (Pfeile). Die Geißeln der sich entwickelnden Spermien sind zu erkennen (Pfeilspitzen). Messbalken: 20 µm.

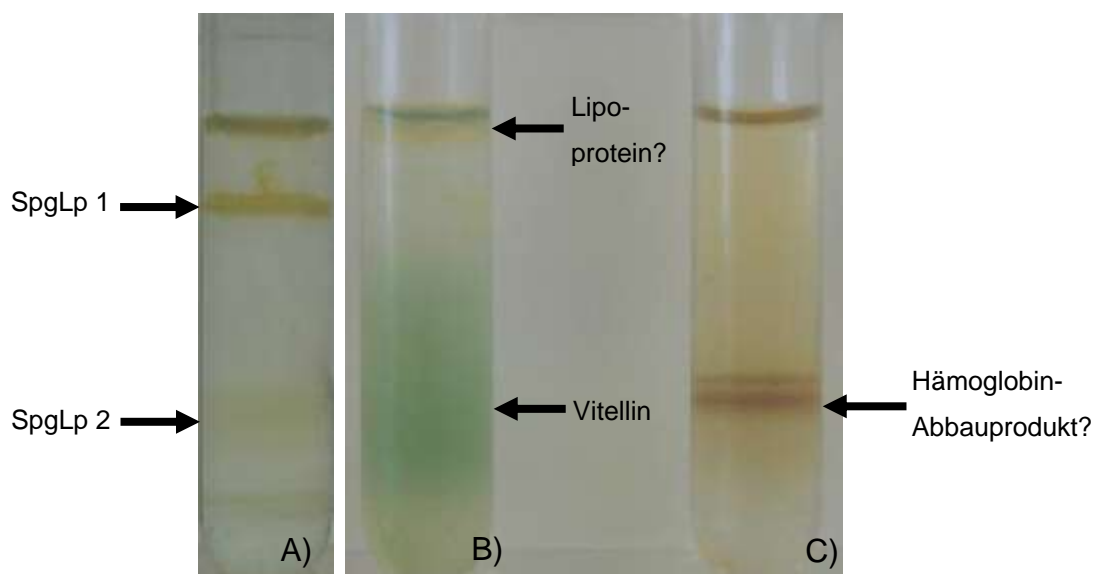
Neben dem diffus leuchtenden Zellkörper konnte eindeutig eine scharf umrissene kappenartige Struktur ausgemacht werden. Diese Struktur liegt im Bereich der Mitochondrien an der Basis der Spermien-Geißel. Im Gegensatz zu den Spermatogonien waren jedoch bei diesen Zelltypen 25 µg/ml Lipoprotein ausreichend, um eine Aufnahme in die Zellen zu demonstrieren.

#### 4 NACHWEIS DES *NEREIS*-LIPOPROTEINS IN VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN

Da gezeigt werden konnte, dass das *Nereis*-Lipoprotein in Kultur von Eizellen, Spermato gonien und Elaeocyten aufgenommen wird, sollte nun überprüft werden, ob das Lipo protein aus diesen Zellen intakt reisoliert werden kann.

##### 4.1 REISOLATION UND CHARAKTERISIERUNG DER FRAKTIONEN

Zunächst wurden cytosolische Fraktionen wie in Material und Methoden (4.2.2) für die Gewinnung von Membranfraktionen beschrieben von verschiedenen Geweben her gestellt. Diese wurden dann entweder 1:1 mit Iodixanol versetzt, oder mit KBr auf eine Dichte von 1,18 g/ml gebracht. Anschließend wurde wie in Material und Methoden (4.1.2) beschrieben zentrifugiert. Nach der Zentrifugation zeigte sich, dass in den Spermato gonien (II) zwei definierte Lipoproteinbanden (SpgLp 1 und 2) zu finden waren. Bei den Oocyten fand sich ebenfalls eine gelbe Bande am oberen Ende des Zentrifugen röhrens, bei den Elaeocyten waren die einzigen auffindbaren Banden bräunlich und somit wahrscheinlich Hämoglobinabbauprodukte (Abb. 43).

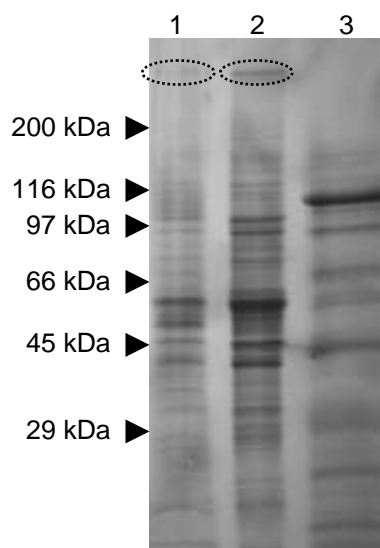


**Abb. 43:** Lipoprotein-Isolierung aus dem Cytosol verschiedener Zellen. A) Spermato gonien II, zentrifugiert in 30% Iodixanol. Deutlich sind zwei gelbe Fraktionen, SpgLp 1 und 2 zu erkennen. B) *Nereis*-Oocyten (~170  $\mu$ m Durchmesser), zentrifugiert in KBr ( $\rho = 1,18$  g/ml). Das Vitellin ist als dominierendes Protein in der unteren Hälfte des Zentrifugenglases zu erkennen, unter dem Meniskus ist eine gelbe Fraktion zu erkennen („Lipoprotein?“) C) Elaeocyten (i-Tier), zentrifugiert in 30% Iodixanol. Außer dem mutmaßlichen Hämoglobinabbauprodukt ist keine Bande sichtbar.



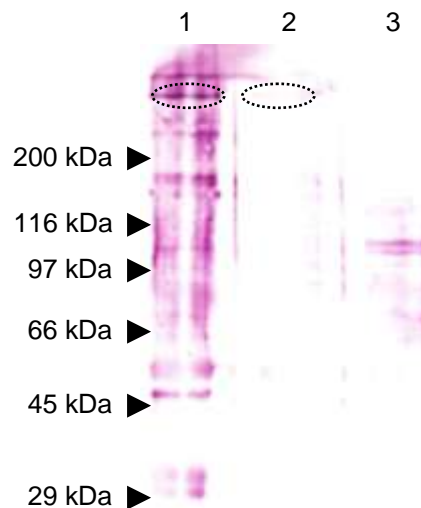
Die Dichte der beiden Lipoproteinfraktionen aus dem Cytosol der Spermatogonien wurde per Refraktometrie als  $1,064 \pm 0,003$  g/ml ( $n = 3$ ) für SpgLp 1 und als  $1,129 \pm 0,003$  g/ml ( $n = 3$ ) für SpgLp 2 bestimmt. Für die mutmaßliche Lipoproteinfraktion aus den Oocyten wurde keine Dichtebestimmung durchgeführt, da diese Isolation nicht in einem Dichtegradienten (Iodixanol oder KBr) durchgeführt wurde, sondern lediglich durch Flotation in KBr. Eine Isolation in Iodixanol war nicht möglich. Die Eizellen der Nereiden besitzen ein sehr stark quellendes Corticalmaterial, welches durch den Aufschluss der Zellen freigesetzt wird und die Probe somit sehr viskos macht. Neben einer starken Verdünnung der Lösung (worauf verzichtet wurde, um die mutmaßlich geringe Konzentration des Lipoproteins nicht noch weiter zu reduzieren) ist die Zugabe von 2,2 M KBr ( $\rho_{2,2 \text{ M KBr/Wasser}} = 1,18$  g/ml, Weast 1974) zum Homogenisationspuffer eine Möglichkeit, die Viskosität herabzusetzen.

Um Fehlschlüsse bei der Identifizierung nach der Ultrazentrifugation auszuschließen wurden die isolierten Proteine per SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Es zeigte sich bei den als SpgLp 1 und SpgLp 2 bezeichneten Fraktionen, dass die das *Nereis*-Lipoprotein charakterisierende Proteinuntereinheit ApoNvLp I neben weiteren Peptiden vorhanden war. In der aus *Nereis*-Oocyten isolierten Fraktion konnte diese Untereinheit in der SDS-PAGE nicht detektiert werden (Abb. 44).



**Abb. 44:** SDS-PAGE (4-20%) mit den isolierten Lipoproteinfraktionen. Spur 1: SpgLp 1. ApoNvLp I ist eindeutig, wenn auch schwach, an seinem typischen Laufverhalten zu erkennen. Spur 2: SpgLp 2. ApoNvLp I ist deutlich sichtbar, ebenso wie eine prominente Bande bei ~60 kDa. Spur 3: *Nereis*-Oocyten-Lipoproteinfraktion. ApoNvLp I ist nicht erkennbar dafür ein Peptid mit einer Masse von ~105 kDa. Die Position von ApoNvLp I in Spur 1 & 2 ist eingekreist. Die Pfeile geben die Positionen der Molekulargewichtsstandards an. Coomassie gefärbt.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den nicht auf den ersten Blick mit dem *Nereis*-Lipoprotein assoziierten Peptiden um Abbauprodukte handelt, oder ob diese anderen Peptiden zuzuordnen sind, wurde mit den entsprechenden Fraktionen ein Western-Blot mit dem  $\alpha$ -*Nereis*-Lipoprotein-Antikörper durchgeführt (Abb. 45).

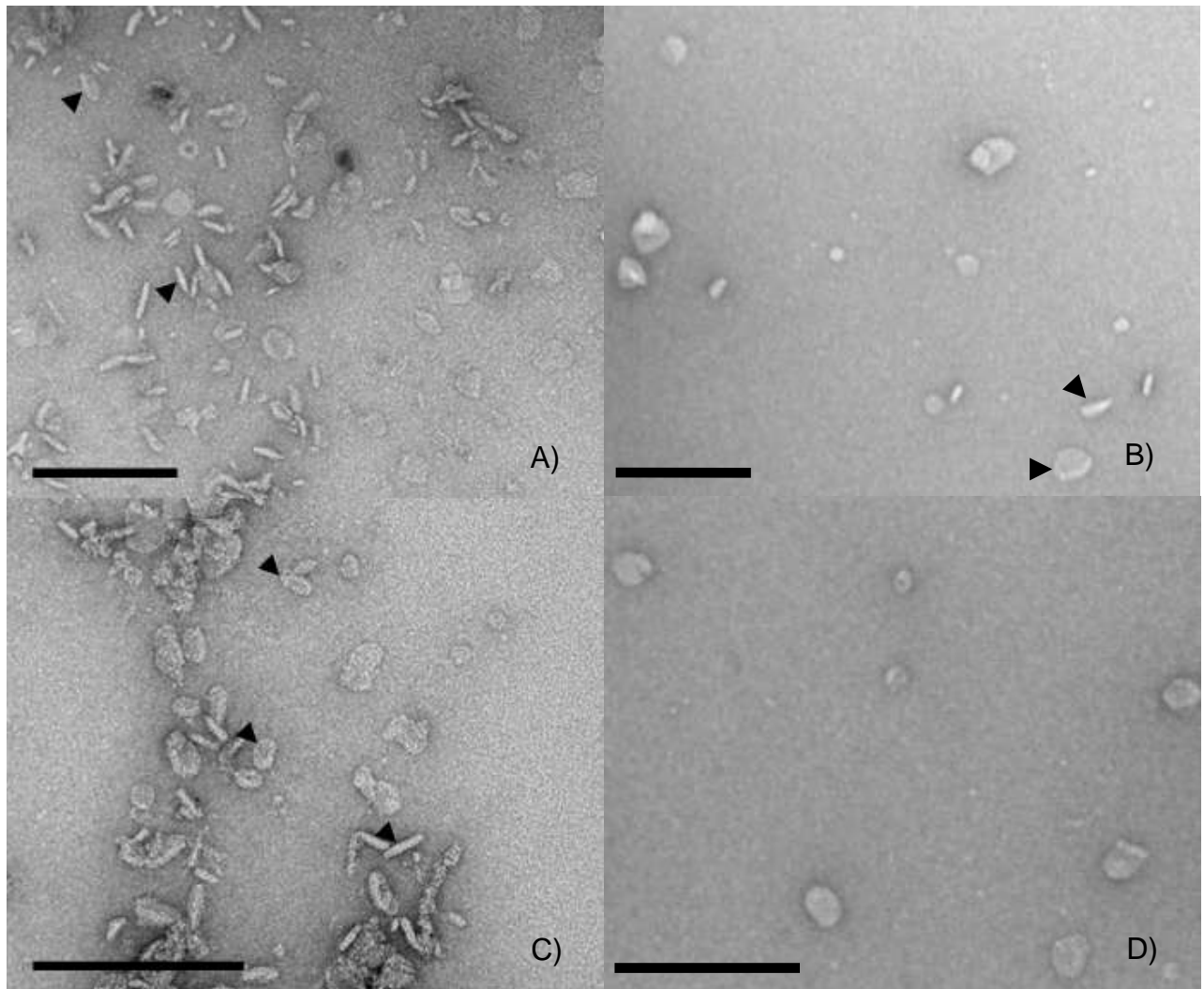


**Abb. 45:** Western-Blot mit aus verschiedenen Geweben isolierten Lipoproteinfraktionen. Die Proteine wurden auf einer 4-20%igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Spur 1: SpgLp 1. Deutlich ist ApoNvLp I zu erkennen, zusätzlich weitere Abbauprodukte. Spur 2: SpgLp 2. ApoNvLp I ist nur schwach erkennbar, auch weitere Abbauprodukte sind nur zu erahnen. Spur 3: *Nereis*-Oocyten-Lipoproteinfraktion. Gefärbt sind zwei Banden mit Massen von ca. 100 und 105 kDa. Die Position von ApoNvLp I in Spur 1 & 2 ist eingekreist. Die Pfeile geben die Positionen der Molekulargewichtsstandards an.

Die Western-Blot-Analyse zeigte deutlich das Vorhandensein von ApoNvLp I in der Fraktion SpgLp 1, wohingegen ApoNvLp I in der Fraktion SpgLp 2 nur ganz schwach nachweisbar war. Zusätzlich zu ApoNvLp I waren noch sehr viele Abbauprodukte zu erkennen. In der aus Oocyten isolierten Fraktion konnte ApoNvLp I nicht nachgewiesen werden, es fanden sich jedoch Abbauprodukte.

#### 4.2 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Um das Auftreten der Lipoproteinbanden im Dichtegradienten mit dem Auftreten von nativen Lipoproteinpartikeln in Bezug zu setzen, wurden die entsprechenden Fraktionen per Transmissionselektronenmikroskopie untersucht. Während in der als SpgLp 1 bezeichneten Fraktion Lipoproteinpartikel gefunden werden konnten (Abb. 46 B & D, nächste Seite), war dies in der Fraktion SpgLp 2 nicht möglich (nicht gezeigt). Auf eine Betrachtung der Oocytenfraktion wurde verzichtet, da im SDS-Gel keinerlei intakte Apolipoproteine nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 46:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Nereis*-Lipoproteinen. A) *Nereis*-Lipoproteine aus der Coelomflüssigkeit isoliert, Vergrößerung 68.000 X. B) SpgLp 1, Vergrößerung 68.000 X. C) *Nereis*-Lipoproteine aus der Coelomflüssigkeit isoliert, Vergrößerung 98.000 X. D) SpgLp 1, Vergrößerung 98.000 X. Konzentration: je 0,2 mg/ml. Continuous Carbon, gefärbt mit 2% (w/v) wässrigem Uranylacetat. Messbalken: 200 nm. Die Pfeilspitzen zeigen durch den Schwermetallfilm senkrecht (oder geknickt) fixierte Lipoproteinpartikel.

Die aus der Fraktion SpgLp 1 isolierten Lipoproteinpartikel zeigen eine ähnliche ‚Morphologie‘ wie die aus der Coelomflüssigkeit. Auch bei ihnen erscheint der Rand der Lipoproteinscheibe heller, was auf Material hindeutet, das elektronendichter als im Zentrum des Partikels ist. Die Dimensionen der Partikel waren mit  $37,3 \pm 8,7$  nm ( $n = 23$ ) etwas kleiner als die Partikel aus der Coelomflüssigkeit ( $42,0 \pm 7,4$  nm, Schenk et al. 2006). Auffällig ist, dass die Konzentration von intakten Lipoproteinpartikeln in der SpgLp 1-Fraktion wesentlich geringer war als in der Coelomflüssigkeit (Abb. 46 A & C), obwohl in beiden Präparationen die gleiche Proteinkonzentration (0,2 mg/ml) aufgetragen wurde.

# DISKUSSION

## 1 LIPOPROTEINE

### 1.1 ISOLATIONEN

Wie beschrieben (Schenk 2003, Schenk et al. 2006) ließ sich das *Nereis*-Lipoprotein durch Iodixanol-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation als eine einzelne Fraktion aus der Coelomflüssigkeit isolieren. Auch die Isolation per KBr-Dichtegradient zeigte das Auftreten einer einzigen Bande im Zentrifugenröhrchen. Die Reinigung des *Nereis*-Lipoproteins wurde routinemäßig durch Flotation in KBr durchgeführt, da KBr durch Dialyse besser aus den Proben entfernbar ist als Iodixanol. Als Dichte wurde 1,16 g/ml gewählt, da dies deutlich über der Schwebdichte des Lipoproteins in KBr ( $\sim 1,1$  g/ml) lag.

### 1.2 DICHTEN

Die Dichte des Lipoproteins wurde mit Hilfe der Refraktometrie bestimmt. In Iodixanol ergab sich eine Dichte von  $1,069 \pm 0,014$  g/ml (siehe auch Schenk et al. 2006). Dies entspricht einem HDL-Partikel, welches in Iodixanol eine Dichte zwischen 1,03 und 1,14 g/ml besitzt (Graham et al. 1996). Die Dichte in KBr wurde nach 16-stündiger Zentrifugation im mehrstufigen KBr-Dichtegradienten (siehe Ergebnisse 1.3) als 1,09-1,10 g/ml bestimmt. Damit ist das *Nereis*-Lipoprotein auch in KBr als HDL zu typisieren, da diese in KBr Schwebdichten von 1,064-1,210 g/ml zeigen (Havel et al. 1955). Die geringere Dichte des Lipoproteins in Iodixanol gegenüber der in KBr ist damit zu erklären, dass das Polymer Iodixanol iso-osmotisch zu physiologischer Kochsalzlösung ist ( $\sim 325$  mOsm, Essellier und Jeanneret 1960) und somit das Lipoprotein seine Hydrathülle behält, während es im stark hygroskopischen Salz KBr diese teilweise verliert (Graham et al. 1996).

Im Vergleich zu anderen Invertebraten ist die in KBr bestimmte Dichte als niedrig einzustufen. So zeigen die HDLp der Insekten Dichten zwischen 1,12 und 1,14 g/ml (Ryan et al. 1986, Ryan und van der Horst 2000, Canavaso et al. 2004, Rodenburg und van der Horst 2005). Bei Mollusken und Arachniden finden sich Dichten zwischen 1,10 und 1,17 g/ml (Hauerland und Bowers 1987, 1989, Pollero et al. 1992, Heras und Pollero 2002). Die HDL der Crustaceen zeigen im Allgemeinen eine höhere Variabilität in ihren Dichten. So sind Werte von 1,08 für *Potamon potamois* (Landkrabbe) und 1,19 g/ml für

*Cancer antennarius* (Salzwasserkrebbe) beschrieben (Yepiz-Plascencia et al. 1995). Auch die Dichten der Hämolympf-Lipoproteine der Flusskrebse sind mit 1,14-1,16 g/ml im Allgemeinen höher (Hall et al. 1995, Avarre et al. 2002, Stieb et al. 2008). Eine Ausnahme stellt das erst kürzlich entdeckte discoidale HDL des europäischen Sumpfkrebse *Astacus leptodactylus* dar, welches ebenfalls eine Dichte von 1,10 g/ml aufweist (Stieb et al. 2008).

### 1.3 NATIVES MOLEKULARGEWICHT

Das native Molekulargewicht des *Nereis*-Lipoproteins wurde mit zwei verschiedenen Methoden ermittelt; zum Einen durch Gelfiltration und zum Anderen durch einen Gleichgewichtslauf in der Analytischen Ultrazentrifuge (AUZ).

Bei der Gelfiltration ergab sich unter Einbeziehung des Korrekturfaktors (siehe Schenk et al. 2006, Stieb et al. 2008) ein natives Molekulargewicht von  $\sim 793.000$  (Ergebnisse 1.4.2). Bei der Molekulargewichtsbestimmung durch Analytische Ultrazentrifugation ergab sich ein Molekulargewicht von  $\sim 857.000$  (Ergebnisse 1.4.1). Die experimentell bestimmten Molekulargewichte liegen 58.000 und 128.000 über dem theoretisch erwarteten Wert von 730.000, der sich aus 50% Protein (bei einer 1:1 Stöchiometrie der Apolipoproteine:  $280.000 + 85.000 = 365.000$ ) und 50% Lipid ergibt. Bei der Bestimmung des Molekulargewichts per Gelfiltration sind die zur Kalibrierung verwendeten Proteine und die daraus resultierende Eichgerade zur Berechnung des Molekulargewichtes von entscheidender Bedeutung; Fehler beim Erstellen dieser Gerade wirken sich direkt auf das ermittelte Molekulargewicht aus. Auch eventuelle Interaktionen der verwendeten Standardproteine oder auch des zu analysierenden Proteins mit der Säulenmatrix sind nicht außer Acht zu lassen, dies gilt in besonderem Maße für nicht-globuläre Proteine wie es auch das *Nereis*-Lipoprotein darstellt (Meredith und Nathans 1982, Schenk et al. 2006). Da jedoch die Eichgerade mehrmals unabhängig voneinander erstellt wurde und sich zwischen den einzelnen Geraden keine Unterschiede zeigten, ist zumindest eine fehlerhafte Eichung der Gelfiltration auszuschließen.

Bei der Massenbestimmung durch AUZ ist zu beachten, dass das partialspezifische Volumen und somit die Dichte des untersuchten Partikels, in diesem Falle des *Nereis*-Lipoproteins, eine entscheidende Größe darstellt (Gellissen und Emmerich 1980, McRorie und Voelker 1993). Da die refraktometrisch ermittelte Dichte noch zuviel Hydratwasser enthielt ( $\sim 79\%$  siehe Anhang 6) konnte diese nicht verwendet werden, und wurde theoretisch als 1,209 g/ml ermittelt (siehe Ergebnisse 1.4.1).

Mit diesem Molekulargewicht (857.000) ist das *Nereis*-Lipoprotein im Bereich der Insekten HDL<sub>p</sub> anzusiedeln, die Molekulargewichte zwischen 450.000-850.000 besitzen (Gellissen und Emmerich 1980, Kawooya et al. 1989, Ryan et al. 1990, Ryan und van der Horst 2000). Es ist jedoch zum Teil wesentlich massereicher als andere Invertebraten-HDL. Die Lipophorine der Cheliceraten zeigen Molekulargewichte um die 500.000 (Cunningham et al. 2007), während die Molekulargewichte der  $\beta$ -Glucan-Binde-Proteine/HDL der Crustaceen im Bereich von  $\sim$ 315.000 liegen (Stieb et al. 2008). Mit einem Molekulargewicht von 930.000 stellt auch hier das discoidale HDL aus *A. leptodactylus* eine Ausnahme dar (Stieb et al. 2008).

Die hier ermittelten Molekulargewichte weichen zum Teil erheblich von den bislang beschriebenen ab. So wurde bei Schenk (2003) ein natives Molekulargewicht von 1.800.000 berichtet und bei Schenk et al. (2006) eines von 675.000. Diese Massenunterschiede sind dadurch zu erklären, dass bei der ersten Bestimmung (Schenk 2003) das Molekulargewicht direkt aus der Eichkurve abgelesen wurde, ohne die Molekülform der Proteine, discoidal beim *Nereis*-Lipoprotein und globulär bei den Standardproteinen, zu berücksichtigen. Es ist also davon auszugehen, dass die berichteten 1.800.000 ein zu großes Molekulargewicht darstellen. Das in Schenk et al. (2006) beschriebene Molekulargewicht von  $\sim$ 675.000 hingegen berücksichtigt diese ‚morphologischen‘ Unterschiede. Wendet man den beschriebenen Korrekturfaktor (Schenk et al. 2006) auf das ermittelte Molekulargewicht von  $\sim$ 1.800.000 (Schenk 2003) an, so erhält man ein vergleichbares korrigiertes natives Molekulargewicht ( $\sim$ 642.000).

Die Molekulargewichtsunterschiede zwischen denen von Schenk et al. (2006) und denen in dieser Arbeit ermittelten Massen könnten z.B. durch eine fehlerhafte Eichgerade bei Schenk et al. (Schenk et al. 2006) begründet sein. Dies ist jedoch auszuschließen. Da das dort beschriebene native Molekulargewicht von 675.000 aus einer Retentionszeit von 19,55 Minuten auf einer Superose 6-Säule, unter identischen Bedingungen wie in dieser Arbeit betrieben, ermittelt wurde. Wird diese Retentionszeit mit der in dieser Arbeit ermittelten Eichgeraden (siehe Ergebnisse 1.4.2) in natives Molekulargewicht umgerechnet, so erhält man lediglich ein Molekulargewicht von 605.000.

Plausibler ist es, die Massenunterschiede darauf zurückzuführen, dass Lipoproteine im Allgemeinen dynamische Partikel sind, deren Lipid-/Apoprotein-Verhältnis sich je nach physiologischem Zustand der Organismen ändert. So sind z.B. bei der Vogelspinne *Eury-*

*pelma californicum* zwei Formen von HDL beschrieben, eine mit 40% Lipidanteil und einem Molekulargewicht von  $\sim 500.000$  und eine mit 44% Lipidanteil und einem Molekulargewicht von  $>500.000$ . Noch extremer scheint es beim Skorpion *Hadrurus arizonensis* zu sein, bei dem der Lipidgehalt der Lipophorine zwischen 28 und 40% schwankt (Hauerland und Bowers 1989). Aber auch bei den Insekten-HDL<sub>p</sub> finden sich unterschiedliche Lipid zu Protein-Verhältnisse. So wurden beim Tabakswärmer *Manduca sexta* Lipidanteile von 40-70% und Molekulargewichte von 500.000-800.000 beschrieben (Pattnaik et al. 1979, Ryan et al. 1992).

#### 1.4 SEDIMENTATIONSKOEFFIZIENT

Die mit dem *Nereis*-Lipoprotein durchgeführten Sedimentationsläufe zeigten ein einheitliches Sedimentationsprofil. Der mittels dem van Holde-Weischet-Algorithmus ermittelte und auf 20°C und Wasser korrigierte Sedimentationskoeffizient betrug  $\sim 9,7$  S. Dieser Wert übersteigt die Sedimentationskoeffizienten anderer Invertebraten HDL zum Teil erheblich. So wurden bei der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* Sedimentationskoeffizienten von 7,5-7,8 S beschrieben (Gellissen und Emmerich 1980, Kashiwazaki und Ikai 1985) und beim larvalen HDL des Tabakswärmers *Manduca sexta* einer von 8,7 S (Pattnaik et al. 1979). Das discoideale HDL aus *A. leptodactylus* hingegen hat einen Sedimentationskoeffizienten von 9,5 S (Stieb, Schenk und Hoeger, unveröffentlicht), und scheint außer dem hier beschriebenen *Nereis*-Lipoprotein das einzige (geschlechtsunabhängige) HDL zu sein, welches einen vergleichbar hohen Sedimentationskoeffizienten besitzt. Die bei Crustaceen für die  $\beta$ GBP/HDL ermittelten Sedimentationskoeffizienten liegen im Bereich von 5,4 bei *Callinectes sapidus* und  $\sim 6$  für *A. leptodactylus* und *Cancer pagurus* (Puppione et al. 1986, Lee und Puppione 1988, Stieb, Schenk und Hoeger, Schenk und Hoeger, beides unveröffentlicht). Weitere Daten zu den Sedimentationskoeffizienten von Invertebraten-Lipoproteinen sind nicht publiziert. Der Sedimentationskoeffizient für humanes LDL liegt zwischen 6 und 6,8 S (Chatterton et al. 1991, Phillips et al. 1994), während der Sedimentationskoeffizient für das HDL des Haushuhns *Gallus gallus* bei  $\sim 4$  S und der für humane HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> bei 5,5 bzw. 4,7 S liegt (Kruski und Scanu 1975).

Die Unterschiede in den Sedimentationskoeffizienten zwischen den Vertebraten- und Crustaceen-HDL einerseits und den Insekten und dem *Nereis*-Lipoprotein andererseits liegen vorrangig in ihrer Masse begründet, da massearme Teilchen im Schwerfeld

weniger schnell sedimentieren als massereiche (Winter und Noll 1998). Die Vertebraten HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub> besitzen Massen von ~260 kDa und ~180 kDa (Anderson et al. 1977) und sind somit den  $\beta$ GBP/HDL der Crustaceen ähnlich, die bei den europäischen Flusskrebse *A. astacus* und *A. leptodactylus* Massen im Bereich von ~315 kDa besitzen (Stieb et al. 2008). Die ebenfalls für den Sedimentationskoeffizienten maßgeblichen Faktoren wie Dichte, Molekülform und -größe (Winter und Noll 1998) können für diesen Vergleich vernachlässigt werden, da die  $\beta$ GBP/HDL durch ihre Dichte von 1,11-1,19 g/ml (Spaziani et al. 1986, Hall et al. 1995, Ruiz-Verdugo et al. 1997, Stieb et al. 2008) als HDL (HDL<sub>2</sub> und HDL<sub>3</sub>,  $\rho = 1,11-1,21$  g/ml, Anderson et al. 1977) klassifiziert sind. Auch sind Molekülform und -größe der genannten Lipoproteine vergleichbar, sie sind mehr oder weniger globulär und haben Durchmesser zwischen 6 und 10 nm (Anderson et al. 1977, Stieb et al. 2008).

Anders verhält es sich bei den Insekten-Lipophorinen, dem discoidalen *A. leptodactylus*-HDL und dem *Nereis*-Lipoprotein. Diese HDL sind wesentlich massereicher (500-930 kDa, siehe 1.3) und zeigen deswegen einen höheren Sedimentationskoeffizienten. Die Unterschiede zwischen den Insekten-Lipophorinen und den discoidalen (*A. leptodactylus*- und *Nereis*-)Lipoproteinen könnte in ihrer Molekülform begründet sein. Zwar hat eine Kugel (Lipophorine) bei gleichem Volumen (Masse) eine geringere Oberfläche als ein Diskus/Zylinder und somit auch eine geringere, der Sedimentation entgegenwirkende, Reibung, jedoch hat eine Kugel keine Möglichkeiten sich im Schwerfeld zu orientieren. Eine Scheibe wird sich im Schwerfeld eher längs als quer zur Zentrifugalkraft stellen und somit dem Medium eine geringere Anströmfläche und somit weniger Strömungswiderstand bieten als eine Kugel, selbst wenn diese einen geringeren Radius aufweist.

Auch aus dem Sedimentationskoeffizient lässt sich das (native) Molekulargewicht eines Moleküls errechnen. Im Fall des *Nereis*-Lipoproteins wurden für das partialspezifische Volumen dieselben Annahmen wie beim Gleichgewichtslauf gemacht und als Diffusionskoeffizient der Wert für *Locusta*-HDL<sub>p</sub> verwendet, den Gellissen und Emmerich (1980) ermittelt haben; damit ergab sich eine native Masse von 981 kDa. Diese Masse liegt ca. 125 kDa über der mittels Gleichgewichtslauf ermittelten Masse (857 kDa) und ~190 kDa über den 793 kDa, die per Gelfiltration bestimmt wurden. Diese Diskrepanz könnte damit zu erklären sein, dass bei der Massenbestimmung aus Sedimentationsläufen zwei Fehlerquellen zu beachten sind. Das partialspezifische Volumen muss ebenso bekannt



sein wie der Diffusionskoeffizient. Die unhydratisierte Dichte, und somit das partialspezifische Volumen des *Nereis*-Lipoproteins, ist derselbe theoretisch hergeleitete Wert wie bei dem Gleichgewichtslauf (0,827 ml/g, siehe Ergebnisse 1.4.1) und kann somit als Sedimentationslauf-spezifischer Fehler ausgeschlossen werden. Der Diffusionskoeffizient hingegen wurde aus der Literatur übernommen. Der verwendete Wert von  $1,38 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  wurde experimentell für *Locusta migratoria* bestimmt (Gellissen und Emmerich 1980), da der Diffusionskoeffizient teilchenspezifisch ist (Winter und Noll 1998), müsste er jedoch auch für das *Nereis*-Lipoprotein experimentell ermittelt werden. Da die durch den Sedimentationskoeffizienten ermittelte Masse jedoch nur um  $\sim 125 \text{ kDa}$  über der mittels Gleichgewichtslauf bestimmten Masse liegt, kann dieser Wert als näherungsweise korrekt betrachtet werden.

## 1.5 MOLARER EXTINKTIONSKOEFFIZIENT

Der molare Extinktionskoeffizient des *Nereis*-Lipoprotein bei 280 nm wurde photometrisch als  $573.358 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bestimmt. Dies bedeutet, dass eine optische Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von 280 nm einer Proteinkonzentration von  $\sim 0,637 \text{ mg/ml}$  entspricht. Im Umkehrschluss heißt das, dass eine Lösung des *Nereis*-Lipoproteins mit einer Konzentration von 1 mg/ml eine optische Dichte von 1,57 besitzt.

Dies ist ein relativ hoher Wert, da man im Allgemeinen bei einer Konzentration von 1 mg/ml eine optische Dichte von  $\sim 1$  erwartet (Fasman 1990). Da die Absorption eines Proteins bei 280 nm hauptsächlich von den Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin bestimmt wird (Edelhoch 1967, Pace et al. 1995), könnte man darauf schließen, dass das *Nereis*-Lipoprotein überdurchschnittlich viele dieser Aminosäuren enthält. Eine weitere Erklärung für den hohen Extinktionskoeffizienten könnten aber auch die transportierten Lipide sein, die ggf. zur Absorption bei 280 nm beitragen.

## 1.6 CHARAKTERISIERUNG DER APOLIPOPOTEINE

### 1.6.1 SEKUNDÄRSTRUKTUREN DER APOLIPOPOTEINE

Die Bestimmung der Sekundärstrukturen des Lipoproteins wurde mittels Circular Dichroismus-Spektroskopie durchgeführt. Es zeigte sich, dass das *Nereis*-Lipoprotein, oder genauer die Apoproteine, zum überwiegenden Teil eine  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (35%) aufwies.  $\alpha$ -Helices waren nur zu 14%, ungeordnete Strukturen und Schleifen waren zu

20 bzw. 28% vertreten (siehe Tab. 7). Da die prozentualen Anteile an den verschiedenen Sekundärstrukturen unter der Annahme einer durchschnittlichen Aminosäuremasse von 115 Da durchgeführt wurden und nicht mit der tatsächlichen Masse der Aminosäuren des *Nereis*-Lipoproteins, die nicht bestimmt werden konnte, können die hier angegebenen Verteilungen nur als näherungsweise korrekt gelten. Dies hängt mit der Tatsache zusammen, dass die aufgenommenen Spektren in der Datenbank mit Referenzproteinen verglichen werden. Da die Absorption und somit die Elliptizität eines Proteins von seiner Konzentration abhängig ist, müssen die erhaltenen Absorptionswerte normiert werden (<http://www.imb-jena.de/ImgLibDoc/cd/tut5a.html>). Dies geschieht durch die Normierung der Elliptizität auf die des durchschnittlichen Aminosäurerestes („mean residue ellipticity“).

Die in dieser Arbeit als durchschnittliche Aminosäuremasse verwendeten 115 Da sind Literaturwerte, die für das HDLp des Tabakswärmers *Manduca sexta* gelten (Ryan et al. 1992). Für Ratten-HDL wird eine durchschnittliche Masse von 112 Da angenommen (Koga et al. 1969). Da das Apolipoproteinmuster von Insekten (in diesem Fall *Manduca sexta*) dem des *Nereis*-Lipoprotein sehr ähnlich ist (Ryan et al. 1992, Schenk 2003, Schenk et al. 2006), wird diese Aminosäuremasse (115 Da) als hinreichend genau angesehen.

