

Charakterisierung und Expression
zweier multimerer
Hämolympheproteine
der Schnecke *Biomphalaria glabrata*

Dissertation zur Erlangung des Grades

"Dr. rer. nat"

an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vanessa Maria Möller

geb. am 21.08.1979 in Bad Schwalbach

Mainz, November 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2012

1 Inhaltsverzeichnis

A Einleitung.	1
1 Das Hämoglobin von <i>Biomphalaria glabrata</i> (BgHb).	3
2 Das Rosettenprotein von <i>Biomphalaria glabrata</i>	5
3 Ziel der Arbeit	9
B Material und Methoden.	11
1 Das Forschungsobjekt.	11
1.1 Systematische Einordnung	11
1.2 Lebensweise von <i>B. glabrata</i>	11
1.3 Herkunft, Hälterung und Präparation der Tiere.	12
2 Chemikalien und Geräte.	12
3 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen.	13
4 Mikrobiologische Methoden.	13
4.1 Bakterienstämme	13
4.2 Plasmidvektoren	13
4.3 Nährmedien und Agarplatten.	14
4.4 Plattenkultur	14
4.5 Flüssigkultur.	14
4.6 Glycerinkultur	14
5 Molekularbiologische Methoden	15
5.1 Präparation von Nukleinsäuren	15

5.1.1	Präparation von Gesamt-RNA	15
5.1.2	Präparation genomischer DNA	15
5.2	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	15
5.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	16
5.4	Primer Design	16
5.4.1	attB-Primer Design	16
5.5	Polymerase Kettenreaktion	18
5.5.1	Taq™ DNA Polymerase Invitrogen (Darmstadt)	18
5.5.2	Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase NEB (Frankfurt)	19
5.5.3	Dream Taq™ Green PCR Master Mix Fermentas (St. Leon-Rot)	19
5.5.4	Advantage® 2 Polymerase Mix Clontech (Saint-Germain-en-Laye)	19
5.5.5	Klon PCR	19
5.5.6	Markierung von DNA mit Digoxigenin	20
5.5.7	RT PCR	20
5.5.8	nested PCR	20
5.6	Genome Walker™ Universal Kit Clontech (Saint-Germain-en-Laye)	21
5.7	PCR-Aufreinigung	21
5.8	Gelelektrophorese	21
5.8.1	DNA-Gelelektrophorese	21
5.8.2	RNA-Gelelektrophorese	22
5.9	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	23
5.10	Klonierung	23
5.10.1	Klonierung von PCR-Produkten	23
5.10.2	Die Gateway™ Klonierung	23
5.11	Blau-Weiß-Selektion	26
5.12	Plasmidisolierung	26
5.13	Southern Blot	27
6	Sequenzanalyse	28
6.1	Sequenzierung von DNA	28
6.2	Analyse der Sequenzierungen	28
6.3	Datenbankanalysen	29
7	Rekombinante Expression	29
7.1	Rekombinante Expression in Bakterienzellen	29
7.1.1	Expressionsprotokoll	30
7.1.2	Proteinpräparation	30

7.2	Rekombinante Expression in Insektenzellen	31
7.2.1	Kultivierung der Insektenzellen	31
7.2.2	Transfektion der Insektenzellen	31
7.2.3	Selektion der transfizierten Zellen	32
7.2.4	5` Aminolävulinsäure	32
7.2.5	Bioreaktor	33
7.2.6	Proteinpräparation	33
8	Proteinbiochemische Methoden	34
8.1	Hämolympheentnahme	34
8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
8.3	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	34
8.3.1	SDS-PAGE	35
8.3.2	Native PAGE	35
8.4	Chromatographische Methoden	35
8.4.1	Anionenaustauschchromatographie	35
8.4.2	Größenausschlusschromatographie	36
8.4.3	Affinitätschromatographie an eine Nickelmatrix	36
8.5	Renaturierung (Refold)	37
8.6	Konzentrieren von Proteinlösungen	37
8.6.1	Aufkonzentrieren größerer Probenvolumina	37
8.6.2	Aufkonzentrieren kleiner Probenvolumina	38
8.7	Proteolytische Spaltung	38
8.8	Dialyse	38
8.9	Herstellung der Antiseren Anti- <i>BgAChBP1</i> und Anti- <i>BgAChBP2</i>	39
8.10	Western-Blot	39
8.10.1	Proteintransfer	39
8.10.2	Immunodetektion#	40
8.11	Immunelektrophorese	40
8.11.1	Crossed Immunelektrophorese	41
9	In situ-Hybridisierung	42
9.1	Whole Mount	42
9.1.1	Vorbereitung der Larven	42
9.1.2	Tag 1 Pigmententfernung und Hybridisierung	43
9.1.3	Tag 2 Blockierung und Inkubation mit Sekundäantikörper	43
9.1.4	Tag 3 Farbreaktion	44
9.1.5	Tag 4 Aufbewahrung	44

10 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	45
11 Thermofluor	45
12 GraFix	46
13 Sauerstoffbindungsanalysen	47
13.1 Überprüfung der Sauerstoffbindefähigkeit	47
13.2 Sauerstoffbindungskurven	47
C Ergebnisse	49
1 BgHb (<i>Biomphalaria glabrata</i> Hämoglobin)	49
1.1 Rekombinante Expression des BgHb in Insektenzellen	49
1.2 BgHb1 und BgHb2 Proteinbiochemische Analyse der rekombinanten Untereinheiten.	49
1.2.1 Nachweis der Dimerisierung des rekombinanten BgHb1	52
1.3 Immunologische Analyse des rekombinanten BgHb1	53
1.4 Elektronenmikroskopische Analyse des rekombinanten BgHb1	54
1.5 Thermofluor und Grafix	55
1.6 Sauerstoffbindungsmessungen an der rekombinanten Untereinheit BgHb1	58
1.6.1 Reversible Sauerstoffbindung.	58
2 BgAChBP (<i>B. glabrata</i> Acetylcholin-Bindeprotein)	61
2.1 Ermittlung der Sequenzdaten	62
2.1.1 Identifizierung und Sequenzermittlung von BgAChBP1	62
2.1.2 Sequenzermittlung BgAChBP2	64
2.2 Sequenzanalysen	65
2.2.1 Vergleich BgAChBP1 und BgAChBP2	65
2.3 Amplifikation von BgAChBP1 und BgAChBP2	66
2.4 Generierung der <i>Attachment</i> -Produkte für die rekombinante Expression ..	67
2.5 Proteinbiochemische Analyse der rekombinanten Expression in Bakterienzellen	70
2.5.1 Rekombinantes BgAChBP1 und BgAChBP2 mit C-terminalem His-Tag	70
2.5.2 Rekombinantes BgAChBP1 und BgAChBP2 mit N-terminalem 6x His und TEV-Schnittstelle	72

2.5.3	Nachweis von Disulfidbrücken im rekombinanten <i>BgAChBP2</i>	74
2.6	Elektronenmikroskopische Analyse der rekombinant exprimierten Unereinheiten <i>BgAChBP1</i> und <i>BgAChBP2</i>	76
2.6.1	Rekombinantes <i>BgAChBP1</i> und <i>BgAChBP2</i> mit C-terminalem His	76
2.6.2	Rekombinantes <i>BgAChBP1</i> mit N-terminalem His-tag und TEV-Schnittstelle	79
2.7	Whole mount <i>in-situ</i> Hybridisierung	81

D Diskussion 85

1	<i>BgHb</i>	85
1.1	Sequenzanalyse der rekombinanten <i>BgHb1</i> - und <i>BgHb2</i> -Konstrukte	85
1.2	Rekombinante Expression	88
1.3	Proteinbiochemische Expressionsanalyse	88
1.4	Quartärstruktur des rekombinanten <i>BgHb1</i>	89
1.5	Stabilisierung des nativen <i>BgHb</i>	90
1.6	Funktionelle Analyse zur Sauerstoffbindung des rekombinanten <i>BgHb1</i> ..	92
1.7	Vergleich der funktionellen Eigenschaften des <i>BgHb</i> mit anderen Hämoglobinen	94
2	<i>BgAChBP</i>	97
2.1	Sequenzanalyse	97
2.2	Rekombinante Expression	102
2.3	Strukturanalyse des rekombinanten <i>BgAChBP</i>	103
2.4	Expressionsanalyse	106
2.5	Hypothesen zur Funktion des <i>BgAChBP</i>	109

E Zusammenfassung 113

F Anhang 115

1	Abkürzungsverzeichnis	115
1.1	Allgemeine Abkürzungen	115
1.2	Abkürzungen in der Proteinforschung	117
1.3	IUPAC-Nomenklatur für Aminosäuren	117
1.4	IUPAC-Nomenklatur für Nukleotide	118

2	Mikrobiologische Methoden	118
2.1	Nährmedien und Agarplatten	118
3	Molekularbiologische Methoden	119
3.1	Vektorspezifische Primer	119
3.2	Genspezifische Primer	119
3.3	<i>attachment</i> -Primer	120
3.4	Gelelektrophorese	121
3.4.1	DNA-Gelelektrophorese	121
3.4.2	RNA-Gelelektrophorese	121
3.5	Southern Blot	122
3.5.1	Puffer-Rezepte	122
3.6	Analyse der Sequenzierungen	123
3.6.1	Internetadressen	123
4	rekombinante Expression	124
4.1	rekombinante Expression in Bakterienzellen	124
4.1.1	Proteinpräparation	124
4.2	rekombinante Expression in Insektenzellen	124
4.2.1	Kultivierung von Insektenzellen	124
5	Proteinbiochemische Methoden	125
5.1	Polyacrylamidgelelektrophorese	125
5.1.1	SDS-PAGE	125
5.1.2	Native PAGE	126
5.2	Chromatographische Methoden	126
5.2.1	Affinitätschromatographie an eine Nickelmatrix	126
5.3	Renaturierung (Refold)	127
5.4	Proteolytische Spaltung	127
5.5	Dialyse	128
5.6	Western-Blot	128
5.6.1	Proteintransfer	128
5.6.2	Immunodetektion	128
5.7	Immunelektrophorese	129
5.7.1	Verwendete Lösungen	129
5.8	Verwendete Antikörper	129

6 In Situ Hybridisierung	130
6.1 Whole Mount	130
6.1.1 Vorbereitung der Larven.	130
6.1.2 Tag 1 Pigmententfernung und Hybridisierung.	130
6.1.3 Tag 2 Blockierung und Inkubation mit Sekundärantikörper	131
6.1.4 Tag 3 Farbreaktion.	131
7 Sequenzen	132
7.1 <i>BgHb1</i>	132
7.2 <i>BgHb2</i>	135
7.3 <i>BgAChBP1</i>	138
7.4 <i>BgAChBP2</i>	140
G Literaturverzeichnis	143
H Danksagung	155
I Erklärung und Copyright	157
1 Erklärung	157
2 Copyright	157
J Curriculum Vitae	159

2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Elektronenmikroskopische Aufnahme der Hämolympheproteine von <i>B. glabrata</i>	2
Abb. 2	Schematische Darstellung eines <i>BgHb</i> Untereinheiten-Dimers.	4
Abb. 3	Sequenzvergleich von Acetylcholin-Bindeproteinen (AChBP) und der Ligandenbindenden Domäne nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChR).....	6
Abb. 4	Quartärstruktur des pentameren AChBP von <i>Lymnea stagnalis</i> und des Rosettenproteins von <i>Biomphalaria glabrata</i>	8
Abb. 5	<i>Biomphalaria glabrata</i>	11
Abb. 6	<i>attB2</i> forward Primer.....	17
Abb. 7	<i>attB1</i> forward Primer.....	17
Abb. 8	Darstellung der BP-Reaktion.....	25
Abb. 9	Schematische Darstellung der LR-Reaktion.....	25
Abb. 10	Grundform der zweidimensionalen Immunelektrophorese.	41
Abb. 11	Rekombinante Expression und Aufreinigung von <i>BgHb1</i>	50
Abb. 12	Absorptionsspektrum von rekombinant exprimierten <i>BgHb1</i>	50
Abb. 13	Western Blot des rekombinanten <i>BgHb1</i> und nativen <i>BgHb</i>	51
Abb. 14	Dimerisierung des nativen <i>BgHb</i> und der rekombinanten Untereinheit <i>BgHb1</i>	52
Abb. 15	Immunologische Charakterisierung des rekombinanten <i>BgHb1</i>	53
Abb. 16	EM-Aufnahmen des nativen <i>BgHb</i> im Vergleich zum rekombinanten <i>BgHb1</i>	54
Abb. 17	Thermofluor und Grafix.	55
Abb. 18	Graphische Auswertung des Thermofluorlaufs.	56
Abb. 19	EM-Aufnahme des <i>BgHb</i> nach Thermofluor und Grafix (Negativkontrastierung).....	57
Abb. 20	Reversible Sauerstoffbindung der rekombinanten Untereinheit <i>BgHb1</i>	59
Abb. 21	15%ige SDS-PAGE des nativen <i>BgAChBP</i> und massenspektrometrische Analyse.	61
Abb. 22	Schematische Darstellung der Genstruktur von <i>BgAChBP1</i>	62
Abb. 23	Multiplies Alignment.	63
Abb. 24	Schematische Darstellung der Genstruktur von <i>BgAChBP2</i>	64
Abb. 25	Sequenzalignment von <i>BgAChBP1</i> und <i>BgAChBP2</i>	65
Abb. 26	Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate von <i>BgAChBP1</i> und <i>BgAChBP2</i>	66
Abb. 27	Gelelektrophorese der <i>Attachment</i> -PCR mit C-terminalen His-Tag.	67

A Einleitung

Hintergrund

Respiratorische Proteine haben ihren Ursprung im Präkambrium und entwickelten sich zunächst in Lebewesen als Schutzmechanismus vor Oxidation, da sich durch das Aufkommen photosynthetischer Bakterien die Atmosphäre zunehmend mit Sauerstoff anreicherte (Van Holde & Miller, 1995; Van Holde et al., 2001). Die ersten prokaryotischen Aerobier lernten schnell die daraus entstandene effizientere oxidative Energiegewinnung als selektiven Vorteil für sich zu nutzen. Dabei war es durch die sauerstoffbindenden Proteine auch möglich, die Transportkapazität des Sauerstoffs in der Körperflüssigkeit im Vergleich zu rein physikalisch gelöstem Sauerstoff zu erhöhen. Diese Proteine liegen entweder frei gelöst oder in Zellen verpackt vor und lassen sich aufgrund der Atome in ihrem aktiven Zentrum in drei Gruppen unterteilen: Hämoglobine, Hämerythrine und Hämocyanine.

Hämoglobine und Hämerythrine binden Sauerstoff reversibel über ein komplexiertes Eisen (II)-Atom, das aktive Zentrum der Hämocyanine beinhaltet zwei Sauerstoff bindende Kupfer (I)-Atome (Hardison, 1996; Terwilliger, 1998; Weber & Vinogradov, 2001; Kurtz, 1992; Bailly et al., 2008; Van Holde & Miller, 1996). Während das Vorkommen der Hämerythrine stets intrazellulär auf wenige Invertebraten beschränkt ist und Hämocyanine die vorherrschenden Sauerstoffproteine der Arthropoden und Mollusken darstellen, sind Hämoglobine in allen Stämmen des Tierreiches zu finden (Kurtz, 1992; Bailly et al., 2008; Van Holde & Miller, 1996; Weber & Vinogradov, 2001).

Im Gegensatz zu den intrazellulären, meist tetrameren Vertebraten-Hämoglobinen weisen die Invertebraten-Hämoglobine eine enorme strukturelle Diversität auf. Während sie intrazellulär als Monomere, Dimere, Tetramere und selten auch als Polymere vorliegen, bilden sie extrazellulär stets große Quartärstrukturen. Neben dieser Strukturvielfalt zeigen sie auch eine erhebliche Variabilität in ihren Sauerstoffbindungseigenschaften, welche sich direkt auf den Lebensraum des jeweiligen Tieres beziehen lässt (Vinogradov et al., 1993; Bugge & Weber, 1999; Weber & Vinogradov, 2001).

Die in dieser Arbeit untersuchte Posthornschncke *Biomphalaria glabrata* lebt in sauerstoffarmen Gewässern, hier wird der Sauerstofftransport durch ein extrazellulär vorliegendes, multimeres Hämoglobin gewährleistet (Bugge & Weber, 1999; Weber & Vinogradov, 2001).

Sie gehört innerhalb der Schnecken zu der einzigen Familie, die Hämoglobin und nicht Hämocyanin als respiratorisches Protein verwendet (Read, 1966; Lieb et al., 2000; 2001; 2004; 2006). In der Hämolymphe von *B. glabrata* stellt das Hämoglobin das Hauptprotein mit einem Anteil von, ca. 95% dar. Neben Spuren eines offenbar mutierten Hämocyanins, welches für den Sauerstofftransport keine Rolle zu spielen scheint, wurde in den restlichen 5% ein rosettenförmiges Protein gefunden, dessen Funktion unklar blieb (*Abb. 1*) (Lieb et al., 2006). In dieser Arbeit wurden Analysen sowohl zum Hämoglobin, als auch zum Rosettenprotein von *B. glabrata* durchgeführt.

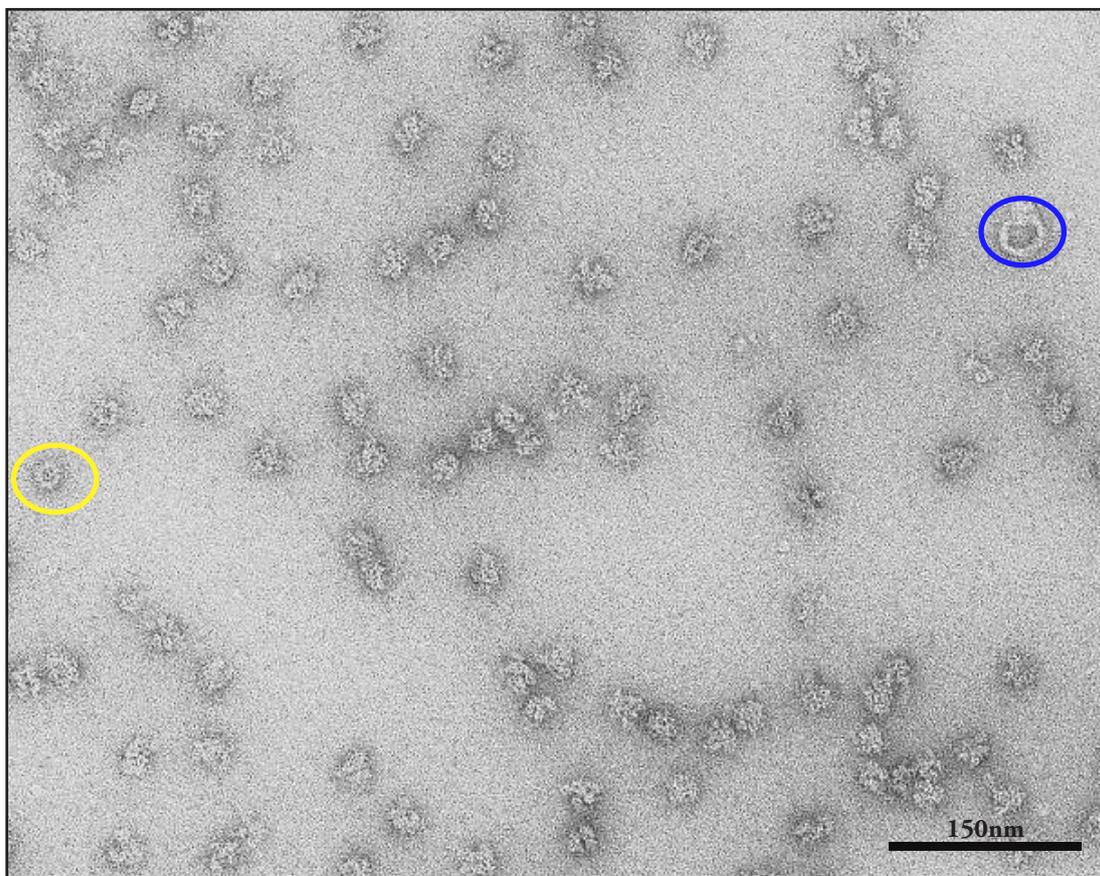


Abb. 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Hämolympheproteine von *B. glabrata*. Negativkontrastierung mit 2% Uranylacetat. Die Aufnahme zeigt vor allem das zum größten Anteil in der Hämolymphe vertretene Hämoglobin (ca. 20nm Durchmesser). Blaue Umrandung, Aufsicht auf ein Hämocyanin Partikel (ca. 35nm Durchmesser). Gelbe Umrandung, Aufsicht auf ein Rosettenprotein Partikel (ca. 22nm Durchmesser).

1 Das Hämoglobin von *Biomphalaria glabrata* (BgHb)

Die Posthornschncke *B. glabrata* lebt in stillen, häufig austrocknenden Gewässern und ist dort extremen Variationen in Sauerstoffkonzentration und Temperatur ausgesetzt (Jones, 1964). Das extrazelluläre Hämoglobin von *B. glabrata* gewährleistet durch seine hohe Sauerstoffaffinität auch in extremen Habitaten eine optimale Sauerstoffversorgung (Grisolia & de Freitas, 1985; Bugge & Weber, 1999). Das BgHb ist ein Glykoprotein mit einem Kohlenhydrat-Anteil von ca. 3% (Afonso et al., 1976) aus den Zuckern Hexose, Mannose, Galactose, Fucose und Glucosamin (Almeida & Neves, 1974). Der humanpathogene Trematode *Schistosoma mansoni*, welchem *B. glabrata* als Zwischenwirt dient, tarnt sich in der Schnecke mit Oberflächenantigenen, welche diesen Glykanen ähneln (Dissous et al., 1986; Markl et al., 1991; Kantelhardt et al., 2002). Aufgrund biochemischer Analysen ging man lange Zeit davon aus, das sich das BgHb aus Polypeptidketten mit einer Molekülmasse von 180kDa zusammensetzt (Terwilliger et al., 1976; Arndt & Santoro, 1998; Arndt et al., 2003). Erst die Sequenzierung der kompletten DNA-Sequenz von zwei BgHb-Untereinheiten deckte die tatsächliche Molekülmasse einer Polypeptidkette von 240kDa auf. Die Sequenzanalysen ergaben, dass sich jede der ca. 2000 Aminosäuren (BgHb1, 2148 Aminosäuren; BgHb2 1765 Aminosäuren) langen Untereinheiten aus 13 Häm-Domänen (BgHb1-a bis BgHb1-m; BgHb2-a bis BgHb2-m) und einer N-terminalen nicht-Häm-Domäne zusammensetzt. Diese "plug-Domäne" ist mit einer Molekülmasse von ca. 11 kDa kleiner als die ca. 17,5kDa großen Häm-Domänen und beinhaltet drei Cysteine (Lieb et al., 2006), welche die Dimerisierung zweier Untereinheiten über Disulfidbrücken ermöglichen (Abb. 2). Ausgehend von dieser Dimerisierung des Moleküls, welche schon durch Nascimento et al., 1982 nachgewiesen wurde, gibt es zur Quartärstruktur mehrere Hypothesen. Einer zunächst vorgeschlagenen pentameren Ringstruktur (Arndt & Santoro, 1998) wurde später durch SAXS-Daten (Small Angle X-Ray Scattering) widersprochen, welche ein tetrameres Modell unterstützten (Arndt et al., 2003). Hierbei sollten acht Polypeptidketten von 180kDa zu einer 4x2meren Struktur mit einer D2-Symmetrie assoziieren. Im Gegensatz dazu steht eine 3D-Rekonstruktion, welche darauf hinweist, dass die Quartärstruktur aus drei Untereinheiten-Dimeren (3x2mer) in einer D3-Symmetrie gebildet wird (Lieb et al., 2006). Neueste Cryo-EM-Daten sprechen jedoch wieder für acht Untereinheiten in einer D2-Symmetrie (Stark & Markl, unveröffentlicht). Noch unklar ist, ob sich dabei die Polypeptidketten des BgHb zu Homo- oder Hetero-Oligomeren zusammenlagern. Des Weiteren konnte durch molekularphylogenetische Analysen gezeigt werden, dass das Planorbiden-Hämoglobin unabhängig von anderen Hämoglobinen durch wiederholte Genduplikationen und Fusionen eines Myoglobins entstanden ist. Vermutlich evolvierte das Hämoglobin als eine Anpassung eines Planorbidenvorfahren an Sauerstoffknappheit (Bugge & Weber, 1999; Lieb et al., 2006). Spuren eines mutierten, wenig effizienten Hämocyans in der Hämolymphe von *B. glabrata* legen nahe, dass dieses durch das hoch

affine Hämoglobin ersetzt wurde. Tatsächlich weist *B. glabrata* im Vergleich zu anderen Süßwasserschnecken, welche Hämocyanin als respiratorisches Protein verwenden, ein wesentlich längeres Tauchvermögen auf (Bugge & Weber, 1999).

In unserer Arbeitsgruppe (Dissertation Dürr, 2008; Diplomarbeit Sarraf-Zadeh, 2007) wurden die gesamte Untereinheit von *BgHb1* in Insektenzellen und verschiedene Segmente aus *BgHb2* in Bakterienzellen exprimiert. Durch die Messung von Sauerstoffbindungskurven konnte gezeigt werden, dass einzelne *BgHb2*-Segmente Sauerstoff reversibel binden und eine dem nativen Protein ähnliche Sauerstoffaffinität aufweisen. Da es sich bei den exprimierten Konstrukten um einzelne Häm-Domänen (*BgHb2*-p, *BgHb2*-a) oder Segmente (*BgHb2*-p-g, *BgHb2*-h-m) handelte, konnte keine Kooperativität nachgewiesen werden. Auch zur Abhängigkeit der Sauerstoffaffinität in Abhängigkeit des pH-Wertes war keine Aussage zu treffen.

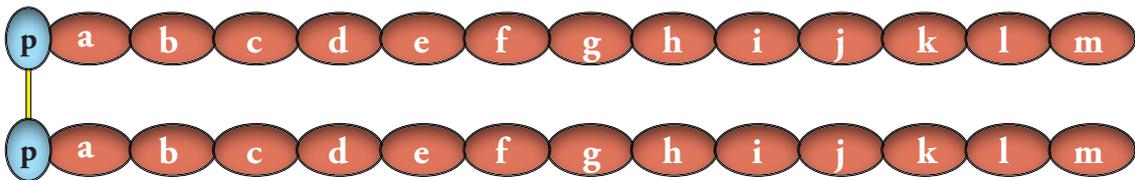


Abb. 2 Schematische Darstellung eines *BgHb* Untereinheiten-Dimers.

Die Darstellung zeigt die 13 globulären Häm-Domänen (a-m) und die N-terminal gelegene, kleinere Nicht Häm-Domäne (plug-Domäne, p), welche über Disulfidbrücken zwei Polypeptidketten zu einem Dimer verbindet.

2 Das Rosettenprotein von *Biomphalaria glabrata*

Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung der Hämolympheproteine und elektronenmikroskopischer Analyse der erhaltenen Fraktionen war neben dem in seiner Struktur assymmetrisch anmutenden Hämoglobin ein ca. 22nm großes, aus zwei Ringen bestehendes, symmetrisches Molekül zu sehen. Dies wurde zuvor auch bei anderen Mitgliedern der Planorbiden beobachtet (Wood & Mosby, 1975; Terwilliger et al., 1976). Aufgrund seiner ähnlichen Größe wurde es zunächst als Hämoglobin interpretiert (Terwilliger et al., 1976). Da es aber weder ein typisches UV-Spektrum eines Proteins mit Pigment zeigte, noch immunologisch mit dem Hämoglobin verwandt war, wurde es als andersartig eingestuft und Rosettenprotein (*BgRp*) genannt (Lieb et al., 2006). Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung der Hämolympheproteine zeigt der Hauptgipfel der Rosettenproteinfraktion im SDS-Gel eine prominente Bande bei ca. 31kDa und eine viel schwächere Bande bei ca. 25kDa. Die 31kDa Bande wurde ausgeschnitten, tryptisch gespalten und massenspektrometrisch untersucht. Dabei deutete sich eine Sequenzverwandtschaft mit Acetylcholin-Bindeproteinen (AChBP) an, etwa von der Spitzschlamm Schnecke *Lymnea stagnalis*. Dieses wasserlösliche Acetylcholin-Bindende Protein wurde in *L. stagnalis* im Zentralnervensystem entdeckt (Smit et al., 2001; Brejc et al., 2001) und daraufhin auch bei einigen anderen Gastropoden, und kürzlich bei dem marinen Anneliden *Capitella teleta* gefunden (Smit et al., 2001; Brejc et al., 2001; Hansen et al., 2004; Celie et al., 2005; Huang et al., 2009; McCormack et al., 2009). Die Sequenz dieser Homopentamere zeigte sich als eng verwandt zu der ligandenbindenden Domäne der nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren (nAChR) (Abb. 3), welche zu der Cys-loop Superfamilie gehören (Brejc et al., 2001; Smit et al., 2001). Ähnlich der α_7 -Untereinheit der nAChR bildet das AChBP Homopentamere. Die fünf Untereinheiten liegen dabei aneinander und bilden in der Mitte eine zentrale Pore. Die Kontakt-, oder Grenzflächen zwischen den Untereinheiten bilden die aktiven Zentren und sind somit für die Ligandenbindung verantwortlich. Sie werden von der "prinzipiellen Seite" deren aromatische Aminosäuren innerhalb der Cys-loop Familie strikt konserviert sind und der in der Aminosäuresequenz variablen "komplementären Seite" gebildet (Celie et al., 2005). Diese geringe Konservierung scheint jedoch auch charakteristisch für Mitglieder der Cys-Loop Superfamilie und wird innerhalb dieser als Ursache für die verschiedenen Kanalöffnungsmechanismen gedeutet. Gleichzeitig resultieren daraus aber auch unterschiedlichste Affinitäten zu einer Reihe von Liganden (Brejc et al., 2001; Celie et al., 2005).

A

		*		140	*	S-S	160	*	180
al pha_4	:	DFAVTHLTKAHLFHDCGRVQVTPPAIYKSSCS							
al pha_7	:	RFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCY							
Hdh_AChBP	:	GKTSASETLALVHSDGG LHI PPTTI KTRC							
Bt_AChBP	:	APELLSADRVVSKDGSVIYVPSQRVRF							
Ls_AChBP	:	KPEVLTPLARVVS DGEVLYNPSI RQRF							
Ac_AChBP	:	PVQVLS PQI AVVTHDGSVMFI PAQRLSFM							
Ct_AChBP	:	DMTLDRTTQAI VFSNGTVLMI PPAVLKVL							
		*		200	*	S-S	220	*	240
al pha_4	:	VNMHS- RVDQLDFVESG- EIVVIYDAVGTYNTRKYE							
al pha_7	:	Q- -MQ- EADI SGYI PNG- EMDLGI PGKRSERFYE							
Hdh_AChBP	:	VSRST- SVDVSSYESGGI AMHLDHAATREVKHYA							
Bt_AChBP	:	ITGEEGVNI AEYFDS- PKFDLSATQSLNRKKYS							
Ls_AChBP	:	DPTTE- NSDDSEYFSQYSRFEI LDVTQKKNSTYS							
Ac_AChBP	:	KTDTD- QVDLSSYYAS- SKYEI LSATQTRQVQHYS							
Ct_AChBP	:	HFMDDKAEVLLDFYQDS- -LEI LENS AQRQEVVYP							

B

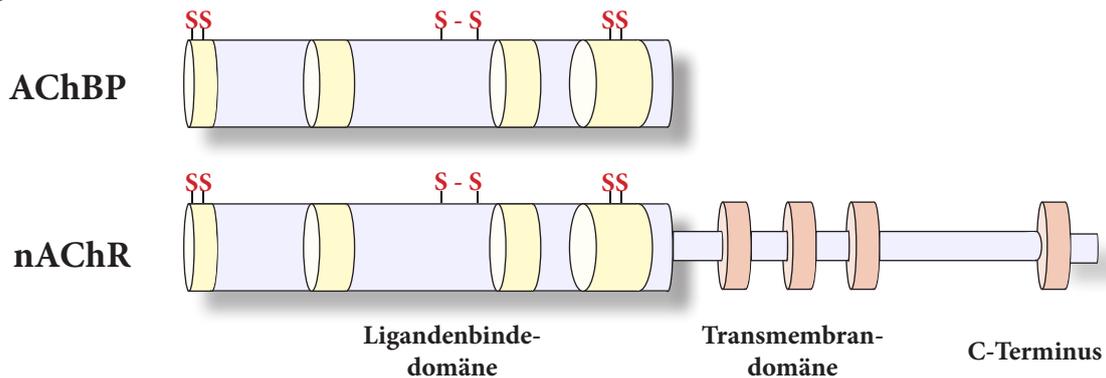


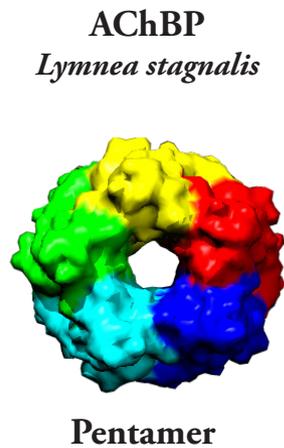
Abb. 3 Sequenzvergleich von Acetylcholin-Bindeproteinen (AChBP) und der Ligandenbindenden Domäne nikotinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChR).

(A) Ausschnitt aus einem Aminosäurealignement der AChBP mit den extrazellulären Domänen des humanen nAChR (alpha 4, alpha 7). Hoch konservierte Bereiche sind schwarz hinterlegt (100%), weniger konservierte grau (80%). Disulfidbrücken, wie der Cys-Loop (C150-C165) sind rot gekennzeichnet. Aligniert mit Clustal (Gibson et al., 2010), bearbeitet mit Genedoc (Nicholas et al., 1997). *HdhAChBP*, *Haliotis discus hannai* (EF565223); *BtAChBP*, *Bulinus truncatus* (CAC69294); *LsAChBP*, *Lymnea stagnalis* (AF364889); *AcAChBP*, *Aplysia californica* (AF322877); *CtAChBP*, *Capitella teleta* (EY637248). Alpha 4 (AAA64743) und alpha 7 (NM0007465), n-terminale extrazelluläre Ligandenbindende Domänen des humanen nAChR.

(B) Schematische Darstellung der Strukturen eines AChBP und eines AChR (nach Smit et al., 2003).

In Hinsicht auf die Funktion der AChBP in Mollusken wurden mehrere Hypothesen aufgestellt. Da die Proteine von Gliazellen exprimiert und sezerniert werden, um dort freigesetztes Acetylcholin zu binden, wurde ihnen eine Rolle als Hemmstoff der neuronalen Signalübertragung zugeschrieben. *In vitro* konnte diese Hypothese durch die Messung der Signalübertragung von Gliazellen umgebenen Nervenzellen bestätigt werden (Smit et al., 2001). Demnach wird der Neurotransmitter Acetylcholin in den synaptischen Spalt ausgeschüttet, was die Nervenzellen umgebenen Gliazellen dazu veranlasst das AChBP zu sezernieren, welches den Neurotransmitter bindet und somit die Neurotransmission inhibiert. *In vivo* konnte jedoch nachgewiesen werden, dass sich die AChBP produzierenden Gliazellen nicht im Bereich der Synapsen, sondern vielmehr in der Umgebung neuronaler Zellkörper befinden. Demzufolge hätte das Protein dort eine regulierende Funktion nicht-synaptischer Übertragungen (Banks et al., 2009). Im Seeohr *Haliotis discus hannai* wurde ein AChBP entdeckt, das dort die Schalenbildung reguliert. In der Perlmuschel *Pinctada fucata* sowie in *Haliotis discus hannai* verhindert dieses "amorphe Calciumcarbonat Bindeprotein" (ACCBP) das Ausfallen überschüssigen Calciumcarbonats (Ma et al., 2007; Huang et al., 2009). Das ACCBP wird von Gobletzellen des Mantels exprimiert und als Homodekamer in die extrapalliale Flüssigkeit zwischen Mantel und Schale sezerniert. Wie das AChBP finden sich im ACCBP hochkonservierte Reste für die Ligandenbindung und auch der charakteristische Cys-Loop (Huang et al., 2009). Eine weitere biologisch relevante Eigenschaft des AChBP scheint zu sein, Phytotoxine zu binden, was eine Art Schutzmechanismus algenfressender Organismen darstellen könnte (Bourne et al., 2010). Wie die ligandengesteuerten Acetylcholinrezeptoren sind auch die wasserlöslichen AChBP in der Lage, verschiedenste Agonisten und Antagonisten selektiv zu binden (Brejc et al., 2001; Hansen et al., 2005). Das Rosettenprotein von *B. glabrata* zeigte in einer in unserer Arbeitsgruppe angefertigten 3D-Rekonstruktion eine sehr ungewöhnliche Struktur. Es ist kein Pentamer, sondern ein Dodekaeder aus 12 Pentameren mit demzufolge 60 Ligandenbindungsstellen (Abb. 4).

A



B

Rosettenprotein
Biomphalaria glabrata

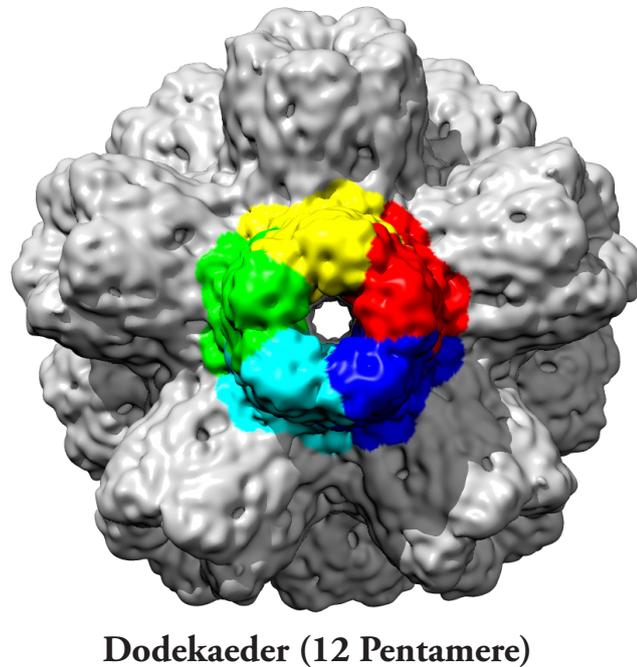


Abb. 4 Quartärstruktur des pentameren AChBP von *Lymnea stagnalis* und des Rosettenproteins von *Biomphalaria glabrata*.

(A) Ansicht des AChBP von *Lymnea stagnalis* entlang der fünf-zähligen Symmetrieachse (pdb-Code 1i9b). Die fünf Monomere sind farblich hervorgehoben.

(B) Kryo-EM-Struktur (6Å) des Rosettenproteins von *B. glabrata* (Saur et al., 2012). Ansicht entlang einer der fünf-zähligen Symmetrieachsen. Monomere des Pentamers sind unterschiedlich farblich gekennzeichnet.

3 Ziel der Arbeit

Im ersten Teil meiner Arbeit war mein Ziel, das Hämoglobin von *Biomphalaria glabrata* rekombinant zu exprimieren und biochemisch zu charakterisieren. Dabei waren die vollständigen Sequenzen von zwei Hämoglobin-Untereinheiten (*BgHb1*, *BgHb2*) bereits bekannt (Lieb et al., 2006) und es konnte für die Expression auf c-DNA Konstrukte zurückgegriffen werden, welche bereits in dem richtigen Eingangsvektor kloniert vorlagen (Dürr, 2008). Die beiden *BgHb*-Untereinheiten sollten in einem stabilen System in Insektenzellen exprimiert und aufgereinigt werden. Neben einem funktionellen Vergleich der rekombinanten Proteine mit dem nativen *BgHb* war ein weiteres Ziel die Voraussetzungen für die Aufklärung der Quartärstruktur zu schaffen, und rekombinantes *BgHb* in biologisch aktiver Form zu exprimieren.

Im zweiten Teil meiner Arbeit sollte die cDNA- und Gensequenz des als Acetylcholin-Bindeprotein identifizierten Rosettenproteins ermittelt werden. Weiterführend sollte das AChBP von *B. glabrata* in *E. coli* Zellen exprimiert werden, um die rekombinanten Moleküle dann nach Aufreinigung, funktionell sowie strukturell mit dem nativen Protein vergleichen zu können. Nach meiner Entdeckung zweier Isoformen sollte zudem aufgeklärt werden, ob für den Aufbau der Quartärstruktur beide Isoformen erforderlich sind, oder eine genügt.