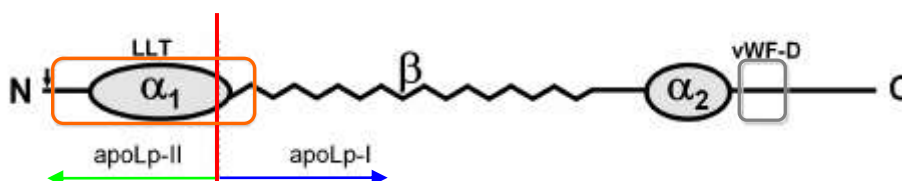
Der sehr hohe Anteil an  $\beta$ -Strukturen scheint ein genereller Befund bei Invertebraten-HDL zu sein. So sind bei Insekten 47-58%  $\beta$ -Faltblatt-Anteile zu finden (Kawooya et al. 1989, Ryan et al. 1992), während im  $\beta$ GBP/HDL der Garnele *Penaeus vannamei* 53%  $\beta$ -Faltblätter vorliegen (Vargas-Requena et al. 2002). Der Anteil an  $\alpha$ -Helices in diesen (Apo-)Lipoproteinen ist sehr unterschiedlich; so sind bei *L. migratoria* und *M. sexta* 30 bzw. 34-36%  $\alpha$ -Helices vorhanden (Kawooya et al. 1989, Ryan et al. 1992), während bei *P. vannamei* 20%  $\alpha$ -Helix vorliegen (Vargas-Requena et al. 2002).

Die  $\beta$ GBP/HDL der europäischen Flußkrebse *A. astacus* und *A. leptodactylus* weisen 7 bzw. 8%  $\alpha$ -Helix- und 39 bzw. 41%  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen auf. Auch das discoidale HDL aus *A. leptodactylus* zeigt diese Sekundärstrukturanteile (Stieb 2007).

Die humanen LDL (Apolipoprotein B) besitzen 36-43%  $\alpha$ -Helices und 17-23%  $\beta$ -Faltblätter (Ettelaie et al. 1997, Johs et al. 2006). Bei der Bestimmung der Sekundärstrukturen durch CD-Spektroskopie scheint beim LDL (ApoB) jedoch der Anteil von  $\beta$ -Faltblättern zu niedrig auszufallen, so ermitteln Ettelaie und Mitarbeiter durch Infrarot-Spektroskopie einen erheblich größeren Anteil an  $\beta$ -Faltblättern (35%, Ettelaie et al. 1997).

Im Gegensatz zu den oben diskutierten ‚nicht-austauschbaren Apolipoproteinen‘ überwiegen bei den ‚austauschbaren Apolipoproteinen‘ (z.B. den humanen Apolipoproteinen A-I, A-II und A-IV sowie C-I, C-II, C-III und E aber auch dem Apolipoprotein III der Insekten)  $\alpha$ -helikale Strukturen, die bis zu 78% der Gesamtsekundärstrukturen ausmachen können (Jonas et al. 1990, Wilson et al. 1991, Segrest et al. 1992, Narayanaswami und Ryan 2000).

Die Haupt-Sekundärstrukturen der Apolipoproteine stellen sogenannte amphipathische  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter dar, von denen die  $\alpha$ -Helix als das weniger hydrophobe Strukturelement angesehen wird (Segrest et al. 1992, Ettelaie et al. 1997, Segrest et al. 2001). Deshalb wird angenommen, dass die an  $\beta$ -Faltblättern reichen Proteindomänen (der sogenannte amphiphile  $\beta$ -Cluster) irreversibel mit der Lipidmatrix interagieren (Ettelaie et al. 1997, Segrest et al. 2001). Beim Prototypen der ‚nicht-austauschbaren Apolipoproteine‘, ApoB 100, sind dies die  $\beta_1$ - $\alpha_2$ - $\beta_2$ - $\alpha_3$ -Domänen, wenn man das fünf-Domänen-Modell (siehe Einleitung 2.2 und Segrest et al. 2001) zugrunde legt. Bei den Insekten-Apolipoproteinen ist die Lipidbindung ganz ähnlich (Smolenaars et al. 2007a). Die Apolipoproteine I und II von *L. migratoria* weisen eine drei-Domänen-Struktur,  $\text{NH}_2$ - $\alpha_1$ - $\beta$ - $\alpha_2$ - $\text{COOH}$ , auf (Abb. 47). Auch hier interagiert der amphiphile  $\beta$ -Cluster irreversibel mit der Lipidmatrix. Interessant ist dabei die Tatsache, dass die den  $\beta_1$ - $\alpha_2$ - $\beta_2$ - $\alpha_3$ -Domänen der Säuger entsprechenden Domänen des Lipophorins,  $\beta$ - $\alpha_2$ - $\text{COOH}$ , ausnahmslos im Apolipoprotein I lokalisiert sind. Apolipoprotein II hingegen besteht nur aus dem N-terminalen Teil der  $\alpha_1$ -Domäne (Smolenaars et al. 2007a).



**Abb. 47:** Domänenstruktur des *L. migratoria* Apolipoprotein II/I-Vorläufers. Die drei charakteristischen Strukturmerkmale  $\text{NH}_2$ - $\alpha_1$ - $\beta$ - $\alpha_2$ - $\text{COOH}$  sind dargestellt. N-terminal der roten Linie befindet sich Apolipoprotein II (grüner Pfeil), C-terminal Apolipoprotein I (blauer Pfeil). Das charakteristische LLT-Modul (siehe Einleitung 2.1) ist orange umrandet und befindet sich fast ausschließlich auf ApoLp II, lediglich ein kleiner Teil liegt am N-terminalen Ende von ApoLp I. Der Pfeil N-terminal des LLT-Moduls gibt die Spaltstelle des Signalpeptids an. C-terminal von  $\alpha_2$  liegt das von Willebrand-Faktor D-Modul (vWF-D, grau umrandet). Verändert nach Smolenaars et al. (2007a).

Aufgrund seines sehr hohen Anteils an  $\beta$ -Faltblättern (siehe oben) und seiner den Apolipoproteinen sehr ähnlichen Apolipoproteinenzusammensetzung (Schenk et al. 2006)

liegt es nahe, einen ähnlichen modularen Aufbau für die *Nereis*-Apolipoproteine anzunehmen, wobei dies jedoch ohne Sequenzanalysen zunächst spekulativ bleiben muss. Durch ihren hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblättern sind die Apolipoproteine des *Nereis*-Lipoproteins jedoch eindeutig als ‚nicht-austauschbare Apolipoproteine‘ zu charakterisieren.

### 1.6.2 STÖCHIOMETRIE

Die durchgeführten Crosslinking-Experimente zeigten eindeutige Ergebnisse. So wurden in der durchgeführten SDS-PAGE nicht mehr zwei Apoproteine gefunden, sondern nur noch ein Peptid mit einer Masse von  $\sim 365$  kDa, was einer 1:1 Stöchiometrie der Apolipoproteine entspricht. Eine 1:1-Stöchiometrie der Apolipoproteine ist auch für andere Invertebraten-Lipoproteine beschrieben. So zeigen die Apolipophorine der Insekten eine 1:1-Stöchiometrie, da sie von einem gemeinsamen Vorläuferprotein, dem Apolipophorin II/I, abstammen, welches dann von einer Furin-Protease gespalten wird (Weers et al. 1993, Smolenaars et al. 2005, Smolenaars et al. 2007a). Auch für die Vogelspinne *E. californicum* konnte diese Stöchiometrie gezeigt werden (Gras, Marksteiner, Hoeger und Schenk, unveröffentlicht), ebenso sind die Apolipoproteine des kürzlich entdeckten discoidalen HDL aus *A. leptodactylus* in einer 1:1-Stöchiometrie angeordnet (Stieb et al. 2008). Dieser Befund ist in sofern interessant, da der Apolipophorin II/I-Vorläufer der Insekten ein dem Apolipoprotein B der Säugetiere homologes Protein ist (Babin et al. 1999, Avarre et al. 2007, Smolenaars et al. 2007b). Daraus könnte auf eine solche Verwandtschaft auch für die Apolipoproteine des *Nereis*-Lipoproteins geschlossen werden.

### 1.6.3 DISULFIDBRÜCKEN

Um das Vorhandensein von intra- und intermolekularen Disulfidbrücken in den Apolipoproteinen des *Nereis*-Lipoproteins zu untersuchen, wurde das Lipoprotein unter reduzierenden, d.h. in Gegenwart von 50 mM DTT, und unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf einer SDS-PAGE analysiert. Es zeigte sich, dass die kleine Untereinheit, ApoNvLp II, unter nicht-reduzierenden Bedingungen weiter migriert als unter reduzierenden. Daraus lässt sich schließen, dass sich im *Nereis*-Lipoprotein zum Einen keine intermolekularen Disulfidbrücken befinden (denn dann müsste sich ein Bild wie beim Crosslinking mit Glutaraldehyd ergeben, d.h. ein Polypeptid mit einer Masse von  $\sim 365$

kDa) und zum Anderen, dass *intramolekulare* Disulfidbrücken nur in ApoNvLp II vorhanden sind. Wenn man postuliert, dass die *Nereis*-Apolipoproteine ebenso wie die Apolipophorine I & II auf ein Prä-Propeptid liegen (Weers et al. 1993), so würde ApoNvLp II N-terminal von ApoNvLp I liegen. Damit würden sich im Prä-Propeptid, dem hypothetischen ApoNvLp II/I-Vorläufer, die Disulfidbrücken, die kotranslational im Endoplasmatischen Reticulum gebildet werden (Woycechowsky und Raines 2000), am N-Terminus befinden. Da sich beim humanen Apolipoprotein B die Disulfidbrücken ausnahmslos am N-Terminus des Proteins befinden (Chan 1992), ist eine solche molekulare Architektur für den hypothetischen ApoNvLp II/I-Vorläufer wahrscheinlich. Um diese Hypothese abzusichern müsste jedoch die Sequenz dieses hypothetischen Prä-Propeptides bekannt sein, bzw. die des codierenden Gens.

#### 1.6.4 LIMITIERTE PROTEOLYSE

Um die Lage der Apoproteine im Lipoproteinpartikel und ihre Ausrichtung zum wässrigen Medium hin zu untersuchen, wurde das *Nereis*-Lipoprotein für einen definierten Zeitraum mit den Proteasen Trypsin und V8 verdaut. Während beide Enzyme die Apoproteine im denaturierten Zustand (5 Minuten 95°C) vollständig verdauten, zeigte die Inkubation des nativen und 2-Butanol-entfetteten Lipoproteinpartikels mit den beiden Proteasen unterschiedliche Muster. Während für Trypsin in jedem Fall nur ApoNvLp II zugänglich war (Auftreten einer charakteristischen Bande bei 72 kDa), war für V8 auch ApoNvLp I zugänglich (Auftreten einer Peptid-,Leiter' mit einer Bande bei 125 kDa). Bei der Inkubation mit V8 zeigte sich eine charakteristische Leiter unterhalb von ApoNvLp I, während bei ApoNvLp II eine schwache Bande im Bereich von 65 kDa auftrat. Dies könnte dafür sprechen, dass nur ein Teil von ApoNvLp II dem wässrigen Medium und damit der Protease zugänglich ist, während von ApoNvLp I ein wesentlich größerer Teil von der Protease angegriffen werden kann. Einen ähnlichen Befund gibt es auch bei den Insekten-Lipophorinen, bei denen ApoLp II ebenfalls wesentlich weniger für Proteolyse zugänglich ist als ApoLp I, da es weiter in die Lipidmatrix eindringt als ApoLp I (Kashiwazaki und Ikai 1985, Robbs et al. 1985, Soulages und Wells 1994a). Auch die beiden Apolipoproteine des discoidalen *A. leptodactylus*-HDL sind in dieser Weise angeordnet (Stieb, Schenk und Hoeger, unveröffentlicht). Die Resistenz von nicht denaturierten ApoNvLp I gegenüber Trypsin im Gegensatz zur guten Zugänglichkeit für V8 könnte sich mit der unterschiedlichen Substratspezifität der beiden Proteasen erklären

lassen. Während V8 C-terminal von Glutaminsäure (und ggf. Asparaginsäure) spaltet (Stennicke und Breddam 2004), schneidet Trypsin C-terminal von Arginin und Lysin (Stryer et al. 2003). Dies wiederum würde bedeuten, dass in ApoNvLp I wesentlich mehr Glutaminsäurereste zum wässrigen Medium hin exponiert sind als Arginin- und Lysinreste, aber auch dass es mehr Glutaminsäurereste enthält als ApoNvLp II, welches ja lediglich ein Abbauprodukt zeigt.

### 1.6.5 KOHLENHYDRATZUSAMMENSETZUNG DER APOPROTEINE

Da nahezu alle extrazellulären Proteine glycosyliert sind (Helenius und Aebi 2001, Stryer et al. 2003, Yan und Lennarz 2005), und dies durch Lektin-Blots auch für das *Nereis*-Lipoprotein gezeigt wurde (Schenk et al. 2006), sollte die Glycosylierung genauer analysiert werden. Dies sollte sowohl anhand der Monosaccharide als auch anhand der N-glycosidisch gebundenen Oligosaccharide des Gesamtproteins geschehen.

Basierend auf den Daten der Monosaccharide wurde die Gesamtglycosylierung des *Nereis*-Lipoproteins auf ~0,66% und die der Apolipoproteine auf ~1,31% bestimmt (siehe Ergebnisse 1.7.5 und Tab. 8). Damit liegt der Gesamtkohlenhydratgehalt des *Nereis*-Lipoproteins etwas niedriger als der der Insekten-Lipophorine, die 1-2% gebundene Kohlenhydrate aufweisen (Kunkel und Nordin 1985), und ist eher mit den Crustaceen  $\beta$ GBP/HDL zu vergleichen, deren Apolipoproteine zu ~0,5% glycosyliert sind (Stieb 2007, Stieb et al. 2008, Schenk und Hoeger, unveröffentlicht). Das humane Apolipoprotein B hingegen ist mit ~10% weitaus stärker glycosyliert (Lee und Breckenridge 1976, Vukmirica et al. 2002). Über die genaue Funktion der proteingebundenen Kohlenhydrate kann bislang nur spekuliert werden. So konnten Weers und Kollegen (1992) zeigen, dass bei den ebenfalls wenig glycosylierten Insekten-Lipophorinen eine Inhibierung der N-Glycosylierung durch Tunicamycin die Sekretion der HDLp verminderte, aber nicht völlig blockierte. Bei den stärker glycosylierten humanen LDL und Insekten-Vitellogeninen (beide ~10%, Kunkel und Nordin 1985, Vukmirica et al. 2002) konnte die Sekretion der Proteine durch Punktmutationen bzw. durch die Zugabe des Glycosylierungshemmers Tunicamycin vollständig inhibiert werden, wobei ihre Lipidbindeeigenschaften nicht betroffen waren (Kunkel und Nordin 1985, Vukmirica et al. 2002). Diese Befunde lassen darauf schließen, dass (Lipo-)Proteine mit einem hohen Glycosylierungsgrad diese Modifikation zur Stabilisierung der Partikel während ihrer Faltung im Endoplasmatischen Reticulum dringender benötigen als

Proteine mit niedriger Glycosylierung. Sie falten sich z.B. komplexer als niedrig glycosylierte Proteine und reagieren somit ‚empfindlicher‘ auf Störungen der N-Glycosylierung. Die Hauptfunktion der N-Glycane im Endoplasmatischen Reticulum besteht in der Unterstützung der Proteinfaltung und der Qualitätskontrolle des sezernierten Proteins (Helenius und Aebi 2001). Es könnte also sein, dass Proteine mit einem hohen Grad an Glycosylierung eine ‚bessere‘ Qualitätskontrolle benötigen.

Bei der Betrachtung der einzelnen Monosaccharide, d.h. der absoluten Anteile der verschiedenen an die Apoproteine gebundenen Zucker (Tab. 9) zeigte sich eine ungefähre 1:1-Verteilung zwischen N-Acetylglucosamin und Mannose, den beiden charakteristischen Zuckerkomponenten in N-glycosidisch gebundenen Kohlenhydraten (Lodish et al. 1996, Stryer et al. 2003). Dieser Befund, im Zusammenspiel mit dem ebenfalls hohen Anteil an Galactose, lässt auf das Vorhandensein von N-Glycanen des komplexen Typs schließen, welche typischerweise je drei Moleküle Mannose und Galactose, sowie fünf Moleküle N-Acetylglucosamin als Grundelemente besitzen (Lodish et al. 1996). Denkbar wäre jedoch auch ein sogenannter Hybridtyp, dessen Monosaccharidzusammensetzung zwischen dem High-Mannose-Typ und dem oben beschriebenen komplexen Typ liegt (Stryer et al. 2003). Mit diesem Typ von N-Glycanen unterscheidet sich das *Nereis*-Lipoprotein von den Lipophorinen der Insekten und dem Vitellogenin des Flusskrebse *Cherax quadricarinatus*, die Glycane vom High-Mannose-Typ besitzen (Kanost et al. 1990, Khalaila et al. 2004).

Die restlichen verbleibenden Kohlenhydrate sollten dann auf O-glycosidisch gebundene Kohlenhydrate zurückzuführen sein. Die Grundstruktur O-glycosidisch gebundener Kohlenhydrate ist Galactose- $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-N-Acetylgalactosamin-1 $\rightarrow$ Ser/Thr (Lodish et al. 1996).

Legt man die Molaritäten der gebundenen Zucker zu Grunde, so ergibt sich ein Verhältnis von Kohlenhydrat zu Apoprotein von  $\sim 25:1$ . Dies wird durch die Analyse der N-glycosidisch gebundenen Zucker gestützt. Wurden die N-Glycane selektiv durch das Enzym PNGase F abgespalten und nach Fluoreszenzmarkierung per HPLC analysiert, so fanden sich zwei prominente Glycane mit Größen von  $\sim 9,9$  und  $\sim 10,75$  Glucoseäquivalenten, was zusammen  $\sim 21$  Mol Kohlenhydrat pro Mol Apolipoprotein entspräche.

Zieht man von den gefundenen 25 Mol Kohlenhydrat pro Mol Apoprotein die oben diskutierten  $\sim 21$  Mol ab, so verbleiben noch 4 Mol, welche den O-glycosidisch gebundenen Kohlenhydraten zuzuordnen sind. Das Vorkommen von O-Glycanen wurde durch Lektin-Blots gezeigt (Schenk et al. 2006). Auch zeigte sich in diesen Blots, dass lediglich ApoNvLp II diesen Typ von Glycanen trägt. Das Vorhandensein von O-Glycanen bei Apolipoproteinen der Wirbellosen scheint ungewöhnlich zu sein. So wurde dieser Typ weder bei den Insekten-Lipophorinen (Weers et al. 1993) noch bei den Lipophorinen der Cheliceraten *E. californicum* und *Pandinus imperator* (Gras, Marksteiner, Hoeger und Schenk, unveröffentlicht), den  $\beta$ GBP/HDL der Crustaceen, noch bei den ‚Clotting-Proteinen‘ und auch nicht bei dem kürzlich beschrieben discoidalen HDL aus *A. leptodactylus* dieser Typ von Glycosylierung gefunden (Yepiz-Plascencia et al. 1995, Yeh et al. 1999, Stieb et al. 2008). Ein Grund für diesen Befund könnte die basale Stellung der Anneliden im Vergleich zu den erwähnten Arthropoden sein. Es wäre von Interesse, die Glycosylierungsmuster von noch basaleren Gliederfüßern als den hier erwähnten durchzuführen. Ein Objekt wäre z.B. der amerikanische Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus*, dessen Apolipoprotein-Muster (Rehn und Lee 1994) dem der Insekten- (Ryan et al. 1990) und Cheliceraten-Lipophorine (Haunerland und Bowers 1987, Cunningham et al. 1994), aber auch dem des discoidalen *A. leptodactylus*-HDL und dem *Nereis*-Lipoprotein sehr ähnlich ist (Schenk 2003, Schenk et al. 2006, Stieb et al. 2008).

## 1.7 LIPIDZUSAMMENSETZUNG

Die vom *Nereis*-Lipoprotein transportierten Lipide wurden mit verschiedenen Methoden analysiert. Zum Einen wurden die Lipidklassen per Dünnschichtchromatographie und HPLC-ELSD identifiziert sowie (bei der Lichtstreuungsdetektion) auch quantifiziert; zum Anderen wurde der Totallipidgehalt mittels der Phospho-Sulpho-Vanillin-Methode und der Phospholipidgehalt mit Hilfe der ANS-Fluoreszenz bestimmt.

Die qualitative Lipidanalyse mittels Dünnschichtchromatographie zeigte die Dominanz von Phospholipiden gegenüber den Neutrallipiden. Innerhalb der Phospholipide dominierte Phosphatidylcholin gegenüber Phosphatidylethanolamin. Die dominanten Neutrallipide waren Diacylglyceride, gefolgt von freien Fettsäuren und Cholesterinestern (siehe dazu auch Schenk et al. 2006). Bei der in dieser Arbeit ebenfalls zur Bestimmung der Lipidbestandteile durchgeführten HPLC-ELSD ergab sich ein anderes Bild. Während Phospholipide (und speziell Phosphatidylcholin) als die dominierende Lipidklasse



bestätigt wurden, fanden sich keine freien Fettsäuren, während Monoacylglyceride mit einem Anteil von ~10,6% das dominierende Neutrallipid noch vor den Di- und den Triacylglyceriden mit ~6,5 bzw. ~6,9% waren. Diese Diskrepanz könnte damit erklärt werden, dass die bei der Dünnschichtchromatographie angewandte Färbemethode (gesättigte Iod-Atmosphäre) nur ungesättigte Fettsäuren färbt, während bei der Lichtstredetektion alle in der Gasphase befindlichen Partikel detektiert werden. Dies würde bedeuten, dass die per Lichtstreuung detektierten Mono- und Triacylglyceride überwiegend nur gesättigte Fettsäuren aufweisen würden, was jedoch als äußerst unwahrscheinlich anzusehen ist, da in tierischen Systemen Ölsäure (C<sub>18</sub> einfach ungesättigt) eine der dominierenden (ungesättigten) Fettsäuren ist (El-Salhy et al. 1981, Ravid et al. 1999, Maldonado et al. 2001). Eine wahrscheinlichere Erklärung scheinen physiologische Unterschiede zu sein. Im Fall der Dünnschichtchromatographie könnte z.B. aber auch eine Zersetzung der Mono- und Triacylglyceride in freie Fettsäuren aufgrund von zu langer Lagerung stattgefunden haben.

Mittels der Phospho-Sulpho-Vanillin-Methode wurde der Gesamtlipidgehalt auf ~48% bestimmt (siehe auch Schenk et al. 2006). Mit diesem Lipidgehalt fügt sich das *Nereis*-Lipoprotein in die Reihe der bereits beschriebenen Wirbellosen-HDL ein. So besitzen die Insekten-HDLp einen Lipidanteil von 40,8-51,5% (Ryan et al. 1986, Canavoso et al. 2001) und auch die Lipophorine der Vogelspinne *E. californicum* und des Skorpions *Hadrurus arizonensis* scheinen etwa 45% Lipid zu besitzen (Hauerland und Bowers 1989). Es sind jedoch auch weniger stark lipidierte Lipoproteine mit einem Lipidgehalt von ~30% bei Cheliceraten beschrieben (Hauerland und Bowers 1989, Cunningham et al. 1994, Cunningham et al. 2007). Die  $\beta$ GBP/HDL der Crustaceen zeigen wiederum eine sehr hohe Variabilität in ihrem Lipidgehalt, der zwischen 25% bei *A. leptodactylus* und 51% bei *Callinectes sapidus* liegen kann (Lee 1991, Hall et al. 1995, Ruiz-Verdugo et al. 1997, Stieb et al. 2008). In Mollusken wurden Lipidanteile von ~35% für die HDL beschrieben (Pollero et al. 1992).

Der Phospholipidgehalt des *Nereis*-Lipoproteins wurde mit Hilfe der ANS-Fluoreszenz ermittelt. Er lag zwischen 37,75 und 43,60  $\mu$ g pro 50  $\mu$ g Apoprotein. Legt man als Gesamtlipidgehalt die mittels Phospho-Sulpho-Vanillin und Lichtstredetektion im Schnitt ermittelten ~50% zugrunde, entspricht dies 75-87% der Gesamtlipidmasse. Dieser Wert liegt geringfügig über dem aus der Lichtstredetektion ermittelten Wert für die

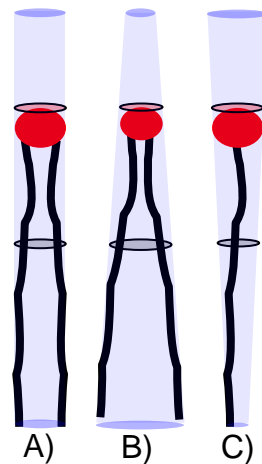
Phospholipide (67,7%), was jedoch daran liegen kann, dass der durch Lichtstreuung allein ermittelte Gesamtlipidgehalt etwas höher liegt als der gemittelte Wert, ~57% im Vergleich zu ~50%. Legt man die per Lichtstreuung ermittelten 57% Gesamtlipidgehalt zugrunde, so entsprechen die ermittelten 37,75-43,60 µg Phospholipid pro 50 µg Apolipoprotein 56,95-65,78% der gesamten Lipidmasse.

Generell scheinen discoidale Lipoproteine sehr hohe Anteile an Phospholipiden zu besitzen (Hamilton et al. 1976, Spaziani et al. 1986, Stieb 2007). Da Phospholipide typischerweise Membranbausteine darstellen (Stryer et al. 2003, Christen und Jaussi 2004), könnte diesen discoidalen Lipoproteinen zusätzlich zu ihrer Funktion im Energiestoffwechsel eine Funktion für die Membranbiosynthese zukommen. Auch könnte der hohe Phospholipidgehalt mit der Architektur der Lipoproteine zusammenhängen. Da die äußere Lipidlage in Lipoproteinen aufgrund ihrer polaren Eigenschaften immer von Phospholipiden (und Cholesterin) gebildet wird (Hevonoja et al. 2000, Ryan und van der Horst 2000, Stryer et al. 2003), ist es aus geometrischen Gründen verständlich, dass ein discoidales Lipoprotein, das im Vergleich zu einem globulären Lipoprotein das geringere Volumen-Oberflächen-Verhältnis hat, einen prozentual höheren Anteil an Phospholipiden aufweist.

Aber auch die Möglichkeit, dass die Phospholipide als Speicherlipide verwendet werden, ist nicht ganz auszuschließen. So ist es bekannt, dass Euphausiiden zusätzlich zu Triacylglyceriden große Mengen an Phospholipiden, namentlich Phosphatidylcholin, speichern (Hagen und Auel 2001). Auch können Phospholipide als Energiesubstrat benutzt werden, dies ist z.B. bei den Spermien von Seeigeln der Ordnung Echinoidea der Fall (Mita und Nakamura 1993).

Zieht man die oben erwähnte Funktion der Phospholipide für den Energiehaushalt in betracht, so lässt sich eine mögliche Erklärung für die beobachtete discoidale Form des *Nereis*-Lipoproteins (Harris et al. 2001, Schenk 2003, Schenk et al. 2006) oder anderer discoidaler Lipoproteine, z.B. die discoidalen HDL aus *L. polyphemus*, *C. anntenarius* oder *A. leptodactylus* (Schenk und Hoeger, unveröffentlicht, Spaziani et al. 1986, Stieb et al. 2008) finden. Phosphatidylcholin, das hauptsächlich vorhandene Phospholipid, bildet aufgrund seiner molekularen Architektur (polarer ‚Kopf‘ und hydrophober ‚Schwanz‘ sind in etwa gleich ‚groß‘ siehe Abb. 48 A, nächste Seite) flache lamelläre  $L_\alpha$ -Phasen (Szule et al. 2002). Das bedeutet, dass sie dazu tendieren Phospholipiddoppelschichten zu bilden.

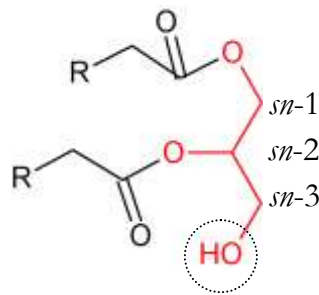
Die energetisch günstigste geometrische Form zum Transport von großen Mengen an Phosphatidylcholin ist aus diesem Grund eine Scheibe. Phospholipide mit einer anderen Architektur, wie z.B. Phosphatidylethanolamin (kleiner polarer ‚Kopf‘ und großer ‚hydrophober‘ Schwanz Abb. 48 B) tendieren dazu, inverse hexagonale  $H_{II}$ -Phasen zu bilden, während Lysophospholipide (großer ‚polarer‘ Kopf und kleiner hydrophober ‚Schwanz‘ Abb. 48 C) Mizellen oder hexagonale  $H_I$ -Phasen bilden (Szule et al. 2002). Für diese Phospholipide wäre die discoidale Form energetisch wesentlich ungünstiger, sie scheiden somit als Hauptlipidkomponenten von discoidalen Lipoproteinen aus.



**Abb. 48:** Schematische Darstellung der verschiedenen Phospholipid-Architekturen. Rot ist die polare Kopfgruppe, schwarz die hydrophoben Acylreste, die roten und schwarzen Ellipsen stellen die Flächen der polaren (rot) bzw. apolaren (schwarz) Komponenten dar. Die blauen Zylinder stellen die generelle Form dar. A) ‚Zylindrisches Lipid‘ mit etwa gleich großen Flächen von Kopf- und Schwanzgruppe, z.B. Phosphatidylcholin. B) ‚Konisches Lipid‘ mit kleiner polarer Kopfgruppe, z.B. Phosphatidylethanolamin. C) ‚Konisches Lipid‘ mit großer polarer Kopfgruppe, z.B. Lysophosphatidylcholin.

Betrachtet man die Gesamtlipidzusammensetzung ergibt sich ein für (marine) Wirbellose nur bedingt typisches Bild (Spaziani et al. 1986, Lee 1991, Lubzens et al. 1997, Ruiz-Verdugo et al. 1997). Zwar überwiegen beim *Nereis*-Lipoprotein wie bei allen marinen Invertebraten die Phospholipide, es wurden jedoch nicht die überwiegend hohen Anteile an Diacylglyceriden gefunden. Vielmehr scheinen sich die Neutrallipide des *Nereis*-Lipoproteins auf die drei Acylglyceridklassen relativ gleichmäßig zu verteilen (siehe oben und Tab. 10 & 11). Diese Lipidklassenverteilung (hauptsächlich Phospholipid und eine in etwa gleiche Verteilung der drei Neutrallipidklassen) ist für die Lipoproteine der Wirbellosen ungewöhnlich. Im Allgemeinen dominiert unter den Neutrallipiden eine bestimmte Klasse, meistens Diacylglyceride (Chino et al. 1969, Kunkel und Nordin 1985, Spaziani et al. 1986, Haunerland und Bowers 1987, Soulages und Wells 1994a, 1994b, Hall

et al. 1995, Ryan und van der Horst 2000) oder wie in einigen wenigen Fällen Triacylglyceride (Cunningham et al. 1994, Heras und Pollero 2002, Pennington und Wells 2002, Cunningham et al. 2007). Vergleicht man die Lipidzusammensetzung des *Nereis*-Lipoproteins mit der des Vitellins aus *Platynereis dumerilii*, so findet man eine ganz ähnliche Verteilung der Lipidklassen, mit der Ausnahme, dass keine Diglyceride vorkommen (U. Hoeger, persönliche Mitteilung). Generell scheinen Vitellogenine/Vitelline, bis auf die der Insekten, vorrangig Triacylglyceride zu binden (Lee und Puppione 1988, Lee 1991, Lubzens et al. 1997, Lee et al. 2005), wobei sich Vitelline und Vitellogenine unterscheiden können: So enthält das Vitellogenin der Garnele *P. semisulcatus* etwa gleiche Mengen an Di- und Triacylglyceriden, das Vitellin hingegen nur noch Triacylglyceride (Lubzens et al. 1997). Bei der Krabbe *C. sapidus* stellen Triacylglyceride (und Steroide) die einzigen Nicht-Phospholipide des Vitellogenins dar (Lee und Puppione 1988), ebenso wie sie es im Vitellin des Polychaeten *Neanthes arenaceodentata* sind (Lee et al. 2005). Beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* sind es außer den Phospholipiden vor allem Triacylglyceride aber auch freie Fettsäuren (Kubagawa et al. 2006). Es könnte also sein, dass die Lipidzusammensetzung des *Nereis*-Lipoproteins eine Art ‚Zwischenstufe‘ zwischen den als Prototypen der Lipoproteine geltenden Vitellogeninen auf der einen und den hoch-evolvierten Lipophorinen auf der anderen Seite darstellt (Mann et al. 1999, Avarre et al. 2007, Smolenaars et al. 2007b). Darüber, inwieweit dies tatsächlich zutrifft, kann nur spekuliert werden. Zunächst wäre die Frage zu klären, warum bei Insekten der energetisch ungünstige Weg der Lipidmobilisierung über Diacylglyceride beschritten wird, bei dem die Lipide zunächst in Form von Triacylglyceriden im Fettkörper gespeichert werden, die ihrerseits wiederum aus Diacylglyceriden (nämlich aus denen der Lipophorine) synthetisiert werden (Rodenburg und van der Horst 2005). Dies ist umso bemerkenswerter, da Diacylglyceride ca. 30% weniger Energie pro Mol liefern als Triacylglyceride (~322 Mol ATP/Mol Distearoylglycerin im Vergleich zu ~468 Mol ATP/Mol Tristearoylglycerin, berechnet nach Christen und Jaussi 2004). Diacylglyceride sind aufgrund ihrer freien Hydroxylgruppe (meist in *sn*-3-Position) zu einem gewissen Grad polar (Abb. 49, nächste Seite). Dies begünstigt deren Exposition an der Oberfläche der Lipophorine (Van der Horst 1990).



**Abb. 49:** Schematische Darstellung eines *sn*-1,2-Diacylglycerides. Der Glycerinrest ist rot dargestellt, der Acylrest schwarz. R steht für den Rest der veresterten Fettsäure. Die unveresterte und somit für eine Restpolarität sorgende Hydroxylgruppe in *sn*-3-Position ist eingekreist.

Dies bedeutet zum Einen eine bessere Zugänglichkeit für die Diacylglyceride hydrolysierenden Lipoprotein-Lipasen, wodurch hohe Metabolisierungsraten (und dadurch erst den ‚reusable shuttle‘-Mechanismus) ermöglicht werden (Soulages et al. 1988, Van der Horst 1990, Soulages und Wells 1994a). Zum Anderen wirkt die Anwesenheit von Diacylglyceriden an der Oberfläche von Lipophorinen auf diese destabilisierend (Soulages und Brenner 1991, Soulages und Wells 1994b), da sie in Phospholipidmembranen dazu tendieren, einen Übergang von der lamellären- in die invertierte hexagonale  $H_{II}$ -Phase zu propagieren (siehe auch Phosphatidylethanolamin weiter oben, Das und Rand 1984, Soulages et al. 1988, Szule et al. 2002). Die dadurch entstehenden hydrophoben Stellen auf der Oberfläche der Lipophorine machen die Assoziation des nicht bei allen Insekten vorhandenen Apolipophorins III mit dem Lipophorinpartikel mit zunehmenden Gehalt an Diacylglyceriden zwingend erforderlich (Soulages und Wells 1994b).

Insekten haben sehr hohe Stoffwechselraten ( $360\text{-}630\text{ mm}^3\text{ O}_2/\text{g Körpermasse}$  und Stunde, bei *Melolontha* bzw. *Schistocerca*), die im Flug auf das 20- bzw. 100-fache gesteigert werden können ( $15.000\text{-}39.700\text{ mm}^3\text{ O}_2/\text{g Körpermasse}$  und Stunde für *Schistocerca* bzw. *Melolontha*, Penzlin 1991). Man könnte also die durch die Diacylglyceride hervorgerufenen Instabilität als ‚physiologischen Preis‘ für den hohen Metabolismus und speziell den Flug betrachten.

Da Polychaeten im Vergleich mit den Insekten eine ungleich niedrige Stoffwechselrate haben (*Arenicola*:  $30\text{ mm}^3\text{ O}_2/\text{g Körpermasse}$  und Stunde, Penzlin 1991), könnte evolutiv nicht die Notwendigkeit bestanden haben, im Energiestoffwechsel auf die hohe Lipidmobilisierungsraten ermöglichenden Diacylglyceride (‚reusable shuttle‘-Mechanismus, siehe oben) oder die hohe Energiedichten ermöglichenden Triacylglyceride ‚umzusteigen‘.