B Material und Methoden

1 Das Forschungsobjekt

1.1 Systematische Einordnung

Stamm	Mollusca
Klasse	Gastropoda
Unterklasse	Orthogastropoda
Überordnung	Heterobranchia
Ordnung	Pulmonata
Unterordnung	Basommatophora
Familie	Planorbidae
Gattung	<i>Biomphalaria</i>
Art	<i>glabrata</i>



Abb. 5 *Biomphalaria glabrata*

Foto: C. Kühne

1.2 Lebensweise von *B. glabrata*

Die 1-2cm große Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* bewohnt ruhige, pflanzenreiche Gewässer in Tropen und Subtropen. Sie besiedelt dort bevorzugt ruhige oder auch langsam fließende Gewässer. Durch erneutes Fluten finden Wieder- und Neubesiedlungen von Lebensräumen statt, bei denen sich die Tiere ihre hermaphroditische Lebensweise zu Nutze machen. Als einzige Ausnahme innerhalb der Gastropoda ist die Familie der Tellerschnecken, zu welcher *B. glabrata* gehört, bekannt für die Verwendung von Hämoglobin als respiratorisches Protein, welches Ihnen auch die typische rote Farbe verleiht. Äußerlich ist *B. glabrata* durch ihr rotes, rechtsgewundenes, flaches Gehäuse von anderen Mitgliedern der Planorbidae zu unterscheiden. Als Zwischenwirt des Pärchenegels *Schistosoma mansoni*, dem Erreger der Tropenkrankheit Bilharziose, erlangte die Gattung *Biomphalaria* auch medizinische Bedeutung.

1.3 Herkunft, Hälterung und Präparation der Tiere

Die Versuchstiere wurden von einer Arbeitsgruppe der Universität Gießen übernommen und in Süßwasserbecken bei einer Temperatur von 20°C gehalten. Sie wurden 3-4 mal die Woche gefüttert und je nach Größe in verschiedene Anzuchtbecken umgesetzt. Zur Präparation wurden bis zu 2cm große, adulte Tiere ausgewählt, welche als erstes zur Betäubung auf Eis gelegt wurden. Zur Gewinnung der Hämolymphe wurde mit einer Kanüle der Fuß der Tiere penetriert, um dann die auslaufende Körperflüssigkeit mit einer Pipette abzusaugen. Adulte Tiere, welche für RNA-Analysen verwendet wurden, wurden unmittelbar nach der ersten Betäubung auf Eis in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C aufbewahrt.

2 Chemikalien und Geräte

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität von den Firmen Martin Mundo OHG (Mainz), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Petrischalen und Falcons wurden von Greiner (Heidelberg), 1,5 und 2ml Reaktionsgefäße von Brand (Wertheim), und 0,2ml PCR-Reaktionsgefäße von Thermo Fisher Scientific (Schwerte) bezogen. Wägearbeiten wurden mit Labor- und Analysewaagen der Firma Mettler (Giessen) durchgeführt. Für Zentrifugationsschritte wurden Tischzentrifugen der Firma Eppendorf (Hamburg; Modelle 5415R und 5424) verwendet. Größere Volumina wurden einer Megafuge (1.0 R) von Heraeus (Fulda) und in einer Sorvall (RC-5B) Zentrifuge von Du Pont Instruments (Bad Homburg) zentrifugiert. Wasserbäder und Heizblöcke stammten von der Firma Julabo (Seelbach), und Elektrophoresekammern samt Zubehör von der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen). Messungen des pH-Wertes wurden mit dem Digital-pH-Meter 646 der Firma Knick (Berlin) durchgeführt. Photometrische Messungen wurden mit einem Biophotometer von Eppendorf (Hamburg) vorgenommen.

3 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Für alle molekularen und mikrobiologischen Arbeiten sowie für Arbeiten in der Zellkultur wurden autoklavierte Geräte benutzt (120°C und 1 bar Überdruck). Wenn erforderlich wurden Puffer und Lösungen mit entmineralisiertem, autoklavierten Wasser angesetzt. Für das sterile Arbeiten in der Zellkultur wurden auch autoklavierte, sowie sterilfiltrierte Lösungen und Medien verwendet und bei jedem Arbeitsschritt, entsprechend der Einweisung in steriles Arbeiten, durchgeführt. Des Weiteren wurden bei allen Arbeitsschritten Latex Einmalhandschuhe und für Arbeiten mit Chemikalien wie Acrylamid, oder Ethidiumbromid Nitrilhandschuhe getragen. Alle Anwendungen mit RNA, wurden unter dem Verbrauch von bidestilliertem, mit 0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser, gestopften Pipettenspitzen, sowie RNase freien Plastikwaren durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass Nukleinsäurelösungen und Enzyme immer gekühlt, oder tiefgekühlt aufbewahrt wurden und sich somit nicht länger als nötig in ungekühltem Zustand befanden.

4 Mikrobiologische Methoden

4.1 Bakterienstämme

- *E. coli* StrataClone™ SoloPack® Competent cells (Klonierungsbakterien, Agilent, Böblingen).
- *E. coli* DH5α™ (Klonierungsbakterien, Invitrogen, Darmstadt).
- *E. coli* BL21-AI™ (Expressionsbakterien, Invitrogen, Darmstadt).

4.2 Plasmidvektoren

- StrataClone™ PCR Cloning Vector pSC-A-amp/kan (Agilent, Böblingen): 4,3 kb; Ampicillin- und Kanamycin Resistenz.
- pDONOR™ 221 (Invitrogen, Darmstadt): 4,7 kb; Kanamycin Resistenz; Gateway Eingangsvektor.
- pDEST™ 14 (Invitrogen, Darmstadt): 6,4 kb; Ampicillin Resistenz; Gateway Expressionsvektor.
- pIB/V5-His-Dest™ (Invitrogen, Darmstadt): 5 kb; Ampicillin- und Blasticidin Resistenz; 6x His-tag; Gateway Expressionsvektor; InsectSelect System.

4.3 Nährmedien und Agarplatten

Die Rezepte aller, für mikrobiologische Methoden benutzten Lösungen sind im Anhang (siehe F 2.1) aufgeführt. Alle Medien wurden nach diesen Rezepten hergestellt und 30 min. bei 1 bar und 120°C autoklaviert. Das noch flüssige LB-Agar wurde nach dem Autoklavieren in Petrischalen gefüllt. Nach Abkühlung auf etwa 55°C wurden die Medien mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, um ein selektives Wachstum der Bakterien zu ermöglichen. Die fertig gegossenen Petrischalen konnten dann für längere Zeit bei 4°C gelagert werden.

4.4 Plattenkultur

Die Bakterien einer Transformationsreaktion oder einer Glycerinkultur wurden unter sterilen Bedingungen auf einer mit dem entsprechenden Antibiotikum versehenen Platte ausgestrichen, und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.5 Flüssigkultur

Zur Herstellung einer Flüssigkultur wurden einzelne Bakterienkolonien von den über Nacht inkubierten Platten gepickt, und in 5ml LB-Medium überführt. Der Übertrag der Kolonien erfolgte mit einer sterilen Pipettenspitze. Dem Medium wurde zuvor das, der Resistenz des Bakterienvektors entsprechendem, Antibiotikum zugesetzt. Zur Vermehrung des Bakterienstammes wurde die Flüssigkultur dann über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt.

4.6 Glycerinkultur

Um Bakterien einer Flüssigkultur länger aufzubewahren, wurden Glycerinkulturen angesetzt. Hierzu wurden 850µl der Flüssigkultur mit 150µl Glycerin versetzt, und der Ansatz anschließend gut vermischt. Nach dem Schockgefrieren in Stickstoff wurden die Glycerinkulturen bei -80°C für mehrere Monate gelagert.

5 Molekularbiologische Methoden

5.1 Präparation von Nukleinsäuren

Für die Nukleinsäurepräparation wurden die lebenden Tiere zur Betäubung etwa 15 bis 30 min. auf Eis abgekühlt. Danach konnte die Schale entfernt und das Gewicht des Tieres bestimmt werden. Darauf folgend wurden die Tiere in flüssigem Stickstoff schockgefroren (-196°C), in einem autoklavierten Keramikmörser pulverisiert und das Gewebe bei - 80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

5.1.1 Präparation von Gesamt-RNA

Gesamt RNA aus Gewebe wurde entweder mit Hilfe des automatisierten Maxwell® Systems (Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers isoliert, oder in besonders reiner Form durch die Aufreinigung mit TRIzol® (Invitrogen, Darmstadt). Diese spezielle Reagenz enthält unter Anderem Guanidiniumthiocyanat, welches die Zellen lysiert und gleichzeitig in der Lage ist RNasen zu inaktivieren. Zusätzlich ist in TRIzol® Phenol enthalten, welches DNA und Proteine löst, die dann durch die Zugabe von Chloroform durch eine Phasentrennung von der RNA abgetrennt werden können. Die RNA in der wässrigen Phase wurde anschließend mit Ethanol präzipitiert und nach mehreren Waschschrinen in RNase freiem Wasser gelöst. Die so extrahierte RNA wurde entweder sofort weiterverwendet, oder längerfristig bei - 80°C gelagert.

5.1.2 Präparation genomischer DNA

Für die Isolierung von genomischer DNA, konnte das pulverisierte Gewebe direkt mit dem Maxwell® System (Promega, Mannheim) nach Herstellerprotokoll verarbeitet werden. Die Lagerung der auf diesem Wege isolierten DNA erfolgte bei - 20°C.

5.2 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Mit Hilfe der Ethanolfällung (Zeugin et al., 1985) können Nukleinsäuren von Verunreinigungen befreit, und gleichzeitig aufkonzentriert werden. Dafür wurde der wässrigen Nukleinsäurelösung 1/10 des Ausgangsvolumens 3M Natriumacetatpuffer (pH 5,8), sowie zwei Volumen eisgekühlter, absoluter Ethanol zugegeben. Nach Vermischen des Ansatzes, erfolgte die Präzipitation für 30 Min auf Eis. Im Anschluss wurde die ausgefallene Nukleinsäure sedimentiert (16000 x g, 10 Minuten, bei 4°C), der Überstand verworfen, und das getrocknete Nukleinsäurepellet nach mehreren Waschschrinen in einem geeignetem Puffer resuspendiert.

5.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde photometrisch über die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Bei einer Küvettenschichtdicke von 1cm, entspricht eine Extinktions-Einheit (A_{260}):

- 50µg/ml doppelsträngiger DNA
- 37µg/ml einzelsträngiger DNA
- 40µg/ml einzelsträngiger RNA

Da das Absorptionsmaximum von Polysacchariden bzw. Proteinen bei 230 bzw. 280 nm liegt, lässt sich durch Ermittlung dieser Extinktionswerte, d.h. der Quotienten OD 260/OD 230, bzw. OD 260/OD280, auch eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäuren treffen. Bei reinen DNA-, oder RNA-Proben liegt das Verhältnis der Extinktionswerte von 260/230 nm bzw. 260/280 nm bei Werten von 1,8 – 2,0.

5.4 Primer Design

Sämtliche, in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden lyophilisiert von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen, und sind im Anhang (siehe F 3.1, 3.2, 3.3) aufgelistet. Sie wurden in einer Konzentration von 100pmol/µl in bidestilliertem Wasser resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Für die Auswahl der Primersequenzen, sowie deren Überprüfung wurden die Programme Geneious (Drummond et al., 2011), sowie das Primer Blast Programm der Internetdatenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information) genutzt. Dabei sollten geeignete Primer folgende Grundsätze erfüllen:

- eine Länge von 18 bis 25 Nukleotiden
- GC-Gehalt von 40 - 60%
- keine Selbstkomplementarität
- keine Komplementarität zwischen dem forward und reverse Primer
- zueinander passende Annealingtemperatur der Primerpaare

5.4.1 *attB*-Primer Design

Für die Herstellung von Gateway Konstrukten zur rekombinanten Expression mussten sehr lange Primer konstruiert werden, welchen neben der sequenzspezifischen Information zusätzlich die für die Rekombination benötigten *attachment*-sites angehängt wurden. Durch die sequenzspezifischen Abschnitte und über die PCR Technologie können diese *attachment*-Seiten einer beliebigen Sequenz angefügt werden. Bei der Konstruktion der *attachment*-Primer mussten folgende Aspekte berücksichtigt werden:

forward Primer

Dem forward oder upstream Primer sollten zur Primerstabilisierung vier Guaninreste am 5'-Ende angefügt werden. Diesen vier Guaninen folgend wurden dann die 25bp lange *attB1*-Sequenz, sowie die 18-25bp lange zum 5'-Ende des Templates komplementäre Sequenz angehängt. Wenn der, wie der in dieser Arbeit verwendete Expressionsvektor kein Startcodon enthält, muss nach der genspezifischen Sequenz noch ein sich im Leseraster befindliches Methionin eingefügt werden. Weiterhin sollte der Primer noch für die bakterielle Expression ein Shine Dalgarno-, sowie für die eukaryotische Expression eine Kozak-Sequenz enthalten. Sofern das Protein in der eukaryotischen Expression sezerniert werden soll, muss noch ein Signalpeptid angefügt werden. Je nachdem, ob das zu exprimierende Protein zur Aufreinigung ein Fusion-Tag enthalten soll, muss dieses, wenn nicht schon im Expressionsvektor vorhanden, auch über die *attachment*-Primer angehängt werden. Dabei ist die Einhaltung des Leserasters, durch Einfügen von zusätzlichen Basen zu beachten.



Abb. 6 *attB2* forward Primer.

Beispiel für *attB1* forward Primer, hier ohne N-terminalen 6 x His-Tag, aber mit Shine Dalgarno Sequenz für die bakterielle Expression.

reverse Primer

Wie der forward Primer, setzt sich auch der reverse Primer aus vier Guaninresten am 5' Ende, gefolgt von einer 25bp langen spezifischen *attB2*-Sequenz, sowie einer 18 - 25bp langen, dem 3' Ende der Sequenz komplementären Sequenz, zusammen. Damit auch hier keine Leserasterverschiebung der Sequenz erfolgt, kann nach dem letzten Thymidin eine zusätzliche Base eingefügt werden. Bei Verwendung von Expressionsvektoren, welche kein Stopcodon besitzen, muss dieses im Leseraster nach der genspezifischen Sequenz eingefügt werden. Weiterhin kann auch hier ein C-terminales Tag zwischen die Sequenz, und das Stopcodon eingefügt werden.



Abb. 7 *attB1* forward Primer.

Beispiel *attB2* reverse Primer mit C-terminalem 6x His-Tag.

5.5 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, zur *in vitro* Vervielfältigung eines definierten Genabschnittes. Die benötigten Hilfsmittel zur Ausführung einer PCR sind eine thermostabile DNA-Polymerase, ein wenig Ausgangsmaterial (DNA-*template*), und zwei Oligonukleotidprimer, welche den zu amplifizierenden Abschnitt einrahmen. Ein typischer Reaktionsverlauf besteht aus einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten, einem Denaturierungsschritt, einem *Annealing*-schritt und schließlich einem Elongationsschritt. Zunächst wird die doppelsträngige „template“-DNA durch eine Temperaturerhöhung auf 94°C denaturiert, d.h. in ihre beiden Einzelstränge zerlegt. Im zweiten Schritt, dem *Annealing*, wird die Temperatur gesenkt, damit jetzt die im Überschuss vorhandenen Primer an die komplementären Sequenzen der Einzelstränge binden können, wobei die gewählte Gradzahl von der jeweiligen Schmelztemperatur der Oligonukleotide abhängt. Dabei lagert sich einer der Primer am „sense“-Strang (5`-3`), und der Andere am „antisense“-Strang (3`-5`) an. Damit legen sie den zu amplifizierenden Bereich fest und liefern mit ihrem freien 3`-OH-Ende den Startpunkt für die hitzestabile DNA-Polymerase. Dieses Enzym kann nun bei 68°C bis 74°C, was ihrem Aktivitätsoptimum entspricht und in Gegenwart von Desoxyribonukleotiden, zur DNA-Matrize komplementäre Stränge synthetisieren was als Elongation bezeichnet wird. Die Elongationszeit muss hierbei der gewünschten Fragmentlänge angepasst werden, wobei man davon ausgeht, dass 1000bp in 1 min. fertig gestellt werden können. Diese drei Schritte werden dann 30- bis 40 mal wiederholt, was eine millionenfache Amplifikation des gewünschten DNA-Bereiches zur Folge hat. Nach dem letzten Zyklus folgt ein finaler Elongationsschritt, indem nicht vollständige Fragmente aufgefüllt werden und an das 3`-Ende der synthetisierten Fragmente wird ein Desoxyadenin angehängt, ein Umstand der später für die Klonierung ausgenutzt werden kann. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche PCR-Techniken, sowie DNA-Polymerasen verwendet, die im Folgenden aufgeführt sind.

5.5.1 *Taq*TM DNA Polymerase Invitrogen (Darmstadt)

Diese Polymerase wurde aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermophilus aquaticus* isoliert, und hat ihr Temperaturoptimum bei 72°C. Da hier alle für die Reaktion benötigten Komponenten getrennt vorliegen, sind unter Benutzung dieses Enzyms mehrere Variationen in Bezug auf Enzym-, MgCl₂- und dNTP-Konzentrationen möglich. Dies hat den Vorteil, optimale Bedingungen für den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt zu ermöglichen. Reaktionsansatz, sowie Ablauf des Programmes wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.5.2 Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase NEB (Frankfurt)

Diese Polymerase ist ein künstlich hergestelltes Enzym, und leitet sich von der *Pyrococcus* DNA-Polymerase ab. Neben Ihrer 3`-5` Exonuklease Aktivität (proofreading) besitzt dieses Enzym eine zusätzlich eingebaute prozessivitätssteigernde DNA-Bindedomäne. Durch diese Eigenschaften, falsch eingebaute Basen bei schneller Synthese zu entfernen, eignet sich die Phusion® Polymerase besonders gut für alle Anwendungen, in denen eine korrekte DNA-Sequenz notwendig ist oder auch zum Amplifizieren längerer Templates. Aufgrund ihrer hohen Thermostabilität können Denaturierungstemperaturen von bis zu 98°C verwendet werden und auch die Elongationszeit kann stark herabgesetzt werden (30 s/kb). Auch hier wurde bei Verwendung dieses Enzyms nach Herstellerangaben verfahren.

5.5.3 Dream Taq™ Green PCR Master Mix Fermentas (St. Leon-Rot)

Dieser Master-Mix beinhaltet alle, für eine PCR Reaktion benötigten Komponenten mit Ausnahme der Primer und der DNA-Matrize. Zusätzlich ist dem Mix auch ein Farbstoff zugesetzt, der ein direktes Auftragen des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel ermöglicht. Bei der hier verwendeten Polymerase handelt es sich auch um die Taq-Polymerase, des Bakteriums *Thermophilus aquaticus*. Es wurden nach Herstellerangaben 25µl Ansätze pipettiert.

5.5.4 Advantage® 2 Polymerase Mix Clontech (Saint-Germain-en-Laye)

Dieser optimierte Mix aus zwei Enzymen beinhaltet eine “proofreading” Polymerase mit der hoch sensitiven Titanium™ Taq DNA-Polymerase. Diese Kombination gewährleistet neben Genauigkeit auch hohe Effizienz, und kann somit zur Amplifikation von langen und komplexen Templates oder für die Analyse von cDNA wenig transkribierter Bereiche genutzt werden. In dieser Arbeit wurde dieser Enzymmix für die Amplifikation der Genome Walker library (siehe 5.6) genutzt und nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.5.5 Klon PCR

Die Klon PCR wurde mit dem Dream Taq™ Green PCR Master Mix durchgeführt. Mit Hilfe dieser PCR-Technik konnten schnell Klonierungsreaktionen überprüft werden. Als Template dienten hierbei einzelne Bakterienkolonien, die zuvor mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Plattenkultur (4.4) gepickt wurden. Es wurden 25 µl Ansätze mit Gen-, oder Vektorspezifischen Primern in den von dem Hersteller empfohlenen Konzentrationen angesetzt. Die mit der Bakterienkolonie besetzten Pipettenspitze wurde dann in den fertigen Reaktionsansatz eingetaucht und mehrmals auf- und abpipettiert.

Mit der gleichen Spitze konnte danach eine Flüssigkultur (4.5) mit LB-Medium angeimpft werden. Der Ablauf der PCR-Reaktion wurde wie unter 5.5 beschrieben nach Herstellerempfehlung durchgeführt, lediglich die Elongationszeit wurde der Länge des zu amplifizierenden Bereiches angepasst.

5.5.6 Markierung von DNA mit Digoxigenin

Um DNA-Fragmente als Sonden für in *situ*-Hybridisierungen zu verwenden, wurden die entsprechende Fragmente zuvor über PCR mit Digoxigenin markiert. Der hierbei verwendete PCR Dig Labelling Mix von Roche (Mannheim) enthält neben den "normalen", unmarkierten Nukleosidtriphosphaten ein mit Dig modifiziertes Dig-UTP. Dieses wird über die PCR-Reaktion zusätzlich zu den anderen Desoxynukleotiden in den DNA-Strang eingebaut. Die so hergestellten Sonden können dann mit Digoxigenin-spezifischen Antikörpern, welche mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt sind, inkubiert werden. Die DNA-Sonden können so später über eine Farbreaktion detektiert werden. Entgegen den Herstellerangaben, wurden 2, anstatt 10µl für eine Markierungsreaktion benutzt. Um zu gewährleisten, dass die Sonden spezifisch binden, wurden die Primer so gewählt, dass sie einen Intron überspannender Bereich abdeckten. Als Template für die Sonden-PCR dienten zuvor aufgereinigte Plasmide.