## 2 LIPOPROTEINREZEPTOREN

### 2.1 LIPOPROTEINREZEPTORISOLIERUNG

Der Lipoproteinrezeptor konnte durch die beschriebene Methodik (siehe Material und Methoden 4.2) erfolgreich isoliert werden. Die in der Literatur zusätzlich zur Affinitätschromatographie beschriebenen Reinigungsschritte wie Anionenaustauschchromatographie bei saurem pH (Schneider et al. 1982, Röhrkasten et al. 1989, Ferez 1990, Tsuchida und Wells 1990) konnten ausgelassen werden. Das so isolierte Rezeptorprotein besaß eine Masse von ~114 kDa im reduzierten und ~120 kDa im nicht-reduzierten Zustand (siehe Abb. 30 A & B). Die Masse von ~114 kDa ist vergleichbar mit den bislang bei Wirbellosen isolierten Lipoproteinrezeptoren, die Massen zwischen 100 und 120 kDa aufweisen (Tsuchida und Wells 1990, Lee et al. 2003a, Lee et al. 2003b, Gopalapillia et al. 2006). Auch die bis dato bei Wirbeltieren isolierten Lipoproteinrezeptoren liegen in diesem Massenbereich (Schneider et al. 1982, Cummings et al. 1983, Schneider 1989, Steyrer et al. 1990). Die Tatsache, dass der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor im nicht-reduzierten Zustand eine Masse von ~120 kDa hat, zeigt, dass es sich um ein monomeres Protein handelt. Würde es sich bei dem Rezeptorprotein um ein im nativen Zustand z.B. dimeres Protein handeln, würde man eine Masse von ~230 kDa erwarten, da durch die nicht erfolgte Reduktion der Disulfide die beiden Untereinheiten nicht dissoziieren würden. Die Möglichkeit, dass es sich beim *Nereis*-Lipoproteinrezeptor um ein Protein handelt, welches nicht durch kovalente Bindungen (hier: Disulfidbrücken) dimerisiert ist, ist ebenfalls auszuschließen, da die Funktionalität des Rezeptors durch den Liganden-Blot demonstriert wurde. Auch sind alle bisher beschriebenen Mitglieder der LDLR-Superfamilie monomere Membranproteine (Willnow 1999). Bemerkenswert ist, dass der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine höhere Masse im SDS-Gel aufweist als unter reduzierenden, was bei den bislang beschriebenen Lipoproteinrezeptoren nicht der Fall ist (Daniel et al. 1983, Röhrkasten und Ferez 1986a, Tsuchida und Wells 1990, Lee et al. 2003b). Im Falle des humanen LDLR kann dies mit dem hohen Gehalt an N-Acetyl-Neuraminsäure erklärt werden (13 Mol pro Mol Rezeptorprotein), welcher zu einem anormalem Laufverhalten im SDS-Gel führt (Cummings et al. 1983). Eine weitere mögliche Erklärung könnte die aus sieben Wiederholungen von 40 Aminosäuren bestehende, jeweils drei Disulfidbrücken ent-

haltende Ligandenbindedomäne des LDLR, sowie eine cystein- und disulfidbrückenreiche EGF-Vorläuferdomäne (Brown et al. 1997) sein; werden diese reduziert, nimmt das Peptid eine weitaus weniger kompakte Form an als in der nicht-reduzierten Form und zeigt somit ein anderes Laufverhalten im SDS-Gel. Da der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor jedoch ebenfalls Disulfidbrücken besitzt, bzw. diese für seine Funktion benötigt (siehe Ergebnisse 2.2.2), kann diese Möglichkeit als Erklärung ausgeschlossen werden. Auch die Möglichkeit, dass der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor weniger Disulfidbrücken in seiner Ligandenbindedomäne besitzt als der humane LDLR ist zumindest theoretisch abzulehnen, da die bislang strukturell charakterisierten Wirbellosen-Lipoproteinrezeptoren eher mehr dieser strukturellen Elemente besitzen als der Prototyp LDLR (Brown et al. 1997, Willnow 1999, Rodenburg und van der Horst 2005).

## 2.2 CHARAKTERISIERUNG

### 2.2.1 GEWEBESPEZIFITÄT

Der Lipoproteinrezeptor konnte in allen untersuchten Zellen und Geweben (Darmepithel, Muskeln, Elaeocyten, Spermatozoen und Oocyten) mittels Liganden-Blot nachgewiesen werden.

Da sowohl Spermatozoen als auch Oocyten und Elaeocyten sehr lipidreich sind (U. Hoeger, persönliche Mitteilung, Fischer und Hoeger 1993, Hoeger et al. 1999), ist anzunehmen, dass diese Lipide zumindest teilweise durch das Lipoprotein zur Verfügung gestellt werden.

Für die Oocyten war das Auftreten eines Lipoproteinrezeptors zunächst nicht erwartet. *Nereis*-Oocyten akkumulieren während ihrer Reifung große Mengen an Dotterprotein (Fischer und Hoeger 1993), das endocytisch über den Vitellogeninrezeptor aufgenommen wird (Fischer et al. 1991, Hafer et al. 1992). Da Vitellogenine und Lipoproteine zumindest bei Insekten (beim Nachtpfauenauge *Hyalophora*) um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren, ist postuliert worden, dass beide Proteine denselben zellulären Rezeptor benutzen (Kulakosky und Telfer 1990). Nach Ansicht dieser Autoren wird die bevorzugte Aufnahme des Vitellogenins in die Oocyten dadurch gewährleistet, dass, trotz eines höheren Hämolymphtiters an Lipophorin im Vergleich zu Vitellogenin (57  $\mu\text{M}$  zu 45,6  $\mu\text{M}$ ), der Rezeptor-Vitellogenin-Komplex eine wesentlich niedrigere Dissoziations-

konstante besitzt als der Rezeptor-Lipophorin-Komplex (18  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu 133  $\mu\text{M}$ ).

Für das hier untersuchte *Nereis*-System kann das oben beschriebene ‚ein-Rezeptor-System‘ durch die unterschiedlichen biochemischen Charakteristika der Rezeptoren ausgeschlossen werden. Der in dieser Arbeit isolierte und charakterisierte Lipoproteinrezeptor besitzt im reduzierten Zustand wie erwähnt eine Masse von  $\sim 114$  kDa und im nicht-reduzierten Zustand eine von  $\sim 120$  kDa. Der Vitellogeninrezeptor hingegen besitzt im nicht-reduzierten Zustand eine Masse von  $\sim 190$  kDa (Hafer et al. 1992), Studien mit dem reduzierten Rezeptorprotein wurden von diesen Autoren nicht durchgeführt. Durch die in dieser Arbeit gelungene Isolierung eines Lipoproteinrezeptors aus Oocyten und der Tatsache, dass der Lipoproteinrezeptor nicht in der Lage war, im Liganden-Blot angebotenes Vitellin zu binden (Daten nicht gezeigt), konnte erstmalig die Existenz zweier unterschiedlicher Rezeptoren demonstriert werden. Die Notwendigkeit eines Lipoprotein-spezifischen Rezeptors kann mit der dadurch möglichen spezifischeren Aufnahme des *Nereis*-Lipoproteins in die Oocyten erklärt werden. Da die *Nereis*-Oocyten zusätzlich zu dem Dotterprotein auch noch große Mengen Lipid einlagern (Fischer und Hoeger 1993) scheint das *Nereis*-Lipoprotein mit seiner hohen Lipidtransportkapazität von  $\sim 50\%$  der Partikelmasse diese Aufgabe zu erfüllen. Dies wird umso verständlicher, wenn man die im Vergleich zum *Nereis*-Lipoprotein um den Faktor drei niedrigere Lipidtransportkapazität des Vitellogenins ( $\sim 16\%$  der Partikelmasse für das Dotterprotein von *Perinereis cultifera*, Baert et al. 1984) und seinem im Vergleich zum Vitellogenin höherem Titer (U. Hoeger, persönliche Mitteilung, Fischer und Hoeger 1993) berücksichtigt.

Bei den männlichen Keimzellen (Spermatogonien) war das Vorhandensein des Lipoproteinrezeptors zu postulieren, da es im männlichen Tier naturgemäß keine Dotterproteine gibt und die schwer löslichen Lipide nicht allein durch Diffusion in den Zellen akkumuliert werden können. Außerdem konnte bei den Sertolizellen (Nährzellen der Spermien) die Bedeutung der HDL für die Cholesterin-Akkumulation zumindest *in vitro* demonstriert werden (Fofana et al. 1996). Bei Seeigel-Spermien sind zudem Phospholipide als Energiesubstrat beschrieben worden (Mita und Nakamura 1993).

Die Elaeocyten akkumulieren während der geschlechtlichen Reifung große Mengen an Lipid und Kohlenhydraten (Fischer und Hoeger 1993, Hoeger et al. 1996). Da sie in



dieser Zeit die Hauptstoffwechsellast tragen und eine Funktion analog der des Insektenfettkörpers bzw. der Vertebratenleber haben (U. Hoeger, persönliche Mitteilung), kommen sie - neben ihrer bereits bekannten Synthese des Dotterproteins im weiblichen Geschlecht - als einer der möglichen Syntheseorte für das *Nereis*-Lipoprotein in Frage. Da die Sekretion von neu synthetisierten Lipoproteinen bei Mammaliern unter anderem durch Lipoproteinrezeptoren in der Leber reguliert wird (Williams et al. 1992, Fisher et al. 2001), könnte dem Lipoproteinrezeptor in den Elaeocyten eine ähnliche Funktion zukommen. Eine weitere Erklärung für das Vorhandensein des Rezeptorproteins könnte die Rolle der Elaeocyten als zentrales ‚Stoffwechselorgan‘ während der Geschlechtsreifung darstellen. So könnten die vom Lipoprotein transportierten Lipide, vornehmlich Phospholipide und Monoacylglyceride, aber auch andere Neutrallipide (siehe Ergebnisse 1.8 und Schenk et al. 2006), nach der in dieser Arbeit nachgewiesenen Endocytose (siehe Ergebnisse 3.4.1) des Lipoproteins in die Elaeocyten aufgenommen werden, und die Fettsäuren dieser Lipide dort in die vorherrschenden Triacylglyceride (Fischer und Hoeger 1993) umgeestert werden. Beim Beschreiten dieses Weges würde den Elaeocyten die Rolle als primärer Lipidspeicher und -verteiler zukommen. Die Überführung der Lipoprotein-Lipide in die intrazellulären Lipidtropfen könnte als ‚Sensor‘ für die Lipidversorgung genutzt werden. Ähnliches trifft bei den Wirbeltieren zu, bei denen die Menge von neusynthetisiertem VLDL von der Lipidverfügbarkeit und nicht von der Apolipoprotein B Syntheserate abhängt (Davis 1999, Shelness und Sellers 2001). Bei den Insekten hingegen ist die Biosynthese von Lipophorin unabhängig vom Lipidgehalt der Nahrung (Canavoso et al. 2001). Allerdings werden auch bei den Insekten die Nahrungslipide in Form von Triacylglyceriden gespeichert, die aus den Fettsäuren der Nahrungslipide synthetisiert werden (Van der Horst 1990, Arrese et al. 2001, Canavoso et al. 2001, Rodenburg und van der Horst 2005).

Das Vorkommen des Lipoproteinrezeptors im Darmepithel spricht für dieses Gewebe als Syntheseort des Lipoproteins, da eine Aufnahme von Lipoproteinen in das Darmepithel überflüssig wäre. Die Nahrungslipide müssen auf ihrem Weg von der Nahrung zu den peripheren Geweben eben dieses Epithel durchqueren, somit bleibt für die Lipoproteinrezeptoren dieses Gewebes nur noch die Möglichkeit einer regulatorischen Funktion in der Sekretion der Lipoproteine, wie dies bei Vertebraten beschrieben ist (Williams et al. 1992, Fisher et al. 2001).

Obwohl Lipide die bevorzugte Energiequelle für ruhende Muskeln darstellen (Stryer et al. 2003) und die Muskeln von *Nereis virens* zu etwa 25% (Trockengewicht) aus Lipiden bestehen (vorrangig Triacylglyceride, Phospholipide, Glycerylether und Sterole, Pocock et al. 1971), war das Auffinden des Lipoproteinrezeptors in diesem Gewebe unerwartet. Bei Insekten werden die Lipide durch eine membranassoziierte Lipoprotein-Lipase hydrolysiert und in Form von freien Fettsäuren in den Flugmuskel aufgenommen (Van Heusden et al. 1987, Van Heusden 1993, Canavoso et al. 2001), und auch die Gewebe von *Nereis virens* sollen eine hohe Lipase-Aktivität zeigen (Pocock et al. 1971). Bei Säugetieren findet sich ein ganz anderes System: Hier werden die Lipide im Fettgewebe hydrolysiert und in Form von freien Fettsäuren an Serumalbumine (z. B. BSA) gebunden transportiert und die Fettsäuren von den Zellen direkt aufgenommen (Elliott und Elliott 1997, Stryer et al. 2003, Christen und Jaussi 2004). Es scheint sich also im Falle des *Nereis*-Lipoprotein-Lipoproteinrezeptor-Systems um eine bislang nicht bekannte Form der Lipidbereitstellung für Muskeln zu handeln. Interessant ist dabei der Aspekt, dass es sich offensichtlich um eine Vorstufe der beiden oben beschriebenen Wege zu handeln scheint: Bei den Vertebraten werden die Lipoproteine nur noch dazu benutzt, die Nahrungslipide zu den Speichergeweben zu transportieren, während der Transport der mobilisierten Lipide (freie Fettsäuren) über die Albumine geschieht. Bei den Insekten werden die Lipophorine sowohl für den Transport zum Speicher als auch für den Transport vom Speicher zum Muskel herangezogen, geben jedoch ihre Fracht ohne Internalisierung ab (Stryer et al. 2003, Rodenburg und van der Horst 2005). Beim Polychaeten *Nereis virens* wiederum werden die Lipoproteine offensichtlich sowohl beim Transport zum Speicherorgan als auch beim Transport zum Muskel benutzt und internalisiert.

### 2.2.2 BINDUNGSEIGENSCHAFTEN

Wie bereits erwähnt (siehe Ergebnisse 2.2.2) benötigt der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor zum Binden des Liganden sowohl  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen als auch das Vorhandensein von Disulfidbrücken; Faktoren, die typische Charakteristika der Mitglieder der LDLR-Superfamilie sind (Schneider 1989, Ferez 1990, Tsuchida und Wells 1990, Brown et al. 1997, Lee et al. 2003a). Hieraus kann geschlossen werden, dass für die Bindung des Lipoproteins an den Rezeptor die gleichen Bedingungen gelten wie für die anderen beschriebenen Lipoproteinrezeptoren.

### 2.2.3 GLYCOSYLIERUNG

Die mit dem Lipoproteinrezeptor durchgeführten Lektin-Blots zeigten das Vorhandensein sowohl von N- als auch O-glycosidisch gebundenen Kohlenhydraten. Die bislang charakterisierten Mitglieder der LDLR-Superfamilie sind ebenfalls Glycoproteine, die sich durch die charakteristische O-Glycan-Domäne auszeichnen (Schneider 1989). Auch die Anwesenheit von N-Glycanen ist für den humanen LDL-Rezeptor gezeigt worden, er besitzt ein einzelnes N-Glycan (Cummings et al. 1983). Die auch zur LDLR-Superfamilie gehörenden Vitellogeninrezeptoren (Ferez 1990, Brown et al. 1997, Willnow 1999, Rodenburg et al. 2006) sind ebenfalls Glycoproteine, die bei *Locusta migratoria* zu ~54% und damit extrem hoch glycosyliert sind (Hafer und Ferez 1991). Studien über die genaue Funktion der Glycane an den Rezeptorproteinen existieren nicht. Da die bislang untersuchten Rezeptoren jedoch große Mengen an Sialinsäuren aufweisen (Cummings et al. 1983, Hafer und Ferez 1991), welche unter physiologischen Bedingungen negativ geladen sind, könnten die Glycane eine Rolle bei der Rezeptor-Ligand-Bindung besitzen, bei der vermutlich elektrostatische Wechselwirkungen eine Rolle spielen (Schneider 1989). So konnte z.B. für den Vitellogeninrezeptor der Wanderheuschrecke gezeigt werden, dass nach einer chemischen Modifikation der kationischen Aminosäuren Arginin und Lysin des Dotterproteins, d.h. nach einer elektrischen Neutralisation des Dotterproteins, keine Bindung an den Vitellogeninrezeptor mehr möglich war (Röhrkasten und Ferez 1992). Eine besondere Eigenschaft der an den *Nereis*-Lipoproteinrezeptor gebundenen Glycane scheint zu sein, dass die Kohlenhydrate nur im reduzierten Zustand im Lektin-Blot nachweisbar sind. Möglicherweise sind die Zuckerbäumchen im nativen (nicht-reduzierten) Molekül so angeordnet, dass sie für die Lektine nicht ‚erfassbar‘ sind. Dies könnte z.B. durch sterische Gegebenheiten aufgrund der vorhandenen Disulfidbrücken passieren. So wäre es denkbar, dass die Glycane nicht ‚abstehen‘ und so von den Lektinen nicht gebunden werden können. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Glycane im Innern des Moleküls liegen und erst durch die Reduktion der Disulfidbrücken an die Oberfläche treten. Aus diesem Befund ergibt sich jedoch die Frage nach der Funktion der Kohlenhydrate beim *Nereis*-Lipoproteinrezeptor: Wenn die Kohlenhydratketten nicht (oder nicht vollständig) zum wässrigen Medium hin exponiert sind, können sie nicht an der Bildung des Rezeptor-Ligand-Komplexes beteiligt sein. Ein ähnliches Phänomen ist vom humanen IgD beschrieben, bei dem eines von drei N-Glycanen zwischen

verschiedenen Proteindomänen ‚vergraben‘ liegt, und zwar in der Nähe der die beiden schweren Ketten verbindenden Disulfidbrücke. Diesem N-Glycan kommt jedoch eine besondere Rolle bei der Sekretion zu, was durch Punktmutationen gezeigt wurde. Die Entfernung dieses Glycans führte dazu, dass sich lediglich sogenannte Halbmoleküle bildeten, die im Endoplasmatischen Reticulum zurückgehalten wurden (Gala und Morrision 2002). Inwieweit diese Möglichkeit auch für den *Nereis*-Lipoproteinrezeptor besteht ist nicht bekannt. Eine Funktion in der Dimerisierung von Polypeptidketten kann jedoch ausgeschlossen werden, da der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor wie alle bislang beschriebenen Lipoproteinrezeptoren ein monomeres Membranprotein ist (siehe oben und Willnow 1999).

### 3 AUFNAHMESTUDIEN

#### 3.1 AUFNAHME DES *NEREIS*-LIPOPROTEINS IN EIZELLEN VERSCHIEDENER GRÖÖE

Die Inkubation von isolierten *Platynereis*-Oocyten mit DiI- oder FITC-markiertem *Nereis*-Lipoprotein zeigte eindeutig die Aufnahme des Lipoproteins in die Zellen. Dabei ließ sich deutlich zwischen großen (Durchmesser  $\sim 160 \mu\text{m}$ ) und kleinen (Durchmesser  $\sim 100 \mu\text{m}$ ) Eizellen unterscheiden. Während sich in den kleinen *Platynereis*-Oocyten das markierte *Nereis*-Lipoprotein sowohl in endocytotischen Vesikeln als auch in Dottergranula nachweisen ließ, konnte das Protein bei großen Eizellen fast ausschließlich in endocytotischen Vesikeln gefunden werden (siehe Abb. 35 B). Dies könnte auf regulatorische Prozesse bei der Eizellreifung zurück zu führen sein. Da Eizellen mit einem Durchmesser von  $>160 \mu\text{m}$  laichreif sind (Fischer und Dorresteyn 2004), erscheint es un schlüssig, dass Zellen in diesem Stadium noch Endocytose betreiben. Dass das *Nereis*-Lipoprotein trotzdem noch aufgenommen wird, könnte mit restlichen noch auf der Zelloberfläche vorhanden Lipoproteinrezeptoren erklärt werden. Die Tatsache, dass die endocytotierten Lipoproteine nicht mehr in die Dottergranula eingelagert werden könnte daran liegen, dass die für die Membranfusion benötigten Proteine (z.B. v-SNARE oder t-SNARE, Christen und Jaussi 2004) nicht mehr vorhanden sind bzw. die Zellen an GTP verarmt sind, welches ebenfalls für die Vesikelfusion benötigt wird (Christen und Jaussi 2004).

Die Fusion der Lipoprotein-enthaltenden endocytotischen Vesikel mit den Dotterprotein- (Vitellin-) enthaltenden Dottergranula bei den kleineren Eizellen erscheint schlüssig. So stellen geschlechtsunabhängige Lipoproteine oder zumindest deren Lipide bei Insekten fundamentale Bestandteile des Eidotters dar (Kawooya et al. 1988, Sun et al. 2000, Fan et al. 2002, Atella et al. 2006, Ziegler und van Antwerpen 2006). Aber auch bei anderen Arthropoden stellen nicht nur die eigentlichen Dotterproteine (Vitellogenine) die Dottermasse dar. Bei der Garnele *P. semisulcatus* scheinen ebenfalls die geschlechtsunabhängigen Lp1 ( $\beta$ GBP/HDL) für den Lipidtransport zu den Ovarien zuständig zu sein (Ravid et al. 1999). Bei den Wirbeltieren sind zumindest in Hühner-Ovarien LDL-Rezeptoren beschrieben worden (Hayashi et al. 1989, Steyrer et al. 1990), was für eine Aufnahme der LDL in die Oocyten spricht.

Das häufige Auftreten der charakteristischen Kappenstruktur bei der Inkubation von Eizellen mittlerer Größe scheint einen gerade stattfindenden Fusionsprozess zwischen dem Lipoprotein-enthaltenden Endosom und dem aufnehmenden Dottergranulum zu zeigen. Das im Vergleich zu den kleinen *Platynereis*-Oocyten (<110 µm) vermehrte Auftreten dieser Struktur bei Eizellen dieser Größe (~115 µm) könnte seine Ursache in der Tatsache haben, dass die kleinen *Platynereis*-Oocyten sich noch nicht in der für die Oocyten der Nereiden charakteristischen schnellen Wachstumsphase befinden (Fischer 1984, Fischer und Hoeger 1993). Deshalb befüllen sie zunächst die wenigen bestehenden (zum Zeitpunkt der Analyse bereits fluoreszierenden) Dottergranula, während die ‚mittelgroßen‘ Eizellen, die sich in der schnellen Wachstumsphase befinden, beginnen, neue Dottergranula zu bilden, bzw. wesentlich mehr Dottergranula per se besitzen.

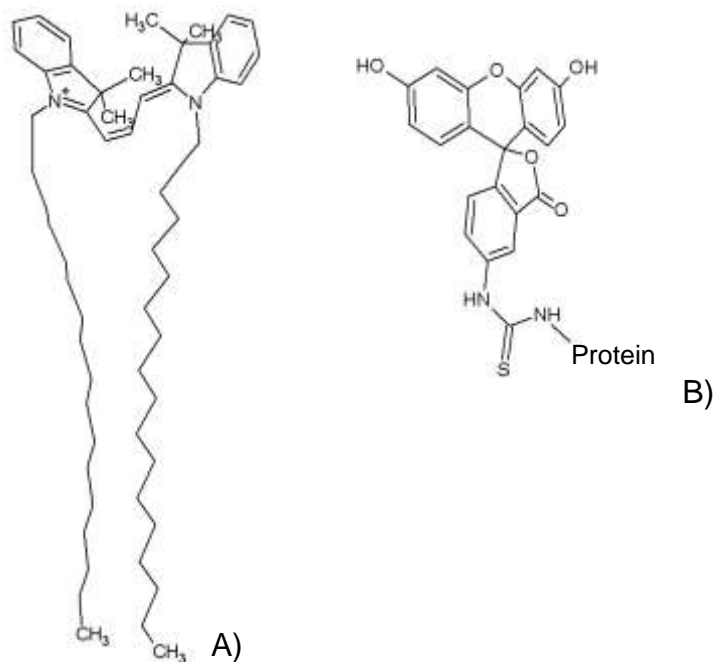
Die Hauptfunktion der Lipoproteineinlagerung in die Oocyten könnte in ihrem hohen Lipidgehalt begründet liegen. So ist bekannt, dass *Nereis*-Oocyten im Verlauf der Geschlechtsreifung große Mengen an Lipid aufnehmen (Fischer und Hoeger 1993). Da die eigentlichen Dotterproteine nur geringe Lipidtransportkapazitäten aufweisen, bei *Perinereis cultifera* etwa 16% (Baert et al. 1984), könnten die geschlechtsunabhängigen Lipoproteine die Hauptlast der Lipidversorgung der Oocyten übernehmen. Auch bei Insekten und Crustaceen stellen die Lipoproteine und nicht die Vitellogenine die Hauptlipidlieferanten für die Eizellen dar (Kawooya et al. 1988, Ravid et al. 1999, Ziegler und van Antwerpen 2006, Ximenes et al. 2008).

### 3.1.1 DIE AUFNAHME VON DiI- UND FITC-LIPOPROTEIN IM VERGLEICH

Wurden die Oocyten für drei Stunden mit durch den Lipidfarbstoff DiI markiertem *Nereis*-Lipoprotein inkubiert (Pulse), gewaschen und für weitere 19 Stunden inkubiert (Chase), so konnte eindeutig die Aufnahme des Proteins in die Oocyten beobachtet werden. Wurden die Zellen jedoch mit FITC-markiertem *Nereis*-Lipoprotein inkubiert, so zeigte sich nach einem dreistündigen Pulse und einem 19-stündigem Chase nur eine geringe Aufnahme in die Eizellen.

Dieser auf den ersten Blick widersprüchliche Befund kann mit der unterschiedlichen Art der Markierung erklärt werden. Wie bereits erwähnt (Material und Methoden 4.15.2) ist DiI ein Fluorophor, der sich mit seinen Acylresten in die Lipidmatrix einlagert, wohingegen FITC ein aminreaktiver Fluorophor ist der kovalent an Arginin- und Lysinreste sowie den N-Terminus bindet (Abb. 50, nächste Seite). Durch die Bindung der

Isothiocyanatgruppe - R-N=C=S - an die NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-Gruppe des Lysins sowie des N-Terminus bzw. an die NH<sub>2</sub><sup>+</sup>-Gruppe des Arginins werden deren positive Ladungen neutralisiert. Dadurch könnte die Bildung des Lipoprotein-Lipoproteinrezeptor-Komplexes beeinträchtigt werden. Die Relevanz von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den stark negativ geladenen Lipoproteinrezeptoren (*Locusta*-Vitellogeninrezeptor pI = 3,4, humaner LDL-Rezeptor pI = 4,6, Schneider et al. 1982, Hafer und Ferenz 1991) wird für den humanen LDL-Rezeptor angenommen (Schneider 1989) und konnte für den *Locusta*-Vitellogeninrezeptor experimentell gezeigt werden (Röhrkasten und Ferenz 1992). Da Lipoproteinrezeptoren und auch Lipoproteine hoch-konserviert sind (Babin et al. 1999, Willnow et al. 1999, Smolenaars et al. 2007b), ist es höchst wahrscheinlich, dass dies auch für das hier untersuchte System zutrifft.



**Abb. 50:** Struktur der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe. A) DiI. Die beiden Acylreste (C<sub>18</sub>) dringen in die Phospholipidschicht des Lipoproteins ein, während das modifizierte doppelte Indol-Ringsystem zwischen den polaren Kopfgruppen der Phospholipide liegt. Nach <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/Product-Structures.-00282.html>. B) FITC-Proteinkonjugat. Modifiziert nach [www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/F1628](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIAL/F1628).

### 3.1.2 LOKALISATION DER LIPOPROTEIN-LIPIDE UND DER APOLIPOPROTEINE NACH DER AUFNAHME IN DIE ZELLEN

Da die Oocyten sehr lipidreich sind (Fischer und Hoeger 1993), ist anzunehmen, dass der Großteil der Lipide entweder durch das Lipoprotein oder aber durch Autosynthese (Taki und Dhainaut 1988a) bereitgestellt wird.

Um das Schicksal der Lipoproteinkomponenten, Lipid und Protein, zu untersuchen, wurden mit den Eizellen Doppelinkubationsversuche durchgeführt. Dafür wurden die Eizellen mit jeweils 50 µg/ml FITC-markiertem und DiI-markiertem Lipoprotein für 20 Stunden inkubiert. Wurden die Zellen anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, zeigte sich, dass sowohl die FITC- (Protein-), als auch die DiI- (Lipid-) Fluoreszenz ausschließlich in den Dottergranula zu finden war (Abb. 38 & 39), was bedeutet, dass die Lipoprotein-Lipide, oder zumindest der Fluorophor DiI, (zunächst) nicht direkt in den Lipidtropfen eingelagert werden. Dieser Befund würde für eine Autosynthese der in den Lipidtropfen enthaltenden Triacylglyceride sprechen. Trotzdem ist eine Bereitstellung der Lipide, oder zumindest der Fettsäuren, durch das Lipoprotein nicht von der Hand zu weisen. Zwar konnten Taki und Dhainaut (1988a) zeigen, dass in Kultur genommene Oocyten von *Nereis diversicolor* aus <sup>14</sup>C-markiertem Acetat <sup>14</sup>C-markierte Triacylglyceride herstellen, inwieweit dieser Biosyntheseweg *in vivo* besritten wird ist jedoch nicht bekannt. Neuere Befunde aus unserem Labor weisen zudem darauf hin, dass *Platynereis*-Oocyten in der Lage sind, aus ihnen angebotenen (fluoreszenzmarkierten) Fettsäuren Phospholipide zu synthetisieren (U. Hoeger, persönliche Mitteilung). Dieser Befund gibt Anlass zu der Annahme, dass die Oocyten ebenso in der Lage sind, aus den Fettsäuren der Lipoprotein-Lipide Triacylglyceride zu synthetisieren. Ein analoger Vorgang findet sich bei den Insekten, bei denen die Lipophorine Diacylglyceride zum Fettkörper transportieren, in welchem diese dann als Triglyceride gespeichert werden (Rodenburg und van der Horst 2005). Auch für die Versorgung der Oocyten ist dieser Weg, die Umesterung von Diacylglyceriden in Triacylglyceride, bei den Insekten beschrieben (Kawooya und Law 1988, Ziegler und van Antwerpen 2006); ebenso wie bei der Garnele *P. semisulcatus* (Ravid et al. 1999). Bei der Interpretation der Ergebnisse darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei dem hier verwendeten Lipidfarbstoff DiI um einen amphiphilen Fluorophor handelt, der sich in die Phospholipidschicht und nicht in die Neutrallipid-Phase der Lipoproteine integriert.



Das heißt, dass DiI streng genommen nur die Phospholipide des *Nereis*-Lipoproteins markiert und somit auch nur über deren Verbleib eine Aussage getroffen werden kann. Um die Frage nach der Herkunft der Lipidtröpfchen-Lipide abschließend zu klären, müsste man das *Nereis*-Lipoprotein mit einem Neutrallipidmarker markieren und dessen Verbleib untersuchen.

### 3.2 SPERMATOGONIEN UND ELAEOCYTEN

Wie in den Oocyten sind auch in den männlichen Keimzellen und den Elaeocyten große Mengen an Lipid gespeichert (Fischer und Hoeger 1993, Hoeger et al. 1999). Da aus diesen Zellen der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor isoliert werden konnte (siehe Ergebnisse 2.2.1 und Abb. 31), sollte untersucht werden, inwieweit diese Zelltypen in der Lage sind fluoreszenzmarkiertes Lipoprotein *in vitro* aufzunehmen. Die Inkubationen zeigten eindeutig die Aufnahme der markierten Lipoproteine in beide Zelltypen.

Wurden Elaeocyten mit FITC-markiertem *Nereis*-Lipoprotein inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert, zeigte sich, wie auch bei den Oocyten, dass die Lipoproteine nicht mit den Lipidtröpfchen assoziiert waren. Dies lässt auch hier darauf schließen, dass die Lipide dieser Fetttröpfchen (Fischer und Hoeger 1993, Hoeger et al. 1996) nicht direkt aus dem Lipoprotein stammen; aber auch hier ist die Möglichkeit einer Umesterung der Fettsäuren der Phospholipide oder der Neutrallipide gegeben. Da die Elaeocyten im Zuge der Geschlechtsreifung zumindest bei Weibchen durch ihre Vitellogeninsekretion größere Mengen Lipide exportieren und im Verlauf der Reifung die Aktivität einer langkettigen Carboxylesterase ansteigt (Hoeger 1991), könnten die Elaeocyten zumindest bei Weibchen als primärer Lipidspeicher betrachtet werden. Es wäre möglich, dass die Elaeocyten das Lipoprotein aus der Coelomflüssigkeit aufnehmen, die Triacylglyceride einlagern und zusätzlich die Fettsäuren der Phospholipide sowie der Mono- und Diacylglyceride in Triacylglyceride umestern. Im Laufe der weiteren Geschlechtsreifung werden diese dann wieder, durch die katalytische Aktivität der erwähnten Carboxylesterase zu Mono- und Diacylglyceriden hydrolysiert und durch das Lipoprotein exportiert (Fontaine et al. 1984, Fischer und Hoeger 1993). Einen ähnlichen Weg findet man im Fettkörper der Insekten bei seiner Be- und Entladung durch die Lipophorine (Rodenburg und van der Horst 2005).

Auch bei den in Kultur genommenen späten Spermatogonien konnte die Aufnahme des Lipoproteins demonstriert werden. Im Vergleich mit den Elaeocyten (und auch den

Oocyten) zeigte sich jedoch, dass eine doppelt so hohe Konzentration (50 µg/ml im Vergleich zu 25 µg/ml) für eine nachweisbare Aufnahme nötig war. Auch fiel auf, dass nicht alle Spermatogonien die markierten Lipoproteine aufgenommen hatten. Dies lässt den Schluss zu, dass die Aufnahme von Lipoproteinen in die männlichen Keimzellen ein vom Entwicklungsstadium der Zellen abhängiger Prozess ist. Spermatogonien proliferieren sehr stark und erzeugen eine große Menge an Biomasse (Hoeger et al. 1996), wofür entsprechend Energie benötigt wird. Es liegt nahe zu postulieren, dass die Spermatogonien bis zu einem bestimmten Entwicklungsstadium Lipoproteine akkumulieren und dann anfangen, sich in die sogenannten Spermatocyten weiter zu differenzieren. Diese differenzieren sich wiederum, womöglich nach erneuter Aufnahme von Lipoproteinen, in die Tetraden, welche sich dann zu je 4 Spermien weiterentwickeln (Hoeger et al. 1996). Zwar konnte die Lipoprotein-Aufnahme nicht für alle nachfolgenden Stadien in der männlichen Keimzellentwicklung gezeigt werden, jedoch gibt es hierfür Indizien. So konnte durch die Inkubation von Tetraden gezeigt werden, dass diese ebenfalls befähigt sind, fluoreszenzmarkierte Lipoproteine aufzunehmen (Abb. 42). Die aufgenommenen Proteine waren vorrangig in der Nähe der Mitochondrien lokalisiert, was durch die gut erkennbare kappenartige Struktur in diesem Bereich deutlich wurde. Diese Lokalisation spricht eher für eine Funktion in der Energieversorgung als für eine bei Bereitstellung von Lipiden für die Membranbiosynthese. Die in den Mitochondrien durch  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren gewonnene Energie könnte entweder zur letzten mitotischen Teilung benötigt werden, oder aber zum Geißelantrieb der Spermien. Befunde bei den Spermien der Echinodermaten *Anthocidaris crassispira*, *Echinometra mathaei* und *Pseudocentrotus depressus* scheinen diese Hypothese zu bestätigen. So zeigten ultrastrukturelle Untersuchungen bei diesen Arten eine Lokalisation der Lipidkörper in der Nähe der Mitochondrien (Mita und Nakamura 1993).

#### 4 NACHWEIS DES *NEREIS*-LIPOPROTEINS IN VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN

Nur aus dem Cytosol von Spermatogonien und Oocyten konnten nach Dichtegradienten-Ultrazentrifugation distinkte Lipoproteinbanden gewonnen werden. Bei den ebenfalls untersuchten Elaeocyten hingegen konnte außer einer mutmaßlichen Hämoglobin-Bande keine Fraktion gewonnen werden.

Wurden die aus Spermatogonien und Oocyten gewonnenen Lipoproteinfraktionen per SDS-PAGE und Western-Blot genauer analysiert, so zeigte sich, dass ein eindeutiger Nachweis des Lipoproteins schwer möglich war. Es konnte zwar sowohl in den Fraktionen SpgLp 1 und SpgLp 2 die charakteristische Bande von ApoNvLp I entdeckt werden, jedoch waren auch sehr viele Abbauprodukte zu erkennen. Dies könnte auf die schon beginnende Hydrolyse der Apolipoproteine zurückzuführen sein, oder aber, im Fall des Western-Blots, auf eine Unspezifität des verwendeten  $\alpha$ -*Nereis*-Lipoprotein-Antikörpers. Für Ersteres spricht die Tatsache, dass Apolipoproteine im Allgemeinen sehr hydrophobe, in der Regel in wässrigen Lösungen unlösliche Proteine darstellen (Kawooya et al. 1989, Chan 1992, Segrest et al. 2001). So ist es möglich, dass die intrazelluläre Degradation schon begonnen hat, aber die Apolipoproteinfragmente aufgrund ihrer Hydrophobizität noch mit ‚ihrem‘ Lipid assoziiert sind und sie sich deswegen im Dichtegradienten isolieren lassen, der ja einzig und allein nach der Schwebdichte der Proteine trennt (Winter und Noll 1998). Darüber, inwieweit diese Vermutung richtig ist, kann nur spekuliert werden, da die nativen *Nereis*-Apolipoproteine sehr resistent gegen proteolytische Degradation zumindest durch die Proteasen Trypsin und V8 sind (siehe Ergebnisse 1.7.4). In welchem Maße die Apoproteine anderen Proteasen zugänglich sind ist nicht bekannt. Zwar wurde gefunden, dass die *Nereis*-Apolipoproteine von Bromelain auch im nativen Zustand nahezu vollständig abgebaut werden (Daten nicht gezeigt), jedoch ist die physiologische Relevanz fragwürdig, da die Cysteinprotease Bromelain pflanzlichen Ursprungs ist. Für das humane Apolipoprotein B konnte jedoch der Abbau durch Cathepsine, die zum Großteil Cysteinproteasen darstellen, gezeigt werden (Van der Westhuyzen et al. 1980, Linke et al. 2006). In der Studie von van der Westhuyzen und Mitarbeitern (1980) zeigte sich auch, dass die mit Cathepsinen behandelten Apolipoproteine nach dem Verdau noch mit Lipid assoziiert waren. Inwieweit Cathepsine in den Lysosomen der Spermatogonien für die Proteindegredation verantwortlich sind, ist jedoch nicht bekannt.

In der aus dem Cytosol der Oocyten gewonnenen mutmaßlichen Lipoproteinfraktion konnten im Gegensatz zu den beiden aus den Spermatogonien isolierten Fraktionen im SDS-Gel anhand des Bandenmusters nur Abbauprodukte nachgewiesen werden (vgl. Abb. 44). Im entsprechenden Western-Blot hingegen zeigte sich, dass lediglich zwei Peptide mit Massen um 100 kDa mit dem  $\alpha$ -*Nereis*-Lipoprotein-Antikörper reagierten (Abb. 45), was auf eine nahezu vollständige Degradation des *Nereis*-Lipoproteins in den analysierten Oocyten schließen lässt. Die Dichte der aus Spermatogonien isolierten Lipoproteine (SpgLp 1 und 2) - die Lipoproteindichte aus der Oocytenfraktion wurde nicht bestimmt - betrug in Iodixanol  $1,064 \pm 0,003$  g/ml für SpgLp 1, bzw.  $1,129 \pm 0,003$  g/ml für SpgLp 2, und ist somit vergleichbar mit der Dichte der aus der Coelomflüssigkeit isolierten Lipoproteine, welche in Iodixanol Dichten von  $1,069 \pm 0,014$  g/ml besitzen (siehe Ergebnisse 1.3, Schenk et al. 2006). Dies lässt darauf schließen, dass SpgLp 1 eine (noch) nicht prozessierte Lipoproteinfraktion in den Spermatogonien darstellt, während SpgLp 2 höchst wahrscheinlich eine lipidärmere Fraktion darstellt, deren Lipide schon in die Lipidtröpfchen der Spermatogonien überführt wurden.

Um die Identität der isolierten Fraktionen mit dem *Nereis*-Lipoprotein der Coelomflüssigkeit abzusichern, wurde die Fraktion SpgLp 1 elektronenmikroskopisch analysiert. Es zeigte sich, dass die aus dem Cytosol der Spermatogonien isolierten Proteine eine ähnliche ‚Morphologie‘ haben wie die Lipoproteine der Coelomflüssigkeit, was auf unprozessierte Lipoproteine schließen lässt. Auffällig ist, dass, obwohl bei den SpgLp 1 und den Lipoproteinen aus der Coelomflüssigkeit die gleichen Konzentrationen (0,2 mg/ml) eingesetzt wurden, bei den SpgLp 1 wesentlich weniger typische Lipoproteinpartikel entdeckt werden konnten. Auch war der Durchmesser mit 37,3 nm etwas kleiner als der der Lipoproteine aus der Coelomflüssigkeit (42,0 nm, Schenk et al. 2006). Beide Befunde könnten mit der bereits begonnenen Degradation der Lipoproteine in den Zellen erklärt werden.

Dieser augenscheinliche Unterschied im intrazellulären ‚Schicksal‘ des aufgenommenen Lipoproteins könnte mit den unterschiedlichen metabolischen Bedürfnissen der beiden Keimzelltypen zusammenhängen.

Die männlichen Keimzellen-Vorstufen erbringen eine hohe Biosyntheseleistung. Spermatogonien differenzieren sich zunächst unter intensiver Proliferation zu Spermatogonien II und wiederum zu Spermatocyten. Die Spermatocyten entwickeln sich dann zu

den sogenannten Tetraden und diese wiederum weiter zu je vier Spermien (Hoeger et al. 1996). Die durch die endocytotische Aufnahme des Lipoproteins in die Spermatogonien eingelagerten Lipide könnten als Ausgangssubstanzen für die bei der Zellteilung notwendige Membranbiosynthese verbraucht werden, oder aber sie dienen als Energielieferant. Für die erste Möglichkeit spricht die Tatsache, dass das *Nereis*-Lipoprotein sehr phospholipidreich ist (Ergebnisse 1.8, Schenk et al. 2006). Da Zellmembranen ihrerseits fast ausschließlich aus Phospholipiden bestehen (Stryer et al. 2003), könnten die transportierten Phospholipide direkt zum Aufbau neuer Membranstrukturen benutzt werden. Aber auch die erwähnte Rolle im Energiehaushalt für die sich teilenden Keimzellen ist nicht von der Hand zu weisen, da die Bewegung der Mikrotubuli zur Tochterchromosomentrennung in der Mitose ein energieabhängiger, genauer gesagt ein GTP-abhängiger Prozess ist (Lewin 2002, Stryer et al. 2003). Auch könnten die Lipide zumindest zum Teil in den Keimzellvorstufen eingelagert werden, um so den Spermien später als Energielieferant für den Geißelantrieb zu dienen. Es ist also ebenso anzunehmen, dass die Lipide, und vor allem die Phospholipide, zur Energiebereitstellung dienen. Welchen physiologischen Prozessen (Zellteilung oder Zellmotilität) diese Energie dient, darüber kann bislang nur spekuliert werden. Da bei Seeigel-Spermien die Energieversorgung durch Phospholipide demonstriert wurde (Mita und Nakamura 1993) scheint dieser Weg der Energiebereitstellung in der Evolution zumindest schon einmal beschritten worden zu sein.

Die Eizelle hingegen stellt in erster Linie Nährstoffe für den sich nach der Befruchtung entwickelnden Embryo zur Verfügung. Diese Nährstoffe bestehen aus Kohlenhydraten, Lipiden und hauptsächlich aus Dotterprotein, welches dem Embryo als Aminosäurequelle dient (Dhainaut et al. 1984, García-Alonso et al. 2006). In diesem Zusammenhang könnten die Apolipoproteine ebenfalls als Aminosäurequelle dienen. Eine weitere mögliche Erklärung für das unterschiedliche ‚Schicksal‘ der Apoproteine könnte der unterschiedliche Reifegrad der betrachteten Keimzellen darstellen. Die untersuchten *Nereis*-Oocyten hatten einen Durchmesser von  $\sim 170 \mu\text{m}$  und waren somit fast laichreif und in ihrer Entwicklung weitgehend abgeschlossen (Fischer und Hoeger 1993). Die Spermatogonien im Stadium II hingegen befinden sich noch in der Entwicklung. In diesem Stadium proliferieren sie zwar nicht mehr so stark wie zu Beginn ihrer Entwicklung, da die benötigte Biomasse im Wesentlichen bereits erzeugt ist. Die

nachfolgende Weiterdifferenzierung in die Spermien ist jedoch noch im vollen Gang (Hoeger et al. 1996). Es könnte also sein, dass die zur Untersuchung herangezogenen männlichen Keimzellen die Lipoproteine über einen noch nicht ausreichenden Zeitraum aufgenommen haben, um sie danach in dem Maße zu degradieren, wie dies bei den Oocyten der Fall ist. Alternativ könnten die Spermatogonien (und die ihnen nachfolgenden Stadien) kontinuierlich Lipoproteine aus der Coelomflüssigkeit aufnehmen um für die Zellteilungen beziehungsweise den Geißelantrieb der Spermien die nötigen Energievorräte zur Verfügung zu haben (siehe dazu auch 3.2).

## 5 FAZIT UND AUSBLICK

### 5.1 FAZIT

Nachdem das discoidale Lipoprotein aus *Nereis virens* bereits früher isoliert und teilweise charakterisiert wurde (Schenk 2003, Schenk et al. 2006), konnten in dieser Arbeit weitere physiko-chemische Charakteristika dieses Lipoproteins ermittelt werden. Das Lipoprotein wurde zunächst auch in KBr als HDL-Partikel klassifiziert, nachdem dies bislang nur in Iodixanol geschehen war (Schenk et al. 2006). Durch Analytische Ultrazentrifugation wurde die molekulare Masse des nativen Proteins auf ~857 kDa bestimmt, während die Massenbestimmung mittels Gelfiltration ~793 kDa ergab (siehe Ergebnisse 1.4.1 und 1.4.2). Weitere Experimente ergaben, dass das Protein einen Sedimentationskoeffizienten von 9,7 S besitzt und so im Bereich der Insekten-Lipophorine liegt, die Sedimentationskoeffizienten von 7,5-8,7 S aufweisen (Pattnaik et al. 1979, Gellissen und Emmerich 1980). Auch die Verteilung der Sekundärstrukturanteile entspricht denen der bislang charakterisierten Invertebraten-Lipoproteine: es überwiegen  $\beta$ -Strukturen und sie ist als typisch für die ‚nicht-austauschbaren Apolipoproteine‘ zu beschreiben (Kawooya et al. 1989, Ryan et al. 1992, Vargas-Requena et al. 2002, Stieb 2007). Der Grad an Proteinglycosylierung zeigte den für Wirbellose typisch niedrigen Wert (0,66%), und auch der Lipidgehalt von ~50% liegt im für Wirbellose typischen Bereich (Pattnaik et al. 1979, Kunkel und Nordin 1985, Stieb et al. 2008). Durch seine Apolipoprotein-Stöchiometrie (1:1) und deren Lage im nativen Partikel (ApoNvLp I peripher und ApoNvLp II innerhalb der Lipidmatrix) kann es als typisches Mitglied der Lipophorine charakterisiert werden (Shapiro et al. 1984, Haunerland und Bowers 1987, Weers et al. 1993). Die Lipidzusammensetzung hingegen ist eher typisch für Vitellogenine (Lee und Puppione 1988, Lubzens et al. 1997, Kubagawa et al. 2006), wodurch es ein Bindeglied zwischen den als Vorläufer der geschlechtsunabhängigen Lipoproteine geltenden Vitellogeninen auf der Einen und den Lipophorinen auf der anderen Seite angesehen werden könnte (Mann et al. 1999, Avarre et al. 2007, Smolenaars et al. 2007b).

Da für extrazelluläre Transportproteine, wie es das *Nereis*-Lipoprotein darstellt, zelluläre Rezeptoren zu postulieren sind, wurde versucht, diese aus putativen Ziel-/Synthesegewebe zu isolieren. Der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor konnte mit seiner Masse von ~114 kDa, wegen seiner funktionalen Abhängigkeit von Disulfidbrücken und der Anwesenheit

von  $\text{Ca}^{2+}$  als typisches Mitglied der LDL-Rezeptor-Superfamilie identifiziert werden (Schneider et al. 1982, Röhrkasten und Ferenz 1986a, Schneider 1989, Tsuchida und Wells 1990, Lee et al. 2003b), auch wenn zur eindeutigen Einordnung noch weitere Studien nötig sind, z.B. eine Sequenzanalyse. Es zeigte sich, dass das Rezeptorprotein in den unterschiedlichsten Zellen und Geweben zu finden war (siehe Ergebnisse 2.2.1), neben dem Darmepithel und den Muskeln waren dies auch die Spermatogonien, die Oocyten und die Elaeocyten. Da letztere Zelltypen direkt mit der Geschlechtsreifung der Tiere assoziiert sind, wurde die Hypothese untermauert, dass das *Nereis*-Lipoprotein eine Rolle in der Geschlechtsreifung der Tiere spielt. Um die physiologische Relevanz des Rezeptors zu testen, wurden isolierte Coelomzellen mit fluoreszenzmarkierten Lipoproteinen *in vitro* inkubiert. Das Hauptaugenmerk bei diesen Versuchen lag auf den Oocyten, da diese im Zuge ihrer Entwicklung große Mengen an Lipid akkumulieren (Fischer und Hoeger 1993). Die Versorgung mit Lipid ausschließlich durch das weibchenspezifische Lipoprotein Vitellogenin erscheint unwahrscheinlich, da es einen relativ niedrigen Titer (0,1-0,6 mg/ml, Fischer und Hoeger 1993) aufweist und nur über eine relativ niedrige Lipidbindekazapazität (16% für das *Perinereis*-Vitelin, Baert et al. 1984) verfügt. Außerdem wurde auch schon für andere Invertebraten die Rolle der geschlechtsunabhängigen Lipoproteine für die Versorgung der Eizellen demonstriert (Kawooya et al. 1988, Ravid et al. 1999, Sun et al. 2000, Fan et al. 2002). Die Inkubationsversuche zeigten eine eindeutige Aufnahme des Lipoproteins in die Eizellen. Dabei konnte klar zwischen Eizellen verschiedener Größe unterschieden werden (Abb. 35). Während kleine Eizellen (Durchmesser  $<110 \mu\text{m}$ ) Fluoreszenzmarkierungen sowohl in endocytotischen Granula, als auch in Dottergranula aufwiesen, konnten bei ‚reifen‘ Eizellen (Durchmesser  $>150 \mu\text{m}$ ) Fluoreszenzmarkierungen nur noch in den Endocytose-Vesikeln erkannt werden, was für eine Reduktion des für die Vesikelfusion benötigten Proteinapparates spricht. Der interessanteste Befund konnte bei Eizellen mittlerer Größe gemacht werden: Es konnte direkt gezeigt werden, dass die das Lipoprotein enthaltenden endocytotischen Vesikel mit den Dottergranula fusionieren (Abb. 39). Dies ist ein Beweis für die Hypothese, dass Lipoproteine nicht nur mit ihren Lipiden zum Eidotter beitragen, sondern auch mit den sie konstituierenden Apolipoproteinen. Da bei keiner der Inkubationsstudien eine Markierung der intrazellulären Lipidtröpfchen ausgemacht werden konnte, ist auszuschließen, dass die Lipoprotein-Lipide direkt in die Lipidtröpfchen eingelagert werden.



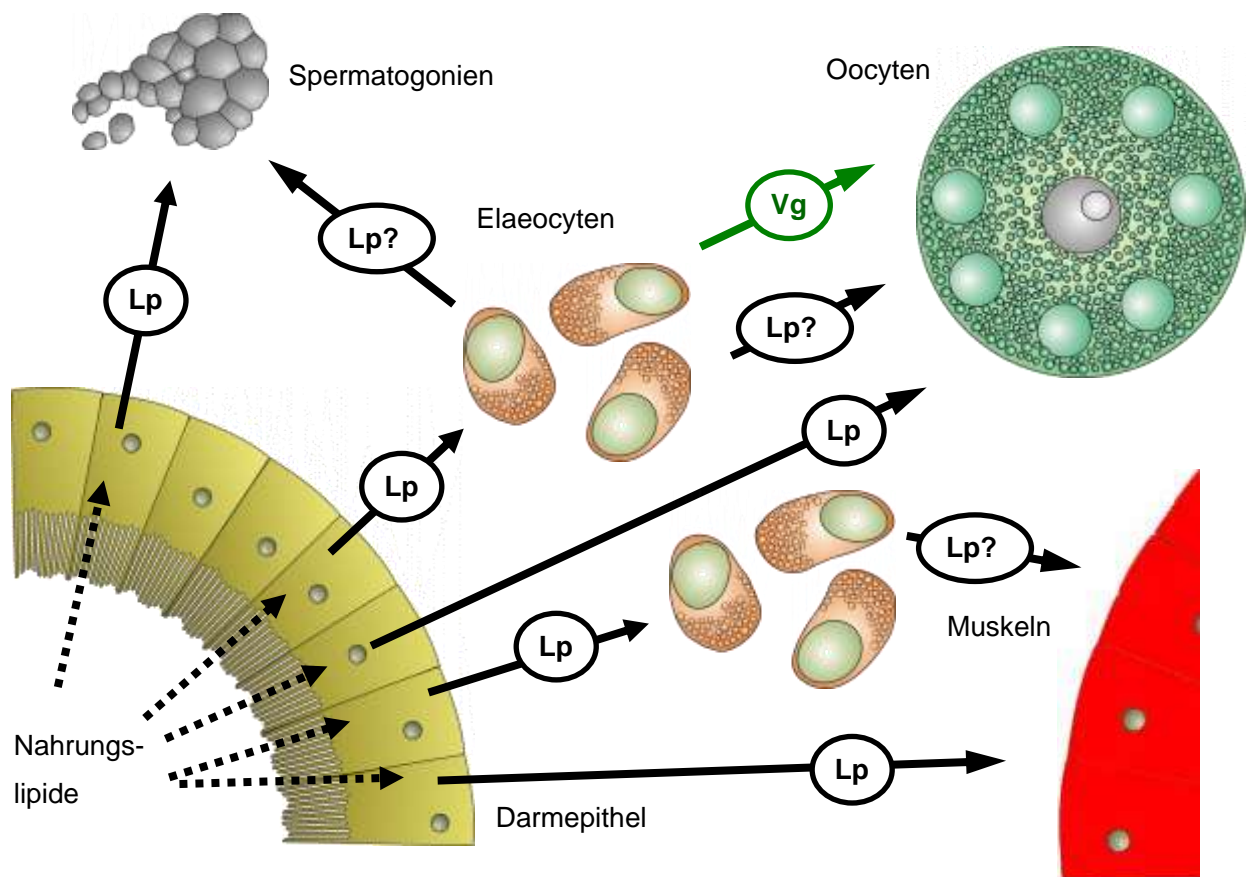
Es scheint vielmehr so zu sein, dass die Fettsäuren der Lipoprotein-Lipide durch eine intrazelluläre Lipase in freie Fettsäuren überführt werden und anschließend im Lipidtropfen zu Triacylglyceriden umgeestert werden. Für die Versorgung von *Platynereis*-Oocyten scheint sich also die von Ziegler und van Antwerpen (2006) postulierte Hypothese für die Lipidversorgung von Insekten-Eizellen zu bestätigen.

Durch die Tatsache, dass das *Nereis*-Lipoprotein nicht nur von Oocyten aufgenommen wird, sondern auch von männlichen Keimzellen (Spermatogonien und Tetraden) und von den, ebenfalls mit der Geschlechtsreifung assoziierten, Elaeocyten, ist eine Rolle des Lipoproteins in der sexuellen Reifung beider Geschlechter gezeigt.

Der Befund, dass das Lipoprotein nicht aus den es aufnehmenden Zellen (mit Ausnahme der Spermatogonien) isoliert werden konnte, spricht gegen den für Insekten-Eizellen beschriebenen Weg, bei dem die HDLp in die Oocyten aufgenommen werden, die Apolipoporphine jedoch nicht degradiert werden (Kawooya und Law 1988, Kawooya et al. 1988, Dantuma et al. 1997), sondern eher für einen den Vertebraten ähnlichen Weg, bei denen die Apolipoproteine nach der endocytotischen Aufnahme degradiert werden (Van der Westhuyzen et al. 1980, Stryer et al. 2003, Linke et al. 2006).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das *Nereis*-Lipoprotein vielfältige Zielgewebe hat, wobei die Rolle der Lipidversorgung von Gameten und Elaeocyten im Zuge der Geschlechtsreifung direkt nachgewiesen werden konnte. Abschließend lässt sich das in Abb. 51 (nächste Seite) dargestellte Bild des Lipoprotein-vermittelten Lipidtransportes in *Nereis virens* postulieren. In diesem stellt das *Nereis*-Lipoprotein den Hauptlipidlieferanten sowohl zu den männlichen Keimzellen, als auch zu den weiblichen dar. Weiterhin scheinen sich die Elaeocyten als zentrales Stoffwechselorgan, vor allem im Lipidstoffwechsel zu bestätigen. Zwar war bekannt, dass die Elaeocyten, die beim Eintritt der Tiere in die Geschlechtsreifung gebildet werden, eine zentrale Rolle einnehmen (Fischer und Hoeger 1993, Hoeger et al. 1996), jedoch war nicht bekannt, welche Rolle sie im Lipidstoffwechsel spielen, außer dass sie große Mengen an Lipid speichern, dieses im weiblichen Geschlecht über das Vitellogenin exportieren und somit die Eizellen versorgen (Fischer und Hoeger 1993, Hoeger et al. 1996, García-Alonso et al. 2006). Zwar konnte in dieser Arbeit nicht direkt gezeigt werden, dass die Elaeocyten das *Nereis*-Lipoprotein auch sezernieren, dies erscheint jedoch wahrscheinlich. Männliche Elaeocyten speichern die gleichen hohen Lipidvorräte wie die Elaeocyten aus weiblichen Tieren. Da diese Vorräte

im Zuge der Geschlechtsentwicklung abnehmen und Elaeocyten aus Männchen nicht die Möglichkeit besitzen die Lipide durch Vitellogenin zu exportieren, bleibt als plausibelste Erklärung der Export durch das *Nereis*-Lipoprotein. Dies wird zudem durch die Tatsache gestützt, dass auch die männlichen Keimzellen in der Lage sind das Lipoprotein aufzunehmen. Es scheint sich in dieser Arbeit also heraus zu kristallisieren, dass die Elaeocyten den zentralen Lipidspeicher- und Mobilisierungsort darstellen.



**Abb. 51:** Postuliertes Modell für den Lipidtransport in *Nereis virens*. Die Nahrungs-lipide werden bei der Passage des Darmepithels an das *Nereis*-Lipoprotein gebunden und entweder direkt zu den Zielgeweben transportiert, oder aber vorerst in den Elaeocyten als zentralem Stoffwechselorgan ‚zwischenlagert‘ und bei Bedarf zu den Zielgeweben transportiert. Abkürzungen: Lp: Lipoprotein. Vg: Vitellogenin. Verändert nach U. Hoeger.

## 5.2 AUSBLICK

Zwar wurde das *Nereis*-Lipoprotein in der vorliegenden Arbeit, bei Schenk et. al. (2006) und in der vorangegangenen Diplomarbeit (Schenk 2003) eingehend charakterisiert, jedoch sind viele weitere Fragen offen. So wäre noch die Frage zu klären, ob es sich bei dem *Nereis*-Lipoprotein tatsächlich um ein dem Apolipoprotein B verwandtes Protein handelt, und wie es evolutiv zu den auch bestens charakterisierten Lipophorinen steht.

Auch das Verwandtschaftsverhältnis zum kürzlich entdeckten discoidalen *Astacus leptodactylus*-HDL (Stieb et al. 2008) wäre in diesem Zusammenhang von Interesse. Die Möglichkeiten diese Fragestellungen zu bearbeiten sind vielfältig: Zum Einen gibt es den molekularbiologischen Ansatz, bei dem man versuchen würde, das *Nereis*-Lipoprotein, oder genauer die Apolipoproteine zu klonieren und zu sequenzieren. Dies ist allerdings mit solch großen Proteinen nicht trivial, zumal hierfür zunächst Sequenzen vorhanden sein müssen um geeignete Primer zu finden. Schneller zum Erfolg führen würde z.B. eine Sequenzierung durch Tandem-Massenspektrometrie (z.B. MALDI-ToF/ToF), die sehr präzise Informationen über die Sequenz liefert, welche dann über Datenbanken mit den schon bekannten Sequenzen der Insekten-Apolipoporphine und des Apolipoprotein B verglichen werden kann. Zwar können damit nur homologe Bereiche identifiziert werden (vgl. z.B. Stieb et al. 2008), jedoch lassen sich aus diesen Aminosäuresequenzen vielversprechende Informationen, auch im Hinblick auf den Entwurf von geeigneten Primern gewinnen. In diesem Zusammenhang stellt sich auch die Frage, inwieweit diese großen discoidalen Lipoproteine einen ‚Lipoprotein-Prototyp‘ darstellen, zumal auch das Lipophorin des ‚lebenden Fossils‘ *L. polyphemus* eine ähnliche Architektur besitzt (Schenk und Hoeger, unveröffentlicht). Erste Studien in unserem Labor führten zu verblüffenden Ergebnissen: So konnte gezeigt werden, dass das Lipophorin der Vogelspinne *E. californicum*, nicht jedoch das des phylogenetisch basaleren Kaiserskorpions *P. imperator*, ebenfalls ein solch großes discoidales Lipoprotein ist (Gras, Marksteiner, Hoeger und Schenk, unveröffentlicht).

Der *Nereis*-Lipoproteinrezeptor wurde in der vorliegenden Arbeit zwar erfolgreich aus mehreren Zellen und Geweben isoliert und ansatzweise biochemisch charakterisiert, es bleiben jedoch noch einige Fragen ungeklärt. So ist für eine sichere Einordnung des Proteins in die Familie der LDL-Rezeptoren eine Sequenzanalyse erforderlich. Damit könnte auch die Frage geklärt werden, ob es sich beim *Nereis*-Lipoproteinrezeptor um einen Vertreter der LDLR-Gruppe handelt oder, wie bei den Insekten, um einen aus der VLDLR-Gruppe. Aber auch bei der biochemischen Charakterisierung sind noch weitere Fragen zu klären. So ist z.B. die Dissoziationskonstante des Liganden-Rezeptor-Komplexes ein wichtiges biochemisches Charakteristikum für einen Rezeptor. Ebenso sind auch entwicklungspezifische Fragestellungen noch völlig ungeklärt. So wäre es z.B. denkbar, dass das Rezeptorprotein nur in bestimmten Phasen der Entwicklung exprimiert

wird, oder zu bestimmten Phasen stärker oder schwächer. Ein vielversprechendes Zielgewebe wären hier die männlichen Keimzellen, von denen gezeigt wurde, dass nicht alle Zellen das Lipoprotein aufnehmen.

Auch die Frage nach der Art des Lipidtransportes bei *Nereis virens* ist noch abschließend zu klären: liegt hier ein ‚reusable shuttle‘ vor oder wird der ‚Vertebraten-Weg‘ beschritten? Dazu wäre es wünschenswert die aufgenommenen Lipoproteine direkt in den hierfür in Frage kommenden Zellen (Elaecyten) nachzuweisen, wie dies hier für die Oocyten gezeigt wurde. Zwar legen die Western-Blots der Gewebsextrakte den ‚Vertebraten-Weg‘ (d.h. eine vollständige Degradation der Apolipoproteine nach der Aufnahme) nahe, doch ist ein Vorhandensein eines ‚shuttle-Systems‘ mit den vorliegenden Ergebnissen nicht auszuschließen.

## LITERATUR

- Abousalham A, Verger R (2000) Egg yolk lipoproteins as substrates for lipases. *Biochim. Biophys. Acta* 1485: 56-62
- Anderson DW, Nichols AV, Forte TM, Lindgren FT (1977) Particle distribution of human serum high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 493: 55-68
- Anumula KR, Du P (1999) Characterization of carbohydrates using highly fluorescent 2-aminobenzoic acid tag following gelelectrophoresis of glycoproteins. *Anal. Biochem.* 275: 236-242
- Arrese EL, Canavaso LE, Jouni ZE, Pennington JE, Tsuchida K, Wells MA (2001) Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 7-17
- Atella GC, Silva-Neto MAC, Goldone DM, Arefin S, Shahabuddin M (2006) *Anopheles gambiae* lipophorin: Characterization and role in lipid transport to developing oocyte. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 375-386
- Avarre J-C, Michelis R, Hall M, Söderhäll K, Khayat M, Tietz A, Lubzens E (2002) Lipid composition during sexual development of the noble crayfish *Astacus astacus* and effect of fungal infection. *Invert. Repr. Dev.* 41: 251-259
- Avarre J-C, Lubzens E, Babin PJ (2007) Apolipocrustacein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipophorin II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evol. Biol.* 7
- Babin PJ, Bogerd J, Kooiman FP, van Marrewijk WJA, van der Horst DJ (1999) Apolipophorin II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *J. Mol. Evol.* 49: 150-160
- Baert J-L, Sautiere P, Porchet M (1984) Purification and characterization of oocyte vitellin from *Perinereis cultrifera*. *Eur. J. Biochem.* 142: 527-532
- Barnes H, Blackstock J (1973) Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for "total" lipid analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12: 103-118
- Benson AA, Lee RF (1975) The role of wax in oceanic food chains. *Scient. Am.* 232: 77-86

- 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
- 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
- Brown MS, Herz J, Goldstein JL (1997) Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature* 388: 629-630
- Budavari S, O`Neil MJ, Smith A, Heckleman PE (eds.) (1989) *The Merck index*, 11<sup>th</sup> Ed., Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey
- Canavaso LE, Wells MA (2001) Role of lipid transfer particle in delivery of diacylglycerol from midgut to lipophorin in larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 783-790
- Canavaso 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
- Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE, Wells MA (2001) Fat metabolism in insects. *Ann. Rev. Nutr.* 21: 23-46
- Carraway M, Herscovitz H, Zannis V, Small DM (2000) Specificity of lipid incorporation is determined by sequences in the N-terminal 37% of apoB. *Biochemistry* 39: 9737-9745
- Chan L (1992) Apolipoprotein B, the major protein component of triglyceride-rich and low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 267: 25621-25624
- Chapman MJ (1980) Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *J. Lipid Res.* 21: 789-853
- Chatterton JE, Phillips ML, Curtiss LK, Mine RW, Marcel YL, Schumaker VN (1991) Mapping apolipoprotein B on the low density lipoprotein surface by immunoelectron microscopy. *J. Biol. Chem.* 266: 5955-5962
- Chino H, Murakami S, Harashima K (1969) Diglyceride-carrying lipoproteins in insect hemolymph. Isolation, purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 176: 1-26
- Chino H, Downer RGH, Wyatt GR, Gilbert LI (1981) Lipophorins, a major class of lipoproteins of insect hemolymph. *Insect Biochem.* 11: 491

- Christen P, Jaussi R (2004) Biochemie-Eine Einführung. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Christie WW, Urwin RA (1995) Separation of lipid classes from plant tissues by high performance liquid chromatography on chemically bonded stationary phases. J. High. Resol. Chromatogr. 18: 97-100
- Chung BH, Wilkinson T, Geer JC, Segrest JP (1980) Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. J. Lipid Res. 21: 284-291
- Chung KT, Ourth DD (2002) Purification and characterization of apolipoprotein III from immune hemolymph of *Heliothis virescens* pupae. Comp. Biochem. Physiol. B 132: 505-514
- Cummings RD, Kornfeld S, Schneider WJ, Hobgood KK, Tolleshaug H, Brown MS, Goldstein JL (1983) Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor. J. Biol. Chem. 258: 15261-15273
- Cunningham M, Pollero RJ, González A (1994) Lipid circulation in spiders. Transport of phospholipids, free fatty acids and triacylglycerols as the major lipid classes by a high density lipoprotein fraction isolated from the plasma of *Polybetes pythagoricus*. Comp. Biochem. Physiol. B 109: 333-338
- 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
- Dantuma NP, Pijnenburg MAP, Diederens JHB, van der Horst DJ (1997) Developmental down-regulation of receptor-mediated endocytosis of an insect lipoprotein. J. Lipid Res. 38: 254-265
- Das S, Rand RP (1984) Diacylglycerol causes major structural transitions in phospholipid bilayer membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 124: 491-496
- Davis RA (1999) Cell and molecular biology of the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins by the liver. Biochim. Biophys. Acta 1440: 1-31

- Dhainaut A, Porchet M, Fischer A, Baert J-L (1984) Biochemical and metabolic aspects of oocyte differentiation in nereids (annelida: polychaeta). *Adv. Invertebr. Reprod.* 3: 3-16
- 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: 9327-9332
- Duvic B, Brehélin (1998) Two major proteins from locust plasma are involved in coagulation and are specifically precipitated by laminarin, a  $\beta$ -1,3-glucan. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 959-967
- Edelhoch H (1967) Spectroscopic determinations of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6: 1948-1954
- El-Salhy M, Gustafsson I-B, Grimelius L, Vessby B (1981) The lipid composition of the haemolymph and hepatopancreas of the scorpion (*Buthus quinquestriatus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 68: 873-876
- Elliott WH, Elliott DC (1997) *Biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, Oxford New York Melbourne.
- Essellier AF, Jeanneret P (1960) Wässrige Lösungen-Elektrolytlösungen zur parenteralen Infusionstherapie. In: Diem K (ed.) *Documenta Geigy. Wissenschaftliche Tabellen.*, J. R. Geigy AG, Basel, Seiten 295-299
- Ettelaie C, Haris PI, James NJ, Wilbourn B, Adam JM, Bruckdorfer KR (1997) Alterations in the structure of apolipoprotein B-100 determine the behaviour of LDL towards thromboplastin. *Biochim. Biophys. Acta* 1345: 237-247
- Fan Y, Chase J, Sevala VL, Schal C (2002) Lipophorin-facilitated hydrocarbon uptake by oocytes in the German cockroach *Blattella germanica* (L.). *J. Exp. Biol.* 205: 781-790
- Fasman GD (ed.) (1990) *Practical handbook of biochemistry and molecular biology*, 1st Ed., CRC Press, Boca Raton Ann Arbor Boston
- Ferenz H-J (1990) The Locust oocyte vitellogenin receptor-function and characteristics. In: Hoshi M, Yamashita O (eds.), *Adv. Invertebr. Reprod.*, pp. 103-107
- Ferenz H-J (1993) Yolk protein accumulation in *Locusta migratoria* (R. & F.) (Orthoptera: Acrididae) oocytes. *Int. J. Insect Morphol. & Embryol.* 22: 295-314
- Fielding CJ, Fielding PE (1994) Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* 36: 211-228



- Fischer A (1984) Control of oocyte differentiation in nereids (Annelida, Polychaeta)-facts and ideas. *Fortschr. Zool.* 29: 227-245
- Fischer A, Rabien H, Heacox AE (1991) Specific, concentration-dependent uptake of vitellin by the oocytes of *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) in vitro. *J. Exp. Zool.* 260: 106-115
- Fischer A, Hoeger U (1993) Metabolic links between somatic sexual maturation and oogenesis in nereid annelids-a brief review. *Invert. Rep. Develop.* 23: 131-138
- Fischer A, Dorresteijn A (2004) The polychaete *Platynereis dumerilii* (Annelida): a laboratory animal with spiralian cleavage, lifelong segment proliferation and a mixed benthic/pelagic life cycle. *BioEssays* 26: 314-325
- Fischer H, Polikarpov I, Craievich AF (2004) Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Prot. Sci.* 13: 2825-2828
- Fisher EA, Pan M, Chen X, Wu X, Wang H, Jamil H, Sparks JD, Williams KJ (2001) The triple threat to nascent apolipoprotein B evidence for multiple, distinct degradative pathways. *J. Biol. Chem.* 276: 27855-27863
- Fofana M, Maboundou J-C, Bocquet J, Le Goff D (1996) Transfer of cholesterol between high density lipoproteins and cultured rat Sertoli cells. *Biochem. Cell Biol.* 74: 681-686
- Folch JM, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509
- Fontaine F, Gevaert MH, Porchet M (1984) Distribution of neutral lipids in coelomic constituents during oogenesis of *Perinereis cultrifera* (Annelida Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol. A* 77: 45-50
- Gala FA, Morrision SL (2002) The role of constant region carbohydrate in the assembly and secretion of human IgD and IgA1. *J. Biol. Chem.* 277: 29005-29011
- García-Alonso J, Hoeger U, Rebscher N (2006) Regulation of vitellogenesis in *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta): Effect of estradiol-17 $\beta$  on leucocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A* 143: 55-61
- Garín CF, Pollero RJ (1995) Isolation and characterization of a low-density lipoprotein from plasma of the aquatic snail *Ampullaria canaliculata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 111: 147-150