5.5.7 RT PCR

Mit Hilfe der sog. RT PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) kann ein spezifische RNA-Abschnitt durch das Enzym Reverse Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben werden. Die Primer liefern hierbei ein freies 3' OH Ende als Startpunkt für die Synthese. In dieser Arbeit wurden Oligo-(dT)-, oder auch genspezifische Primer verwendet (siehe Anhang, F3.2) von denen ausgehend die cDNA synthetisiert wurde. Diese diente dann im darauf folgenden Schritt als Matrize für eine PCR-Reaktion. Verwendet wurde das Two-Step RT-PCR Kit von Invitrogen (Darmstadt). Bei dem Reaktionsverlauf wurde sich auch hier an das Herstellerprotokoll gehalten.

5.5.8 nested PCR

Bei der sogenannten nested PCR handelt es sich um eine Variation der normalen PCR-Reaktion, bei der in zwei aufeinanderfolgenden Reaktionen verschachtelt verschieden Primerpaare benutzt werden. In der ersten Reaktion wird ein bestimmter Abschnitt mit einem Primerpaar amplifiziert. Das Produkt dieser PCR dient dann als Matrize für die zweite Reaktion. Dabei ist es wichtig, dass das Primerpaar der zweiten Reaktion innerhalb des zuvor amplifizierten Bereiches liegt.

Mit dieser Methode kann die Spezifität der Reaktion erhöht werden, da es unwahrscheinlich

ist, dass unerwünschte Fragmente Bindungsstellen für beide Primerpaare enthalten. Diese Methode wurde wie im Herstellerprotokoll empfohlen mit dem Advantage[®] 2 Polymerase Mix (5.5.4) im Rahmen des Genome Walker Verfahrens durchgeführt.

5.6 Genome Walker[™] Universal Kit Clontech (Saint-Germain-en-Laye)

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich unbekannte genomische Sequenzen zu synthetisieren, die im 5'-Bereich einer bereits bekannten Sequenz liegen. Hierbei wird die DNA zuerst mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, und an die beiden Enden der dabei entstehenden Fragmente werden dann in einem weiteren Schritt Adaptoren ligiert. Mit der so hergestellten DNA-Library, wird zunächst eine PCR durchgeführt, mit einem Adaptor, und einem genspezifischen Primer. Die daraus resultierenden PCR Produkte, werden dann anschließend in einer zweiten Amplifikation als Template für eine nested PCR benutzt. Das GenomeWalker[™] Universal Kit wurde genau nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Als Polymerase wurde der vom Hersteller empfohlenen Advantage[®] 2 Polymerase Mix (5.5.4) verwendet.

5.7 PCR-Aufreinigung

Mit der PCR-Aufreinigung lassen sich amplifizierte PCR-Produkt aufreinigen, d.h. von kleineren Oligonukleotiden wie z.B. nicht gebundenen Primern befreien. Hierfür wurde das GeneJET[™] PCR Purification Kit der Firma Fermentas (St. Leon-Rot), oder GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (Roboklon, Berlin) nach Herstellerangaben verwendet. Beide Kits basieren auf dem Prinzip der reversibelen Bindung der DNA an die Silikamembran eines Zentrifugensäulchens unter Hochsalzbedingungen. Darauf folgen dann mehrere Waschschrirte, die Trocknung und anschließend die Elution der gebundenen DNA unter Niedrigsalzbedingungen.

5.8 Gelelektrophorese

5.8.1 DNA-Gelelektrophorese

Mit Hilfe dieser Methode können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt und isoliert werden. Dabei macht man sich zu Nutze, dass DNA wegen des negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückrats im elektrischen Feld zur Anode wandert. Zur Herstellung des Gels wird Agarose verwendet, ein Polysaccharid aus D-Galaktose und 3,6 Anhydro-L-galaktose, die glykosydisch miteinander verbunden sind. Diese aus Rotalgen gewonnene Substanz bildet eine Gelmatrix, die wie ein Molekularsieb wirkt. Die Wanderungsgeschwindigkeit

richtet sich demnach durch die von der Agarosekonzentration bestimmten Porengröße, sowie nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente. In dieser Arbeit wurden horizontale Gele verwendet, deren Agarosekonzentration je nach erforderlichem Auftrennungsbereich zwischen 0,8% und 2% lagen. Zur Detektion der DNA-Banden nach dem Lauf wurde den Agarosegelen 0,5 µl Ethidiumbromid pro ml Gel hinzugegeben. Die Ethidiumbromidmoleküle interkalieren zwischen den Basenpaaren des DNA-Doppelstrangs, wodurch sich das Anregungsspektrum des Ethidiumbromids verändert und die Fluoreszenz dieser Substanz erhöht wird. Das Ergebnis sind leuchtende Stellen auf dem Gel dort, wo sich die Nukleinsäure befindet und der Rest bleibt dunkel. Die Agarose wurde abgewogen und je nach gewünschter Konzentration in 1x TBE-Puffer gelöst. Das Gel wurde in der Kammer platziert und mit Elektrophoresepuffer (1x TBE) bedeckt. Die PCR Proben wurden mit Beladungspuffer vermischt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Um später die Größe der DNA-Fragmente abzuschätzen, wurde zusätzlich meist in die äußeren Taschen noch ein DNA-Marker als Größenstandard aufgetragen. Das so vorbereitete Gel konnte dann an eine konstante Spannungsquelle (6V/cm Elektodenabstand) angeschlossen werden. Der Gellauf konnte abschließend mittels eines Geldokumentationssystems der Firma Peqlab (Erlangen) und einer daran angeschlossenen Kamera (Sony, Berlin) festgehalten werden. Alle für diese Methode verwendeten Lösungen sind im Anhang unter F 3.4.1 aufgeführt.

5.8.2 RNA-Gelelektrophorese

Um die Qualität einer isolierten RNA zu überprüfen konnte nach erfolgter Präparation eine RNA-Gelelektrophorese durchgeführt werden. Im Gegensatz zu der Gelelektrophorese mit DNA musste hier darauf geachtet werden, dass die einzelsträngige RNA nicht durch RNasen degradiert wird. Dies konnte durch den Zusatz von Formaldehyd zu dem Gel, sowie zu dem verwendeten Probenpuffer, welches die Wasserstoffbrückenbindung blockiert, verhindert werden. Der RNA wurden 1/10 Probenpuffer zugegeben, und dieses Gemisch wurde dann auf 70°C erhitzt. Anschließend wurde die Probe durch eine zweiminütige Inkubation in Eiswasser wieder abgekühlt. Auch hier wurde das Gel mit Ethidiumbromid versetzt, um die RNA sichtbar zu machen. Die hier verwendete Minigelkammer wurde auf Eis platziert, und an eine Spannung von 100 V angeschlossen. Die Dokumentation erfolgte wie unter 5.8.1 beschrieben und Rezepte sind unter F 3.4.2 aufgelistet.

5.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Nach erfolgter elektrophoretischer Trennung konnte das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden. Diese Methode der DNA-Isolierung hat den Vorteil, dass lediglich das gewünschte PCR-Produkt isoliert wird ohne andere mitamplifizierte, unerwünschte Nebenprodukte zu erhalten. Alle in dieser Arbeit erhaltenen Fragmente wurden mit dem GeneJet™ Gel Extraction Kit der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) isoliert. Dabei wird das Gel mit einem in dem Kit enthaltenen Puffer vermischt und geschmolzen. Im Folgenden kann die DNA dann über eine in dem Kit enthaltenen Säule aufgereinigt und extrahiert werden. Das Prinzip dieser Methode ist das Gleiche wie bei der unter 5.7 beschriebenen PCR-Aufreinigung.

5.10 Klonierung

5.10.1 Klonierung von PCR-Produkten

Als Klonierung wird die Methode bezeichnet, mit der ein beliebiges DNA-Fragment in einen Vektor integriert werden kann (Ligation), welcher dann die Vermehrung dieser DNA in Wirtszellen ermöglicht (Transformation). Somit wird durch Anwendung dieser Methode das Kopieren der gewünschten PCR-Produkte in hoher Anzahl und sehr reiner Form ermöglicht. Die vorher gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden aus dem Gel extrahiert, um sie dann anschließend mit dieser Methode zu vervielfältigen. Für die vorliegende Arbeit wurde zum Überprüfen der amplifizierten Fragmente das StrataClone™ PCR Cloning Kit (Agilent, Böblingen) verwendet. Wobei die zu klonierenden Fragmente hier ein durch die Polymerase an das 3'-Ende angehängtes Desoxyadenin benötigen, welches sich dann mit dem 3'-Desoxyuracil des Vektors mit Hilfe einer Topoisomerase 1, verbinden kann. Die Vorgänge der Ligation, Transformation, sowie alle Mengenangaben und weitere Vorgehensweisen wurden wie in der Herstelleranleitung beschrieben durchgeführt.

5.10.2 Die Gateway™ Klonierung

Um die zu exprimierenden Fragmente in die gewünschten Expressionsvektoren (siehe 4.2) zu bringen, wurde in dieser Arbeit mit der Gateway™-Technologie (Invitrogen, Darmstadt) gearbeitet. Hierbei handelt es sich um eine universelle Klonierungsmethode, welche auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ basiert (Landy, 1989). Dabei können durch die Rekombination zwischen bestimmte homologen Sequenzen (sog. *attachment* Seiten) beliebige DNA-Fragmente, unter Beibehaltung des richtigen Leserasters, sowie der richtigen Orientierung, in verschiedenen Vektoren inkloniert werden (Hartley et al., 2000).

Die *attachment* Seiten B, P, L und R, innerhalb deren Grenzen der rekombinante Sequenzaustausch stattfindet, dienen hierbei, zum einen als Bindungsstelle für die Rekombinationsproteine und zum anderen, beinhalten sie auch die für die Rekombination notwendige 15bp lange Kernregion. Rekombinationsproteine sind hierbei die Enzyme Bakteriophage λ Integrase, die Exzisionase, sowie das *E. coli* Protein Integration Host Factor. Diese Faktoren bringen die Zielsequenzen in räumliche Nähe, schneiden und verbinden die DNA-Fragmente. Alle nativen Komponenten wurden für ihren Einsatz in dem Gateway-System zur Verbesserung der Effizienz, sowie der Spezifität modifiziert (Yin et al., 1985). Das ganze System baut sich aus zwei hintereinander durchzuführenden Schritten, der sog. BP-, und der LR-Reaktion auf, die im Folgenden beschrieben sind. Vorteil der Gateway Klonierung ist, dass der in der ersten Reaktion generierte Vektor (Eingangsklon), welcher das gewünschte DNA-Fragment trägt, in der zweiten Reaktion in viele unterschiedliche Vektorsysteme, auch für unterschiedliche Expressionssysteme eingebracht werden kann.

BP-Reaktion

Diese Reaktion entspricht dem lysogenen Zyklus des Bakteriophagen λ und wird von dem BP-Clonase IITM Enzymmix katalysiert. Der Mix enthält dabei ein Gemisch aus der Integrase, und dem Integration Host Factor. Die Reaktion findet zwischen dem in einer *attachment* PCR generiertem Produkt, und den *attachment* P-Seiten des Donorvektors statt. Ein sich im Donorvektor befindliches *ccdB* Lethal-Gen wird hierbei gegen die Zielsequenz ausgetauscht. Resultierend aus dieser Reaktion entsteht also der mit *attachment* L versehene Eingangsklon, welcher das gewünschte DNA-Fragment trägt, und ein *attachment* R tragendes Beiprodukt, das das Lethal-Gen enthält. In dieser Arbeit wurden die *attachment* PCR-Produkte alle in den Eingangsklon pDONORTM 221 (4.2) eingebracht.

Für die Durchführung einer BP-Reaktion sollten der Donorvektor und das *attachment*-PCR-Produkt in äquimolaren Mengen eingesetzt werden. Wie im Protokoll des Herstellers angegeben, wurden 50fmol des *attachment*-PCR-Produktes in einem 10 μ l Ansatz eingesetzt. Für die Umrechnung von femtomol zu nanogramm wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{ng} = (\text{Einsatzmenge in fmol}) \times (N) \times (660 \text{ fg/fmol}) \times (1 \text{ ng}/10^6 \text{ fg})$$

Dabei entspricht N der Größe des PCR-Produktes in Basenpaaren. Als Beispiel für eine 1000bp langen Sequenz:

$$\text{ng} = (50 \text{ fmol}) \times (1000\text{bp}) \times (660 \text{ fg/fmol}) \times (1 \text{ ng}) \\ 10^6 \text{ fg}$$

$$\text{ng} = 33 \text{ ng des attachment-PCR-Produktes wird benötigt}$$

Der Reaktionsansatz, wurde wie im Manual empfohlen mit positiv und negativ Kontrolle angesetzt. Nach dem Mischen des Ansatzes wurde allen pipettierten Proben, außer der Negativkontrolle, 2 μ l des BP-Clonase IITM Enzymmixes hinzugegeben. Darauf folgte eine Inkubation von mind. 1 h bei 25°C. Um die Reaktion nach gewünschter Zeit dann abzustoppen, wurde dem Ansatz 1 μ l Proteinase K (2 μ g) zugegeben, und für 10 min bei 37°C inkubiert.

Für die Transformation wurden 1µl dieses BP-Ansatzes zu 25µl chemisch kompetenten *E. coli* DH5α (4.1) gegeben. Da der in dieser Arbeit verwendete Vektor (pDonor221) eine Kanamycin Resistenz besitzt, wurde der Ansatz nach dem Hitzeschock und der Inkubation auf den entsprechenden LB-Platten ausplattiert. Um die Größe des Inserts zu überprüfen, wurde am nächsten Tag eine Klon-PCR (5.5.5) durchgeführt, es wurden ausserdem Flüssigkulturen angesetzt, aus denen dann die Plasmide am nächsten Tag isoliert wurden. Abschließend wurden diese mit den entsprechenden Vektorprimern (hier M13 forward und reverse (siehe Anhang F3.1) sequenziert.

LR-Reaktion

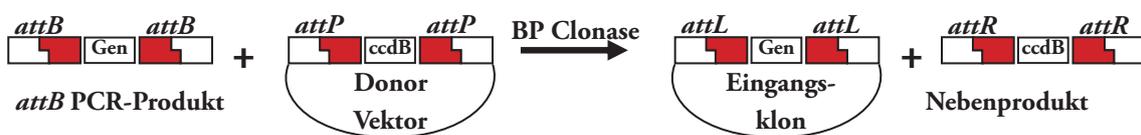


Abb. 8 Darstellung der BP-Reaktion.

Die BP-Clonase katalysiert eine Rekombinationsreaktion zwischen dem *attB*-PCR-Produkt und dem *attP*-Seiten tragenden Donorvektor. Dadurch wird das *ccdB*-Lethal-Gen im Donorvektor gegen die Zielsequenz ausgetauscht. Am Ende der Reaktion entsteht der rekombinante Eingangsklon.

Diese Reaktion wird von dem LR-Clonase IITM Mix katalysiert, und basiert auf dem lytischen Weg des Bakteriophagen λ . Durch die Rekombination zwischen dem in der BP-Reaktion generiertem *attachment* L tragendem Eingangsklon und dem für die Expression gewünschtem Zielvektor entsteht hier der Expressionsklon. Als Zielvektoren für die Expression wurden in dieser Arbeit, für die bakterielle Expression, der pDest14 Vektor (4.2) benutzt, und für die eukaryotische Expression der Zielvektor pIB/V5-His-Dest (4.2). Wie bei der vorher beschriebenen BP-Reaktion wurde auch die LR-Reaktion nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.



Abb. 9 Schematische Darstellung der LR-Reaktion.

Die LR-Clonase katalysiert die Reaktion zwischen dem in der BP-Reaktion generierten Eingangsklon, und dem *attR*-sites tragenden Zielvektor. Auch hier wird das *ccdB*-lethal-Gen gegen die Zielsequenz ausgetauscht. Auf diese Weise entsteht der rekombinante Expressionsklon.

5.11 Blau-Weiß-Selektion

Nach erfolgter Ligation und Transformation (siehe 5.10.1) wurden die Bakterien auf den mit der Vektorresistenz entsprechenden Agarplatten ausgestrichen, und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag mussten dann die Bakterienklone, welche den Vektor mit dem entsprechenden Insert aufgenommen hatten von den anderen, nicht Insert tragenden unterschieden werden. Die Blau-Weiß-Selektion ist eine Methode, welche diese Unterscheidung leicht ermöglicht. Sie wurde für alle, mit dem StrataClone™ PCR Cloning Kit klonierten PCR-Produkte angewandt. Die Selektion beruht darauf, dass der verwendete *E. coli* Stamm hier ein mutiertes LacZ-Gen trägt, welches für den α -Peptidteil einer β -Galaktosidase codiert. Um das Enzym zu komplementieren, muss über den transformierten Plasmidvektor der fehlende Teil eingebracht werden. Allerdings bleibt die Expression dieses Teils aus, wenn zuvor durch die Ligation ein Insert (PCR-Produkt) einligiert wurde. Erfolgreich komplementiert, d.h. ohne Insert, katalysiert das exprimierte Enzym das Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galaktopyranosid), welches dann zu einem blauen Produkt umgesetzt wird. Somit sind negative Bakterienkolonien ohne das Insert durch ihre blaue Färbung leicht von den positiven, das Insert tragende Kolonien zu unterscheiden. Diese weiß gefärbten Kolonien wurden wie unter 4.5 beschrieben mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt, und zur Vermehrung in eine Flüssigkultur gegeben.

5.12 Plasmidisolierung

Die Isolierung der einklonierten Inserts aus den in der Flüssigkultur gewachsenen Bakterienzellen erfolgte nach dem Protokoll des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon Rot). Die Anwendung beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen und der selektiven, reversiblen Bindung der DNA an die HiBind-Silikamenbranen der Zentrifugensäulchen. Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass die bakterielle DNA nach Denaturierung nicht renaturieren kann, und so mit den bakteriellen Proteinen, und Zellbestandteilen gefällt und abzentrifugiert wird. Die dann im Überstand vorhandene Plasmid-DNA bindet dann an die Silikamembran der Säulchen, wird in mehreren Waschschritten gereinigt und letztendlich mit Wasser von der Säule eluiert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde anschließend wie unter 5.3 beschrieben photometrisch bestimmt.

5.13 Southern Blot

Ziel dieser Methode ist es, eine bestimmte DNA-Sequenz in einem komplexen DNA-Gemisch nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde das Verfahren leicht abgeändert dazu verwendet, um die Bindungsspezifität von DNA-Sonden, welche später in der *In situ*-Hybridisierung eingesetzt wurden, zu testen. Durch die Methode der *In situ*-Hybridisierung sollten die unterschiedlichen Expressionsorte zweier Isoformen eines Gens in dem Versuchsobjekt nachgewiesen werden. Aus den Sequenzen der jeweiligen Isoformen des Gens wurden spezifische Sonden (siehe 5.5.6) für die Detektion hergestellt. Durch eine zuvor durchgeführte Überprüfung der Sonden via Southern Blot, sollte ausgeschlossen werden, dass die Sonden kreuzhybridisieren. Dafür wurden je 1 µl Plasmid-DNA, die das entsprechende Gen trug, auf Nitrocellulosemembran in einer Verdünnungsreihe (immer jeweils 1:5) aufgetropft. Die DNA sollte dann kurz an die Nylonmembran antrocknen, bevor sie durch die Zugabe der Denaturierungslösung degradiert wird. Dafür wurden mehrere Whatmanpapiere mit der Denaturierungslösung getränkt, und die Nylonmembran mit der "DNA-Seite" nach oben daraufgelegt. Nach fünf minütiger Denaturierung wurde das gleiche Verfahren auch für die Neutralisation, und die Äquillibrierung angewandt, wobei nach jedem "Tränkschritt" die Membran 15-20 Min an der Luft getrocknet wurde. Zur Fixierung wurde die Membran dann 30 Min bei 80°C in den Trockenschrank gelegt. Darauf folgte ein zweimal fünfminütiges schwenken in Äquillibrierungslösung, Zum Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran 1h bei 68°C im Wasserbad mit Hybridisierungslösung prähybridisiert, bevor es zu der eigentlichen Hybridisierung der Sonde an die DNA kam. Vor der Hybridisierung mussten die Sonden denaturiert werden, damit sie einzelsträngig an die ebenso durch Denaturierung einzelsträngige Plasmid-DNA binden konnten. Dafür wurden beide Sonden für 10 Minuten auf 65°C im Cycler erhitzt. Danach wurden die Sonden in einer Konzentration von 10ng/ml zu der Hybridisierungslösung gegeben (10ng Sonde pro ml Hybridisierungslösung). Die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht bei 68°C im Wasserbad. Am nächsten Tag musste dann die Sonde durch mehrerer Waschschrte entfernt werden (2 x 5 Min in Waschpuffer 1, bei Raumtemperatur; 2 x 15 Min in Waschpuffer 2, bei 68°C). Darauf folgte die Blockierung für 30 Min bei Raumtemperatur, bevor dann der Antikörper zum Binden dazu gegeben werden konnte. Bei dem hier verwendeten Antikörper handelt es sich um ein α - Dig AP-Konjugat, das mit der alkalischen Phosphatase gekoppelt ist und mit dem in der Sonde eingebautem Digoxigenin reagieren kann. Die Membran wurde 60 Min in einer 1 : 7500 Verdünnung des Antikörpers in Blockierungslösung inkubiert. Danach erfolgten wieder drei fünfminütige Waschschrte bei Raumtemperatur in Waschpuffer 3. Dann wurde die Membran kurz in Äquillibrierungspuffer geschwenkt bevor die Farbreaktion durchgeführt werden konnte. Durch die zu dem Äquillibrierungspuffer zugegebene Färbelösung findet eine Farbreaktion statt, in der das BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolphosphat)

von der Phosphatase zu einem violetten Produkt umgesetzt wird. Dadurch ergibt sich an den Stellen auf der Membran, an denen die Sonde erfolgreich an die gesuchte DNA hybridisiert hat eine violette Färbung, die dann durch H_2O gestoppt werden kann. Die Rezepte aller hier verwendeter Lösungen, auch die der Färbelösung sind im Anhang unter F 3.5 aufgeführt.