- Gellissen G, Emmerich H (1980) Purification and properties of a diglyceride-binding lipoprotein (LP1) of the hemolymph of adult *Locusta migratoria*. J. Comp. Physiol. B 136: 1-9
- Gillian-Daniel DL, Bates PW, Tebon A, Attie AD (2002) Endoplasmic reticulum localization of the low density lipoprotein receptor mediates presecretory degradation of apolipoprotein B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 4337-4342
- Gopalapillia R, Kando-Okuda K, Tsuchida K, Yamamoto K, Nohata J, Ajimura M, Mita K (2006) Lipophorin receptor of *Bombyx mori*: cDNA cloning, genomic structure, alternative splicing, and isolation of a new isoform. J. Lipid Res. 47: 1005-1013
- Graham JM, Higgins JA, Gillot T, Taylor T, Wilkinson J, Ford T, Billington D (1996) A novel method for the rapid separation of plasma lipoproteins using self-generating gradients of iodixanol. Atherosclerosis 124: 125-135
- Hafer J, Ferenz H-J (1991) Locust vitellogenin receptor: An acidic glycoprotein with N- and O-linked oligosaccharides. Comp. Biochem. Physiol. B 100: 579-586
- Hafer J, Fischer A, Ferenz HJ (1992) Identification of the yolk receptor protein in oocytes of *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta) and comparison with the locust vitellogenin receptor. J. Comp. Physiol. B 162: 148-152
- Hagedorn HH, Maddison DR, Tu Z (1998) The evolution of vitellogenins, cyclorrhaphan yolk proteins and related molecules. Adv. Insect Physiol. 27: 335-383
- Hagen W, Auel H (2001) Seasonal adaptations and the role of lipids in oceanic zooplankton. Zoology 104: 313-326
- 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, Sotterup-Jensen I, Söderhäll K (1999) The crayfish plasma clotting protein: a vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 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. In: Harris JR (ed.) Electron Microscopy in Biology: A Practical Approach., IRL/OUP, Oxford, pp. 203-228

- Harris JR (1999) Negative staining of thinly spread biological particulates. In: Hajibagheri N (ed.) *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 13-30
- Harris JR, Hoeger U, Adrian M (2001) Transmission electron microscopical studies on some haemolymph proteins from the marine polychaete *Nereis virens*. *Micron* 32: 599-613
- Harris JR, Scheffler D (2002) Routine preparation of air-dried negatively stained and unstained specimens on holey carbon support films: a review of applications. *Micron* 33: 461-480
- Hauenschild C, Fischer A (1969) *Platynereis dumerilii*. In: *Großes Zoologisches Praktikum*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- Haunerland NH, Bowers WS (1987) Lipoproteins in the hemolymph of the tarantula, *Eurypelma californicum*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 86: 571-574
- Haunerland NH, Bowers WS (1989) Comparative studies on arthropod lipoproteins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 92: 137-141
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* 39: 1345-1353
- Hayashi K, Nimpf J, Schneider WJ (1989) Chicken oocytes and fibroblasts express different apolipoprotein-B-specific receptors. *J. Biol. Chem.* 264: 3131-3139
- Heacox AE, Fischer A, Frangenberg H-R (1983) Development of a medium for in vitro culture of oocytes from the polychaete *Nereis virens*. *In Vitro* 19: 825-832
- Helenius A, Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2361-2369
- Helmerhorst E, Stokes GB (1980) Microcentrifuge desalting: a rapid, quantitative method for desalting small amounts of protein. *Anal. Biochem.* 104: 130-135
- Heras H, Pollero R (1992) Hemocyanin as an apolipoprotein in the hemolymph of the cephalopod *Octopus tehuelchus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1125: 245-250
- 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

- Hoeger U (1991) Hydrolytic enzymes in the coelomic cells of the polychaete *Nereis virens* during sexual maturation. *Mar. Biol.* 110: 7-12
- Hoeger U, Märker C, Geier G (1996) Adenylate storage, metabolism and utilization of the polychaete *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). *Experientia* 52: 481-486
- Hoeger U, Rebscher N, Geier G (1999) Metabolite supply in growing oocytes of *Nereis virens*: role of nucleosides. *Hydrobiologia* 402: 163-174
- Jaenicke E, Walsh PJ, Decker H (2003) Isolation and characterization of haemoporphin, an abundant haemolymph protein from *Aplysia californica*. *Biochem. J.* 375: 381-688
- Johs A, Hammel M, Waldner I, May RP, Laggner P, Prassl R (2006) Modular structure of solubilized human apolipoprotein B-100. Low resolution model revealed by small angle neutron scattering. *J. Biol. Chem* 281: 19732-19739
- Jonas A, Hefele Wald J, Harms Toohill KL, Krul ES, Kézdy KE (1990) Apolipoprotein A-I structure and lipid properties in homogeneous reconstituted spherical and discoidal high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 265: 22123-22129
- Kanost MR, Kawooya JK, Law JH, Ryan RO, van Heusden MC, Ziegler R (1990) Insect haemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.* 22: 299-396
- Kashiwazaki Y, Ikai A (1985) Structure of apoproteins in insect lipophorin. *Arch. Biochem. Biophys.* 237: 160-169
- Kawooya JK, Law JH (1988) Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. *J. Biol. Chem.* 263: 8748-8753
- Kawooya JK, Osir EO, Law JH (1988) Uptake of the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. *J. Biol. Chem.* 263: 8740-8747
- Kawooya JK, Wells MA, Law JH (1989) A strategy for solubilizing delipidated apolipoprotein with lysophosphatidylcholine and reconstitution with phosphatidylcholine. *Biochemistry* 28: 6658-6667
- Khalaila I, Peter-Katalinic J, Tsang C, Radcliffe CM, Aflalo ED, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM, Sagi A (2004) Structural characterization of the N-glycan moiety and site of glycosylation in vitellogenin from the decapod crustacean *Cherax quadricarinatus*. *Glycobiology* 14: 767-774
- Khovidhunkit W, Kim M-S, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C (2004) Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* 45: 1169-1196

- Knippers R (1997) Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.
- Koga S, Horwitz DL, Scanu AM (1969) Isolation and properties of lipoproteins from normal rat serum. *J. Lipid Res.* 10: 577-588
- Komatsu M, Ando S (1992) Isolation of crustacean egg yolk lipoproteins by differential density gradient ultracentrifugation. *Comp. Biochem. Physiol. B* 103: 363-368
- Komatsu M, Ando S, Teshima S-I (1993) Comparison of hemolymph lipoproteins from four species of crustacea. *J. Exp. Zool.* 266: 257-265
- Kopáček P, Hall M, Söderhäll K (1993) Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur. J. Biochem.* 213: 591-597
- Koppaka V (2001) Structural studies of discoidal lipoprotein A-I. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 885-893
- Kruski AW, Scanu AM (1975) Properties of rooster serum high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 409: 26-38
- Kubagawa HM, Watts JL, Corrigan C, Edmonds JW, Sztul E, Browse J, Miller MA (2006) Oocyte signals derived from polyunsaturated fatty acids control sperm recruitment *in vivo*. *Nature Cell. Biol.* 8: 1143-1148
- 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 (eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, Pergamon Press, New York, Seiten 83-111
- 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
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Latscha HP, Klein HA (1993) Biochemisch wichtige Ester (Lipide, Nucleotide). In: *Chemie Basiswissen. Organische Chemie.*, Springer, Berlin-Heidelberg, Seiten 479-499

- Lee CS, Han JH, Kim BS, Lee SM, Hwang JS, Kang SW, Lee BH, Kim HR (2003a) Wax moth, *Galleria mellonella*, high density lipophorin receptor: alternative splicing, tissue-specific expression, and developmental regulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33: 761-771
- Lee CS, Han JH, Lee SM, Hwang JS, Kang SW, Lee BH, Kim HR (2003b) Wax moth, *Galleria mellonella*, fat body receptor for high-density lipophorin (HDLp). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54: 14-24
- Lee P, Breckenridge WC (1976) The carbohydrate composition of human apo low density lipoprotein from normal and type II hyperlipoproteinemic subjects. *Can. J. Biochem.* 54: 42-49
- Lee RF, Puppione DL (1978) Serum lipoproteins in the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 59: 239-243
- Lee RF, Puppione DL (1988) Lipoproteins I and II from the hemolymph of the blue crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II associated with vitellogenesis. *J. Exp. Zool.* 248: 278-289
- Lee RF (1991) Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. In: Gilles R (ed.) *Adv. Comp. Environ. Physiol.*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Seiten 187-207
- Lee RF, Walker A, Reish DJ (2005) Characterization of lipovitellin in the eggs of the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 140: 381-386
- Leon LJ, Idangodage H, Wan C-PL, Weers PMM (2006) Apolipoprotein III: Lipopolysaccharide binding requires helix bundle opening. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348: 1328-1333
- Lewin B (2002) *Molekularbiologie der Gene*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Liao W, Chan L (2001) Tunicamycin induces ubiquitination and degradation of apolipoprotein B in HepG2 cells. *Biochem. J.* 353: 493-501
- Linke M, Gordon RE, Brillard M, Lecaille F, Lalmanach G, Brömme D (2006) Degradation of apolipoprotein B-100 by lysosomal cysteine cathepsins. *Biol. Chem.* 387: 1295-1303
- Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J (1996) *Molekulare Zellbiologie*. Walter de Gruyter, Berlin New York.

- 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
- Maldonado EN, Romero JR, Ochoa B, Aveldaño MI (2001) Lipid and fatty acid composition of canine lipoproteins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 128: 719-729
- Mann CJ, Anderson TA, Read J, Chester SA, Harrison GB, Köchl S, Ritchie PJ, Bradbury P, Hussain FS, Amey J, Vanloo B, Rosseneu M, Infante R, Hancock JM, Levitt DG, Banaszak LJ, Scott J, Shoulders CC (1999) The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of of atherogenic lipoproteins. *J. Mol. Biol.* 285: 391-408
- 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
- Mayes PA (1990) Lipid transport & storage. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds.), *Harper's Biochemistry*, Appelton & Lange, San Mateo, CA/Norwalk, CT, Seiten 234-248
- McRorie DK, Voelker PJ (1993) *Self-associating systems in the analytical ultracentrifuge*. Beckman Instruments, Fullerton.
- 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
- Narayanaswami V, Ryan RO (2000) Molecular basis of exchangeable apolipoprotein function. *Biochim. Biophys. Acta* 1483: 15-36
- Newman GC, Huang C-h (1975) Structural studies on phosphatidylcholine-cholesterol mixed vesicles. *Biochemistry* 14: 3363-3370
- Olsson U, Östergren-Lundén G, Moses J (2001) Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction. *Glycoconjugate J.* 18: 789-797
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Prot. Sci.* 4: 2411-2423

- Palumbo G, Zullo F (1987) The use of iodine staining for the quantitative analysis of lipids separated by thin layer chromatography. *Lipids* 22: 201-205
- 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: 469-476
- Pennington JE, Wells MA (2002) Triacylglycerol-rich lipophorins are found in the dipteran infraorder culicomorpha, not just in mosquitos. *J. Insect Sci.* 2
- Penzlin H (1991) *Lehrbuch der Tierphysiologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Phillips ML, Lembartas AV, Schumaker VN, Lawn RM, Shire SJ, Zioncheck TF (1994) Electron-microscopic and hydrodynamic characterization of recombinant apolipoprotein (a) and its association with LDL. *Chem. Phys. Lipids* 67/68: 91-97
- Pocock DM-E, Marsden JR, Hamilton JG (1971) Lipids in an intertidal polychaete and their relation to maturation of the worm. *Comp. Biochem. Physiol. A* 39: 683-697
- 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
- Puppione DL, Jensen DF, O'Connor JD (1986) Physicochemical study of rock crab lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 875: 563-568
- Ravid T, Tietz A, Khayat M, Boehm E, Michelis R, Lubzens E (1999) Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan). *J. Exp. Biol.* 202: 1819-1829
- 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
- Robbs SL, Ryan RO, Schmidt JO, Keim PS, Law JH (1985) Lipophorin of the larval honeybee, *Apis mellifera* L. *J. Lipid Res.* 26: 241-247
- 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 MMW, 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: 250-263



- Röhrkasten A, Ferenz H-J (1986a) Properties of the vitellogenin receptor of isolated locust oocyte membranes. *Int. J. Reprod. Dev.* 10: 133-142
- Röhrkasten A, Ferenz H-J (1986b) Solubilization of the locust vitellogenin receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 860: 577-582
- Röhrkasten A, Ferenz H-J, Buschmann-Gebhardt B, Hafer J (1989) Isolation of the vitellogenin-binding protein from locust ovaries. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 10: 141-149
- Röhrkasten A, Ferenz H-J (1992) Role of the lysine and arginine residues of vitellogenin in high affinity binding to vitellogenin receptors in locust oocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1133: 160-166
- Ruiz-Verdugo LM, García-Bañuelos ML, Vargas-Albores F, Inocencio H-C, 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, van Antwerpen R, van der Horst DJ, Beenackers AMT, Law JH (1990) *Manduca sexta* lipid transfer particle acts upon a lipoprotein to catalyze lipid and apoprotein disproportionation. *J. Biol. Chem.* 265: 546-552
- Ryan RO, Kay CM, Oikawa K, Liu H, Bradley R, Scaba DG (1992) Effect of particle lipid content on the structure of insect lipophorins. *J. Lipid Res.* 33: 55-63
- Ryan RO (1996) Structural studies of lipoproteins and their apolipoprotein components. *Biochem. Cell Biol.* 74: 155-164
- Ryan RO, van der Horst DJ (2000) Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Ann. Rev. Entomol.* 45: 233-260
- Schenk S (2003) Charakterisierung eines Lipoproteins bei *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta). Diplomarbeit, Institut für Zoologie, Johannes-Gutenberg Universität, Mainz
- 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

- Schneider WJ, Beisiegel U, Goldstein JL, Brown MS (1982) Purification of the low density lipoprotein receptor, an acidic glycoprotein of 164,000 molecular weight. *J. Biol. Chem.* 257: 2664-2673
- Schneider WJ (1989) The low density lipoprotein receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 988: 303-317
- Schneider WJ, Nimpf J (2003) LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 892-903
- Segrest JP, Jones MK, de Loofs H, Brouillette C, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM (1992) The amphipatic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J. Lipid Res.* 33: 141-166
- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N (2001) Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* 42: 1346-1367
- Shapiro JP, Keim PS, Law JH (1984) Structural studies on lipophorin, an insect lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 259: 3680-3685
- Shelness GS, Sellers JA (2001) Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr. Opin. Lipidol.* 12: 151-157
- Shelness GS, Ledford AS (2005) Evolution and mechanism of apolipoprotein B-containing lipoprotein assembly. *Curr. Opin. Lipidol.* 16: 325-332
- 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, apolipophorin-II/I. *J. Lipid Res.* 46: 412-421
- Smolenaars MMW, De Morré A, Kerver J, Van der Horst DJ, Rodenburg KW (2007a) Insect lipoprotein biogenesis depends on an amphipatic  $\beta$  cluster in apolipophorin II/I and is stimulated by microsomal triglyceride transfer protein. *J. Lipid Res.* 48: 1955-1965
- Smolenaars MMW, Madsen O, Rodenburg KW, Van der Horst DJ (2007b) Molecular diversity of the large lipid transfer protein superfamily. *J. Lipid Res.* 48: 489-502
- Soulages JL, Rimoldi OJ, Brenner RR (1988) Lipid thermotropic transitions in *Triatoma infestans* lipophorin. *J. Lipid Res.* 29: 171-182

- Soulages JL, Brenner RR (1991) Study on the composition-structure relationship of lipophorins. *J. Lipid Res.* 32: 407-415
- Soulages JL, Wells MA (1994a) Lipophorin: The structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Adv. Prot. Chem.* 45: 371-415
- Soulages JL, Wells MA (1994b) Effect of diacylglycerol content on some physicochemical properties of the insect lipoprotein, lipophorin. Correlation with the binding of apolipophorin-III. *Biochemistry* 33: 2356-2362
- 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: 307-314
- Spaziani E, Wang WL, Novy LA (1995) Serum high-density lipoproteins in the crab *Cancer antennarius*-IV. Electrophoretic analyses of apolipoproteins and a question of female-specific lipoproteins. *Comp. Biochem. Physiol. B* 111: 265-276
- Sreerama N, Woody RW (2000) Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* 287: 252-260
- Stennicke HR, Breddam K (2004) Glutamyl endopeptidase I. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF (eds.), *Handbook of proteolytic enzymes*, Elsevier, Seiten 1449-1451
- Steyrer E, Barber DL, Schneider WJ (1990) Evolution of lipoprotein receptors. The chicken oocyte receptor for very low density lipoprotein and vitellogenin binds the mammalian ligand apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* 265: 19575-19581
- Stieb S (2007) Charakterisierung von Lipoproteinen beim Flusskrebs. Diplomarbeit, Institut für Zoologie, 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
- Strydom DJ (1994) Chromatographic separation of 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone-derivatized neutral, acidic and basic aldoses. *J. Chromatogr. A* 678: 17-23
- Stryer L (1965) The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J. Mol. Biol.* 13: 482-495

- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2003) Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Sun J, Hiraoka T, Dittmer NT, Cho K-H, Raikhel AS (2000) Lipophorin as a yolk protein precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 30: 1161-1171
- Szule JA, Fuller NL, Rand RP (2002) The effects of acyl chain length and saturation of diacylglycerols and phosphatidylcholines on membrane monolayer curvature. Biophys. J. 83: 977-984
- Taki H, Dhainaut A (1988a) Influence of the cerebral neuroendocrine system on neutral lipid synthesis during oogenesis in *Nereis diversicolor*. II. Action on oocytes. Invert. Repr. Dev. 14: 221-230
- Taki H, Dhainaut A (1988b) Influence of the cerebral neuroendocrine system on neutral lipid synthesis during oogenesis in *Nereis diversicolor*. I. Action on coelomocytes. Invert. Repr. Dev. 14: 211-221
- Thörnqvist P-O, Johansson MW, Söderhäll K (1994) Opsonic activity of cell adhesion proteins and  $\beta$ -1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. Dev. Comp. Immunol. 18: 3-12
- Trombetta ES (2003) The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. Glycobiology 13: 77R-91R
- Tsuboi S, Fukuda M (2001) Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. BioEssays 23: 46-53
- Tsuchida K, Wells MA (1990) Isolation and characterization of a lipoprotein receptor from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. J. Biol. Chem. 265: 5761-5767
- Tsuchida K, Soulages JL, Moribayashi A, Suzuki K, Maekawa H, Wells MA (1997) Purification and properties of a lipid transfer particle from *Bombyx mori*: comparison to the lipid transfer particle from *Manduca sexta*. Biochim. Biophys. Acta 1337: 57-65
- Van der Horst DJ (1990) Lipid transport functions of lipoproteins in flying insects. Biochim. 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 der Horst DJ (2003) Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. Comp. Biochem. Physiol. B 136: 217-226

- Van der Westhuyzen DR, Gevers W, Coetzee GA (1980) Cathepsin-D-dependent initiation of the hydrolysis by lysosomal enzymes of apoprotein B from low-density lipoproteins. *Eur. J. Biochem.* 112: 153-160
- Van Heusden MC, van der Horst DJ, van Doorn JM, Beenackers AMT (1987) Partial purification of locust flight muscle lipoprotein lipase (LpL): Apparent differences from mammalian LpL. *Comp. Biochem. Physiol. B* 88: 523-527
- Van Heusden MC (1993) Characterization and identification of a lipoprotein lipase from *Manduca sexta* flight muscle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23: 785-792
- Van Holde KE, Weischet WO (1978) Boundary analysis of sedimentation-velocity experiments with monodisperse and paucidisperse solutes. *Biopolymers* 17: 1387-1403
- Van Hoof D, Rodenburg KW, van der Horst DJ (2002) Insect lipoprotein follows a transferrin-like recycling pathway that is mediated by the insect LDL receptor homologue. *J. Cell Sci.* 115: 4001-4012
- Van Hoof D, Rodenburg KW, van der Horst DJ (2005) Intracellular fate of LDL receptor family members depends on the cooperation between their ligand-binding domains. *J. Cell Sci.* 118: 1309-1320
- Vargas-Requena CL, Hernández-Santoyo A, Yepiz-Plascencia GM, Vargas-Albores F, Higuera-Ciajara 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
- Vukmirica J, Nishimaki-Mogami T, Tran K, Shan J, McLeod RS, Yuan J, Yao Z (2002) The N-linked oligosaccharides at the amino terminus of human apoB are important for the assembly and secretion of VLDL. *J. Lipid Res.* 43: 1496-1507
- Weast RC (1974) *CRC Handbook of chemistry and physics.* CRC Press.
- Weers PMM, van der Horst DJ, van Marrewijk WJA, van den Eijnden M, van Doorn JM, Beenackers AMT (1992) Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein. *J. Lipid Res.* 33: 485-491
- Weers PMM, van Marrewijk WJA, Beenackers AMT, van der Horst DJ (1993) Biosynthesis of locust lipophorin: Apolipophorins I and II originate from a common precursor. *J. Biol. Chem.* 268: 4300-4303

- Weers PMM, van der Horst DJ, Ryan RO (2000) Interaction of locust apolipoprotein III with lipoproteins and phospholipid vesicles: effect of glycosylation. *J. Lipid Res.* 41: 416-423
- Weers PMM, Ryan RO (2006) Apolipoprotein III: Role model apolipoprotein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 231-240
- Wehner R, Gehring W (1995) *Zoologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.
- Wessel D, Flügge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143
- Williams KJ, Fless GM, Petrie KA, Snyder ML, Brocia RW, Swenson TL (1992) Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 267: 13284-13292
- Willnow TE (1999) The low-density lipoprotein receptor gene family: multiple roles in lipid metabolism. *J. Mol. Med.* 77: 306-315
- Willnow TE, Nykjaer A, Herz J (1999) Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nature Cell Biol.* 1: E157-E162
- Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA (1991) Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 252: 1817-1822
- Winter R, Noll F (1998) *Methoden der biophysikalischen Chemie*. B. G. Teubner, Stuttgart.
- Woycechowsky KJ, Raines RT (2000) Native disulfide bond formation in proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 533-539
- Ximenes AA, Oliveira GA, Bittencourt-Cunha P, Tomokyo M, Leite DB, Folly E, Golodne DM, Atella GC (2008) Purification, partial characterization and role in lipid transport to developing oocytes of a novel lipoprotein from the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41: 18-25
- Yan A, Lennarz WJ (2005) Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 280: 3121-3124
- Yeh M-S, Huang C-J, Leu J-H, Lee YC, Tsai I-H (1999) Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Eur. J. Biochem.* 266: 624-633

- 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 GM, 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
- Yokoyama S (1998) Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1392: 1-15
- Ziegler R, van Antwerpen R (2006) Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 264-272

### Internetquellen

- <http://www.kolloidanalytik.de/uz/equil/hequil.pdf> Letzter Zugriff: 12.09.08
- <http://www.biophys.uni-frankfurt.de/~hauser/prakt/Ultrazentrifugation.pdf> Letzter Zugriff: 12.09.08
- <http://www.cyberlipid.org/cyberlip/desc0004.htm#top> Letzter Zugriff: 12.09.08

## 1 VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

ANS	8-Anilin-1-naphthalensulfonsäure	Lp	Lipoprotein/-phorin
AUZ	Analytische Ultrazentrifuge/- zentrifugation	M	molar (Mol/l)
$\alpha$	Anti(körper)	NBSS	Nereis balanced salt solution
BCA	2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure	Nm	Newtonmeter
BSA	Bovines Serum Albumin	OGP	Octyl- $\beta$ -D-glucopyranosid
$\beta$ GBP	$\beta$ -1,3-D-Glucan-Bindeprotein	Osm	Osmol
ConA	Concanavalin A	PBS	Posphate buffered saline
D	Diffusionskoeffizient (cm <sup>2</sup> /s)	PBT	Phosphate buffered saline plus Tween
Da	Dalton	PMP	5-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5- on
ddH <sub>2</sub> O	Reinstwasser	PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
dH <sub>2</sub> O	voll entsalztes Wasser	PNA	Peanut agglutinin
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetra- methyldocarbocyaninperchlorat	R	universelle Gaskonstante
DTT	<i>threo</i> -1,4-Dimercapto-2,3-butandiol	rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	$\rho$	Dichte
EGF	Epidermal growth factor	S	Svedberg (s <sup>-13</sup> )
erg	10 <sup>-7</sup> J	S <sub>20,w</sub>	Sedimentationskoeffizient auf 20°C und Wasser korrigiert
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	SDS	Natriumdodecylsulfat
HBS	Hepes buffered saline	Spg	Spermatogonien
HDL	High-density lipoprotein	T	absolute Temperatur in Kelvin
HDLp	High-density lipophorin	TCA	Trichloressigsäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure	TFA	Trifluoressigsäure
J	Joule	Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)- propan-1,3-diol
K	Kelvin	$\Theta$	Elliptizität
LDL	Low-density lipoprotein	v	partialspezifisches Volumen
LDLp	Low-density lipophorin		
LDLR	Low-density lipoprotein receptor		



V8 *Staphylococcus aureus* Endoproteinase w/v Gewicht pro Volumen  
 Glu-C xg relative Zentrifugalbeschleunigung

VHDL Very-high density lipoprotein

VLDL Very-low density lipoprotein

v/v Volumen pro Volumen

## 2 UMRECHNUNG DER SKALENTEILE DES KRÜSS HR 900 IN DEN BRECHUNGSINDEX

TAB. 12: Umrechnung der Skalenteile in den Brechungsindex

Skalenteile	Brechungsindex	Skalenteile	Brechungsindex
0	1,3330	18	1,3605
1	1,3344	19	1,3622
2	1,3359	20	1,3638
3	1,3373	21	1,3655
4	1,3388	22	1,3672
5	1,3403	23	1,3689
6	1,3418	24	1,3706
7	1,3433	25	1,3723
8	1,3448	26	1,3740
9	1,3463	27	1,3758
10	1,3478	28	1,3776
11	1,3494	29	1,3793
12	1,3509	30	1,3811
13	1,3525	31	1,3829
14	1,3541	32	1,3847
15	1,3557	33	1,3866
16	1,3573	34	1,3884
17	1,3589	35	1,3903

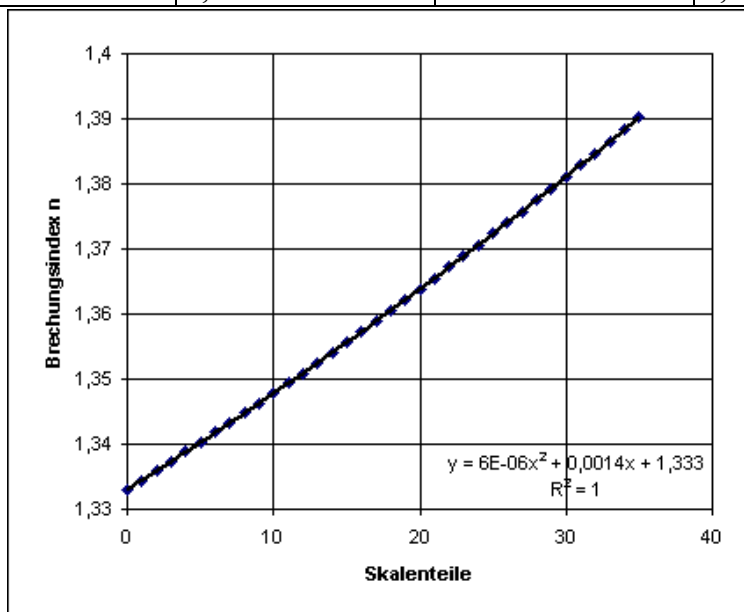
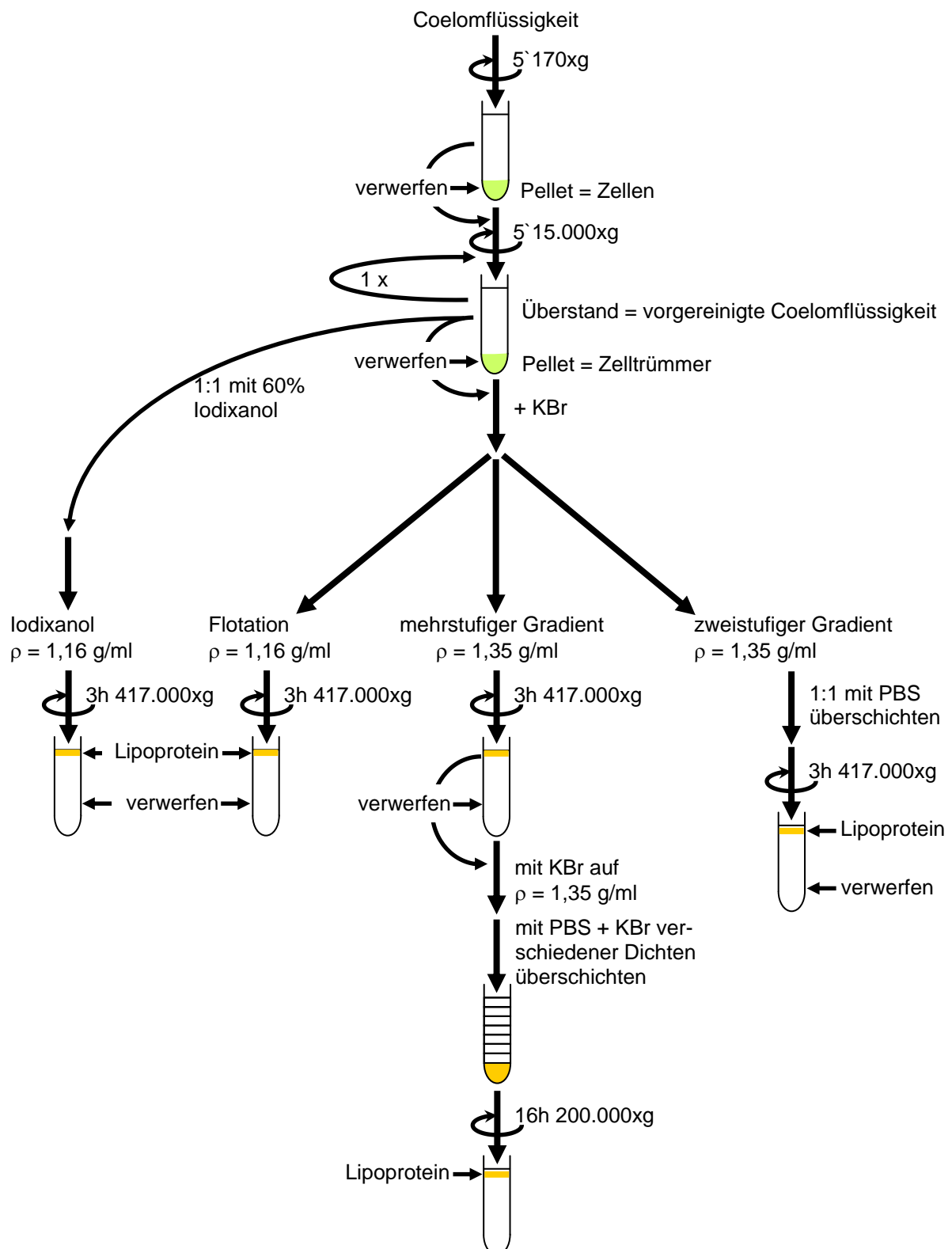


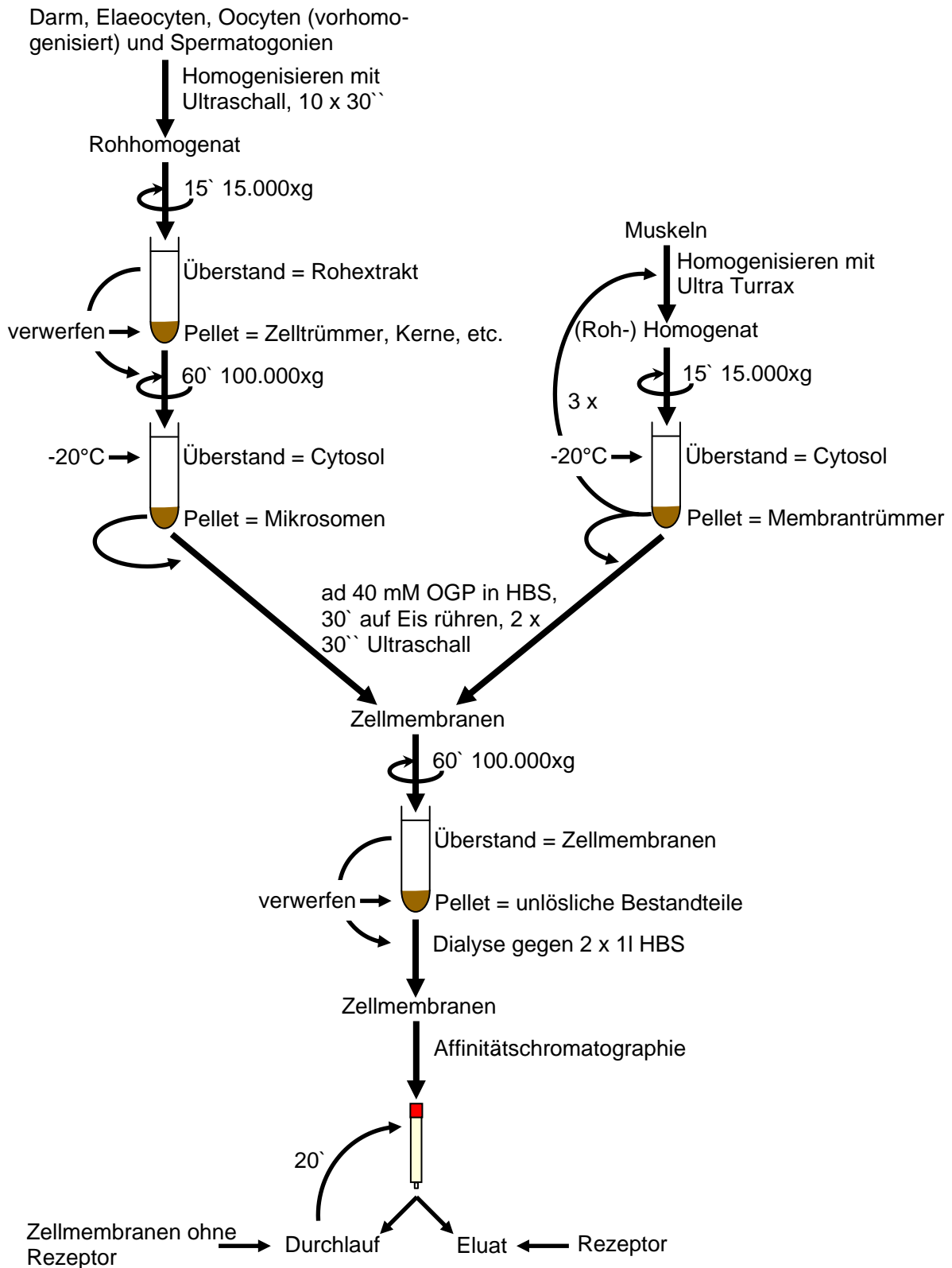
Abb. 52: Graphischer Zusammenhang zwischen den Abgelesenen Skalenteilen und dem Brechungsindex.

## 3 SCHEMA DER LIPOPROTEINISOLIERUNG



**Abb. 53:** Schematische Übersicht über die verschiedenen Möglichkeiten der Lipoproteinisolierung aus der *Nereis*-Coelomflüssigkeit. Deutlich wird vor allem der zum Teil erhebliche Unterschiedliche Zeitbedarf bei den verschiedenen Methoden.

## 4 SCHEMA DER LIPOPROTEINREZEPTOR-ISOLIERUNG



**Abb. 54:** Schematische Übersicht über die Isolierung des *Nereis*-Lipoproteinrezeptors aus verschiedenen Zellen und Geweben.

## 5 DICHTEN DER *NEREIS*-LIPOPROTEIN-KOMPONENTEN (LIPIDE UND KOHLENHYDRATE)

### 5.1 LIPIDE

**TAB. 13:** Literaturwerte für die Dichten der im *Nereis*-Lipoprotein vorkommenden Lipide (siehe Ergebnisse 1.8).

Lipid	Dichte [g/ml]	Referenz
Cholesterin	1,067	(Weast 1974)
Cholesteryloleat	0,997	siehe unten
Dioleylglycerin <sup>+</sup>	0,917	(Chino et al. 1969)
Monooleylglycerin	0,942	(Weast 1974)
Phospholipid <sup>x</sup>	1,032	(Budavari et al. 1989)
Trioleylglycerin	0,898	(Weast 1974)

<sup>+</sup>: Dieser Wert ist als partialspezifisches Volumen angegeben. Als Dichte wurde der Kehrwert des partialspezifischen Volumens verwendet.

<sup>x</sup>: Der angegebene Wert ist der für Phosphatidylcholin. Da sich keine Angabe für Phosphatidylethanolamin fand, wurde aufgrund des geringen Anteils an Phosphatidylethanolamin (~4,5% der Phospholipidmenge) der entstehende Fehler als vernachlässigbar angesehen.

Der Wert für Cholesteryloleat wurde rechnerisch ermittelt, da dieser nicht angegeben war. Dabei wurde angenommen, dass die Gesamtdichte des Moleküls gleich der Summe der Dichten der relativen Massenanteile seiner Komponenten ist.

Zunächst wird der Massenanteil des Cholesterins am Cholesteryloleat (CO) errechnet:

$$\frac{\text{Cholesterin}}{\text{CO}} = \frac{\text{MW}(\text{Cholesterin}) - 1}{\text{MW}(\text{CO})} \quad (12)$$

Nach Einsetzen der entsprechenden Werte (MW(Cholesterin) = 386,64 Da, MW(CO) = 651,06 Da) in Gleichung 12 ergibt sich (das Subtrahieren von 1 beim Molekulargewicht des Cholesterins ist nötig, da bei der Veresterung von Cholesterin und Ölsäure zu Cholesteryloleat das Cholesterin ein Proton an das entstehende H<sub>2</sub>O abgibt):

$$\frac{385,64 \text{ Da}}{651,06 \text{ Da}} = 0,5923 \quad (13)$$

Das bedeutet, dass Cholesterin im CO mit 59,23 Massenprozent eingeht. Damit ergibt sich der Massenanteil der Ölsäure im CO:

$$1 - 0,5923 = 0,4077 \quad (14)$$

Die Gesamtdichte des CO ergibt sich jetzt aus der Addition der relativen Anteile der Einzeldichten (Cholesterin = 1,067 g/ml, Ölsäure = 0,895 g/ml, Budavari et al. 1989):

$$0,5923 \times 1,067 \text{ g/ml} + 0,4077 \times 0,895 \text{ g/ml} = 0,997 \text{ g/ml} \quad (15)$$

Die Richtigkeit der obigen Berechnung wurde durch Berechnung der Dichte von Monoacetyl glycerin und dem nachfolgenden Vergleich mit dem bei Budavari et al. (1989) angegebenen Wert überprüft:

$$\frac{\rho(\text{errechnet})}{\rho(\text{Literatur})} = \frac{1,195 \text{ g/ml}}{1,206 \text{ g/ml}} = 0,9909 \quad (16)$$

Da die errechnete Dichte 99,09% des Wertes der angegebenen Dichte lieferte wurde die Dichtenberechnung nach obigem Schema als korrekt angesehen.

Aus den in Tabelle 13 angegebenen Dichten und den aus Tabelle 11 entnommen relativen Anteilen der einzelnen Lipide lässt sich die Dichte der Lipidmatrix berechnen (Tab. 14):

**TAB. 14:** Errechnung der Dichte der Lipidmatrix des *Nereis*-Lipoproteins.

Lipid	Dichte [g/ml]	Relative Häufigkeit	Produkt [g/ml]
Cholesterin	1,067	0,0162	0,0173
Cholesteryloleat	0,997	0,0675	0,0673
Diolelylglycerin	0,917	0,0650	0,0596
Monooleylglycerin	0,942	0,1056	0,0995
Phospholipid	1,032	0,6772	0,6989
Trioleylglycerin	0,898	0,0686	0,0616
<b>Summe</b>		1,0001 <sup>x</sup>	<b>1,0042</b>

<sup>x</sup>: Der Wert größer als 1 ist auf Rundungsfehler zurückzuführen.

## 5.2 KOHLENHYDRATE

**TAB. 15:** Literaturwerte für die Dichten der im *Nereis*-Lipoprotein vorkommenden Kohlenhydrate.

Kohlenhydrat	Dichte [g/ml]	Referenz
N-Acetylgalactosamin <sup>+</sup>	1,462	(McRorie und Voelker 1993)
N-Acetylglucosamin <sup>+</sup>	1,462	(McRorie und Voelker 1993)
Fucose	1,471	<sup>x</sup>
Galactose <sup>+</sup>	1,601	(McRorie und Voelker 1993)
Mannose <sup>+</sup>	1,647	(McRorie und Voelker 1993)
Rhamnose	1,471	(Budavari et al. 1989)

<sup>+</sup>: Diese Werte sind aus den partialspezifischen Volumina die bei McRorie (1993) angegeben sind errechnet.

<sup>x</sup>: Als Dichte für Fucose wird derselbe Wert wie für Rhamnose angenommen, da es sich bei Fucose (6-Desoxy-D-galactose) sowie Rhamnose (6-Desoxy-D-mannose) um 6-Desoxy-Hexosen handelt.

Die Gesamtdichte der Kohlenhydrate wird wieder aus den Dichten der einzelnen Komponenten (Tab. 15) und ihres relativen Vorkommens im *Nereis*-Lipoprotein (Tab. 16) errechnet. Da die genaue Struktur der Glycane nicht bekannt ist, und aus Gründen der

Einfachheit wurden die Kohlenhydrate als Einzelkomponenten betrachtet und nicht als miteinander glycosidisch verknüpft:

**TAB. 16:** Relative Anteile der im *Nereis*-Lipoprotein vorkommenden Kohlenhydrate.

Kohlenhydrat	Häufigkeit [%]
N-Acetylgalactosamin	6,02
N-Acetylglucosamin	24,81
Fucose	11,27
Galactose	31,58
Mannose	21,80
Rhamnose	4,51

**TAB. 17:** Errechnung der Dichte der Kohlenhydratmatrix des *Nereis*-Lipoproteins.

Kohlenhydrat	Dichte [g/ml]	Relative Häufigkeit	Produkt [g/ml]
N-Acetylgalactosamin	1,462	0,0602	0,0880
N-Acetylglucosamin	1,462	0,2481	0,3627
Fucose	1,471	0,1127	0,1658
Galactose	1,601	0,3158	0,5056
Mannose	1,647	0,218	0,3590
Rhamnose	1,471	0,0451	0,0663
<b>Summe</b>		0,9999 <sup>x</sup>	<b>1,5474</b>

<sup>x</sup>: Der Wert kleiner als 1 ist auf Rundungsfehler zurück zu führen.

## 6 BERECHNUNG DES HYDRATWASSERGEHALTES

Da das *Nereis*-Lipoprotein eine Scheibe darstellt, hat aufgrund der relativ größeren Oberfläche die Hydrathülle des Proteins einen wesentlich größeren Einfluss auf die Schwebdichte des Proteins als auf ein vergleichbares kugeliges Protein. Der Gehalt an Hydratwasser bei der Dichtebestimmung kann unter der Annahme berechnet werden, dass die im Polymer Iodixanol bestimmte Dichte die vollständig hydratisierte Dichte darstellt (Graham et al. 1996). Nach Stieb (2007) gilt folgende Beziehung:

$$\rho(\text{hydratisiert}) = \rho(\text{unhydratisiert}) \times \% \text{Lipoproteinanteil} + \rho(\text{Wasser}) \times (100\% - \% \text{Lipoproteinanteil}) \quad (17)$$

Nach Einsetzen der entsprechenden Werte ( $\rho_{\text{unhydratisiert}} = 1,209$  g/ml, siehe oben,  $\rho_{\text{Wasser}, 20^\circ\text{C}} = 0,99823$  g/ml, Weast 1974,  $\rho_{\text{hydratisiert}} = 1,069$  g/ml, Schenk et al. 2006) ergibt sich der Anteil des Lipoproteins an der bestimmten hydratisierten Dichte als 33,58% und somit der Anteil des Hydratwasser zu:

$$100\% - 33,58\% = 66,42\% \quad (18)$$

Das heißt, dass von der in Iodixanol bestimmten Dichte 66,42% der Dichte des (Hydrat)Wassers zuzuschreiben sind.

Setzt man in Gleichung 17 für die hydratisierte Dichte den in KBr bestimmten Wert, d.h. die teilhydratisierte Dichte, (1,1 g/ml, siehe Ergebnisse 1.3) ein, so erhält man als Anteil der Lipoprotein-Dichte 48,28%. Daraus folgt, dass bei der Bestimmung der Dichte in KBr das Hydratwasser noch zu:

$$100\% - 48,28\% = 51,72\% \quad (19)$$

einght.

Wenn man jetzt die Anteile der Hydrathüllen an den bestimmten Dichte unter der Annahme zueinander in Relation in Relation setzt, dass die in Iodixanol bestimmte Dichte der vollständig hydratisierten Dichte entspricht (und somit der oben errechnete Wassergehalt der des vollständig hydratisieren Lipoproteins ist), erhält man die relative Proteinhydratisierung:

$$\frac{\text{Wassergehalt}(\text{teilhydratisert})}{\text{Wassergehalt}(\text{hydratisiert})} = \text{relative Proteinhydratisierung} \quad (20)$$

Nach Einsetzen ergibt sich:

$$\frac{51,72\%}{66,42\%} = 0,7887 \quad (21)$$

Das bedeutet, dass das Lipoprotein nach der Isolierung in KBr noch 78,87% seiner Hydrathülle besitzt.

## 7 BERECHNUNG DES LIPID-, BEZIEHUNGSWEISE DES KOHLENHYDRAT-GEHALTES DES *NEREIS*-LIPOPROTEINS

### 7.1 KOHLENHYDRATGEHALT

Aus der Monosaccharid-Analyse ergaben sich 133 ng Kohlenhydrate pro 10 µg Apolipoprotein (siehe Ergebnisse 1.7.5). Der Glycosylierungsgrad ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$\text{Gesamtglycosylierung} [\%] = \left( \frac{\text{Masse Kohlenhydrat} [\text{ng}]}{\text{Masse Protein} [\text{ng}] + \text{Masse Kohlenhydrat} [\text{ng}]} \right) \times 100 \quad (22)$$

Nach Einsetzen ergibt sich:

$$\text{Gesamtglycosylierung} [\%] = \left( \frac{133 \text{ ng}}{10.000 \text{ ng} + 133 \text{ ng}} \right) \times 100 = 1,31\% \quad (23)$$

## 7.2 LIPIDGEHALT

Bei der Quantifizierung der Lipidklassen, z.B. per ELSD ergaben sich 2,652  $\mu\text{g}$  Lipide pro 2  $\mu\text{g}$  Apolipoprotein (siehe Ergebnisse 1.8.2). Die Berechnung des Lipidgehaltes ist jetzt prinzipiell ähnlich der Berechnung der Gesamtglycosylierung:

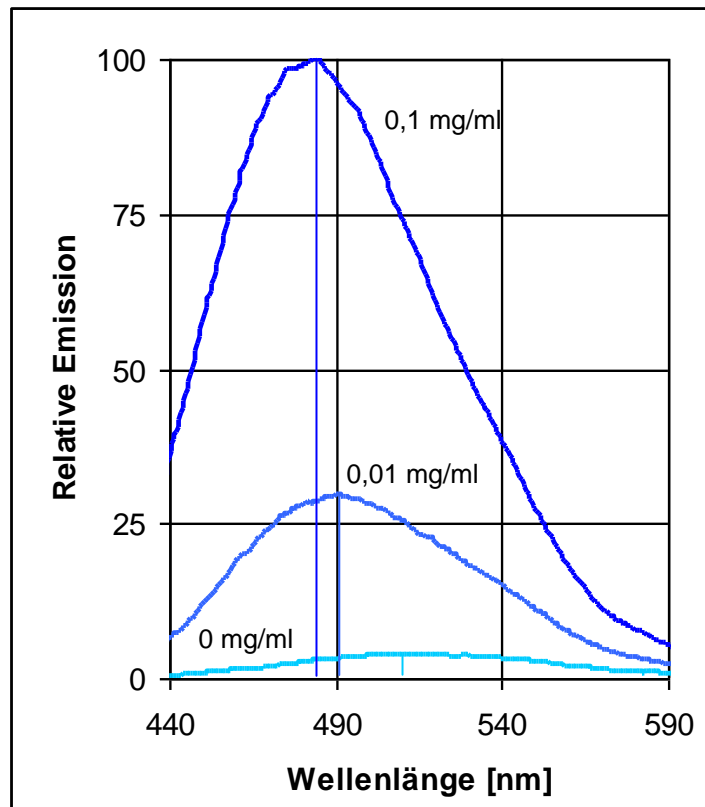
$$\text{Lipidgehalt}[\%] = \left[ \frac{\text{Masse Lipid} [\mu\text{g}]}{(\text{Masse Protein} [\mu\text{g}] \times 1,0131) + \text{Masse Lipid} [\mu\text{g}]} \right] \times 100 \quad (24)$$

Der Faktor 1,0131 im Nenner von Gleichung 24 berücksichtigt die Glycosylierung der Apolipoproteine (1,31%, siehe oben). Nach Einsetzen ergibt sich:

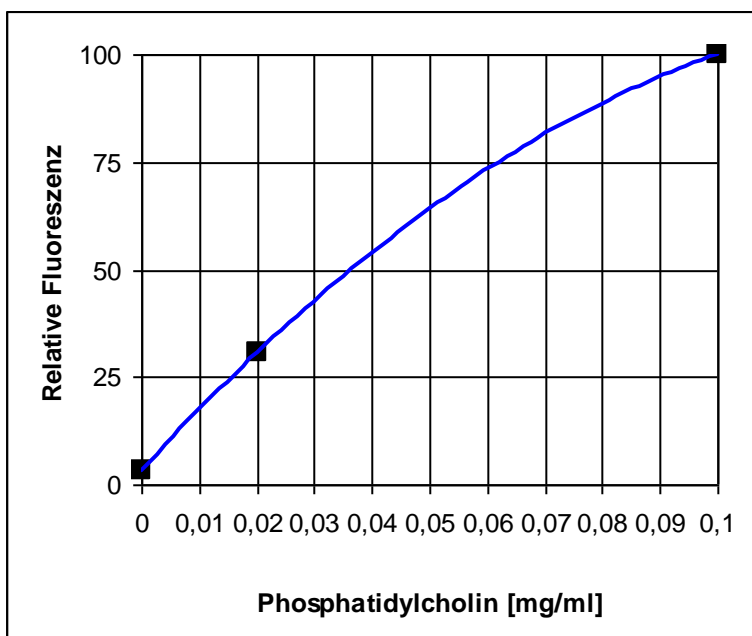
$$\text{Lipidgehalt}[\%] = \left[ \frac{2,652 \mu\text{g}}{(2 \mu\text{g} \times 1,0131) + 2,652 \mu\text{g}} \right] \times 100 = 55,69\% \quad (25)$$



## 8 ANS-FLUORESZENZ

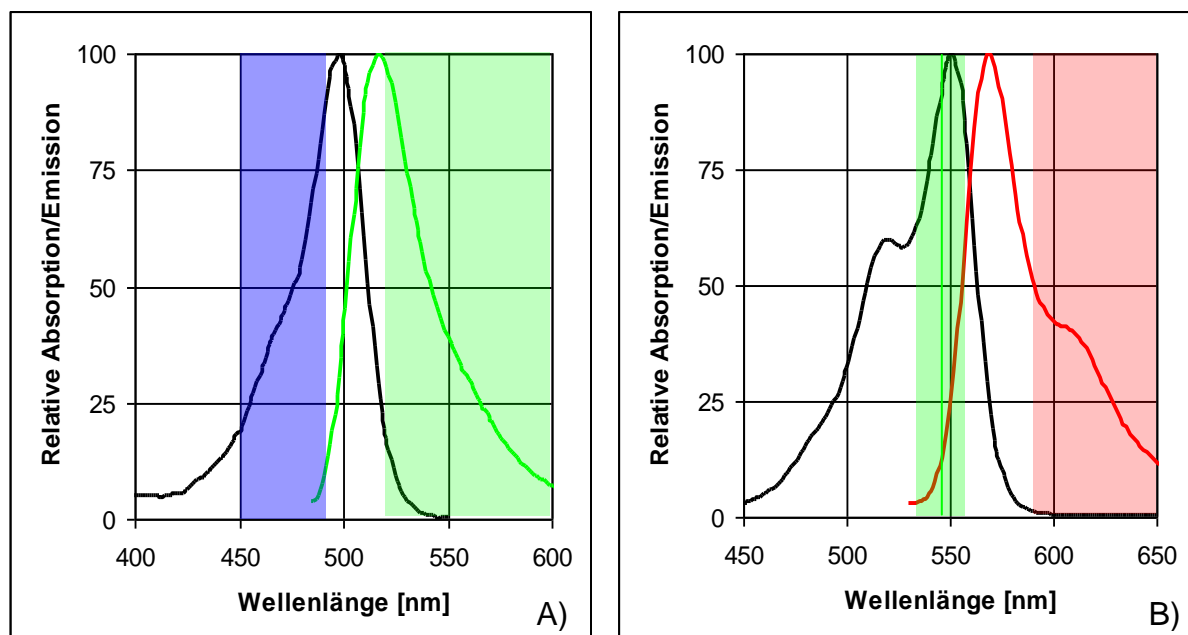


**Abb. 55:** Emissionsspektren des zur Phospholipidbestimmung eingesetzten Fluorophors ANS. Zu sehen sind die Emissionsspektren (Excitationswellenlänge: 395 nm) von 0 mg/ml, 0,02 mg/ml, 0,1 mg/ml Phosphatidylcholin in PBS + 0,1 mM ANS. Die Fluoreszenzemissionen für 0,1 mg Phosphatidylcholin/ml PBS sind auf 100 gesetzt. Die jeweiligen Maxima (0,1 mg/ml: 484 nm, 0,02 mg/ml: 490,5 nm, 0 mg/ml: 509 nm) sind durch Linien in der entsprechenden Farbe gekennzeichnet. Deutlich ist der Anstieg der Fluoreszenzemission zu erkennen. Deutlich wird der Verschluss der Maxima hin zu kürzeren Wellenlängen bei steigenden Phosphatidylcholinkonzentrationen.



**Abb. 56:** Relative Fluoreszenz der ANS-Phospholipid-Komplexe bei 490 nm nach Anregung bei 395 nm. Die Fluoreszenzemission wurde wieder für 0,1 mg/ml auf 100 gesetzt. Kurve auf den Spektren von Abb. 55 basierend. Die nicht strikte Linearität könnte auf innere Filter- und Streueffekte der einzelnen Phospholipidmizellen zurückzuführen sein, die mit zunehmender Konzentration des Phospholipids und somit der Mizellen zunimmt.

## 9 FLUORESCENZSPEKTREN VON FITC UND DiI



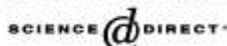
**Abb. 57:** Fluoreszenz- und Emissionsspektren der für die Zellinkubationsversuche verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. A) FITC an goat- $\alpha$ -mouse-IgG gebunden bei pH 8. B) DiI in einer Phospholipiddoppelschicht. Die Markierungen geben die Bandbreiten der Excitations- bzw. Emissionsfilter an. Der FITC-Filter ist ein Breitbandfilter mit einem Anregungswellenlängenspektrum von 450-490 nm (blau hinterlegt) und einem Sperrfilter der Wellenlängen  $>520$  nm durch lässt (hellgrün hinterlegt). Der für die DiI-Fluoreszenz verwendete TRITC-Filter erlaubt eine Anregungswellenlänge von  $546 \pm 12$  nm (grüne Line: 546 nm, hellgrüne Fläche  $\pm 12$  nm) und der Sperrfilter lässt Wellenlängen  $>590$  nm passieren (rötlich hinterlegt). Spektren nach <http://probes.invitrogen.com/handbook/tables/0372.html>.

**10 PHYSIKALISCH-CHEMISCHE PARAMETER DES *NEREIS*-LIPOPROTEINS**

Untereinheiten:	280.000 85.000
Untereinheitenstruktur:	Heterodimer
Lipidgehalt:	50-55%
Lipidzusammensetzung:	64,78% Phosphatidylcholin 10,56% Monoacylglyceride 6,86% Triacylglyceride 6,75% Cholesterylester 6,50% Diacylglyceride 2,94% Phosphatidylethanolamin 1,62% Cholesterin
Molarer Extinktionskoeffizient:	573.358 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
Sedimentationskoeffizient (S <sub>w,20</sub> ):	9,7 S
Sekundärstrukturen:	14% α-Helix 35% β-Faltblatt 22% Schleifen 28% Ungeordnet
Dimensionen (negative staining):	42 nm Durchmesser 10 nm Dicke
Dichte (vollhydratisiert):	1,069 g/ml (Iodixanol)
Dichte (teilhydratisiert):	1,09-1,10 g/ml (KBr)
Dichte (unhydratisiert, theoretisch):	1,209 g/ml
Natives Molekulargewicht:	857.000 (AUZ/Gleichgewichtslauf) 793.000 (Gelfiltration) 730.000 (theoretisch, bei 50% Lipid) 981.000 (AUZ/Sedimentationslauf)
Glycosylierung:	0,66% (Holopartikel) 1,31% (Apolipoproteine)

## 11 LEBENSLAUF

## 12 VERÖFFENTLICHUNGEN

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 143 (2006) 236–243

CBP

[www.elsevier.com/locate/cbpb](http://www.elsevier.com/locate/cbpb)

## A discoidal lipoprotein from the coelomic fluid of the polychaete *Nereis virens*

Sven Schenk\*, J. Robin Harris, Ulrich Hoeger

Institut für Zoologie, Universität Mainz, D-55099 Mainz, Germany

Received 16 June 2005; received in revised form 15 November 2005; accepted 17 November 2005  
Available online 27 December 2005

### Abstract

A discoidal lipoprotein was isolated from the coelomic fluid of the polychaete, *Nereis virens*, by density gradient centrifugation. The lipoprotein was present in both sexes and moved as a uniform band in an agarose gel. The average diameter of the lipoprotein particles determined by electron microscopy was 42 nm with a thickness of 10 nm. SDS electrophoresis showed two apoprotein subunits with molecular masses of 247 and 85 kDa, respectively. In lectin blots, both apoproteins were reactive with Concanavalin A indicating the presence of *N*-glycans. The small subunit was also reactive with peanut lectin, indicating additional *O*-glycosylation. The total lipid content was 48% and consisted mainly of phospholipids and some diglycerides as judged by thin layer chromatography. The estimated native molecular mass of *N. virens* lipoprotein (~675 kDa) lies in the range of vertebrate high-density lipoprotein and insect lipophorins. The size of the apoproteins is similar to those found in insects, while the composition of the lipid fraction is more similar to that of crustacean lipoproteins.  
© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Coelomic fluid; Discoidal lipoprotein; Glycosylation; *Nereis virens*; Polychaetes

### 1. Introduction

To mediate the transport of lipophilic compounds in a hydrophilic environment animals rely on lipoproteins as mediator between these two phases. Vertebrates on the one hand possess different types of lipoproteins with various functions (Yokoyama, 1998; Rhoads and Brissette, 1999; Khovidhunkit et al., 2004); in insect hemolymph, on the other hand, only a single type of lipoprotein–lipophorin–is found (see Rodenburg and van der Horst, 2005, for a review). The lipoproteins of insects have received most attention among invertebrates due to their high lipid mobilization rates during flight. Lipophorins can be classified as low-density (LDLp), high-density (HDLp) and very high-density lipophorins, depending on their lipid loading (for a recent overview, see Arrese et al., 2001). These lipophorins have previously been thought to represent a reusable, non-internalized shuttle. However, this view has recently been challenged by the finding

that lipoproteins can undergo endocytosis in the fat body and the apoproteins are released from the cell following a transferrin like pathway (van Hoof et al., 2002; van Hoof et al., 2003).

In crustaceans, the other group from which a number of studies are available, lipoproteins are also major components involved in blood clotting, indicating their role in defense reactions in addition to their lipid transport functions (Hall et al., 1999). Similarly, insect lipophorins were also shown to be directly linked to immune responses and blood clotting (Duvic and Brehélin, 1998; Chung and Ourth, 2002; Smolenaars et al., 2005). As shown for crustaceans, the immune reactive lipoproteins carry a  $\beta$ -1,3-glucan binding site (Duvic and Söderhäll, 1990) and even vertebrate lipoproteins have retained a glucan binding site by which they bind to proteoglycans (Olsson et al., 2001) that have regulatory functions in the secretion of VLDL synthesized by the liver (Williams et al., 1992; Fisher et al., 2001).

In contrast to vertebrate lipoproteins that transport different lipid classes, diacylglycerol (DAG) is the predominant core neutral lipid of the lipophorins, with lower amounts of sterols, hydrocarbons, carotenoids and other acylglycerols, which are surrounded by a monolayer of phospholipids (Ryan and van

\* Corresponding author. Tel.: +49 6131 39 24481; fax: +49 6131 39 23835.  
E-mail address: [schen038@students.uni-mainz.de](mailto:schen038@students.uni-mainz.de) (S. Schenk).

der Horst, 2000). In crustaceans, likewise, the predominating lipid species are phospholipids (especially phosphatidylcholine) and, to a lesser content, diacylglycerols and steroids in the neutral lipid core of the lipoproteins (Lee and Puppione, 1978; Spaziani et al., 1986; Hall et al., 1995; Lubzens et al., 1997). In mollusks, the predominating lipids are also phospholipids and to a lesser extent sterols and triacylglycerols (Heras and Pollero, 2002).

In addition to their differences in lipid content, the structure of lipoproteins is also different. Most lipoproteins, with exception of immature vertebrate HDL, seem to be globular particles, while in crustaceans, examples of mature discoidal lipoproteins have also been described (Lee and Puppione, 1978; Spaziani et al., 1986; Ryan et al., 1990; Hevonoja et al., 2000; Koppaka, 2001). Here, we report another example of a mature annelid discoidal lipoprotein.

Invertebrates other than insects and crustaceans have been poorly studied with respect to lipoprotein structure and function; however, the fact that many lipoproteins are highly conserved throughout evolution (van Hoof et al., 2002) make them an interesting group of proteins, especially in light of their proposed common evolutionary ancestors, the female specific lipoproteins, the vitellogenins and the clotting proteins found in crustaceans (Hagedorn et al., 1998; Babin et al., 1999; Hall et al., 1999).

Since both vitellogenins and lipoproteins have evolved from a common ancestor (Hagedorn et al., 1998), the study of lipoproteins in lower groups is of interest, particularly in terms of the comparison of lipid transport and function of these apparently ancient molecules. Comparison of these two types of lipoproteins may provide insights into the evolution of the functions of these two groups of lipoproteins and lead to further understanding of the general principles of lipid transport.

In light of these differences in the lipid composition of crustaceans and insects on the one hand and vertebrates on the other, it was of interest to study the lipoprotein of a more basal group, such as the polychaetes, with the purpose of elucidating the location, composition, structure and possible functions of a polychaete annelid lipoprotein, extending from the earlier description based only on electron microscopical observations (Harris et al., 2001). This is the first, albeit partial, characterization of a lipoprotein molecule in a polychaete annelid.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

*Nereis virens* were collected at low tide at Yerseke, Oosterscheldt Bay, The Netherlands, and provided by a commercial bait supplier. The animals were kept moist and transferred to the laboratory within 6 to 8 h. They were kept first for 2 days in artificial seawater (850 mOsm) containing penicillin (0.02%) and streptomycin (0.02%) and then transferred to 40 L trays with aerated artificial seawater and a sandy bottom. The temperature was maintained at  $15 \pm 1$  °C and the photoperiod was set according to the ambient conditions. The sex was determined after puncturing the coelomic cavity with a

fine capillary and examination of the cellular contents under a light microscope.

### 2.2. Collection of coelomic fluid

The animals were cooled to  $-1$  °C for 20–30 min and placed on an ice-cold metal block. A glass capillary was inserted between two parapodia and coelomic fluid was collected by applying gentle pressure on the body. Care was taken not to injure the digestive tract. The clear (hemoglobin-free) coelomic fluid was collected on ice in microcentrifuge vials. The yield was 0.3 to 1.0 mL, depending on the size of the animal. The coelomic fluid samples were centrifuged first at  $150 \times g$  for 3 min to sediment coelomic cells and the supernatant was transferred to new tubes and centrifuged another 3 min at  $15,000 \times g$  to remove cell debris. PMSF (20 mM in DMSO) and EDTA (1 M in distilled water) were added to the clear supernatant, to give a final concentration of 0.1 mM and 5 mM, respectively. Samples were then stored in liquid nitrogen until further use.

### 2.3. Isolation of the lipoprotein

Sudan Black-stained coelomic fluid (see below) was equally mixed with a stock solution of 60% iodixanol (Optiprep®, Sigma), thus generating a 30% of iodixanol solution with a density of  $\sim 1163$  kg/m<sup>3</sup>. The samples were then centrifuged for 3 h in a Beckman Optima Max ultracentrifuge at  $355,000 \times g_{avg}$  at 16 °C using a TLA 120.1 rotor, as described previously (Graham et al., 1996). Fractions containing the colored bands were collected from the centrifuge tubes. After centrifugation, the density of the lipoprotein containing fraction was calculated from the refractive index (Ford et al., 1994) obtained by a hand refractometer (HR 900, A. Krüss).

In some cases, the lipoprotein was precipitated from the corresponding fractions after ultracentrifugation with dextran sulfate/MgCl<sub>2</sub>, according to the method described by Bachorik and Albers (1986), for further purification. In brief, solution A (20 g/L dextran sulfate, pH 7.0) was mixed with an equal volume of solution B (1 M MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) to form the reaction solution. To 100 μL of the lipoprotein sample, 10 μL of the reaction solution was added and incubated for 10 min at room temperature. Finally, the sample was centrifuged at  $1500 \times g_{avg}$  at 4 °C for 30 min in a swing-out rotor. The clear supernatant was discarded and the pellet reconstituted in phosphate buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4).

### 2.4. Gel electrophoresis

Native lipoproteins were electrophoresed on 0.6% agarose gels (9 × 6 cm) prepared in electrophoresis buffer (50 mM barbital–sodium acetate, pH 8.7) (Noble, 1968). To 100 μL of the coelomic fluid or lipoprotein fraction, 4 μL of a stock solution of Sudan Black (0.5% in DMSO) were added and the mixture gently shaken on a rotary shaker for about 30 min. Stained coelomic fluid samples were desalted and equilibrated in electrophoresis buffer by microcentrifuge desalting on

Sephadex G-25 (fine) (Helmerhorst and Stokes, 1980) prior to electrophoresis. The samples were then mixed with one-tenth of volume of a bromophenol blue solution (0.02% in 10% glycerol in electrophoresis buffer) and added to the sample wells. The gels were run for 2 h at 50 V.

Denaturing SDS polyacrylamide gel electrophoresis was carried out in a Mini-Protean® 3 cell (BioRad, Munich, Germany) using 4–20% gradient gels with 4% stacking gels according to Laemmli (1970) with DTT (100 mM) as reducing agent and 2 mM EDTA in the sample buffer.

#### 2.5. Lectin blotting

Purified samples of the lipoprotein were separated by SDS-PAGE (see above) and then transferred onto a nitrocellulose membrane (Schleicher und Schüll, Dassel, Germany). The membrane was blocked overnight with 5% BSA (w/v) in Tris buffered saline (TBS 1, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl). The membrane was then washed two times in TBS 1 and then incubated for 1 h at 37 °C with 10 µg/mL of biotin-labeled lectin (concanavalin A or peanut lectin, both from Sigma) in TBS 2 (TBS1 containing 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM MnCl<sub>2</sub>). After washing the membrane in TBS 2, it was incubated for another hour at 37 °C with 0.05 µg/mL peroxidase conjugated avidin in TBS 3 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 347 mM NaCl). After another washing in TBS 1, the blot was developed by incubation with chloronaphthol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mg/mL chloronaphthol, 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS 1).

#### 2.6. Size exclusion chromatography

Size-dependent separation of the lipoprotein was carried out using a 50 × 1.3 cm Superose 6B column (Pharmacia) with 150 mM NaCl, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4 containing 1 mM EDTA and 0.02% NaN<sub>3</sub> as mobile phase. Sudan Black-stained samples (see above) were injected and chromatographed at a flow rate of 0.5 mL/min. The eluent was monitored spectrophotometrically at 280 nm and 600 nm, for protein and Sudan Black detection, respectively. The column was calibrated using proteins with a wide range of molecular size (keyhole limpet hemocyanin type1, 4.0 MDa; *N. virens* hemoglobin, 3.5 MDa; *Biomphalaria glabrata* hemoglobin, 1.8 MDa; thyroglobulin, 669 kDa; ferritin, 440 kDa; glutamate dehydrogenase, 290 kDa; aldolase, 158 kDa; lactate dehydrogenase, 140 kDa; creatine kinase, 81 kDa; BSA, 67 kDa; chymotrypsinogen A, 25 kDa; DNase I, 31 kDa; lysozyme, 14.3 kDa; iodixanol, 1.55 kDa).

#### 2.7. Electron microscopy

The lipoproteins were transferred onto glow-discharge treated continuous carbon support films, prepared from carbon deposition in vacuo on freshly cleaved mica and negatively stained with 2% w/v aqueous uranyl acetate (pH 4.5), as described (Harris, 1999; Harris et al., 2001). Examination of the specimens was carried out using a Tecnai 12 transmission electron microscope. Electron micrographs were recorded at

instrumental magnifications between 50,000× and 85,000×, using a Mega View III digital camera.

#### 2.8. Lipid analysis

Lipids were extracted from the purified lipoprotein with chloroform-methanol 2:1 (Folch et al., 1957). The extracted lipids were separated on TLC-plates (Polygram®SIL G 0.2 mm silica gel, Macherey-Nagel, Düren, Germany) with hexane-diethylether-glacial acetic acid (60:45:1 v/v/v) as mobile phase (Haunerland, 1998, modified) for neutral lipids and with chloroform-methanol-glacial acetic acid-H<sub>2</sub>O (85:15:10:3.5 v/v/v/v). The separated lipids were either stained by spraying with 0.05 mM 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (hemimagnesium salt) in acetone, with lipid detection under ultraviolet light (254 nm or 366 nm) (Müthing und Kemminer, 1996) or by exposure to iodine vapor (Palumbo and Zullo, 1987).

For the determination of the lipid content, the chloroform-methanol extract was assayed by the sulphophosphovanillin method as described by Barnes and Blackstock (1973), using 3-*sn*-phosphatidylcholine as standard.

#### 2.9. Protein determination

The protein content of the purified lipoprotein was determined by the bicinchoninic acid assay as described by Kaushal and Barnes (1986), using bovine serum albumin as reference.

### 3. Results and discussion

Our study presents the first biochemical characterization of a lipoprotein from a polychaete. Although previous findings from our laboratory had indicated the presence of the lipoprotein in the blood system (Harris et al., 2001), our current data indicates that the lipoprotein is exclusively found in the coelomic fluid. Thus, the earlier data can now be accounted for by seepage from the coelom during veinous puncture, when blood samples were taken.

The iodixanol density gradient centrifugation revealed the presence of the lipoprotein in both sexes. There was no distinguishable difference between samples from male and female worms. The density calculated from the refractive index of the lipoprotein containing fraction yielded a buoyant density between 1054 and 1093 kg/m<sup>3</sup>. Thus, the *N. virens* represents a high-density lipoprotein displaying banding densities between 1030 and 1140 kg/m<sup>3</sup> in iodixanol gradients (Graham et al., 1996). In light of this finding, the *N. virens* lipoprotein seems to be less dense than insect high-density lipoproteins, which are reported to yield a density between 1120 and 1140 kg/m<sup>3</sup> (Ryan et al., 1986; Ryan and van der Horst, 2000; Canavaso et al., 2004; Rodenburg and van der Horst, 2005). Crustacean HDL however show a broader range of buoyant densities between 1080 and 1190 kg/m<sup>3</sup> (see Yepiz-Plascencia et al., 1995). This makes the *N. virens* lipoprotein more comparable to crustacean lipoproteins than to insect lipoproteins. The densities of other invertebrate high-density lipoproteins, such as mollusks, are

also in the range of 1100–1150 kg/m<sup>3</sup> as reported for *Ampullaria canaliculata* (Pollero et al., 1992; Heras and Pollero, 2002).

Nonetheless, it should be considered that the *N. virens* lipoprotein was isolated in an iodixanol gradient in which banding densities are apparently lighter than in salt gradients. This is explained by the fact that iodixanol is isoosmotic and therefore keeps the lipoproteins in their native hydration stage, which is not the case for the highly hyperosmotic salt gradients used in most cases (Graham et al., 1996). Considering this, the densities of the different lipoproteins cannot be directly compared.

### 3.1. Molecular mass

During the agarose gel electrophoresis, Sudan Black-stained lipoprotein migrated as a single band (Fig. 1), with no differences between the sexes (data not shown).