6 Sequenzanalyse

6.1 Sequenzierung von DNA

Die in dieser Arbeit generierten DNA-Fragmente wurden zur Sequenzierung an die StarSEQ® GmbH (Mainz) übergeben. Zu der zu sequenzierenden Probe (400-700ng Plasmid-DNA, oder 50-200ng PCR-Produkt) musste vorab nur der entsprechende Primer gegeben werden (1µl einer 10µM Primerlösung). Anschließend wurden die so vorbereiteten Proben dann von Mitarbeitern der Firma StarSEQ® nach dem Sanger-Verfahren (Sanger et al., 1977) sequenziert. Diese, auch als Kettenabbruch-Synthese bezeichnete Methode beruht auf den zufälligen Einbau von dem Sequenzieransatz zugefügten Didesoxynukleotiden. Diese besitzen keine 3'OH-Gruppe, was es der Polymerase unmöglich macht weiter zu synthetisieren. Ausgehend von dem Primer wird die Sequenz also linear durch die Polymerase verlängert, bis diese durch ein eingebautes Didesoxynukleotid die Polymerisationsreaktion abbrechen muss. In Folge dessen entstehen hierbei Fragmente unterschiedlicher Länge die in einem Gel aufgetrennt werden können, und durch ihr Laufverhalten Rückschlüsse auf ihre Basenabfolge erlauben. Nach erfolgter Sequenzierung wurden die Rohdaten von StarSEQ® in elektronischer Form (Fasta Datei) übermittelt. Diese Daten konnten dann mit Hilfe verschiedener Programme weiterverarbeitet und analysiert werden (6.2).

6.2 Analyse der Sequenzierungen

Die erhaltenen Sequenzierungen wurden zunächst mit dem Softwarepaket Geneious (Drummond et al., 2011) auf ihre Qualität überprüft. Weiterhin konnten die Sequenzen mit den Internetdatenbanken des NCBI (National Center of Biotechnology Information) abgeglichen werden, und mit dem Internetprogramm Translate, oder auch mit dem Geneious Softwarepaket in Aminosäuresequenzen übersetzt werden. Alle in dieser Arbeit vorgenommenen Alignierungen, Assemblierungen sowie statistische Sequenzauswertungen wurden auch mit Geneious, oder Programmen der ExPasy Internetseite durchgeführt. Für die Charakterisierung der Sequenzen, wie die Identifizierung des Signalpeptids wurde der SignalP 4.0 Server (CBS) verwendet. oder für die Ermittlung der Exon Intron Struktur das Internetprogramm Genewise (EMBL-EBI). Alle Internetadressen der hier verwendeten Programme und Internetseiten sind weiter ausführlich im Anhang F 3.6.1 aufgelistet.

6.3 Datenbankanalysen

Mit den aus der Maldi Analyse (Matrix-assisted laser desorption/ionization) erhaltenen Peptid-Sequenzen wurden eine Proteindatenbanksuche durchgeführt. Hierfür wurde das tblastn Programm der NCBI Datenbank verwendet. Mit Hilfe dieser Datenbank war es möglich zwei den Peptidfragmenten ähnliche Sequenzen zu bekommen. Bei diesen Sequenzen handelte es sich um sogenannte ESTs (Expressed Sequence Tags), kurze, exprimierte DNA-Sequenzen, welche im Internet zugänglich sind. Durch eine darauffolgende Suche in der Datenbank mit diesen ESTs, konnten für die gesuchten Sequenzen SRA-Daten (Short Read Archive) ermittelt werden. Diese wurden dann mit Hilfe von Geneious zu Contigs assembliert. Mit diesen Contigs wurde dann die im Internet frei zugängliche genomische Datenbank von *Biomphalaria glabrata* (http://129.24.144.93/blast_bg/2index.html) durchsucht, woraus sich Scaffolds ergaben, mit denen dann die komplette Exon Intron Struktur für beide Isoformen ermittelt werden konnten. Für die Charakterisierung der beiden Sequenzen wurden weiterhin die Programme Genewise (EMBL-EBI), und der SignalP 4.0 Server (CBS) herangezogen.

7 Rekombinante Expression

7.1 Rekombinante Expression in Bakterienzellen

Die rekombinante Expression in Bakterienzellen eignet sich um die gewünschten Proteine in großen Mengen relativ einfach und schnell herzustellen. Ein bevorzugtes System hierfür ist die Produktion des Proteins in dem Darmbakterium *E. coli*. Mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Gateway Klonierung konnten die zu exprimierenden Gene in den bakteriellen Expressionsvektore pDEST14 eingebracht werden. Da dieser kein C-, oder N-terminales Tag enthielt, wurden diese über eine zuvor durchgeführte attachment PCR den Genen angefügt, diese so konstruierten Sequenzen konnten dann wie unter 5.10 beschrieben inkloniert werden. Mit 10ng dieser Expressionskonstrukte wurden dann BL21-AITM Expressionsbakterien transformiert. Dabei wird das inklonierte Zielgen von der T7 RNA-Polymerase abgelesen, welche der Kontrolle des in dem Vektor enthaltenen T7-Promoters unterliegt. Die Expression in den BL21-AI-Bakterien wird von den Zuckern L-Arabinose und Glucose reguliert. Durch L-Arabinose kann die Expression induziert werden (Lee et al., 1987), während durch Glucose die basale Expression weiter verringert werden kann (Miyada et al., 1984). Die Rezepte aller hierfür verwendeten Puffer und Lösungen können im Anhang unter F 4.1 nachgeschlagen werden.

7.1.1 Expressionsprotokoll

Für die Expression wurden positive Klone der zuvor transformierten Expressionsbakterien von einer Ampicillin-haltigen LB-Platte gepickt, um damit zunächst 5ml LB-Medium, welches auch Ampicillin enthielt, anzupfen. Nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht, konnten diese dann zu größeren Ansätzen von LB-Medium gegeben werden. Diese wurden wieder bei 37°C inkubiert, und immer wieder verdünnt, bis die Bakteriensuspensionen bei gewünschtem Volumen (hier je 1L) eine OD₆₀₀ von 0,7 - 0,8 hatten. Nun konnte ein Teil der so herangewachsenen Bakterienkulturen als Negativkontrolle abgenommen werden, und der Rest mit je 0,2% L-Arabinose induziert werden. Alle Ansätze, die Induzierten, als auch die uninduzierte Negativkontrolle wurden dann über Nacht bei 24 - 25°C auf dem Schüttler inkubiert.

7.1.2 Proteinpräparation

Die Ernte der über Nacht inkubierten Expressionsbakterien erfolgte durch eine 15minütige Zentrifugation bei 5000rpm und 4°C. Nach dem Dekantieren des Überstandes, konnte das Bakterienzellen haltige Pellet entweder bis auf Weiters bei -20°C eingefroren werden, oder direkt weiter verarbeitet werden. Zum mechanischen Aufbrechen der Bakterienzellwände wurde das Pellet drei bis viermal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Wasserbad bei 42°C wieder aufgetaut. Anschließend wurde das Pellet dann in 1/10 Volumen des ursprünglichen Expressionsansatzes Lysispuffer resuspendiert. Darauf folgte eine einstündige Inkubation auf Eis, in welcher die Ansätze immer wieder gevortext wurden, um die Pellets komplett zu lösen. Um alle unerwünschten bakteriellen Nukleinsäuren zu entfernen wurde den Proben 25U Benzonase Nuklease pro ml Ansatz zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 Minuten bei 37°C, und nochmal einer halben Stunde auf Eis, wurden dann die unlöslichen Bestandteile per Zentrifugation (40 Min, 5000rpm, 4°C) abgetrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand weggeschüttet, und zu dem Pellet 30 ml Puffer B gegeben. Zum Aufbrechen dieses "inclusion body pellets" wurden die Proben anschließend noch 10-20 mal 30 Sekunden lang bei 200 - 300Watt sonifiziert. Nach jeder Sonifiziereinheit wurden die Proben wieder für 30 Sekunden auf Eis gehalten. Die restlichen unerwünschten bakteriellen Bestandteile, wie die Membran der inclusion bodies, konnten dann durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (15 Min, 2000xg, 10°C) endgültig entfernt werden. Nach jedem der hier aufgeführten Schritte wurde ein Teil der Proben abgenommen, um jedes Stadium der Proteinpräparation per SDS-PAGE und Western-Blot (8.3.1, 8.10) überprüfen zu können. Das exprimierte, so gewonnene rekombinante Protein wurde dann mit Hilfe des His-Tags über eine Nickelsäule (8.4.3) aufgereinigt, bevor die so gewonnenen Monomere in einem Puffer zu der Quartärstruktur rückgefaltet werden konnten (8.5).

Nach dem Refold wurden die Proben eingeeignet (8.6), und in den entsprechenden Puffer umdialysiert (8.8), um sie dann entweder über eine Gelfiltrationssäule (8.4.2) weiter aufzureinigen, oder direkt über Elektronenmikroskopie (12) zu analysieren. Bei einem Teil der rekombinanten Proteine, welche vorher mit einem N-terminalen His-Tag und einer Tev-Schnittstelle versehen wurden, wurde der Tag nach der Rückfaltung entfernt.

7.2 Rekombinante Expression in Insektenzellen

Die Nutzung eines eukaryotischen Expressionssystems, wie der Insektenzellkultur, bietet gegenüber dem prokaryotischen System den Vorteil, dass hier posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Glykosylierungen oder Phosphorylierungen, möglich sind. In dieser Arbeit wurden verschiedene Konstrukte in sog. High Five™ Insektenzellen (Invitrogen) stabil transfiziert. Mit der stabilen Expression im InsectSelect™ System ist es möglich auch für die bakterielle Expression zu große Proteine im Überstand zu exprimieren. Auch hier wurden mit Hilfe der Gateway-Klonierung (5.10.2) das Expressionskonstrukt in den verwendeten Expressionsvektor (pIB/V5 - His-DEST™-Vektor, (4.2) eingebracht. Dieser zeichnet sich durch ein C-terminales His-Tag, und seine Blasticidin Resistenz aus. Pufferrezepte und verwendete Medien sind im Anhang unter F 4.2 aufgeführt.

7.2.1 Kultivierung der Insektenzellen

Die Insektenzellen wurden adhärent als Monolayer bei 27°C in Brutschränken (Fricocell 55, Memmert) unter ausreichender Belüftung mit Sauerstoff kultiviert. Um optimales Wachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen alle 2-4 Tage, bei 80 - 90 % Konfluenz umgesetzt. Dafür wurde zunächst das alte, verbrauchte Medium, welches auch tote, nicht adhärente Zellen enthielt, abgesaugt. Mit frisch angesetztem Medium wurden dann die Zellen vorsichtig von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst, um sie dann in verschiedenen Verdünnungen in neue Flaschen umzusetzen. Je nach Verdünnung wurden so in frischen Zellkulturflaschen (25cm³, 75cm³, 175cm³) neue Zelllinien kultiviert. Die Bestimmung der Zellzahl und Vitalität der Zellen erfolgte regelmäßig unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer.

7.2.2 Transfektion der Insektenzellen

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA, oder RNA in eukaryotische Zellen. In dieser Arbeit wurden die Insektenzellen stabil transfiziert, d.h. die Plasmide wurden dauerhaft in das Genom der Wirtszellen eingebracht. Dabei wurde sich die Methode der Lipofektion zum Einbringen der Fremd-DNA zu Nutze gemacht. Dabei wird das genetische Material, in diesem Fall das Plasmid, mit Hilfe von Liposomen die leicht mit der

Zellwand fusionieren können eingebracht. In dieser Arbeit wurde dafür das kationische Lipid Cellfectin® (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Für die Transfektion wurden 5 µg des Expressionskonstruktes (aufgereinigtes Plasmid, Insert im pIBV5-His-DEST™-Vektor) mit 250 µl Zellkulturmedium versetzt, sowie in einem zweiten Eppendorfgefäß 20 µl Cellfectin mit der gleichen Menge an Medium. Beide Ansätze wurden vorsichtig gemischt, zusammengegeben werden, und wieder vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min. wurde das Gemisch dann tropfenweise auf 60% konfluente *High-five* Zellen gegeben. Zwei Tage nach der Transfektion wurde dann mit der Selektion begonnen.

7.2.3 Selektion der transfizierten Zellen

Um positiv transfizierte Zellen von Untransfizierten, oder durch die Transfektion geschädigten Zellen zu isolieren, wurde das Antibiotikum Blasticidin zu den Insektenzellen gegeben. Zuerst musste zwei Tage nach der Transfektion der Überstand abgenommen werden, um die Zellen wie in 7.2 beschrieben in einer 1:3 Verdünnung umzusetzen. Einen Tag später wurde dann das Antibiotikum in einer Konzentration von 50 µg pro ml Insektenzellmedium hinzugegeben. Nach drei bis vier Tagen wurde das alte Medium durch frisches ersetzt, und wieder das Selektionsantibiotikum hinzugegeben, solange bis nach ca. 1 Woche Foci positiver, sich klonal vermehrender Zellen zu erkennen waren. Nun konnte die Konzentration des Blasticidins auf 10 µg pro ml Medium herabgesetzt werden. Wie unter 7.2.1 beschrieben wurden diese stabilen, das Protein in den Überstand exprimierenden Zellen dann bei 80 - 90% Konfluenz umgesetzt.

7.2.4 5`Aminolävulinsäure

Für die Expression des *Biomphalaria* Hämoglobins wurde dem Expressionsmedium nach erfolgter Selektion 1 mM 5`-Aminolävulinsäure zugegeben. Dabei handelt es sich um eine Vorstufe des Häms in der Porphyrinsynthese, das benötigt wird um die prosthetische Gruppe des Hämoglobins zu bilden.

7.2.5 Bioreaktor

Das Umsetzen der stabil transfizierten, selektierten Zellen erfolgte so lange, bis sie sich zu einer hohen Zellzahl ($1,6 \times 10^6$ Zellen/ml) vermehrt hatten, und in den Bioreaktor (CEL-Line AD 1000; IBS Integra, Chur) umgesetzt werden konnten. In diesem ist ein großes Mediumkompartiment durch eine semipermeable Membran von einem kleinen Zellkompartiment getrennt. Die Zellen wachsen auch hier adhärent am Boden des Bioreaktors, und werden über die Membran mit den Nährstoffen des Mediums versorgt. Die in den Überstand szenierten rekombinanten Proteine konnten dann aus dem Zellkompartiment des Bioreaktors geerntet werden.

7.2.6 Proteinpräparation

Die rekombinanten Proteine konnten aus dem Insektenzellüberstand durch den im Vektor enthaltenen His-Tag, über eine Nickelmatrix (8.4.3) aufgereinigt werden. Um verschieden große rekombinante Partikel voneinander zu trennen wurde eine Gelfiltration durchgeführt (8.4.2), und die aufgereinigten Partikel dann über proteinbiochemische Standardmethoden, wie SDS-PAGE, Western-Blot oder Immunelektrophorese charakterisiert.

8 Proteinbiochemische Methoden

8.1 Hämolympheentnahme

Um die nativen Proteine von *Biomphalaria glabrata* aufzureinigen, musste zuerst die Hämolymphe entnommen werden. Dafür wurden die Tiere zuerst ca. 10 bis 15 Min auf Eis gehalten, um sie zu narkotisieren. Das erste Stück der filligranen Schale wurde abgebrochen, um dann mit einer feinen Kanüle in den Fuß zu stechen. Die ablaufende Hämolymphe konnte dann mit einer Pipette abgesaugt, und in einem Eppendorfgesäß auf Eis gesammelt werden. Um Zellbestandteile und Gewebeteile zu entfernen wurde die Hämolymphe dann bei 10.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 8.2 beschrieben.

8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen können in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt werden. Diese Absorption ist typisch für Proteine und wird hervorgerufen durch die Absorption der aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin. Dabei entspricht eine OD_{280} von 1 einer Proteinkonzentration von 1mg/ml. In dieser Arbeit wurde auch mit dem Hämoglobin von *Biomphalaria glabrata* gearbeitet, dieses besitzt ein zweites typisches Absorptionsmaxima bei 411 - 414nm. Dabei entspricht der Peak bei 414nm dem oxygenierten Zustand des Hämoglobins, und der bei 427nm dem deoxygenierten Zustand, was durch die Zugabe von Natriumdithionit zu der Probe erreicht werden kann.

8.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Bei dieser Methode macht man sich zu Nutze, dass sich Proteine entsprechend ihrer Ladung in einem elektrischen Feld auftrennen lassen. Es wird dazu ein Polyacrylamidgel als Matrix verwendet, das sich aus einem weitmaschigen Sammelgel und einem enger vernetzten Trenngel zusammensetzt. Die Proteinproben werden zunächst in dem Sammelgel fokussiert, das meist ein niedrigprozentiges Gel mit dadurch großen Porenweiten darstellt. Im Trenngel kann der Vernetzungsgrad variiert werden, was zu unterschiedlichen Porenweiten führt (Pippetierschema). Es wurden vertikale Gelkammern der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen) verwendet. Die Gele waren sog. „Minigele“ mit einem 80 x 82mm Format und einer Schichtdicke von 1 mm. Die Elektrophorese erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (SDS-Page) als auch unter nicht denaturierenden Bedingungen (native Page) nach Laemmli (1970). Die Gele wurden bei einer Stromstärke von ca. 20 mA für ca. 90 min. laufen gelassen. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele in einer Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung für

mind. 15 min. auf dem Schüttler gefärbt. Danach erfolgte die Entfärbung der Gele, bis nur noch die Banden auf dem Gel sichtbar waren mit einer entsprechenden Entfärbelösung. Die Gele konnten dann in 7,5%iger Essigsäurelösung gelagert werden. Alle Rezepte der hier verwendeten Lösungen sind im Anhang unter F 5.1 aufgeführt.

8.3.1 SDS-PAGE

Bei dieser Form der Elektrophorese werden die Proteine zunächst durch Zugabe von 1% Dithiothreitol (DTT) und 2% Natriumdodecylsulfat (SDS) 5 min. bei 95°C denaturiert. DTT spaltet die kovalenten Bindungen zwischen den Seitenketten, wodurch sich das Protein voll entfalten kann. Durch Zugabe des SDS wird die Eigenladung des Proteins abgeschirmt, das Protein wird dadurch von einer negativen Hülle ummantelt so, dass in der SDS-PAGE eine ausschließliche Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgen kann. Alle Proteine wandern nun zur Anode, und anhand der zurückgelegten Laufstrecke kann mit Hilfe eines Markers die Molmasse bestimmt werden. Es wurden etwa 5 - 10µg Protein aufgetragen, die vorher mit 25% Probenpuffer versetzt wurden und zusammen mit dem Marker auf einem Heizblock denaturiert wurden. Als Marker wurden in dieser Arbeit der SDS-6H Marker von Sigma (Deisenhofen), und der ProSieve™QuadColor™ Protein Marker der Firma Lonza (Rockland) verwendet.