SDS-PAGE of the purified lipoprotein revealed the presence of two subunits in either sex, with a molecular mass of 247±9 kDa (*n*=38) and 85±6 kDa (*n*=22), respectively (Fig. 2a and b). The larger subunit migrated as a sharper band than the smaller subunit, the latter showing a larger standard deviation than the former. The apparent molecular mass of the two *Nereis* apolipoproteins is in the range of the molecular mass of insect apolipoprotein I (240–250 kDa) and apolipoprotein II (75–80 kDa) (Ryan et al., 1990; Weers et al., 1993; Tsuchida et al., 1997), and in that of some crustacean apolipoproteins with similar molecular masses of 210 and 100 kDa (Hall et al., 1995). Komatsu et al. (1993) described several crustacean species and divided them into a “marine” and a “freshwater” type exhibiting three and two types of apoproteins, respectively, with the large apoproteins between 340 and 230 kDa and the small apoproteins with 100 kDa.



Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of Sudan black stained lipoproteins after density gradient ultracentrifugation. 100 µL aliquots were collected from the top of the lipoprotein fraction and 25 µL of the first (left lane), second (middle lane) and third fraction (right lane) were applied to the gel.

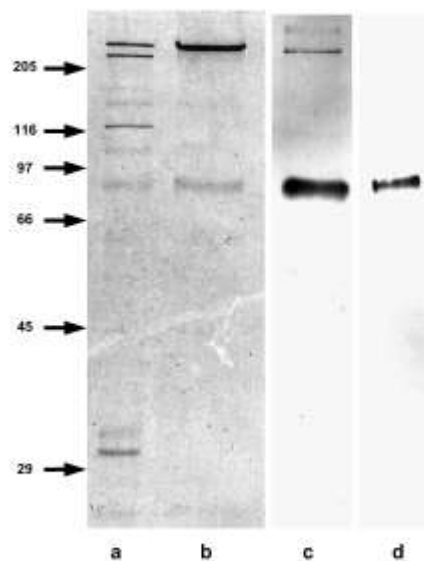


Fig. 2. SDS-PAGE and lectin blots of coelomic fluid and isolated lipoproteins. Coomassie stained coelomic fluid (a) and isolated lipoprotein (b) from the same coelomic fluid. All but the two lipoprotein specific proteins are removed from the sample by ultracentrifugation. Western blot of isolated lipoprotein after lectin staining with concanavalin A (c) and peanut agglutinin (d). Arrows indicate the molecular mass (kDa) of standard proteins. An additional set of high molecular weight marker proteins (17–245 kDa) yielded essentially the same results (data not shown).

In a previous study (Lai et al., 1989), a lipid associated proteoglycan was found in the coelomic fluid of *N. virens*. This proteoglycan showed particular heat sensitivity and a high content of uronic acid, hexosamine and sulfate. Although it has an apparent molecular mass of more than 200 kDa, it can be concluded that this proteoglycan is not identical to the lipoprotein described here. The high content of uronic acids in this proteoglycan would lead to a high negative charge. In contrast, the *N. virens* lipoprotein can be precipitated with dextran sulfate, which is highly negatively charged. In addition, lipoproteins typically exhibit a cationic character due to their high content of lysine and arginine residues, necessary for binding to the lipoprotein receptor (Steyrer et al., 1990). Also, the previously described proteoglycan exhibits a high content of bound carbohydrate, which would lead to broadly smeared bands in SDS-PAGE instead of the distinct protein bands shown here.

The retention time of 19.55 min (Fig. 3) resulted in a theoretical molecular weight of 1.89 MDa as estimated from the retention times of the calibration standards used (see Material and methods section). However, since molecular weight determination by size exclusion chromatography can be unreliable with particles deviating from the ideal globular shape, the volume of the lipoprotein particle was tentatively calculated using a discoidal shape with a diameter of 42 nm and a thickness of 10 nm as derived from the electron micrographs (see below). Since the volume of such a disc would be only



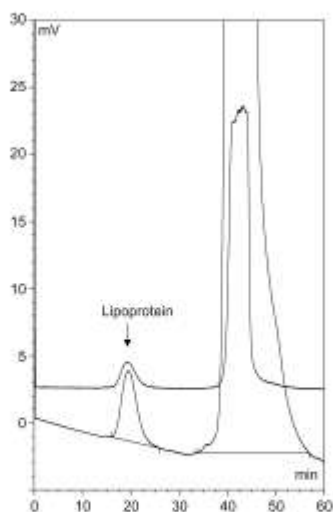


Fig. 3. Elution pattern of Sudan black stained lipoproteins from a Superose 6 column. The upper line shows the absorption of the lipophilic dye Sudan black (600 nm) and the lower line the absorption of the protein moiety (280 nm). The lipoprotein elutes at 19.55 min. The second peak shows the gradient medium iodixanol, which strongly absorbs at 280 nm.

about 35.7% of a sphere with an equivalent diameter, the corrected molecular mass for the discoidal lipoprotein particle would thus be about 675 kDa. This value is similar to insect HDLp, which is reported to have a molecular mass between 450 and 770 kDa (Ryan et al., 1990; Ryan and van der Horst, 2000) and to rat serum HDL (around 600 kDa; Koga et al., 1969). Compared to crustacean lipoproteins, the *N. virens* lipoprotein is rather large. Crustacean lipoproteins involved in clotting have a reported native molecular mass of 420 and 440 kDa for the lipoglycoproteins in *Pacifastacus leniusculus* and *Panulirus interruptus*, respectively (Yepiz-Plascencia et al., 1995).

### 3.2. Lectin blotting

Lectin blotting showed that the two subunits associated with the *N. virens* lipoprotein are glycosylated in a different way (Fig. 2c and d). While Con A stained both subunits, PNA stained only the smaller subunit. Due to the known differential carbohydrate specificity of the two lectins used, Con A generally recognizes mannose-rich carbohydrates that occur in nearly all N-linked glycans, while PNA recognizes Gal- $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3-GalNAc1 $\rightarrow$ Ser/Thr, a structure common to O-linked glycans (Piller and Piller, 1993). We therefore conclude that the large subunit (247 kDa) has only N-linked glycans, while the small subunit possesses both types of carbohydrate structures. Other lipoproteins are likewise glycosylated, which is also the case for insect apolipoproteins (Chung and Ourth, 2002) and crustacean apolipoproteins (Yepiz-Plascencia et al., 1995).

### 3.3. Electron microscopy

In transmission electron microscopy, the *N. virens* lipoprotein displays a characteristic discoidal shape, with an average diameter of  $42 \pm 7.4$  nm ( $n=88$ ) and a thickness of  $10 \pm 2.1$  nm ( $n=41$ ), as judged from the particles orientated in an edge-on position (Fig. 4). However, the overall profile was often a flattened doughnut-shape, with an elevated outer rim and a lower inner sector. This structure is in complete agreement with the discoidal lipoprotein, now thought to be coelomic contaminant, detected previously in blood samples taken from *N. virens* (Harris et al., 2001). The shape of the *Nereis* lipoprotein is somewhat reminiscent of native vertebrate HDL particles secreted from intestine and liver that are also discoidal lipoproteins and consist of a phospholipid bilayer. Mammalian HDL particles then mature by the action of associated lecithin: cholesterol acyltransferase (Mayes, 1990; Koppaka, 2001). The action of this enzyme leads to the incorporation of cholesterol esters, thus converting the originally flat particle to a more globular shape. However, globular particles were not found in the coelomic fluid of *N. virens* and, furthermore, no significant amounts of cholesterol esters were detected in the lipid fraction extracted from the *N. virens* lipoprotein (Fig. 5). It is not known whether in annelids (or any other invertebrate group) lecithin: cholesterol acyltransferase is involved in the maturation of lipoprotein particles. It may be that maturation of HDL particles, with a definable shape change, is restricted to vertebrates.

With respect to size, the *N. virens* lipoprotein differs markedly from those in insects, where lipoproteins with an diameter of  $\sim 18$  nm (HDLp) and 26 nm (LDLp) have been described, while in crustaceans lipoproteins with a  $\sim 16$  nm diameter are known (Spaziani et al., 1986; Ryan et al., 1990; Weers et al., 1993). The diameter of the *N. virens* lipoprotein is more in the range of the vertebrate globular VLDL (80–200 nm;

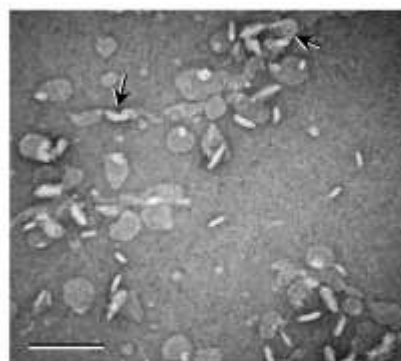


Fig. 4. An electron micrograph of isolated lipoprotein particles from the coelomic fluid of *Nereis virens*, negatively stained with 2% w/v aqueous uranyl acetate. The particles are lying either flat or are supported in an approximately upright position by the negative stain, with some exhibiting folding at their edges (arrows), indicating the flexibility of the discoidal lipoprotein. Scale bar: 100 nm.

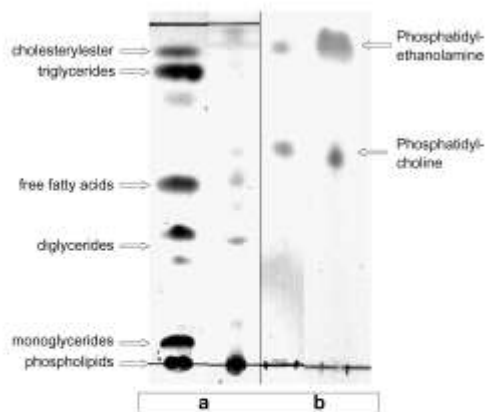


Fig. 5. Thin layer chromatography of *Nereis virens* lipoprotein lipids (a) and phospholipids after staining with iodine vapor (b). (a) Left lane: lipid standards. Right lane: chloroform/methanol extracted lipids (10  $\mu$ g). (b) Left lane: chloroform/methanol extracted lipids (10  $\mu$ g). Right lane: phospholipid standards.

given in Hevonoja et al., 2000) than in the general size range of invertebrate lipoproteins.

The thickness of the *N. virens* lipoprotein molecule at  $\sim 10$  nm compares closely with that of a lipid bilayer (Stryer et al., 2003). With respect to the "doughnut-like" shape of the lipoprotein and the overall dimensions, it seems likely that the *N. virens* lipoprotein is surrounded by at least one of the two apoproteins in a belt-like manner with the lipid bilayer stretched between the protein(s), as proposed for discoidal human HDL (Koppaka, 2001).

#### 3.4. Lipids

Total lipid content of the lipoprotein was 47.9% as determined by the sulphophosphovanillin method. This lipid content is similar to that of *Manduca sexta* HDLp (51.5%), *Locusta migratoria* HDLp (40.8%), *Periplaneta americana* HDLp (49.5%) and *Aedes aegypti* HDLp (42.3%) (Ryan et al., 1986; Canavoso et al., 2001). In crustaceans, lipid contents of 35 and 51% for *Procambarus* sp. and *Callinectes sapidus* have been reported (Lee, 1991), as well 47.6% for the HDL isolated from *P. leniusculus* (Hall et al., 1995) and 50% in *Panaeus vannamei* plasma HDL (Ruiz-Verdugo et al., 1997). In mollusks, the isolated LDL and HDL yielded about 45.5% and 34.4% lipid, respectively (Pollero et al., 1992; Garin and Pollero, 1995).

The female specific lipoproteins, the vitellogenins, on the other hand, exhibit significantly less lipid, e.g. between 7% for vitellin and 9% for vitellogenin in various insect species (Kunkel and Nordin, 1985). In crustaceans, however, the total lipid content of the yolk proteins reaches values between 29% and 43.8% for *Homarus americanus* and *Panaeus vannamei*, respectively (Lee, 1991; Yepiz-Plascencia et al., 2002). Having a lipid content of 16% (Baert et al., 1984), polychaete vitellin possesses an intermediate lipid content compared to insects and

crustaceans. Recently, however, a highly lipidated vitellin has been purified from the oocytes of the polychaete *Neanthes arenaceodentata*, which consist of 42% lipid (Lee et al., 2005).

Thin layer chromatography of the lipids extracted from the *N. virens* lipoprotein showed a predominance of phospholipids and diglycerides, while cholesterol esters and free fatty acids were present only in traces (Fig. 5a). Phospholipid analyses showed the predominance of phosphatidylcholine and, to a lesser extent, the presence of phosphatidylethanolamine (see Fig. 5b). This overall lipid composition resembles the findings from other invertebrate lipoproteins, especially crustaceans (Lee and Puppione, 1978; Spaziani et al., 1986; Hall et al., 1995; Lubzens et al., 1997), but also in insects (Ziegler et al., 1999; Arrese et al., 2001), and some mollusks (Pollero et al., 1992; Garin and Pollero, 1995; Heras and Pollero, 2002), where the major lipoprotein lipid is also phospholipid. This lipid composition is markedly different from that found in vertebrate lipoproteins that are primarily responsible for the transport of cholesterol and free fatty acids (Hevonoja et al., 2000). It can therefore be concluded that the annelid lipoprotein described here has functions other than simply delivering lipids for energy metabolism, which would require higher content of typical storage lipids, such as the triacylglycerols. It is likely that the *N. virens* lipoprotein serves mainly as a carrier for phospholipids involved in membrane biosynthesis. This could indicate an additional role in sexual maturation of *N. virens* when large numbers of germ cells and leucocytes are generated (Hoeger et al., 1999). The lipoprotein of *N. virens* would thus have a more important role in the lipid transport than the female specific VHDL vitellogenin, which has a much lower lipid binding capacity, as judged from the lipid content of its mature form, vitellin (Baert et al., 1984). Studies are in progress to identify target tissues supplied by the *N. virens* lipoprotein.

#### Acknowledgements

This study was supported by the Feldbausch Foundation, University of Mainz.

#### References

- Arrese, E.L., Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Pennington, J.E., Tsuchida, K., Wells, M.A., 2001. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 7–17.
- Babin, P.J., Bogerd, J., Kooiman, F.P., van Marrewijk, W.J.A., van der Horst, D. J., 1999. Apolipoprotein III, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *J. Mol. Evol.* 49, 150–160.
- Bachorik, P.S., Albers, J.J., 1986. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Meth. Enzymol.* 129, 79–100.
- Baert, J.L., Sautiere, P., Porchet, M., 1984. Purification and characterization of oocyte vitellin from *Perinereis cultrifera*. *Eur. J. Biochem.* 142, 527–532.
- Barnes, H., Blackstock, J., 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for "total" lipid analysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12, 103–118.
- Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Kamas, K.J., Pennington, J.E., Wells, M.A., 2001. Fat metabolism in insects. *Ann. Rev. Nutr.* 21, 23–46.

- Camavaso, L.E., Kyung Yun, H., Jouni, Z.E., Wells, M.A., 2004. Lipid transfer particle mediates the delivery of diacylglycerol from lipophorin to fat body in larval *Manduca sexta*. *J. Lipid Res.* 45, 456–465.
- Chung, K.T., Outh, D.D., 2002. Purification and characterization of apolipoprotein III from immature hemolymph of *Heliothis virescens* pupae. *Comp. Biochem. Physiol. B* 132, 505–514.
- Davie, B., Brehelin, 1998. Two major proteins from locust plasma are involved in coagulation and are specifically precipitated by laminarin, a  $\beta$ -1,3-glucan. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 959–967.
- Davie, 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, 9327–9332.
- Fisher, E.A., Pan, M., Chen, X., Wu, X., Wang, H., Jamil, H., Sparks, J.D., Williams, K.J., 2001. The triple threat to nascent apolipoprotein B evidence for multiple, distinct degradative pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 27855–27863.
- Folch, J.M., Lees, M., Sloane-Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Ford, T., Graham, J., Rickwood, D., 1994. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal. Biochem.* 220, 360–366.
- Garin, C.F., Pollero, R.J., 1995. Isolation and characterization of a low-density lipoprotein from plasma of the aquatic snail *Anghullaria canalicularata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 111, 147–150.
- Graham, J.M., Higgins, J.A., Gilfoyl, T., Taylor, T., Wilkinson, J., Ford, T., Billington, D., 1996. A novel method for the rapid separation of plasma lipoproteins using self-generating gradients of iodixanol. *Atherosclerosis* 124, 125–135.
- Hagedorn, H.H., Maddison, D.R., Tu, Z., 1998. The evolution of vitellogenin, cyclorhaphan yolk proteins and related molecules. *Adv. Insect Physiol.* 27, 335–383.
- Hall, M., van Heesden, M.C., 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., Sotterup-Jensen, I., Söderhäll, K., 1999. The crayfish plasma clotting protein: a vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1965–1970.
- Harris, J.R., 1999. Negative staining of thinly spread biological particulates. In: Hajibagheri, N. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 117. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 13–30.
- Harris, J.R., Hoeger, U., Adrian, M., 2001. Transmission electron microscopical studies on some haemolymph proteins from the marine polychaete *Nereis virens*. *Micron* 32, 599–613.
- Haunerland, N.H., 1998. Thin Layer Chromatography. <http://www.sfu.ca/bisc/bisc-429/TLC.html>.
- Helmerhorst, E., Stokes, G.B., 1980. Microcentrifuge desalting: a rapid, quantitative method for desalting small amounts of protein. *Anal. Biochem.* 104, 130–135.
- Heras, H., Pollero, R.J., 2002. Lipoproteins from plasma and perivitelline fluid of the apple snail *Pomacea canalicularata*. *Biocell* 26, 111–118.
- Hevonoja, T., Penttinen, M.O., Hyytiäinen, M.T., Kovanen, P.T., 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.
- Hoeger, U., Rebscher, N., Geier, G., 1999. Metabolite supply in growing oocytes of *Nereis virens*: role of nucleosides. *Hydrobiologia* 402, 163–174.
- Kaushal, V., Barnes, L.D., 1986. Effect of zwitterionic buffers on measurement of small masses of protein with bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 157, 291–294.
- Khovidhunkit, W., Kim, M.-S., Menson, R.A., Shigenaga, J.K., Muser, A.H., Feingold, K.R., Grunfeld, C., 2004. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J. Lipid Res.* 45, 1169–1196.
- Koga, S., Horwitz, D.L., Scam, A.M., 1969. Isolation and properties of lipoproteins from normal rat serum. *J. Lipid Res.* 10, 577–588.
- Komatsu, M., Ando, S., Teshima, S.-I., 1993. Comparison of hemolymph lipoproteins from four species of Crustacea. *J. Exp. Zool.* 266, 257–265.
- Koppaka, V., 2001. Structural studies of discoidal lipoprotein A-I. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 885–893.
- Kunkel, J.G., Nordin, J.H., 1985. Yolk proteins. In: Kerut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, New York, pp. 83–111.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lai, P.-S., So, L.-P., Russell, C.S., 1989. A lipid-associated sulfated proteoglycan from *Nereis* coelomic fluid is a hemagglutinin. *Comp. Biochem. Physiol.* 93 B, 859–865.
- Lee, R.F., 1991. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. In: Gilles, R. (Ed.), *Adv. Comp. Environ. Physiol.*, vol. 7. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 187–207.
- Lee, R.F., Pappione, D.L., 1978. Serum lipoproteins in the spiny lobster *Panulirus interruptus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 59, 239–243.
- Lee, R.F., Walker, A., Reish, D.J., 2005. Characterization of lipovitellin in the eggs of the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 140, 381–386.
- 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 vannamei* (de Haan): apoproteins and lipids. *J. Exp. Zool.* 278, 339–348.
- Mayes, P.A., 1990. Lipid transport and storage. In: Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W. (Eds.), *Harper's Biochemistry*, Appleton and Lange, San Mateo, CA/Norwalk, CT, pp. 234–248.
- Müthing, J., Kemmner, S.E., 1996. Nondestructive detection of neutral glycosphingolipids with lipophilic anionic fluorochromes and their employment for preparative high-performance thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.* 238, 195–202.
- Noble, R.P., 1968. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gels. *J. Lipid Res.* 9, 693–700.
- Olsson, U., Östergren-Lundén, G., Moses, J., 2001. Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction. *Glycoconj. J.* 18, 789–797.
- Palumbo, G., Zullo, F., 1987. The use of iodine staining for the quantitative analysis of lipids separated by thin layer chromatography. *Lipids* 22, 201–205.
- Piller, F., Piller, V., 1993. Structural characterization of mucin-type O-linked oligosaccharides. In: Fukuda, M., Kobata, A. (Eds.), *Glycobiology: A practical Approach*. Oxford Univ. Press, Oxford, pp. 291–328.
- Pollero, R.J., González-Baró, M.R., Garin, C., 1992. Lipid transport in snails. Partial characterization of a high-density lipoprotein isolated from *Anghullaria canalicularata* plasma. *Comp. Biochem. Physiol. B* 102, 717–720.
- Rhoads, D., Brissette, L., 1999. Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 915–931.
- Rodenburg, K.W., van der Horst, D.J., 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.
- Ruiz-Verdugo, L.M., García-Bañuelos, M.L., Vargas-Albore, F., Inocencio, H.-C., Yepiz-Pascencia, G.M., 1997. Amino acids and lipids of the plasma HDL from the white shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Comp. Biochem. Physiol. B* 118, 91–96.
- Ryan, R.O., van der Horst, D.J., 2000. Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Ann. Rev. Entomol.* 45, 233–260.
- Ryan, R.O., Prasad, S.V., Henriksen, E.J., Wells, M.A., Law, J.H., 1986. Lipoprotein interconversions in an insect, *Manduca sexta*: Evidence for a lipid transfer factor in the hemolymph. *J. Biol. Chem.* 261, 563–568.
- Ryan, R.O., van Antwerpen, R., van der Horst, D.J., Boonakkens, A.M.T., Law, J.H., 1990. *Manduca sexta* lipid transfer particle acts upon a lipoprotein to catalyze lipid and apoprotein disproportionation. *J. Biol. Chem.* 265, 546–552.
- Smolenaars, M.M.W., Kasperaats, M.A.M., Richardson, P.E., Rodenburg, K.W., Van der Horst, D.J., 2005. Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein: involvement of flavin in cleavage of the apoB homolog, apolipoprotein-II/I. *J. Lipid Res.* 46, 412–421.

- Spaziani, E., Havel, R.J., Hamilton, R.L., Hardman, D.A., Stodolnick, J.B., Watson, R.D., 1986. Properties of serum high-density lipoproteins in the crab, *Cancer antennarius* Stimpson. *Comp. Biochem. Physiol. B* 85, 307–314.
- Steyrer, E., Barber, D.L., Schneider, W.J., 1990. Evolution of lipoprotein receptors. The chicken oocyte receptor for very low density lipoprotein and vitellogenin binds the mammalian ligand apolipoprotein E. *J. Biol. Chem.* 265, 19575–19581.
- Stryer, L., Berg, J.M., Tymoczko, J.L., 2003. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Tsuchida, K., Soulages, J.L., Moribayashi, A., Suzuki, K., Maekawa, H., Wells, M.A., 1997. Purification and properties of a lipid transfer particle from *Bombix mori*: comparison to the lipid transfer particle from *Manduca sexta*. *Biochim. Biophys. Acta* 1337, 57–65.
- van Hoof, D., Rodenburg, K.W., van der Horst, D.J., 2002. Insect lipoprotein follows a transferrin-like recycling pathway that is mediated by the insect LDL receptor homologue. *J. Cell Sci.* 115, 4001–4012.
- van Hoof, D., Rodenburg, K.W., van der Horst, D.J., 2003. Lipoprotein receptor-mediated lipoprotein endocytosis in insect fat body cells. *J. Lipid Res.* 44, 1431–1440.
- Weers, P.M.M., van Marrewijk, W.J.A., Boenakkers, A.M.T., van der Horst, D. J., 1993. Biosynthesis of locust lipoprotein: apolipoproteins I and II originate from a common precursor. *J. Biol. Chem.* 268, 4300–4303.
- Williams, K.J., Fless, G.M., Petrie, K.A., Snyder, M.L., Brocia, R.W., Swenson, T.L., 1992. Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 267, 13284–13292.
- Yepiz-Plascencia, G.M., Sotelo-Mundo, R., Vazquez-Moreno, I., Ziegler, R., Higuera-Ciapaña, 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., Jiménez-Vega, F., Romo-Figueroa, M.G., Sotelo-Mundo, R.R., Vargas-Albores, F., 2002. Molecular characterization of bifunctional VLDL-CP from the hemolymph of white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 132, 585–592.
- Yokoyama, S., 1998. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1392, 1–15.
- Ziegler, R., Willingham, L.A., Engler, D.L., Tolman, K.J., Bellows, D., van der Horst, D.J., Yepiz-Plascencia, G.M., Law, J.H., 1999. A novel lipoprotein from the hemolymph of the cochineal insect, *Dactylopus confinis*. *Eur. J. Biochem.* 261, 285–290.

## A large discoidal lipoprotein present in only one of two closely related crayfish

Stefanie Stieb · Ulrich Hoeger · Sven Schenk

Received: 19 October 2007 / Revised: 28 March 2008 / Accepted: 31 March 2008 / Published online: 16 April 2008  
 © Springer-Verlag 2008

**Abstract** The hemolymph lipoproteins of two European freshwater crayfish, *Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus*, were isolated and characterized. The former species possesses two sex-independent lipoproteins, which can be related to the formerly described high-density lipoprotein (HDL)/ $\beta$ -glucan binding protein and very high-density lipoprotein/clotting protein from other crustaceans. The latter species, however, contains an additional third lipoprotein with a unique structure. It is a large discoidal HDL with a diameter of 42 nm, a thickness of 7 nm and a density of 1.1 g/ml. SDS-PAGE revealed two different apolipoproteins with molecular masses of 240 and 85 kDa, respectively, arranged in a 1:1 stoichiometry as judged from cross linking experiments. The lipid content of this lipoprotein was 67%, far higher than in every other crustacean lipoprotein described so far. The native molecular mass of this HDL-type lipoprotein was estimated to be about 930 kDa. The lipid content of the other lipoproteins ranged between 25 and 30% for the HDL/ $\beta$ -glucan binding protein and 6–8% for the VHDL/clotting protein.

**Keywords** Crayfish · Lipoprotein · Density gradient ultracentrifugation · Electron microscopy · MALDI-TOF-TOF

### Abbreviations

Aa *Astacus astacus*  
 Al *Astacus leptodactylus*

ANS 8-Anilino-1-naphthalenesulphonic acid  
 BCA Bicinchoninic acid  
 $\beta$ GBP  $\beta$ -Glucan binding protein  
 CP Clotting protein  
 HDL High density lipoprotein  
 LDL Low density lipoprotein  
 LLTP Large lipid transfer protein  
 Lp Lipoprotein  
 MALDI Matrix assisted laser desorption/ionisation  
 TOF Time of flight  
 VHDL Very high density lipoprotein

### Introduction

The transport of hydrophobic molecules such as dietary lipids or hormones through the aqueous body fluids requires the presence of amphiphilic molecules as mediators between these two phases, the lipoproteins. While lipid transport in vertebrates relies on a variety of lipoproteins with various lipid and apoprotein composition (Khovidhunkit et al. 2004), many invertebrates possess only one type of sex-independent lipoprotein, such as the lipophorins in flying insects and chelicerata (Haunerland and Bowers 1987; Lee 1991; Rodenburg and van der Horst 2005; Cunningham et al. 2007) or the recently discovered HDL-type lipoprotein from a polychaete (Schenk et al. 2006), which can arise in different density classes depending on the species or the physiological state. Lipoproteins may serve not only for the transport of lipids through the body cavity, but also for hemolymph clotting and wound closure as shown at least for insect and crustacean lipoproteins (Chung and Ourth 2002; Smolenaars et al. 2005). In the latter group, two types of lipoproteins are generally present: a VHDL-type clotting protein involved in hemolymph coagulation

Communicated by G. Heldmaier.

S. Stieb · U. Hoeger (✉) · S. Schenk  
 Institute of Zoology, Johannes Gutenberg-University,  
 Johannes von Müllerweg 6, 55099 Mainz, Germany  
 e-mail: uhoeger@uni-mainz.de

Springer

and a HDL-type lipoprotein also termed  $\beta$ -glucan binding protein,  $\beta$ GBP. The latter assumes both primitive immune functions and serves for the general lipid transport (Hall et al. 1995; Ruiz-Verdugo et al. 1997; Hall et al. 1999; Kollman and Quispe 2005; Perazzolo et al. 2005).

Insect lipoporphins consist of at least two apoproteins (apolipoprotein I and II) of 220–250 and 75–85 kDa, respectively, which can be accompanied by a third (apolipoprotein III) of about 17 kDa (Rodenburg and van der Horst 2005). The apoprotein compositions of spider lipoporphins and polychaete lipoproteins are strikingly similar, as both lipoproteins contain two apolipoproteins of about 250 and 80–85 kDa (Hauerland and Bowers 1987; Schenk et al. 2006). On the other hand, crustacean lipoproteins are thought to contain only one single apolipoprotein with a mass of  $\sim$ 100 kDa (Lee and Puppione 1978; Puppione et al. 1986; Hall et al. 1995; Yepiz-Plascencia et al. 1995; Lubzens et al. 1997). Although there are some other findings regarding the subunit structure of crustacean lipoproteins, Komatsu et al. (1993) describe a fresh water and a salt water pattern of lipoproteins consisting of either two or three apolipoproteins with molecular masses between 340 and 230 kDa for the large and  $\sim$ 100 kDa for the small subunit(s), respectively. Spaziani et al. (1995) also described three apoproteins in the lipoprotein of a crab.

Despite their differences in apoprotein composition, the lipid to protein ratio seems to be more or less constant in the invertebrate lipoproteins investigated so far, i.e. between  $\sim$ 30 and  $\sim$ 50% (Ryan et al. 1986; Lee 1991; Ruiz-Verdugo et al. 1997; Schenk et al. 2006). Regarding the lipid composition, phospholipids (especially phosphatidylethanolamine) seem to be the predominant species which discriminates invertebrate from vertebrate lipoproteins where cholesterol esters are the predominant lipid class. Amongst the neutral lipids, diacylglycerols represent the major lipid class in most invertebrates while triacylglycerols are dominating in vertebrates, chelicerates and mollusks (Hevonoja et al. 2000; Heras and Pollero 2002; Smolenaars et al. 2007b).

Other differences between the invertebrate and vertebrate lipoproteins investigated to date is their markedly different morphology. While the lipoporphins are thought to be globular (Ryan 1994) as are the vertebrate lipoproteins, the crustacean lipoproteins are thought to be of a more irregular somewhat discoidal shape (Lee and Puppione 1978; Spaziani et al. 1986), while the polychaete high-density lipoprotein is a true discus (Harris et al. 2001; Schenk et al. 2006).

Crustacean lipoproteins other than shrimp have been scarcely investigated so far and studies on freshwater crayfish are nearly completely lacking (Lee and Puppione 1978; Spaziani et al. 1986; Hall et al. 1995). The following study was carried out on two European freshwater crayfish species, *Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus*. Here we show that a third, sex-independent lipoprotein is present in

freshwater crayfish which surprisingly was found only in one of the two closely related species.

## Materials and methods

All chemicals were of the highest available grade and obtained from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany), Roth (Karlsruhe, Germany), Fisher Scientific (Loughborough, UK), AppliChem (Darmstadt, Germany) and Acros Organics (New Jersey, USA).

## Animals

Living *A. astacus* and *A. leptodactylus* were obtained from commercial suppliers (Erste Bayerische Satzkrebszucht, Augsburg, Germany and Firma Edelfisch, Frankfurt am Main, Germany, respectively). The crayfish were kept in aerated running tap water in  $1 \times 0.5 \times 0.5$  m stone basins at 18°C with a 14/10 h light/dark cycle. They were fed pieces of fish weekly.

## Collection of hemolymph

The animals were cooled down on ice and a hypodermic syringe was inserted into the cardiac sinus. The hemolymph was collected in pre-cooled centrifugation tubes and diluted approximately 1:1 with crayfish ringer (225 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, pH 7.1). Hemocytes were pelleted first for 1 min at  $1,000 \times g$  at 4°C and the supernatant was recentrifuged for 10 min at  $4,500 \times g$  at 4°C to further pellet cell debris. The clear supernatant was shock frozen in liquid nitrogen and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until further use. Only intermolt cycle animals ( $\sim$ 25 of each sex) were used and bled throughout the year.

## Density gradient ultracentrifugation

The lipoproteins were isolated by a two step density gradient ultracentrifugation. The cell free hemolymph was brought to a density of 1.350 g/ml by addition of solid KBr and then centrifuged for 3 h at 4°C at  $417,000 \times g_{\text{av}}$  to float and concentrate the hemolymph lipoproteins and to pellet the hemocyanin. The lipoproteins were recovered from the top of the tube and readjusted to a density of 1.350 g/ml with solid KBr. Phosphate buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 mM KCl, 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4,  $\rho_{20^\circ\text{C}} = 1.006$  g/ml) was adjusted to different densities (1.300, 1.250, 1.200, 1.150, 1.100, 1.050 g/ml) by the addition of solid KBr and, together with the sample, layered in a centrifuge tube starting with the highest density at the bottom and ending with PBS on top. The samples were spun using a MLS 50 swing out bucket rotor in a Beckman

Optima MAX<sup>TM</sup> ultracentrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, USA) at  $200,000\times g_{avg}$  for 16 hours at 4°C with slow acceleration and brakes off. The lipoproteins were then extensively dialyzed against PBS containing 1 mM EDTA, finally made 0.02% in  $\text{NaN}_3$  and stored at 4°C. The densities of the isolated lipoproteins were calculated from the refractive indices determined with a HR 900 hand refractometer (A. Krüss, Hamburg, Germany), using the tables given in Weast (1974).

#### Protein determination

The total protein content was determined using the BCA-Assay (Smith et al. 1985) with BSA as standard.

#### SDS-PAGE

SDS-PAGE was performed according to Laemmli (1970) with 50 mM DTT as reducing agent in the sample buffer. Prior to electrophoresis, the samples were incubated for 5 min at 95°C. The lipoproteins were then separated on 3.5–15% gradient gels or on 6% gels using 3.5% stacking gels. Gels were run at 200 V and stained with Coomassie Brilliant Blue. Molecular mass standards (in kDa) were keyhole limpet hemocyanin (400), myosin (200),  $\beta$ -galactosidase (116), phosphorylase B (97), bovine serum albumin (66), ovalbumin (45) and carboanhydrase (29).

#### Chemical cross linking with glutaraldehyde

Apoproteins were cross linked in the presence of 0.025% glutaraldehyde for 30 minutes at room temperature. The reaction was stopped by making the samples 0.1 M in Tris by the addition of 1/10 vol of a 1 M Tris/HCl, pH 7.5, solution.

#### Gel filtration

Size-dependent separation of the lipoproteins was carried out using a  $50 \times 1.3$  cm Superose 6B column (Pharmacia, Freiburg, Germany) with a mobile phase consisting of 150 mM NaCl, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4, containing 1 mM EDTA and a flow rate of 0.5 ml/min. The eluent was monitored at 280 nm. The column was calibrated using proteins with a wide range of molecular masses (*Nereis virens* hemoglobin (3.5 MDa), tyroglobulin (669 kDa), ferritin (440 kDa), aldolase (158 kDa), BSA dimer (134 kDa), DNase I (31 kDa), lysozyme (14.3 kDa)). The identity of the peaks was ascertained by SDS-PAGE.

#### Lectin blotting

Samples were separated by SDS-PAGE (3.5–15%; see above) and then blotted onto a nitrocellulose membrane

(Bolt and Mahoney 1997). The membrane was blocked for 1 h with blocking buffer (5% BSA (w/v) in TBS 1: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl). After washing two times in TBS 1, the membrane was incubated with biotin labeled lectins (from *Canavalia ensiformis* and *Arachis hypogaea*, both from Sigma, dissolved in TBS 2: TBS 1 containing 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 mM  $\text{MnCl}_2$ ) for 1 h at 37°C. The membrane was then washed two times in TBS 2 and incubated with peroxidase conjugated avidin (0.05  $\mu\text{g/ml}$  in TBS 3: 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 347 mM NaCl). After another wash with TBS 1, the membrane was developed with chloronaphthol/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.5 mg/ml chloronaphthol, 0.005%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in TBS 1).

#### Total lipids

Total lipid content of the lipoproteins was determined by the use of the fluorogenic probe ANS (Stieb, Schenk and Hoeger, in preparation). Briefly, the lipoproteins were dried down in a vacuum-concentrator and extracted twice by the addition of 100  $\mu\text{l}$  chloroform/methanol 2:1. Both extracts were pooled and dried down again in vacuo. PBS (500  $\mu\text{l}$ ) was added and the lipids were emulsified by sonication ( $3 \times 10$  s). The samples were then made 0.1 mM with ANS added from a stock solution of ANS (10 mM in 3% DMSO/PBS). The fluorescence was measured in a Perkin Elmer LS 50 B luminescence spectrometer with an excitation wavelength of 395 nm and emission at 490 nm. Phosphatidylcholine served as standard and was treated likewise.