8.3.2 Native PAGE

Bei der nativen PAGE werden die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse, ihrer spezifischen Eigenladung und ihrer Tertiärstruktur nach aufgetrennt. Hierbei spielt also diesmal auch die Molekülfaltung, die auf das Laufverhalten Einfluss nimmt, eine Rolle. Aus diesem Grund werden die Proben hierbei nicht mit SDS und β-Mercaptoethanol behandelt, und es findet auch keine Denaturierung statt. Die Proben wurden mit Probenpuffer beschwert, und es wurden ca. 5 - 10µg aufgetragen. Färbung und Entfärbung erfolgten analog der SDS-PAGE.

8.4 Chromatographische Methoden

8.4.1 Anionenaustauschchromatographie

Mit Hilfe dieser analytischen Methode können Proteine ihrer Ladung nach aufgetrennt werden. Dabei befinden sich an einer polymeren Matrix funktionelle Gruppen, welche reversibel die entsprechenden Gegenionen, im Fall der Anionenaustauschchromatographie Anionen, binden können. Die Probe wird in die sog. Probenschleife injiziert, und mit der

Öffnung eines Ventils durch eine Pumpe auf die Säule befördert. Das Ionengemisch wird an der Säule gebunden und ausgetauscht, um dann durch einen Gradient von der Säule eluiert zu werden. In dieser Arbeit wurde eine Q-Sepharosesäule (GE Healthcare, Freiburg) angeschlossen an eine HPLC-Pumpe (High performance liquid chromatography) der Firma Gilson (Limburg) verwendet, um die nativen Hämolympheproteine voneinander zu trennen. Die einzelnen Fraktionen wurden von einem Fraktionssammler (Gilson, Limburg) aufgefangen, nachdem die Absorption wie unter 8.2 beschrieben gemessen wurde. Die Auswertung eines Laufs wurde mit einer von Gibson gestellten Software bearbeitet.

8.4.2 Größenausschlusschromatographie

Diese Methode der Gelfiltration wurde verwendet, um Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Dabei dient hier als Matrix ein Gel aus Polyacrylamidpartikeln, welche ein dreidimensionales Netzwerk bilden und es dadurch ermöglichen die Proteine ihrer Größe nach zu eluieren. Kleine Proteine dringen in diese von den Partikeln gebildeten Poren ein und haben somit einen längeren Weg, als größere Proteine, welche die Säulenmatrix ungehindert und somit schneller passieren. Mittels eines Photometers (Gilson, Limburg) wurden auch hier die Absorptionen der einzelnen Fraktionen vor dem Sammeln bestimmt, und jeder Lauf für die Auswertung von einem Flachbettschreiber (Kipp und Zonen, Delft) graphisch festgehalten. Verwendet wurden je nach Größe der aufzureinigenden Proben die Bio-Gele[®] 0,5M, 1,5M und A15M der Firma BioGel[®] (München).

8.4.3 Affinitätschromatographie an eine Nickelmatrix

Die Nickelaufreinigung wurde verwendet, um rekombinante Proteine, welche zuvor mit einem His-Tag versehen werden konnten, aufzureinigen. Dabei binden die Proteine reversibel an eine Trägersubstanz (Nickel-Sepharose), die mit einem N- oder C-terminalem 6 x His-Tag exprimiert worden sind. In dieser Arbeit wurden alle, prokaryotisch, sowie eukaryotisch exprimierten Partikel wie unter 5.4.1 beschrieben mit einem His-Tag versehen. Die Aufreinigung erfolgte unter denaturierenden (prokaryotische Expression), als auch nativen (eukaryotischen Expression) Bedingungen und wurde nach Herstellerangaben (GE Healthcare, München) durchgeführt. Die Proteinlösungen wurden filtriert, und auf 20mM Imidazol-Konzentration eingestellt. Das Binden an die Matrix erfolgte nach dem batch Verfahren, durch 90 minütiges Invertieren des Ansatzes. Danach konnte mit den Protein-Nickellösungen eine Säule gefüllt werden, um die Reinigung mittels Schwerkraft durchzuführen. Die ungebundenen Partikel wurden im ersten Durchlauf aufgefangen, bevor dann die Säule mit 5 Säulenvolumina Waschpuffer gewaschen wurde. Nach auffangen der Waschfraktion wurde mit einem Elutionspuffer das gewünschte Protein eluiert. Bei dieser Methode enthalten

Wasch-, und Elutionspuffer Imidazol, dessen Konzentration schrittweise angehoben wird, um erst zu reinigen, und später durch eine höhere Imidazolkonzentration die His getaggten rekombinanten Proteine von der Säule zu verdrängen. Die hier verwendeten Lösungen sind nach Expressionssystem geordnet im Anhang (F 5.2.1) aufgeführt.

8.5 Renaturierung (Refold)

Durch Überexpression der rekombinanten Proteine in dem prokaryotischen System traten oft unlösliche, von einer Membran umschlossene sog. Einschlusskörperchen (inclusion bodies) auf. Um die rekombinanten Proteine aus diesen aufzureinigen wurde unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Da das Ziel der rekombinanten Expression die native Faltung der rekombinanten Proteine war, mussten die richtigen Bedingungen gefunden werden um die Monomere in die richtige Konformation zu überführen. In dieser Arbeit wurden dafür die sich im Elutionspuffer der Nickelaufreinigung befindlichen Monomere in dem entsprechenden Puffer (Rezept nach Huang et al., 2009, siehe Anhang F 5.3) verdünnt. Dazu wurde die Monomer haltige Lösung in ein großes Volumen Refoldingpuffer zu einer Konzentration von 30µg/ml unter Rühren im Kühlraum (4°C) mit einer Geschwindigkeit von 0,2ml/Min eingetropft. Nach 18 - 24 Stunden konnte diese Proteinlösung dann wie unter 8.6.1 beschrieben aufkonzentriert werden.

8.6 Konzentrieren von Proteinlösungen

Um die rekombinanten, sowie die durch Affinitätschromatographie aufgereinigten nativen Proteine aus den Lösungen aufzukonzentrieren, kamen verschiedene Konzentratoren zum Einsatz.

8.6.1 Aufkonzentrieren größerer Probenvolumina

Zum Aufkonzentrieren der rekombinanten Proteine aus größeren Voluminas wurde eine Amicon Rührzelle (Modell 8400) der Firma Merck Millipore (Massachusetts) verwendet. Die wie unter 8.5 refoldeten Proteine, welche in ein großes Volumina an Puffer gegeben wurden, konnten so aus der Lösung eingeeengt werden. Dafür wurde die Protein-Pufferlösung in die Rührzelle gegeben, in welche vorher eine Membran (Ultrafiltrations-Membranscheibe, Merck Millipore, Massachusetts), in diesem Fall mit der Ausschlussgröße von 10.000 kDa gelegt wurde. Die Lösung wird dann durch Stickstoffzufuhr durch die Membran gedrückt, wobei Partikel deren Größe über der der Ausschlussgröße liegt in dem Behälter zurückgehalten werden. Auf diese Weise konnten mehrere Liter aufkonzentriert werden, bis zu einem Volumina von mindestens 50ml, mit welchen dann zur weiteren Einengung nach dem Spindown

Konzentrierverfahren (8.6.2) weitergearbeitet werden konnte. Vor und nach der Anwendung musste die Membran nach Herstellerangaben entweder mit Pufferlösung, oder destilliertem Wasser gespült werden.

8.6.2 Aufkonzentrieren kleiner Probenvolumina

Zur Aufkonzentrierung kleinerer Probenvoluminas kamen verschiedene Spindown-Konzentratoren zur Anwendung. Für Volumina von bis zu 500 μ l wurden die Zentrifugensäulchen von Amicon (Amicon-Ultra0,5) der Firma Merck Millipore (Massachusetts) verwendet. Für bis zu 15ml konnte auf größere, Falcon ähnliche Säulen (Amicon-Ultra15) der gleichen Firma zurückgegriffen werden. Die Anwendung all diese Zentrifugensäulen beruht auf einer Membran im Inneren der Säule, welche nur für bestimmte Größen durchlässig ist. Die zu aufkonzentrierende Proteinlösung wird auf die Säule gegeben und die Lösung dann durch Zentrifugation durch die Membran gepresst. In dieser Arbeit wurden je nach Größe des Proteins 5.000, 10.000, 50.000 und, oder 100.000 kDa Ausschlussgrößen nach Herstellerangaben verwendet.

8.7 Proteolytische Spaltung

Um den His-Tag zu entfernen, wurde der Sequenz mancher rekombinanter Proteine wie in 5.4.1 beschrieben eine sog. TEV-Schnittstelle angefügt. Diese ist die Erkennungssequenz für die TEV-Protease, durch welche in einem Verdau bei Raumtemperatur der N-terminalen His-Tag abgespalten werden konnte. Die rekombinant hergestellte TEV-Protease wurde mit einer Konzentration von 1mg/ml mit dem entsprechenden Protokoll von Patrick Keller (Merck, Darmstadt) bezogen, und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für den Verdau wurden 100 μ g der Protease zu 200 μ g rekombinantes BgAChBP in dem entsprechendem Puffer (F 5.4) gegeben, und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spaltung wurden dann in einem Western Blot (8.10) überprüft.

8.8 Dialyse

Das Verfahren der Dialyse wird angewandt, um Proteinlösungen in einen anderen Puffer zu überführen, oder niedermolekulare Substanzen aus der Lösung zu entfernen. Dazu werden semipermeable Dialyseschläuche verwendet, welche den kontrollierten Austausch von Stoffen erlauben. Durch die verschiedenen Ausschlussgrößen können kleinere Moleküle passieren, während die größeren Proteine in dem Dialyseschlauch zurückgehalten werden. Es wurden Dialyseschläuche der Firma Roth (Karlsruhe) mit einer Ausschlussgröße von 14.000 kDa benutzt, die vor der Anwendung fünf Minuten in destilliertem Wasser gekocht werden mussten.

Die Probe wurde in den Schlauch gefüllt, dieser gut abgedichtet und das ganze dann in einen Erlenmeyerkolben mit dem gewünschten Puffer gegeben. Um den kompletten austausch zu gewährleisten, sollte bei der Dialyse darauf geachtet werden, dass das Volumenverhältnis Probe zu Puffer bei 1:1000 liegt. Jede hier durchgeführte Dialyse erfolgte unter Rühren im Kühlraum über Nacht bei 4°C. Zur Steigerung der Effizienz des Austausches wurde der Puffer dabei auch mehrfach gewechselt. Das Rezept des Dialysepuffers ist im Anhang unter F 5.5 aufgeführt.

8.9 Herstellung der Antiseren Anti-*BgAChBP1* und Anti-*BgAChBP2*

Für die Herstellung der beiden Antiseren wurde je einem Kännchen in einem Zeitraum von ca. zwei Monaten mehrere Injektionen des rekombinant hergestellten *BgAChBP1* und *BgAChBP2* verabreicht. Zwei Wochen nach der vierten Injektion wurden die Tiere entblutet. Nach der zweiten und dritten Injektion wurden Serumproben entnommen, und auch das Endserum konnte nach dem entbluten getestet werden. Die komplette Immunisierung der Kännchen wurde von der Firma Charles River-Laboratories (Kisslegg) durchgeführt.

8.10 Western-Blot

Um Proteine, die zuvor mittels PAGE (8.3) aufgetrennt wurden spezifisch nachzuweisen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Dazu wurden die in dem Gel enthaltenen Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes zuerst auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, um sie dann durch spezifischen gegen sie gerichteten Antikörpern zu detektieren.

8.10.1 Proteintransfer

Die Proteine wurden im Semi-Dry Western Blot-Verfahren von dem Gel auf die Nitrocellulosemembran transferiert. Es wurden zunächst 2 x 5 Whatmanpapiere (Hartenstein, Würzburg), die Nitrocellulosemembran (4,5µm Porengröße, Machery-Nagel, Düren), sowie das Polyacrylamidgel mit Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei in eine Blot-Kammer (Modell SDI, cti, Idstein) übereinander gelegt. Diese Kammer wurde dann an ein senkrecht zu dem Gel angelegtes elektrisches Feld bei 45mA für 90 Min bei Raumtemperatur angeschlossen. Bei dieser Elektrophorese wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode auf die Nitrocellulosemembran, und bleiben dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Nach dem Transfer konnte mit der Immunodetektion der Proteine begonnen werden. Alle Pufferlösungen, sowie die Antikörper, die für den Western Blot verwendet wurden sind im Anhang unter F 5.6, bzw. F 5.8 aufgeführt.

8.10.2 Immunodetektion

Nach dem oben beschriebenen Transfer, müssen zuerst die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran blockiert werden, da hier sonst die Antikörper binden würden, was einen spezifischen Nachweis unmöglich machen würde. Dafür wurde die Membran für eine Stunde mit 3% BSA bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Blockieren konnte die Membran dann über Nacht bei 4°C mit einer verdünnten Lösung des spezifischen Antikörpers behandelt werden. Der Antikörper wurde dafür in 1 x TBS/3% BSA zu verschiedenen Konzentrationen verdünnt. Nach drei 10 minütigen Waschschritten in 1 x TBST bei Raumtemperatur, um unspezifisch gebundene Antikörper von der Membran zu entfernen, konnte die Membran mit dem zweiten Antikörper inkubiert werden. Dieser sekundäre Antikörper ist spezifisch gegen den Ersten gerichtet und entweder mit dem Enzym Peroxidase, oder einer alkalischen Phosphatase gekoppelt. Nach einer 1,5 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur, erfolgten nochmal 3 x 10 minütige Waschschrritte in 1 x TBST. In einer anschließenden Farbreaktion konnten nun durch Zugabe des zu dem sekundären Antikörper passenden Substrates die transferierten Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden. Die Peroxidase oxidiert hierbei das Substrat AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) zu einem braunen Niederschlag. Ist der zweite Antikörper hingegen an eine alkalische Phosphatase gekoppelt, werden die Substrate BCIP (5-Brom-4-Chlor-indolylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumsalz) für eine Farbreaktion benötigt. Dabei muß die Membran vorher 5 Minuten in AP-Puffer geschwenkt werden, um die optimalen pH-Bedingungen für diese Katalyse zu schaffen. Bei der darauffolgenden Reaktion wird das BCIP dephosphoryliert, das NBT gleichzeitig reduziert, was zu einem blauvioletten Niederschlag führt. Die Reaktionen wurden, sobald die Banden spezifisch gefärbt waren, sofort mit destilliertem Wasser gestoppt. Sämtliche Inkubationen wurden, wenn nicht im Text anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

8.11 Immunelektrophorese

Um die rekombinanten Proteine weiter immunologisch zu charakterisieren, wurde eine zweidimensionale Immunelektrophorese nach Laurell (1965) und Weeke (1973) durchgeführt. Hierbei wird die zu charakterisierende Proteinlösung in zwei Dimensionen in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. In der ersten Dimension werden die Proteine dabei aufgrund ihrer Ladung aufgetrennt. In der zweiten Dimension wandern sie dann gegen einen der Agarose zugegebenen spezifischen Antikörper. Dieser bildet mit den im Überschuss vorliegenden, elektrophoretisch beweglichen Antigenen (Proteinlösung) lösliche Komplexe. An der Stelle, an welcher der Konzentrationsäquivalenzpunkt zwischen Antigen und Antikörper erreicht ist, verbinden sich die Moleküle und können dann nach der Färbung als ein charakteristisches

gipfförmiges Präzipitat sichtbar gemacht werden. Anhand der unterschiedlichen Muster der Präzipitate lassen sich dann Rückschlüsse auf die strukturelle Verwandtschaft zwischen den Proteinen eines Proteingemisches ziehen. Aufgrund der Auftrennung in zwei Dimensionen spricht man hier von der sog. *Crossed* Immunelektrophorese (Abb. 10). Die Rezepte aller Pufferlösungen und die verwendeten Antikörper sind im Anhang unter F 5.7, bzw. 5.8 aufgeführt.

8.11.1 Crossed Immunelektrophorese

1. Dimension

Eine 1%ige Immunagarose wurde aufgekocht, und 10ml davon wurden gleichmäßig auf einer 10 x 7cm großen Glasplatte verteilt. Nachdem die Agarose polymerisiert war, wurden je nach aufzutragender Proteinlösung 2 - 4mm große Löcher in diese gestanzt. Als Lauffrontmarker wurde in die äußersten Löcher jeweils 2µl einer Bromphenol-Glycerin-Lösung gegeben. Die Glasplatte mit der Proteinbeladenen Agarose konnte dann in die Elektrophoresekammer, eine Multiphor-Apparatur (Modell 2117, Pharmacia, Freiburg) gelegt werden. Damit über der Platte ein elektrisches Feld angelegt werden konnte, mussten Pufferbrücken aus Chromatographiepapier (3MM, Schleicher & Schuell, Dassel) zwischen Gel und Puffer luftblasenfrei aufgelegt werden. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte dann bei 600V, und konnte nach ca 90 Min, bei Erreichen der blauen Lauffront des Gellendes, gestoppt werden.

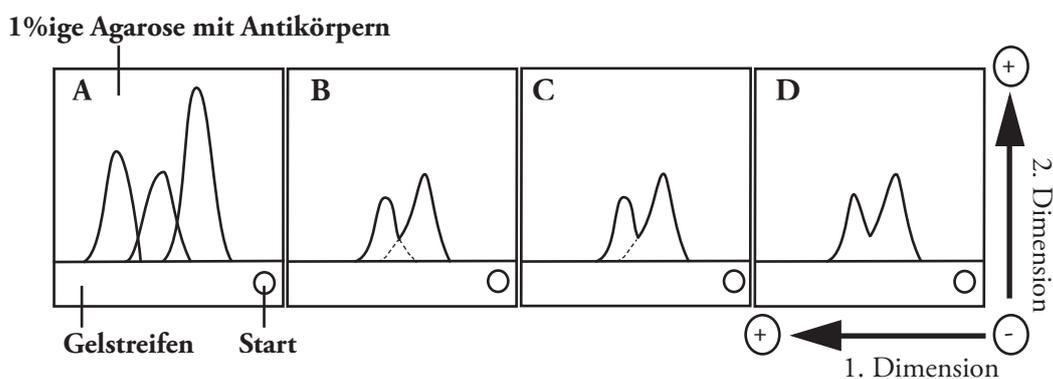


Abb. 10 Grundform der zweidimensionalen Immunelektrophorese.

(A) immunologisch nicht identische Proteine; (B) Immunologisch partiell identische Proteine; (C) siehe (B), aber das linke ist dem rechten Protein gegenüber immunologisch unvollständig; (D) immunologisch identische Proteine.

2. Dimension

Für die zweite Dimension wurden die Gelstreifen mit dem aufgetrennten Proteingemisch der ersten Dimension nach einer Vorlage ausgeschnitten, und auf die hydrophile Seite eines GelBond®-Films (4,2 x 5cm, Stärke 0,2mm, Biozym, Oldendorf) gelegt. Die Antikörperlösung wurde zu 2ml flüssiger, auf 58°C temperierter Agarose gegeben, und auf die freie Stelle des geviertelten Films gegossen. Dann konnte die zweite Elektrophorese bei 300V über Nacht, wie für die erste Dimension beschrieben, durchgeführt werden. Nach dem Lauf wurden zunächst ungebundene Proteine und Antikörper ausgesalzt, um den Hintergrund für die Färbung möglichst gering zu halten. Dafür wurden die Filme zunächst mit angefeuchtetem Filterpapier bedeckt, und 5 Minuten gepresst. Danach folgte ein 10minütiger Waschschrift in 0,6%iger NaCl-Lösung. Diese beiden Schritte wurden noch zweimal wiederholt, wobei der letzte Waschschrift mit destilliertem Wasser durchgeführt wurde. Nach einem letzten Pressen wurden die auf den Filmen aufgepressten Gele dann mit einem Fön getrocknet, bevor sie dann 5 Minuten in Coomassie (Coomassie® Brilliant Blue G 250, Roth, Karlsruhe) zur Färbung gegeben werden konnten. Die unspezifische Färbung des Gels konnte mit destilliertem Wasser entfernt werden, bevor die Gele erneut getrocknet wurden.

9 In situ-Hybridisierung

9.1 Whole Mount

Um die Expressionsorte der beiden Isoformen *BgAChBP1*, und *BgAChBP2* im Gewebe von *Biomphalaria glabrata* nachzuweisen, wurde eine sog. Whole Mount in *situ*-Hybridisierung durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden dafür mit Digoxigenin markierte DNA-Sonden hergestellt (siehe 5.5.6), welche Isoformspezifisch an die m-RNA binden können. Dann wurden komplette Tiere mit diesen Sonden inkubiert, um dann durch eine spätere Farbreaktion den Expressionsort der jeweiligen Isoform nachweisen zu können. Alle hierfür verwendeten Lösungen sind im Anhang unter F 6 aufgeführt.

9.1.1 Vorbereitung der Larven

Bevor mit der Hybridisierung begonnen werden konnte, mussten die Larven vorbereitet werden. Dafür wurden die Schnecken zunächst für 10 - 15 min. in Relaxinlösung eingelegt, um die Muskeln der Tiere zu entspannen. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Erstfixierung in Fixierungslösung. das Fixativ wurde dann entfernt, und gegen Frisches ausgetauscht. Nach einer weiteren Inkubation in dieser für 30 min., musste das Fixativ in mehreren Waschschriften entfernt werden. Dafür wurden die Versuchsobjekte zuerst in einem Fixativ/

Ethanol Gemisch (1:1) gelegt, und danach viermal mit 100%igem Ethanol gewaschen. Anschließend konnte dann unter dem Binokular in 70%igem Ethanol die filligrane Schale der Tiere mit einer Pinzette entfernt werden. Um sicher zu stellen, dass auch das komplette Gewebe fixiert ist, wurde die Fixierung nochmal über Nacht bei 4°C wiederholt.

9.1.2 Tag 1 Pigmententfernung und Hybridisierung

Am ersten Tag des Versuchs, musste die Pigmentierung der Tiere entfernt werden. Aus diesem Grund wurden die Schnecken solange mit einer 3% H_2O_2 /0,5%KOH-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine ausreichende Bleichung erreicht werden konnte. Die Versuchstiere wurden dann zweimal kurz in 100%igem Methanol gewaschen, bevor dieses dann durch PBT ersetzt wurde. Zur Rehydrierung erfolgte dann ein 20minütiger Inkubationsschritt in PPE, und anschließend fünf weitere, kurze Waschschriffe in vorher auf 4°C runtergekühltem PPE. Um der DNA-Sonde, und dem Antikörper den Zugang zu dem Gewebe zu erleichtern mussten die Tiere für 20 min. bei 37°C mit Proteinase K (20 μ g/ml) in PBT inkubiert werden. Mit vier daran anschließenden Waschschriffen für 5 min. mit PBT bei 4°C konnte der Proteinase K Verdau dann gestoppt werden. Darauf folgte eine Inkubation von 45 min. in 4% Paraformaldehyd/PBS mit fünf anschließenden Waschschriffen (je 5 Minuten) in PBT, um das überschüssige Paraformaldehyd wieder zu entfernen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen erfolgte eine Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer für 3 Stunden im Wasserbad bei 48°C, in gut verschlossenen leeren Pipettenboxen. Die eigentliche Hybridisierung mit der zuvor bei 65°C für 10 Minuten denaturierten Sonde (10 - 40 μ g pro ml Hybridisierungspuffer) erfolgte dann bei gleicher Temperatur über Nacht.

9.1.3 Tag 2 Blockierung und Inkubation mit Sekundärantikörper

Um die Hybridisierungslösung zu entfernen mussten mehrere Waschschriffe bei 50°C durchgeführt werden: dreimal mit 4xWaschpuffer (je 10 Minuten), zweimal mit 2xWaschpuffer (je 15 Minuten) und zweimal mit 1xWaschpuffer (je 15 Minuten). Danach wurden die Tiere bei Raumtemperatur dreimal in 1 x SSC/0,1% Tween gewaschen (je 20 Minuten), dann zweimal in Maleinsäurepuffer (10 Minuten) und einmal für 10 Minuten in Blockierungslösung, bevor dann die eigentliche Blockierung für 2 - 3 Stunden bei Raumtemperatur erfolgen konnte. Im Anschluss wurde dann der Antikörper (Anti-Digoxygenin-alkalische-Phosphatase) in einer Konzentration 1:2000 (0,5 μ l Antikörper pro ml Blockierungslösung) zugegeben, und mit diesem über Nacht bei 4°C inkubiert.

9.1.4 Tag 3 Farbreaktion

Der Antikörper wurde jetzt durch fünf 15minütige Waschschrirte in Maleinsäurepuffer/0,1%Tween entfernt. Danach wurden die Tiere zur Vorbereitung auf die anschließend folgende farbreaktion zweimal 10 Min in AP-Puffer gewaschen. Währenddessen konnte die Enzymlösung für die Farbreaktion frisch angesetzt werden. Hierzu wurden pro ml AP-Puffer 5 μ l NBT mit 3,75 μ l BCIP vermischt, und zu den Tieren gegeben. Die Farbreaktion erfolgte unter Aufsicht bei 4°C, und wurde sofort nach der ersten Färbung durch dreimaliges waschen in Maleinsäurepuffer (je 5 min.) und zweimaliges waschen in PBT (5 min.) gestoppt. Danach erfolgte eine Postfixierung in 4%PFA/PBS.

9.1.5 Tag 4 Aufbewahrung

Abschließend erfolgten vier Waschschrirte in PBS. Danach wurden die Versuchstiere in eine 70%ige Ethanollösung eingelegt und bei 4°C bis zur Auswertung gelagert.#

10 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Diese Methode der Elektronenmikroskopie ermöglicht die direkte Abbildung von kleinen Objekten im Mikrometer bis Nanometerbereich mit Hilfe von Elektronenstrahlen. Die Elektronen werden mittels Spannung beschleunigt, und durch elektromagnetische Linsen fokussiert. Wenn die Elektronen auf die Probe treffen werden sie abgelenkt, wobei sie von Objekten hoher Dichte stark, und von solchen geringerer Dichte schwach abgelenkt werden. Die nicht abgelenkten Elektronen können detektiert werden, und auf einem Leuchtschirm oder einer Fotoplatte ein charakteristisches Abbild des Objektes erzeugen. Wobei Bereiche geringerer Dichte hell, und solche höherer Dichte dunkel erscheinen. Der so entstehende Kontrast ermöglicht es die Strukturen des Objekts bildlich darzustellen. Die EM-Präparation aller Proben erfolgte nach der single-droplet Methode und es wurde das „Negative Staining Verfahren“ (Harris & Horne, 1991) angewandt. Hierzu benötigt man Kupfernetzchen mit 300 – 400 Maschen die mit einem Kohlenstoff-Film beschichtet sind. Diese Netzchen werden kurz vor der Beladung mit der Proteinprobe in einer Abdampfanlage einer Hitzeentladung ausgesetzt. Durch diese Behandlung wird die Kohlenstoffoberfläche hydrophil, was sie für das Protein adsorbtionsfähiger macht. Auf diese Träger wurden ca. 20 µl der Proteinlösung (0,1 – 0,5 mg/ml) aufgetragen. Überschüssige Flüssigkeit wurde nach einer kurzen Einwirkzeit mit Filterpapier abgesaugt. Das Netzchen wurde dann dreimal mit der Kohlenstoffoberfläche durch destilliertes Wasser gezogen, um Puffersalze zu entfernen, und schließlich mit Kontrastmittel (2% Uranylacetat) versehen. Anschließend wurde das Netzchen zum Trocknen bei Raumtemperatur auf Filterpapier in eine Petrischale gelegt, und dort bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die mikroskopische Untersuchung der Präparate erfolgte durch Mitarbeiter unseres Instituts in einem Zeiss EM 900 Transmissions-Elektronenmikroskop und die Aufnahmen wurden auf Kodak EM-Filmen (Typ 4489) festgehalten.

11 Thermofluor

Diese Methode basiert auf der Grundlage, dass sich Proteine in wässrigen Lösungen spontan zu ihrer Quartärstruktur falten können. Diese Faltung kann durch eine Erhöhung der Temperatur aufgehoben werden. Liegt das Protein dann entfaltet vor, können zuvor dazugegebene sog. Fluorophore mit dem Protein über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen interagieren. Im nativen Zustand ist die Oberfläche des Proteins hydrophil, so dass das Fluorophor nicht binden kann. Bei der Entfaltung werden hydrophobe Teile des Proteins zugänglich, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff dann an diese binden kann. Dies führt zu einer messbaren Zunahme der Fluoreszenz der Proteinlösung. Das Ergebnis ist eine sigmoidale Kurve, welche den Fluoreszenzgrad, und somit die Stabilität des Proteins darstellt.

Somit eignet sich diese Methode zu einem Screening der Pufferbedingungen, in welchem das Protein stabil vorliegt. Die Methode wurde mit nativen, aufgereinigten Proben des Hämoglobins von *Biomphalaria glabrata* am Institut für Biochemie des Max-Planck Institutes Göttingen in Zusammenarbeit und unter der Anleitung von Dr. Ashwin Chari durchgeführt. Dafür wurden in eine 96 well Platte je 2µl von verschiedenen vorgefertigte Pufferkompositionen (Phat buffer screen, Emerald Biosystems, Bainbridge Island) gegeben zu welchen dann 16µl derv 0,5µM Proteinlösung gegeben wurden. Der Farbstoff (Sypro[®] Orange; Bio-Rad, München) wurde 1:50 im entsprechenden Probenpuffer verdünnt, und davon je 2µl zu den Lösungen in den verschiedenen Wells pipetiert. Als referenz wurde das Protein zu Wasser und der ursprünglichen Pufferlösung in eine weitere Reihe der well-Plate gegeben. Die Well-Plate mit den Lösungen wurde dann in einen Real-Time-PCR Cyclyer (Bio-Rad, München) gegeben, und das entsprechende Programm eingestellt. In diesem wird das Protein in den verschiedenen Puffern je für 30 Zyklen ab 30°C bis 100°C denaturiert. Die Auswertung erfolgte über ein speziell für diese Methode entwickeltes Softwareprogramm.

12 GraFix

Auch diese Methode wurde am Institut für Biochemie des Max Planck Institutes in Göttingen in Zusammenarbeit mit Dr. Ashwin Chari durchgeführt. Bei GraFix (Kastner et al., 2008) handelt es sich um eine Methode der Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie. Hierbei wird eine Dichtezentrifugation gegen einen Glycerin Gradienten durchgeführt, bei welchem die Moleküle im gleichen Schritt auch fixiert werden. Durch den langsamen Anstieg des Fixativs in der Lösung, lassen sich Probleme wie Aggregation, oder Instabilität der Proteine verhindern. Die Zentrifugation kann schwache Aggregate lösen, und gleichzeitig werden die Moleküle fixiert. Es wurden dafür zwei in ihrem Sucrose gehalt unterschiedliche Lösungen angesetzt. Die "leichtere Lösung" (10%ige Sucrose) wird dann mit einer Kanüle in den unteren Teil des Zentrifugenröhrchens gegeben. Dann wurde die erste Lösung mit der zweiten, "schwereren" Lösung (40%ige Sucrose) unterspritzt. Zuvor wurde zu dieser zweiten Lösung noch das Fixativ (25% Glutaaldehyd) gegeben. Als Letztes konnte dann die Proteinlösung mit einer Konzentration von 5mg/ml möglichst Luftblasenfrei auf die Lösungen gegeben werden. Nachdem der Gradient durch einen Gradientenmixer eingestellt werden konnte (ca. 1h bei 4°C) wurden die so vorbereiteten Proben über Nacht bei 37.000 rpm zentrifugiert. Am nächsten Tag wurde einen schwere Kanüle auf den Boden des Röhrchens gestellt, um die Lösung von unten nach oben abzusaugen, und zu fraktionieren. Von jeder gesammelten Fraktion wurde durch ein Photometer ein Absorptionsspektrum gemessen. Die Peak Fraktionen, welche dem Hämoglobin entsprachen wurden so isoliert, und für die Elektronenmikroskopie vorbereitet.

13 Sauerstoffbindungsanalysen

Um das rekombinant hergestellte *Biomphalaria glabrata* Hämoglobin auch funktionell zu charakterisieren, wurden am Institut für molekulare Biophysik in Zusammenarbeit mit HD Dr. Nadja Hellman Sauerstoffbindungsanalysen durchgeführt. Hierbei wurde die erste Isoform des Hämoglobins auf die reversible Sauerstoffbindung überprüft, und auch eine Sauerstoffbindungskurve erstellt.

13.1 Überprüfung der Sauerstoffbindefähigkeit

Um nachzuweisen, dass die in Zusammenarbeit mit Dr. Ralf Dürr hergestellten, rekombinanten Moleküle der ersten Isoform die Fähigkeit besitzen Sauerstoff zu binden, wurden die Absorptionsspektren der Oxy- und Deoxy-Formen gemessen. Der aufgezeichnete Wellenlängenbereich lag hierbei bei zwischen 250 und 600nm. Nach der Messung mit Hilfe eines Absorptionsspektrometers (Ultraspec 3100 Pro Uv/Visible Spectrophotometer) wurde zu der Probe zur Deoxygenierung eine Spatelspitze Natrium-Dithionit gegeben. Nach kurzem mischen, konnte so durch erneutes messen das Deoxy-Spektrum ermittelt werden.

13.2 Sauerstoffbindungskurven

Da die rekombinanten Konstrukte zu einem großen Teil in der met-Konformation (Fe^{3+}) vorlagen, mussten diese vor Messung der Sauerstoffbindungsanalysen zuerst in die oxy-Konformation überführt werden. Die Reduktion der Proben erfolgte nach dem Protokoll von Hyashi et al. (1973). Nach dieser Behandlung konnten kontinuierliche Sauerstoffbindungskurven nach einer modifizierten Methode von Loewe (1978) gemessen werden, bei welcher anstelle der Fluoreszenz die Absorption gemessen wurde. Zunächst musste dafür der pH-Wert der Probe auf 7,8 eingestellt werden, bevor sie durch die Begasung mit Sauerstoff komplett oxygeniert werden konnte. Eingesetzt wurden hierbei 0,1 - 0,5mg/ml Protein, gelöst in einem 10mM Tris/Phosphat-Puffer. Die Probe wurde in eine Standard-Absorptions-Küvette pipetiert, in diese wurden die sauerstoffelektrode, sowie eine Kanüle für die Gaszufuhr gegeben. Nachdem die Probe durch eine kontinuierliche Sauerstoffzufuhr (20% Sauerstoff) vollständig oxygeniert vorlag, erfolgte durch die Zufuhr von Stickstoff die langsame Deoxygenierung der Proben. Alle Messungen erfolgten bei 25°C, und die Deoxygenierung konnte über die Abnahme der Absorption bei 414nm verfolgt werden. Die ermittelte Sauerstoffsättigung konnte gegen den Sauerstoffpartialdruck aufgetragen werden, wodurch aus den daten auch der Halbsättigungsdruck (P_{50}) sowie die Kooperativität (n_{50}) ermittelt wurden. Zur Datenaanalyse wurde das Programm Sigma Plot verwendet.

C Ergebnisse

1 *BgHb* (*Biomphalaria glabrata* Hämoglobin)

1.1 Rekombinante Expression des *BgHb* in Insektenzellen

Die kompletten c-DNAs der beiden Untereinheiten des *BgHb* (*BgHb1* und *BgHb2*), bestehend aus der plug-Domäne (*BgHb1-p*, *BgHb2-p*), und den 13 Häm-Domänen (*BgHb1-a-m*, *BgHb2-a-m*) wurden in unserer Arbeitsgruppe amplifiziert und sequenziert. Die mit einem intrinsischen N-terminalem Signalpeptid versehenen Konstrukte des *BgHb* wurden dann in einen Gateway Eingangsvektor (pDest14, siehe 4.2) inkloniert (Dürr, 2008), um damit in meiner eigenen Arbeit in einem stabilen Expressionssystem Insektenzellen zu transfizieren. Dabei war die Zugabe von 1mM Aminolävulinsäure von zentraler Bedeutung. Es handelt sich dabei um eine Vorstufe des Häms, welches dessen Einbau in das aktive Zentrum des respiratorischen Proteins verbessert.

1.2 *BgHb1* und *BgHb2* Proteinbiochemische Analyse der rekombinanten Untereinheiten

Der Überstand der Insektenzellen zeigte schon wenige Tage nach der Transfektion die für Hämoglobin typische rote Farbe (Abb. 11A). Durch das Einbringen der *BgHb*-Konstrukte in den Expressionsvektor (pIB/V5-His-Dest) waren beide Untereinheiten mit einem C-terminalem 6x His-tag versehen und konnten so direkt aus dem Insektenzellüberstand über eine Ni-Matrix aufgereinigt werden. Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden gesammelt und im Vergleich zu dem nativen Protein auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 11B). Das rekombinant exprimierte *BgHb1* war in allen sechs Elutionsfraktionen vorhanden. Es zeigt ebenso wie das native Protein die typische Bande bei 180kDa. Diese Molekülmasse nach der Auftrennung liegt unter der aus der Sequenz errechneten Größe von 240kDa, was auf ein irreguläres Wanderverhalten des Proteins zurückzuführen ist, welches schon bei der Auftrennung des nativen *BgHb* beobachtet werden konnte (Lieb et al., 2006). Obwohl sich auch ein kleiner Teil des Proteins nach der Aufreinigung im Durchfluss und in der Waschfraktion befand, konnte doch der größte Teil von der Nickelmatrix eluiert werden.

Diese Elutionsfraktionen wurden vereint und über Zentrifugensäulen mit geeigneter Ausschlussgröße aufkonzentriert (100kDa, siehe 8.6). Anschließend wurde davon ein Absorptionsspektrum gemessen (Abb. 12), welches das für das Hämoglobin charakteristische Absorptionsmaximum bei 411nm aufzeigte.

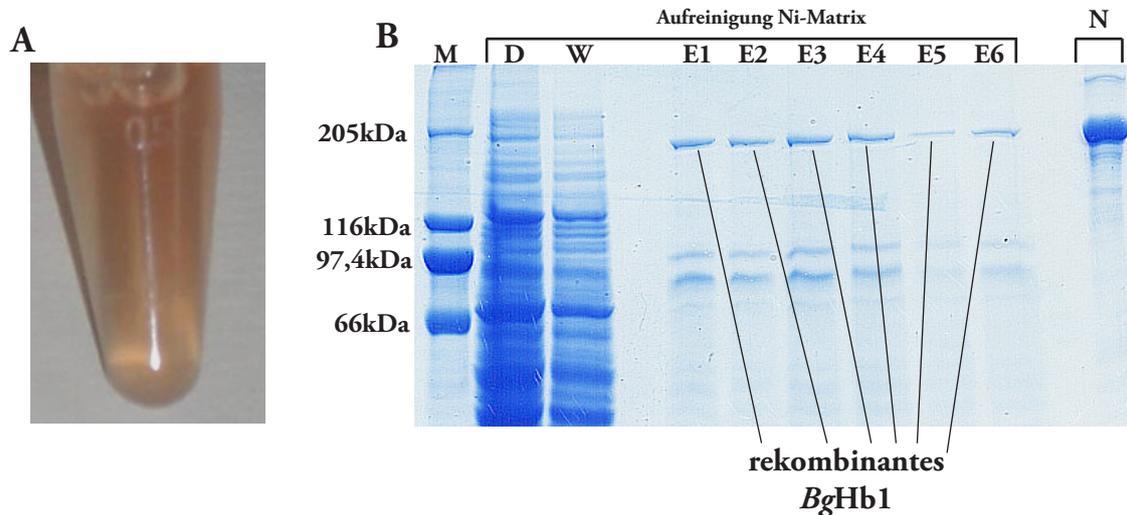


Abb. 11 Rekombinante Expression und Aufreinigung von *BgHb1*.

(A) Überstand der stabilen Expression vor der Aufreinigung. (B) 7,5%ige SDS-PAGE der Aufreinigung über die Ni-Säule von 15ml Insektenzellüberstand. M, Marker (HMW-Marker Sigma-Aldrich); D, Durchfluss; W, Waschschrift; E1-E6, Elutionsfraktionen; N, natives *BgHb* (10µg). Es wurden von allen Fraktionen je 30µl mit 10µl 5x Probenpuffer versehen und davon 30µl aufgetragen.

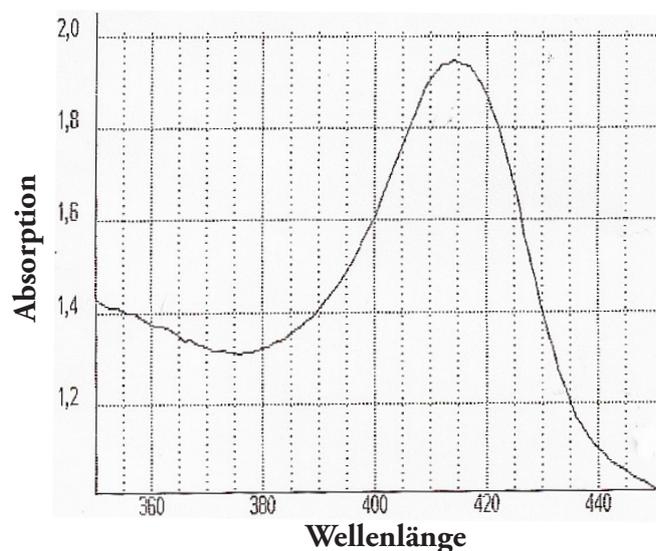


Abb. 12 Absorptionsspektrum von rekombinant exprimierten *BgHb1*.