#### Electron microscopy

The lipoproteins were negatively stained with 2% (w/v) aqueous uranyl acetate (pH 4.5) after being transferred onto glow-discharge treated continuous carbon support films, prepared from carbon deposition in vacuo on freshly cleaved mica, as described (Harris 1999; Harris et al. 2001). Examination of the specimen was carried out using a Technai 12 transmission electron microscope. Electron micrographs were recorded at instrumental magnifications between  $49,000\times$  and  $150,000\times$ , using an attached Olympus MegaView III digital camera.

#### Analysis by MALDI-TOF-TOF

Coomassie stained lipoprotein polypeptides of Lp 1, Lp 1b and Lp 2 were excised from SDS gels and subjected to tryptic in gel digestion following MALDI-TOF-TOF analysis of the fragments after reduction and alkylation. The analysis was carried out by ChromaTec GmbH, Greifswald, Germany, using an Applied Biosystems model 4800 MALDI TOF/TOF analyzer. The peptide masses were searched against the MSDB database using the Mascot analysis

tool (<http://www.matrixscience.com>). Search parameters allowed for a mass accuracy of  $\pm 50$  ppm, one missed cleavage of trypsin, oxidation of methionine, and carbamido-methylation of cysteine. The three peaks with the highest intensity were further analyzed by MS/MS applying the same parameters as above, with a fragment tolerance of 0.6 Da.

## Results

### Isolation

Density gradient ultracentrifugation in KBr revealed the presence of two different sex-independent lipoproteins in the noble crayfish *A. astacus* and three different sex-independent lipoproteins in the galician crayfish *A. leptodactylus* (Aa Lp 1 and 2 and Al Lp 1a, 1b and 2, respectively) (Fig. 1). The lipoproteins belonged to the HDL or VHDL class with densities of 1.14 and 1.23 g/ml for Aa Lp 1 and 2, respectively and 1.10, 1.16 and 1.24 g/ml for Al Lp 1a, 1b and 2, respectively, as determined by refractometry.

### Electron microscopy

The different lipoproteins isolated from the two freshwater crayfish could be clearly discriminated from each other by electron microscopy regarding to shape and size. While Aa Lp 1 and Al Lp 1b seem to be more or less globular shaped

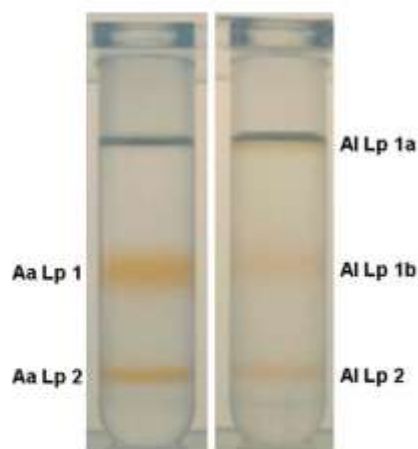
proteins with a diameter of approximately 6 nm, Aa and Al Lp 2 seem to be somewhat larger, i.e. 7 nm and more triangular with a small cavity in the midst (not shown). In contrast to these albeit slightly irregular lipoproteins the newly discovered Al Lp 1a seems to be of discoidal shape, resembling a doughnut, with a diameter of approximately 42 nm and a thickness of about 7 nm (Fig. 2). It appears that the edge of the lipoprotein is somewhat elevated above the center indicating that the more electron dense protein moiety is located on the outside of the protein while the lipids seem to be located in the center.

### SDS-PAGE

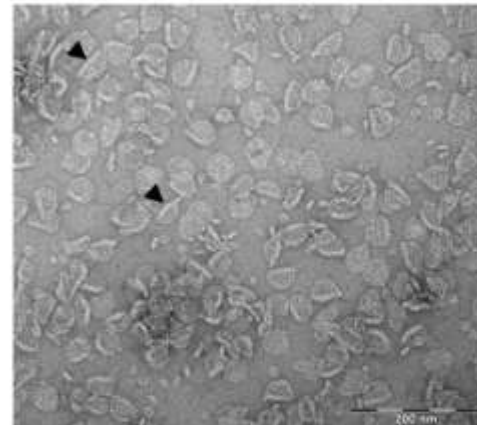
SDS-PAGE showed characteristic apoprotein patterns for each of the isolated lipoproteins. The *A. astacus* lipoproteins 1 and 2 and *A. leptodactylus* lipoproteins 1b and 2 showed the apolipoprotein patterns expected from other crustaceans. Aa Lp 1 showed a single apoprotein of about 105 kDa with a minor band at about 100 kDa; Al Lp 1b exhibited a single band at 110 kDa. Both Aa Lp 2 and Al Lp 2 showed a single band of about 190 kDa with a second band presumably representing a degradation product which was found to increase with prolonged storage. The novel Al Lp 1a consisted of two apolipoproteins of 240 kDa for the larger and 85 kDa for the smaller subunit, respectively (Fig. 3).

### Chemical cross linking

Using the bifunctional cross linker glutaraldehyde to reveal the stoichiometry of the apolipoproteins led to clear results

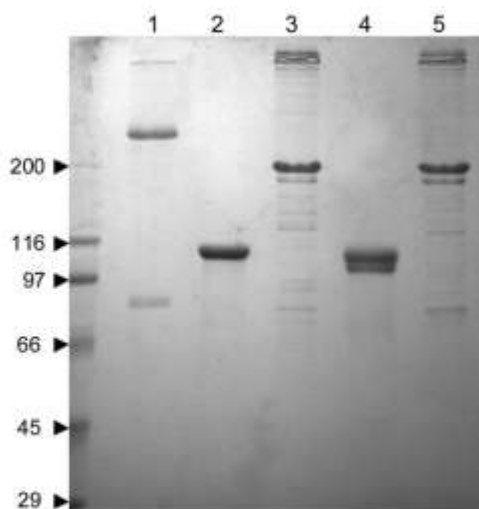


**Fig. 1** Purification of the crayfish hemolymph lipoproteins by KBr density gradient ultracentrifugation. *Left tube* *Astacus astacus* lipoproteins. *Right tube* *Astacus leptodactylus* lipoproteins, the presence of three different hemolymph lipoproteins is clearly visible. The *Astacus leptodactylus* Lp 1a is located directly beneath the meniscus



**Fig. 2** Electron micrograph of Al Lp 1a, negatively stained with 2% uranyl acetate. The proteins are either lying flat or are supported in an almost upright position by the negative stain (*arrowheads*). Scale bar 200 nm





**Fig. 3** Coomassie stained SDS-PAGE (3.5–15%) of the isolated lipoproteins. Lane 1 A1 Lp 1a, Lane 2 A1 Lp 1b, Lane 3 A1 Lp 2, Lane 4 Aa Lp 1, Lane 5 Aa Lp 2. It is evident that the lipoproteins are purified to homogeneity by KBr density gradient ultracentrifugation. Arrowheads indicate molecular mass standards, values are given in kDa

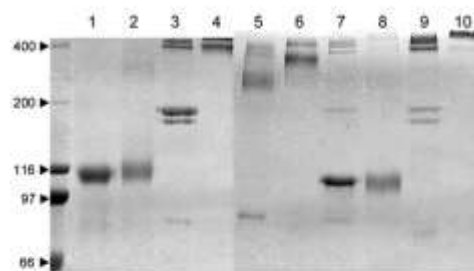
in the case of Aa Lp 2 and A1 Lp 2 and A1 Lp 1a. While the respective Lp 2's formed an aggregate corresponding to ~400 kDa, the cross linking of the A1 Lp 1a subunits led to a polypeptide with ~335 kDa. The cross linking of Aa Lp 1 and A1 Lp 1b, however, yielded not as clear results as the other crayfish lipoproteins as no clearly visible band could be detected. Any attempt to obtain a clear banding pattern resulted only in some very high molecular species and a faint smeared band with a molecular mass of ~200 kDa, which could represent a dimer (Fig. 4).

#### Lipid content

The total lipid content of the lipoproteins (Table 1) showed remarkable similarities between Aa Lp 1 and A1 Lp 1b and between Aa Lp 2 and A1 Lp 2 having a total lipid content of 31 and 25% for the former two and 6 and 8% for the latter lipoproteins. In contrast, A1 Lp 1a yielded a total lipid content of 67% as determined by the ANS fluorescence method.

#### Gel filtration

The different lipoproteins showed unique elution patterns when analyzed by size exclusion chromatography (Fig. 5). The native molecular masses obtained by comparison with the standard proteins used yielded masses of 317 kDa for



**Fig. 4** Coomassie stained SDS-PAGE (6%) of the isolated and chemically cross linked apolipoproteins. Lane 1 Aa Lp 1, Lane 2 Aa Lp 1 glutaraldehyde cross linked, Lane 3 Aa Lp 2, Lane 4 Aa Lp 2 glutaraldehyde cross linked, Lane 5 A1 Lp 1a, Lane 6 A1 Lp 1a glutaraldehyde cross linked, Lane 7 A1 Lp 1b, Lane 8 A1 Lp 1b glutaraldehyde cross linked, Lane 9 A1 Lp 2, Lane 10 A1 Lp 2 glutaraldehyde cross linked. Arrowheads indicate molecular mass standards, values are given in kDa

Aa Lp 1 and A1 Lp 1b, of 415 kDa for Aa Lp 2 and of 495 kDa for A1 Lp 2. The native molecular mass for A1 Lp 1a could not directly be read from the retention time of the protein as it is a discoidal protein and the column was calibrated with globular proteins. Direct comparison of the obtained retention time with that of the standard proteins would therefore lead to a considerable overestimation. To overcome this problem, the apparent molecular mass calculated from the standard curve (3,740 kDa) was corrected by the assumption that a discoidal protein with a diameter of 42 nm and a thickness of 7 nm, as judged by electron microscopy, would have only 25% of the volume of that of a sphere of equivalent diameter. This, in turn, would lead to a corrected molecular mass of 935 kDa. This value was in excellent agreement with the molecular mass calculation obtained by taking the molecular mass of the individual apoproteins (obtained by SDS-PAGE), their subunit association (as revealed by the cross linking experiments) and the lipid content (ANS-method) into account (Table 1).

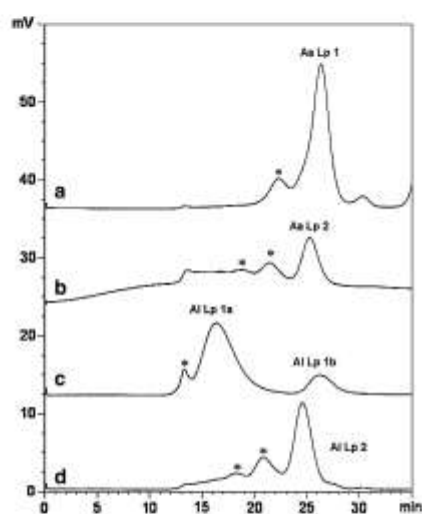
#### Lectin blotting

Probing the blotted lipoproteins with concanavalin A and peanut lectin led to a clear signal only in the case of ConA (Fig. 6). This indicates that the lipoproteins contain only N-linked glycans as ConA generally recognizes mannose rich carbohydrates which occur in nearly all N-linked glycans, while PNA recognizes Gal- $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3-GalNAc1 $\rightarrow$ Ser/Thr, a structure common to O-linked glycans. It can be judged from the intensity of the bands that the VLDL/CP's are more heavily glycosylated than the  $\beta$ GBP/HDL's and A1 Lp 1a. For A1 Lp 1a the staining pattern suggests that the smaller subunit bears the majority of the glycans while the 240 kDa peptide is not as heavy glycosylated.

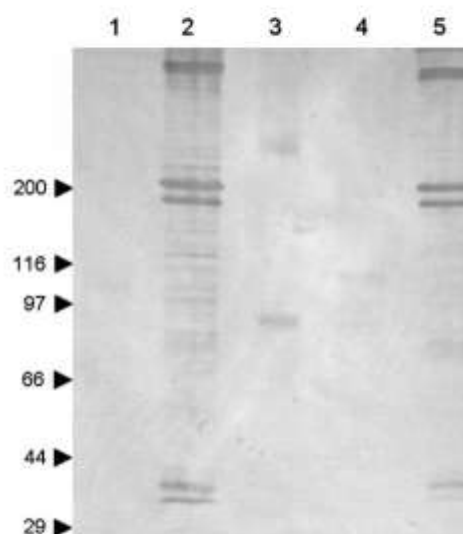
**Table 1** Comparison of crayfish lipoproteins

Lipoprotein	Apoproteins (kDa)	Subunit composition	Calculated molecular mass (protein) (kDa)	Lipid (%)	Calculated molecular mass (protein + lipids) (kDa)	Molecular mass (gel filtration) (kDa)
Al Lp 1a	240, 85	Heterodimer	325	66.5	970	935
Al Lp 1b	110	Homodimer	220	25	275	318
Al Lp 2	190	Homodimer	380	8.5	415	496
Aa Lp 1	105 (100)	Homodimer	210	31	275	316
Aa Lp 2	190	Homodimer	380	6	404	413

Aa *Astacus astacus*; Al *Astacus leptodactylus*; Lp lipoprotein



**Fig. 5** Elution patterns of the lipoproteins from a Superose 6B column. The eluent was monitored at 280 nm. **a** Aa Lp 1, eluting at 26.35 min. **b** Aa Lp 2, eluting at 25.57 min. **c** Al Lp 1a and Al Lp 1b, eluting at 16.35 and 26.33 min, respectively. **d** Al Lp 2, eluting at 24.53 min. Asterisks indicate aggregates



**Fig. 6** Western blot probed with Con A for the presence of N-linked carbohydrates. Lane 1 Aa Lp 1, Lane 2 Aa Lp 2, Lane 3 Al Lp 1a, Lane 4 Al Lp 1b, Lane 5 Al Lp 2. Arrowheads indicate molecular mass standards, values are given in kDa

#### MALDI-TOF-TOF analysis

MALDI-TOF-TOF analysis of the most intense tryptic fragments (see materials and methods section) of Al Lp 1b and Aa Lp 1 identified a 1,784 Da peptide present in each of the apoproteins with ion scores of 52 and 75, based on the Mowse algorithm (Pappin et al. 1993), for *A. astacus* and *A. leptodactylus*, respectively. Based on this algorithm, ion scores of > 46 indicate identity or extensive homology ( $P < 0.05$ ) with the search parameters applied. MS/MS fragmentation pattern of the 1,784 Da peptide strongly suggests the identity with a heptadecapeptide (IEST-LTPLPALVFGIGR) located between the amino acid

residues 1,087 and 1,103 in the sequence of the  $\beta$ GBP of *Pacifastacus leniusculus* (Swiss-Prot accession no. Q26048; Cerenius et al. 1994). The two other fragments (1,511 and 2,152 Da for *A. astacus* and 1,510 and 1,725 Da for *A. leptodactylus*) subjected to MS/MS, however, yielded ion scores of only 24 and 13 for the fragments of *A. astacus* and 26 and 31 for the fragments of *A. leptodactylus* and were not considered as relevant hits (Table 2).

In contrast, no significant similarities were found for the MALDI fragment patterns of the Al Lp 2 and Aa Lp 2 applying the same search parameters. As our biochemical data suggested that both Lp 2's resemble the clotting proteins of other crustaceans (Hall et al. 1995, 1999; Yeh et al.

**Table 2** MS/MS search results of tryptic digests of the *Astacus astacus* Lp 1 and *Astacus leptodactylus* Lp 1b

Species	Match	Accession number (Swiss-Prot)	Peptide	Ion score	Matches/total fragment ions
Al	1,3-beta-D-glucan-binding protein precursor ( <i>Pacifastacus leniusculus</i> )	A55301	IESTLTPLPALVFGIGR	75	12/277
	Hypothetical protein ( <i>Dicryostellium discoideum</i> )	Q54YM2	ELIPMINNLMYIK	31	
	Methylenetetrahydrofolate reductase ( <i>Ralstonia metallidurans</i> )	Q1LJ15	IASFALKLESFIQR	26	
Aa	1,3-beta-D-glucan-binding protein precursor ( <i>Pacifastacus leniusculus</i> )	A55301	IESTLTPLPALVFGIGR	52	9/277
	Septum site-determining protein MinC ( <i>Lactobacillus plantarum</i> )	Q88UY3	QEASFDDIMVDLK	24	
	Putative chromosome segregation protein, SMC ATPase superfamily ( <i>Prochlorosoccus marinus</i> )	Q7V5H6	KPDNADSSSTMIGKAFELVR	13	

Aa *Astacus astacus*; Al *Astacus leptodactylus*

1999) we used theoretical peptide fragments derived from the sequences available for the clotting proteins of *P. leniusculus* (Swiss-Prot accession no. Q9UAR3), *Penaeus monodon* (no. Q9U572), *P. japonicus* (no. A7YIH6) and *P. vannamei* (no. A8DR94) for cross species comparison. The PeptideMass program (<http://www.expasy.org>) was used for the generation of fragment patterns to be searched against the MSDB database applying the same parameters as for the  $\beta$ GBP's. Even among these clotting proteins, however, no similarities were detected.

## Discussion

Isolation of the hemolymph lipoproteins from *A. astacus* and *A. leptodactylus* clearly showed the existence of two and three different sex-independent lipoproteins, respectively. All the lipoproteins belonged to the HDL or VHDL class, as expected for crustacean lipoproteins. The appearance of two lipoproteins, a HDL and a VHDL, in the hemolymph of the noble crayfish resembles the findings of the previously described hemolymph lipoproteins from the signal crayfish *P. leniusculus* (Hall et al. 1995). The appearance of three different sex independent lipoproteins in a crustacean hemolymph on the other hand is to our knowledge unique.

As judged from the specific density, the composition and the molecular mass of the apoproteins, the two high-density lipoproteins Aa Lp 1 and Al Lp 1b conform to the  $\beta$ GBP type. Our view is supported by the analysis of tryptic fragment patterns by MALDI-TOF-TOF, in which both the Aa Lp 1 and Al Lp 1b showed a significant similarity with the  $\beta$ GBP from *P. leniusculus* (Cerenius et al. 1994). They can therefore be named alike in the two *Astacus* species studied

here. Analysis of the peptide fragment patterns of Aa Lp 2 and Al Lp 2 on the other hand did not show any similarity with the published sequences of other crustacean clotting proteins. This however does not rule out that they are indeed the proposed hemolymph clotting proteins. Although the clotting proteins group together in phylogenetic trees (Avarre et al. 2007) based on nucleotide sequences, they could display higher amino acid sequence variability as the  $\beta$ GBP, which could obscure similarities based on the peptide fragment comparison.

The third lipoprotein from *A. leptodactylus* resembles the lipoprotein found in the polychaete *Nereis virens* (Schenk et al. 2006).

## Electron microscopy

The doughnut like shape of the Al Lp 1a is very similar to the lipoprotein isolated from *Nereis virens* (Schenk et al. 2006) indicating a conserved structural appearance of these large discoidal lipoproteins. We suggest that such a large discoidal shape may represent a 'prototype' form of lipoprotein architecture, as this kind of lipoprotein morphology is not known from more evolved groups such as insects and vertebrates. This view is further supported by the finding that the lipophorin from a primitive chelicerate, the horse-shoe crab *Limulus polyphemus*, is also discoidal in appearance with strikingly similar dimensions (Schenk, Stieb and Hoeger, unpublished). In vertebrates (i.e., humans), such discoidal lipoproteins have been found as transient HDL-particles rich in phospholipids and free cholesterol which mature to a final spherical size as a result of the formation of cholesterol esters catalyzed by the enzyme, lecithin:cholesterol-acetyltransferase (Khovidhunkit et al. 2004). Nothing is known about the activity of this enzyme in

crustaceans, however, which could influence the shape of the discoidal lipoprotein by its supply with cholesterol esters.

#### SDS-PAGE

The two HDL/ $\beta$ GBP lipoproteins from *A. astacus* and *A. leptodactylus* with their molecular masses of about 105 kDa and the two VHDL/CP's (190 kDa) correlate to previous results (Hall et al. 1995; Yepiz-Plascencia et al. 1995, 1998), whereas the AI Lp 1a from *A. leptodactylus* with its two subunits (240 and 85 kDa) has never been detected in crustacea, though lipoproteins with a similar subunit composition have already been observed in many insects (Ryan et al. 1990; Weers et al. 1992, 1993; Tsuchida et al. 1997) as well as in spiders (Haunerland and Bowers 1987; Cunningham et al. 1994) and the polychaete *Nereis virens* (Schenk et al. 2006). This could indicate that the appearance of two apolipoproteins is a common pattern in invertebrates and may be indicative for a "primitive" lipoprotein subunit composition. This is further supported by the finding that even the lipophorin from the "living fossil" *Limulus polyphemus* has very similar apoprotein patterns (Rehn and Lee 1994).

#### Chemical cross linking

Chemical cross linking led to the finding of dimers throughout the investigated lipoproteins. Both Lp 2's had a cross linked molecular mass of ~400 kDa indicating the presence of dimeric subunit organization as also shown for the crustacean clotting proteins so far (Hall et al. 1995; Komatsu and Ando 1998; Hall et al. 1999; Kollman and Quispe 2005). The cross linking of the Aa Lp 1 and AI Lp 1b led to rather poor results. Although one could detect a faint band indicating a dimer the vast majority of the proteins were not cross linked under our experimental conditions. Extending the incubation time led to higher molecular mass aggregates whereas shorter showed no cross linking at all. This could be due to the higher molarity of the apoproteins, which would then more readily form intermolecular cross links between neighboring molecules than intramolecular cross links.

The cross linked subunits of the AI Lp 1a showed a molecular mass of 335 kDa, thus indicating a 1:1 stoichiometry of the subunits. Interestingly, the apolipophorin I and II of the insect lipophorins show a 1:1 stoichiometry as they originate from a common precursor which is then cleaved by an intracellular furin type protease (Weers et al. 1993; Smolenaars et al. 2005; Smolenaars et al. 2007a). As the apolipophorin III precursor is a mammalian apolipoprotein B homologue and is clustering together with this protein in phylogenetic trees of the LLTP superfamily

(Avarre et al. 2007; Smolenaars et al. 2007a) it could be assumed that the apolipoproteins of AI Lp 1a would also group with these proteins. This would be of general interest in the light of the molecular evolution of the LLTP superfamily as it is considered until now that female-specific crustacean vitellogenins are grouping within the apoB cluster, while the apolipoproteins of the sex-independent  $\beta$ GBP/HDL's are not present in these phylogenetic trees. The VHDL/CP's, on the other hand, are grouping within the vitellogenin-branch of these trees (Avarre et al. 2007). Studies are currently undertaken in our laboratory to prove this hypothesis.

#### Lipid analysis

The absolute lipid content of the lipoproteins was determined with the ANS-fluorescence method. Remarkable is the strikingly high lipid content of AI Lp 1a clearly exceeding the 50%-proportion, which therefore seems to have a far higher lipid transport capacity than any described crustacean lipoprotein. The lipid contents of the analyzed clotting proteins correspond with data from Komatsu and Ando (1998); the CP's have a total lipid content between 6 and 8% in both our and Komatsu's studies. Not in agreement are our results on the lipid content and the literature data concerning the  $\beta$ GBP's. The lipid content of 30% measured in this work is notably lower than the 50% observed by Vargas-Requena et al. (2002) and Hall et al. (1995). In *A. leptodactylus*, the lower lipid content of  $\beta$ GBP could be compensated for by AI Lp 1a with its high lipid content of ~67%, which then could allocate for the missing lipid transport capacity. In *A. astacus*, however, there was no such high lipid bearing lipoprotein, so it may be that this species overcomes the lacking lipid transport capacity by a higher titer of the  $\beta$ GBP/HDL.

#### Gel filtration

Determination of the native molecular masses via gel filtration led to results which fit with the quantitative lipid analysis (see Table 1). The estimated molecular mass of AI Lp 1a (935 kDa) is the sum of the lipoproteins' two subunits (240 + 85 kDa = 325 kDa, 1:1 stoichiometry) and its bound lipids (66.5%): 325 kDa/33.5% = 970 kDa. This dimension exceeds any invertebrate mass range, which show molecular masses between 420 and 770 kDa (Ryan et al. 1990; Yepiz-Plascencia et al. 1995) for  $\beta$ GBP and HDLp. This value is also supported by analytical ultracentrifugation studies which led to a molecular mass of ~930 kDa (Schenk, Stieb and Hoeger, in preparation).

As the cross linking results indicate a mainly dimeric occurrence of the  $\beta$ GBP's apoproteins, the molecular weights theoretically result from twice the subunit mass

of ~105 kDa (together ~210 kDa) and the lipid part (30%), which leads to a native molecular mass of ~300 kDa and comes close to the measured ~315 kDa. A monomeric elution peak was not visible under the used experimental conditions.

The clotting protein from *A. leptodactylus* has, according to our determination, a native molecular mass of 495 kDa, which is a quite high value for the CP consisting of two identical subunits of 190 kDa each and of 8.5% lipids, altogether at most 415 kDa. Aside from the theoretical calculation, values of 420 kDa have been reported for clotting proteins of other crustaceans (Kollman and Quispe 2005). It seems more likely that the overestimated molecular mass is a result from gel filtration rather than from an underestimated lipid content. In contrast, the molecular mass for the Aa Lp 2 (413 kDa) fits very well to the values given in literature and the calculation as shown in Table 1.

#### Lectin blotting

As evident from the lectin blots (see Fig. 6) none of the investigated apolipoproteins contains any O-linked sugars, as probing the proteins with peanut lectin was negative, while all of them seem to possess N-linked carbohydrate structures, as judged from the interaction with Con A, which recognizes mannose rich carbohydrates as well as  $\alpha$ -D-glucose.

As the carbohydrate moiety of the  $\beta$ GBP's investigated so far appears to consist only of N-linked oligosaccharides (Yepiz-Plascencia et al. 1995) these results were not unexpected for the  $\beta$ GBP's investigated in this study. For the *A. leptodactylus* specific Lp 1a, the absence of O-linked sugars is unexpected due to its remarkable similarities to the *N. virens* HDL, which is obviously O-glycosylated (Schenk et al. 2006). On the other hand, the well characterized insect lipophorins also lack O-glycosylation (Weers et al. 1993), which then in turn could be a common pattern among crustacean and other arthropod lipoproteins in contrast to the more "basal" annelid lipoprotein. As studies regarding the glycosylation patterns of the crustacean clotting proteins are scarce it can not be directly ruled out that there are O-linked sugars generally missing, but due to the finding that the  $\beta$ GBP's and the insect lipophorins, the tiger shrimp clotting protein (Yeh et al. 1999) as well the herein investigated VHDL/CP contain only N-glycans it can be assumed that this again is a common pattern in arthropod immune active proteins. This in turn would lead to the question why invertebrates can forgo on O-linked carbohydrates on their immune active proteins while vertebrates seem to essentially rely on the very existence of these O-linked sugars (Tsuboi and Fukuda 2001).

The degree of glycosylation seems to be low in invertebrate lipoproteins in general. The total carbohydrate content

in the  $\beta$ GBP of *A. leptodactylus* was found to be only 0.44% (w/w) (Stieb, unpublished) which is consistent with the presence of only two glycosylation sites in the  $\beta$ GBP of the prawn *Fenneropenaeus chinensis* (Du et al. 2007).

The low degree of glycosylation may be responsible for the observation, that although tunicamycin successfully prevented the glycosylation of *Locusta migratoria* apolipophorins, the secretion of these proteins was reduced but not completely blocked (Weers et al. 1992). In contrast, vertebrate apolipoprotein B-100 as well as insect vitellogenins exhibit a higher degree of glycosylation (up to 11% (w/w)). Elimination of the glycosylation sites either by point mutation in apoB or blocking of glycosylation during vitellogenin synthesis led to a blocking of lipoprotein secretion although this did not afflict their lipid binding capacity (Kunkel and Nordin 1985; Vukmirica et al. 2002). It is therefore assumable that (lipo)proteins with a high degree of glycosylation are more dependable on this very posttranslational modification in terms of protein stability and secretion than are the less heavily glycosylated ones.

#### Conclusion

The properties of the VHDL and the HDL-type lipoproteins initially termed Lp 2 and Lp 1 (Lp 1b in the case of *A. leptodactylus*), respectively, in our study, share the same characteristics as the clotting proteins and the  $\beta$ GBP's already described in crabs (Puppione et al. 1986; Kollman and Quispe 2005), shrimp (Yepiz-Plascencia et al. 1995; Yepiz-Plascencia et al. 2002; Perazzolo et al. 2005) and crayfish (Kopáček et al. 1993, Hall et al. 1995, 1999), and therefore should be named alike. In contrast, the additional HDL-type lipoprotein Lp 1a found in *A. leptodactylus* seems so far to be unique and should be named *A. leptodactylus* discoidal HDL. The unusual presence of this lipoprotein raises the question as to the physiological significance in this species considering its absence in the closely related *A. astacus*. Nutritional factors for its absence in *A. astacus* can be ruled out since the animals were kept under identical conditions. Furthermore, starvation of *A. leptodactylus* over four weeks did not lead to a decrease in the discoidal HDL concentration as judged from the banding pattern obtained after ultracentrifugation (data not shown). The fact that a lipoprotein of similar size and apoprotein composition was recently described in a lower metazoan, the polychaete *Nereis virens* (Schenk et al. 2006), could indicate its loss in *A. astacus*. However, the loss of a lipoprotein with a high apparent lipid transport capacity remains enigmatic at present. Extending the analysis of lipoprotein patterns to other decapod taxa should provide insights whether the presence of an *A. leptodactylus* discoidal HDL-like lipoprotein is related to a systematic

position within the decapods or represents a yet unknown physiological adaptation.

**Acknowledgments** This study was partially supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ho-889/7-1).

## References

- 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
- 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
- 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
- Chung KT, Ourth DD (2002) Purification and characterization of apolipoprotein III from immune hemolymph of *Heliothis virescens* pupae. *Comp Biochem Physiol B* 132:505–514
- Cunningham M, Pollero RJ, González A (1994) Lipid circulation in spiders. Transport of phospholipids, free fatty acids and triacylglycerols as the major lipid classes by a high-density lipoprotein fraction isolated from the plasma of *Polybetes pythagoricus*. *Comp Biochem Physiol B* 109:333–338
- Cunningham M, García F, Pollero RJ (2007) Arachnid lipoproteins: comparative aspects. *Comp Biochem Physiol C* 146:79–87
- Du X-J, Zhao X-F, Wang J-X (2007) Molecular cloning and characterization of a lipopolysaccharide and  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein from fleshy prawn (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mol Immunol* 44:1085–1094
- 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 USA* 96:1965–1970
- Harris JR (1999) Negative staining of thinly spread biological particulates. In: Hajibagheri N (ed) *Methods in Molecular Biology*, vol 117. Humana Press, Totowa, pp 13–30
- Harris JR, Hoeger U, Adrian M (2001) Transmission electron microscopical studies on some haemolymph proteins from the marine polychaete *Nereis virens*. *Micron* 32:599–613
- Hauncland NH, Bowers WS (1987) Lipoproteins in the hemolymph of the tarantula, *Eurypelma californicum*. *Comp Biochem Physiol B* 86:571–574
- Heras H, Pollero RJ (2002) Lipoproteins from plasma and perivitelline fluid of the apple snail *Pomacea canaliculata*. *Biocell* 26:111–118
- Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen 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
- Khovichunkit W, Kim MS, Memon RA, Shigenaga JK, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C (2004) Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. *J Lipid Res* 45:1169–1196
- Kollman JM, Quispe J (2005) The 17A structure of the 420 kDa lobster clottable protein by single particle reconstruction from cryoelectron micrographs. *J Struct Biol* 151:306–314
- Komatsu M, Ando S, Teshima S (1993) Comparison of hemolymph lipoproteins from four species of crustacea. *J Exp Zool* 266:257–265
- Komatsu M, Ando S (1998) A very-high-density lipoprotein with clotting ability from hemolymph of sand crayfish, *Ibacus ciliatus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:459–463
- Kopáček P, Hall M, Söderhäll K (1993) Characterization of a clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Eur J Biochem* 213:591–597
- Kunkel JG, Nordin JH (1985) Yolk proteins. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds) *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, New York, pp 83–111
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lee RF (1991) Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. In: Gilles R (ed) *Adv Comp Environ Physiol*, vol 7. Springer, Berlin, pp 187–207
- Lee RF, Puppione DL (1978) Serum lipoproteins in the spiny lobster, *Panulirus interruptus*. *Comp Biochem Physiol B* 59:239–243
- Lubzens E, Ravid T, Khayat M, Daube N, Tictz 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
- Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ (1993) Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3:327–332
- 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
- Puppione DL, Jensen DF, O'Connor JD (1986) Physicochemical study of rock crab lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 875:563–568
- 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
- Ruiz-Verdugo LM, García-Bañuelos ML, Vargas-Albores F, Higuera-Ciapara I, 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 (1994) The structure of insect lipoproteins. *Curr Opin Struct Biol* 4:499–506
- Ryan RO, van Antwerpen R, van der Horst DJ, Beenackers AM, Law JH (1990) *Manduca sexta* lipid transfer particle acts upon a lipoprotein to catalyze lipid and apoprotein disproportionation. *J Biol Chem* 265:546–552
- 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
- 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 MM, Kasperaitis MA, 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 MM, de Morreé A, Kerver J, van der Horst DJ, Rodenburg KW (2007a) Insect lipoprotein biogenesis depends on an amphi-

- patric  $\beta$  cluster in apolipoprotein II/I and is stimulated by microsomal triglyceride transfer protein. *J Lipid Res* 48:1955–1965
- Smolenaars MM, Madsen O, Rodenburg KW, van der Horst DJ (2007b) Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *J Lipid Res* 48:489–502
- 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* 85:307–314
- Spaziani E, Wang WL, Novy LA (1995) Serum high-density lipoproteins in the crab *Cancer antennarius* - IV. Electrophoretic and immunological analyses of apolipoproteins and a question of female-specific lipoproteins. *Comp Biochem Physiol B* 111:265–276
- Tsuboi S, Fukuda M (2001) Roles of O-linked oligosaccharides in immune responses. *BioEssays* 23:46–53
- Tsuchida K, Soulagès JL, Moribayashi A, Suzuki K, Maekawa H, Wells MA (1997) Purification and properties of a lipid transfer particle from *Bombyx mori*: comparison to the lipid transfer particle from *Manduca sexta*. *Biochim Biophys Acta* 1337:57–65
- Vargas-Requena CL, Hernandez-Santoyo A, Yepiz-Plascencia G, Vargas-Albores F, Higuera-Ciajara I, Rodriguez-Romero A, Soulagès JL, Sotelo-Mundo RR (2002) Biophysical evidence of lipid and carbohydrate binding activities of shrimp high-density lipoprotein/ $\beta$  glucan binding protein. *Protein Pept Lett* 9:337–344
- Vukmirica J, Nishimaki-Mogami T, Tran K, Shan J, McLeod RS, Yuan J, Yao Z (2002) The N-linked oligosaccharides at the amino terminus of human apoB are important for the assembly and secretion of VLDL. *J Lipid Res* 43:1496–1507
- Weast RC (1974) CRC handbook of chemistry and physics. CRC Press, Boca Raton
- Weers PMM, van der Horst DJ, van Marrewijk WJA, van den Eijnden M, van Doorn JM, Beenackers AMT (1992) Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein. *J Lipid Res* 33:485–491
- Weers PMM, van Marrewijk WJA, Beenackers AMT, van der Horst DJ (1993) Biosynthesis of locust lipoprotein: Apolipoproteins I and II originate from a common precursor. *J Biol Chem* 268:4300–4303
- Wojchowski D-M, Parsons P, Nordin JH, Kunkel JG (1986) Processing of pro-vitellogenin in insect fat body: a role for high-mannose oligosaccharide. *Dev Biol* 116:422–430
- 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* 266:624–633
- Yepiz-Plascencia GM, Sotelo-Mundo R, Vazquez-Moreno L, Ziegler R, Higuera-Ciajara 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
- Yepiz-Plascencia G, Jiménez-Vega F, Romo-Figueroa MG, Sotelo-Mundo RR, Vargas-Albores F (2002) Molecular characterization of bifunctional VHDL-CP from the hemolymph of white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol B* 132:585–592

## ERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, Sven Schenk, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt habe und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, September 2008

---



## **DANKE**

Tja, fünfeinhalb Jahre (mit Diplomarbeit) am selben Ort sind ne lange Zeit. Da muss man einigen danken. Also:

**Dankeschön an:**



*„Vernunft kennt keine Unterkunft in der grossen Koboldzunft“*

*-Pumuckl-*