Die Elutionsfraktionen wurden vereint und aufkonzentriert. Mit der Proteinlösung wurde dann ein Absorptionsspektrum von 360nm bis 450nm gemessen.

Somit wurde aus dem Insektenzellüberstand ein lösliches rekombinant exprimiertes *BgHb1* aufgereinigt, welches funktionell ein ähnliches Absorptionsmaxima wie das native Protein zeigte. Des Weiteren wurde ein Western Blot mit dem rekombinanten *BgHb1* durchgeführt. Dafür wurde die zuvor aufgereinigte, aufkonzentrierte Probe des rekombinanten Konstrukts auf einem SDS-Gel aufgetrennt, um sie dann auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren. Der Nachweis erfolgte mit einem Antikörper gegen denaturiertes *BgHb*, welcher das rekombinante *BgHb1*, sowie das native Protein detektierte (Abb. 13).

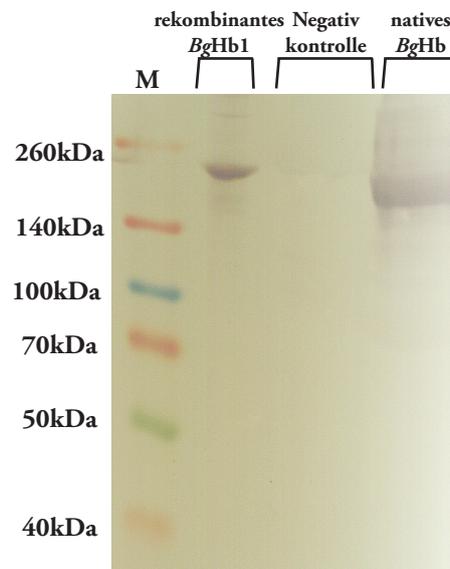


Abb. 13 Western Blot des rekombinanten *BgHb1* und nativen *BgHb*.

Das rekombinante *BgHb1* aus dem Insektenzellüberstand wurde zusammen mit dem nativen *BgHb*, und KLH1 (keyhole limpet hemocyanin isoform 1) als Negativkontrolle auf einem SDS-Gel aufgetrennt und dann auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Es wurden 3-5 μ g Protein aufgetragen und mit einer 1: 500 Verdünnung des anti-*BgHb*-Antikörpers (denaturiert) inkubiert. M, Marker (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas).

1.2.1 Nachweis der Dimerisierung des rekombinanten *BgHb1*

Da die exprimierten Konstrukte eine plug-Domäne besaßen und diese im nativen *BgHb* aufgrund ihrer Cysteine für die Dimer-Bildung verantwortlich ist, sollte auch das rekombinante *BgHb1* auf Dimerisierung untersucht werden. Dazu wurden die Elutionsfraktionen aufkonzentriert und unter reduzierenden sowie nicht reduzierenden Bedingungen auf SDS-Gele aufgetragen.

Wie in *Abb. 14A* zu erkennen ist, liegt das native *BgHb*, aufgetragen ohne die Zugabe des reduzierenden Agens β -Mercaptoethanol, vollständig als Dimer bei 360kDa vor. Die rekombinante Untereinheit *BgHb1* hingegen zeigte unter den gleichen Bedingungen auch die Monomerbande bei 180kDa, nur ca. 40% des exprimierten Materials lag dimerisiert vor (*Abb. 14B*). Unter reduzierenden Bedingungen zeigte das native *BgHb* eine schwache Dimerbande, das rekombinante *BgHb1* lag hier ausschließlich als Monomer vor.

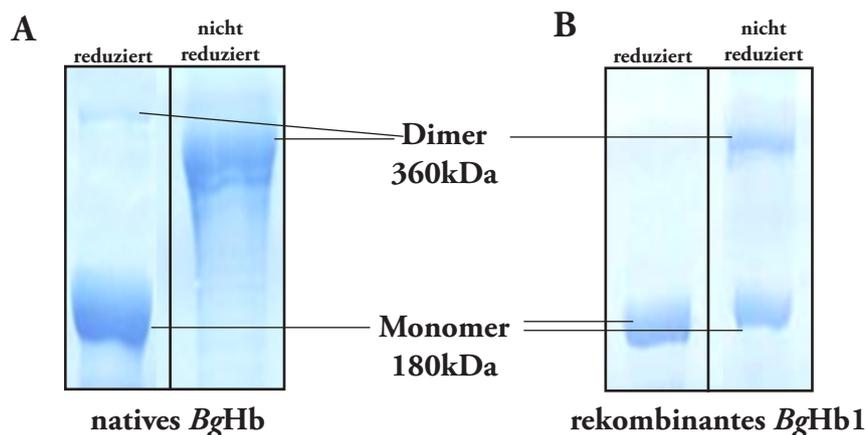


Abb. 14 Dimerisierung des nativen *BgHb* und der rekombinanten Untereinheit *BgHb1*.

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus vier SDS-Gele. In (A) ist das native *BgHb* unter reduzierenden, und daneben unter nicht reduzierenden Bedingungen dargestellt. (B) zeigt das Gleiche für das aus dem Insektenzellüberstand aufgereinigte *BgHb1*. Es wurden 7,5%ige Polyacrylamidgele verwendet. Die Konzentration der Proben wurde gemessen, 30 μ l Probe jeweils mit 10 μ l des entsprechenden Probenpuffer (mit oder ohne β -Mercaptoethanol) vermischt, und je 10 μ g aufgetragen. Wie bereits erwähnt, wandern die Polypeptide irregulär. Die tatsächlichen Molekülmassen betragen 240kDa für das Monomer und 480kDa für das Dimer (aus den Sequenzen berechnet).

1.3 Immunologische Analyse des rekombinanten *BgHb1*

Um das rekombinante *BgHb1* auch immunologisch mit dem nativen Protein zu vergleichen, wurden die Proteine mittels 2D-Immunelektrophorese analysiert. Dafür wurden mit dem rekombinanten Konstrukt aus der stabilen Expression in Insektenzellen (*BgHb1*), und dem nativen *BgHb* Tandem-Immunelektrophorese durchgeführt. Wie in *Abb. 15C* zu sehen ist, zeigten die beiden Proteine immunologisch eine vollständige Identität, belegt durch das deutliches Verschmelzen beider Immunpräzipitate. Zu erwarten gewesen wäre lediglich eine teilweise Verschmelzung, da es sich bei dem nativen Protein wahrscheinlich um ein Gemisch der Isoformen *BgHb1* und *BgHb2* handelt. Jedoch konnte schon in vorangegangenen Analysen (Dürr, 2008) gezeigt werden, dass die verwendeten Antikörper nicht zwischen den Isoformen unterscheiden konnten.

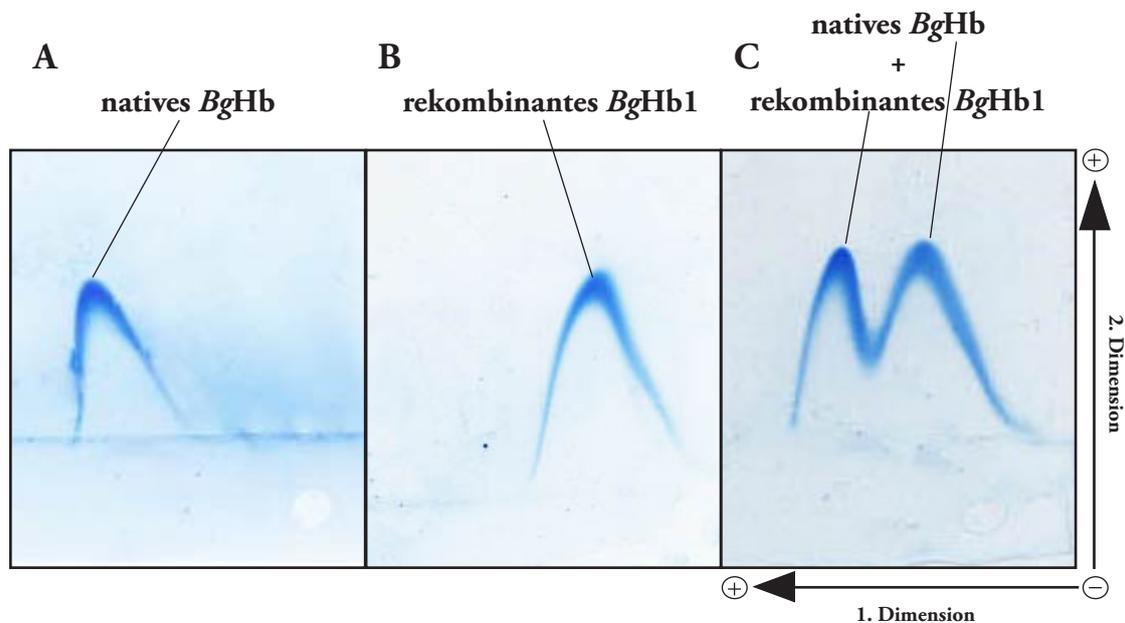


Abb. 15 Immunologische Charakterisierung des rekombinanten *BgHb1*.

2D-Immunelektrophoresen des nativen *BgHb* (A) und des rekombinanten *BgHb1* (B). Immunologischer Vergleich der beiden Proteine durch Tandem-Immunelektrophorese (C), wofür die beiden Proteinlösungen versetzt aufgetragen wurden.

1.4 Elektronenmikroskopische Analyse des rekombinanten *BgHb1*

Die elektronenmikroskopische Analyse sollte aufdecken, ob die aus dem Insektenzellüberstand aufgereinigte Untereinheit oligomerisiert und darüber hinaus eine zu dem nativen *BgHb* ähnliche Quartärstruktur bildet. Die über den His-tag aufgereinigten Proben wurden zuvor noch über Größenausschluss weiter aufgereinigt, um größere rekombinante Partikel von kleineren zu trennen, bevor die einzelnen Fraktionen dann elektronenmikroskopisch analysiert wurden. Es wurden sowohl vom rekombinanten, als auch vom nativen Protein EM-Aufnahmen gemacht und aus Einzelpartikeln definierter Lage Klassensummen erstellt (Abb. 16).

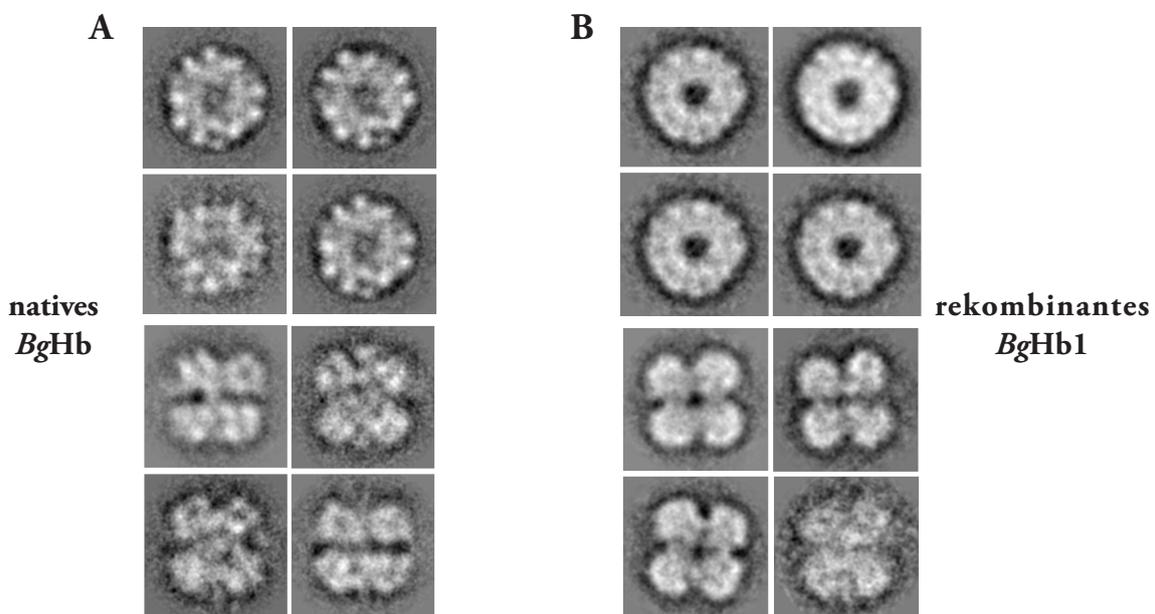


Abb. 16 EM-Aufnahmen des nativen *BgHb* im Vergleich zum rekombinanten *BgHb1*.

(Erstellt in unserer Arbeitsgruppe von A. Moeller).

Die aus dem Insektenzellüberstand aufgereinigte und aufkonzentrierte *BgHb1*-Lösung sowie das native *BgHb* wurden mittels Uranylacetat kontrastiert und elektronenmikroskopisch analysiert. Zu sehen sind Klassensummen des nativen (A) und des rekombinanten Proteins (B). Jede hier dargestellte Klassensumme enthält mehrere Einzelpartikel.

Die Klassensummen im Vergleich zeigen, dass das rekombinante *BgHb1* in der Lage ist, 20nm große Partikel zu bilden, welche in ihrer Form den Partikeln des nativen *BgHb* gleichen. In Abb. 16 ist die Ähnlichkeit der Partikel klar zu erkennen. Gezeigt sind Negativ-Kontrastierungen charakteristischer Ansichten des Moleküls. Somit war es durch die rekombinante Expression des *BgHb1* möglich, nicht nur Dimere zu erhalten, sondern auch die Bildung einer dem nativen Hämoglobin ähnlichen Quartärstruktur zu erzeugen.

1.5 Thermofluor und Grafix

Durch die strukturelle Instabilität des nativen *BgHb* war es bisher nicht möglich, eine 3D-Rekonstruktion des Moleküls in hoher Auflösung zu erstellen. Da die Gründe dafür nicht in der Struktur selbst, sondern in dem für die Aufreinigung verwendeten Puffer, sowie in der Fixierung des Moleküls vermutet wurden, wurde im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Dr. Ashwin Chari (Max Planck-Institut Göttingen) versucht, bessere Bedingungen zu finden. Ziel dabei war es, durch die von ihm weiterentwickelte Thermofluor-Methode (Niesen et al., 2007) (siehe *B11*) ein Puffersystem zu finden, in welcher das native *BgHb* besonders stabil ist. Wie die elektronenmikroskopische Aufnahme des nativen *BgHb* (*Abb. 17A*) zeigt, ist das Protein in dem normalerweise verwendeten Puffer (50mM Tris, 5mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 150mM NaCl, pH 7,4) teilweise aufgeklappt. Dagegen erschien das Protein in dem in der Thermofluor-Analyse getesteten Imidazolpuffer (100mM Imidazol, 5mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , 150mM NaCl, pH 5,8) wesentlich kompakter. In *Abb. 17B* sind einzelne Moleküle klar zu erkennen.

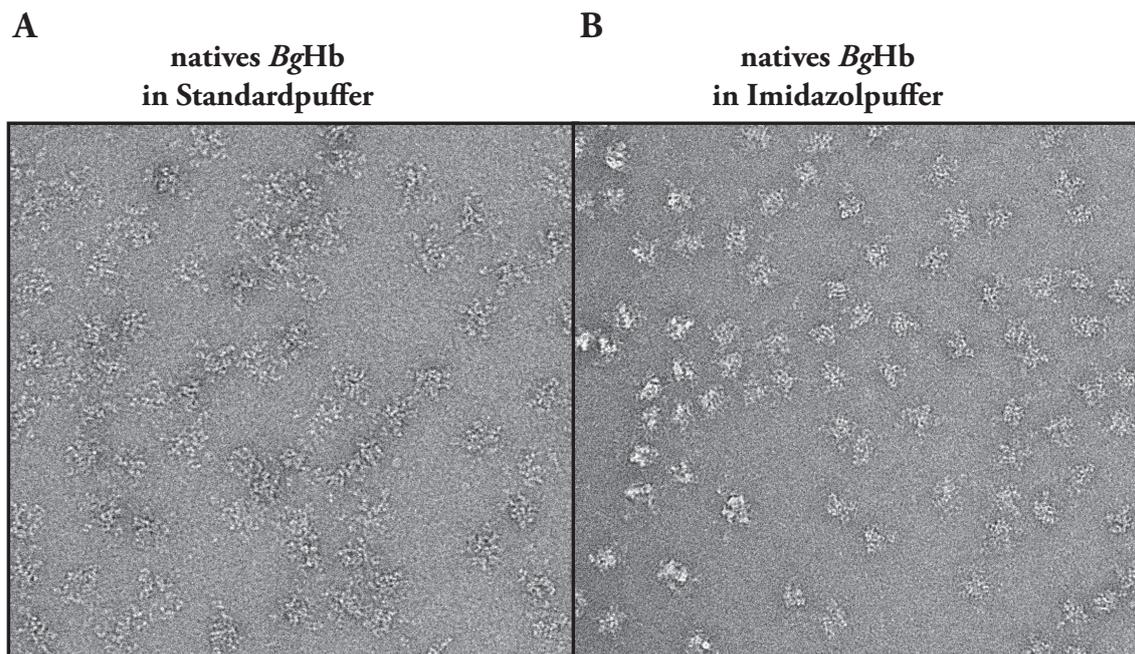


Abb. 17 Thermofluor und Grafix.

(**A**) EM-Aufnahme des nativen *BgHb* in Standardpuffer; (**B**) EM-Aufnahme des nativen *BgHb* nach Pufferwechsel zu Imidazolpuffer.

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den in *Abb. 18* gezeigten Kurven wieder. Die Kurve für das native BgHb in dem Standardpuffer (rote Kurve) zeigt, dass das Protein hier von Anfang an instabil ist. Das wahrscheinlich in diesem Puffersystem schon teilweise denaturiert vorliegende Protein zeigt einen leichten Anstieg in der Fluoreszenz, bevor es vollständig dissoziiert. Die Fluoreszenz steigt dabei nicht nochmal an, da sich in diesem Zustand wahrscheinlich die OH-Gruppen aneinander lagern, was die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs verhindert. In der Kurve, welche für das BgHb in Imidazolpuffer steht (blaue Kurve), ist die Fluoreszenz hoch. Das Protein verbleibt länger in einem Übergangszustand und denaturiert erst ab 90° C. Das Protein bleibt hier deutlich länger stabil.

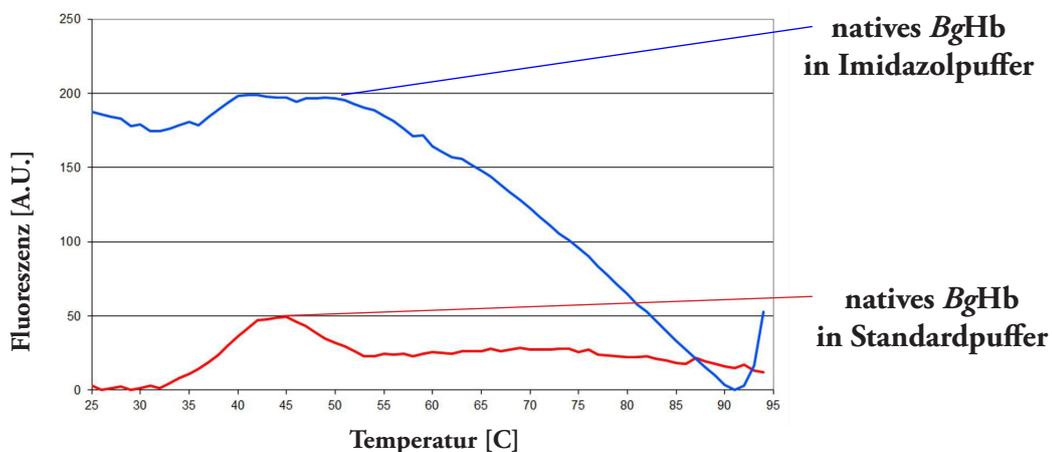


Abb. 18 Graphische Auswertung des Thermofluorlaufs.

BgHb in Standardpuffer (rot), BgHb in Imidazolpuffer (blau).

Das Ergebnis sollte eine sigmoidale Kurve sein, aus der durch die Errechnung der Schmelztemperatur Aussagen über die Stabilität des Komplexes gemacht werden können (Niesen et al., 2007). Im Falle der Messungen des nativen BgHb ergaben sich keine sigmoidalen Kurven (*Abb. 18*). Dies könnte daran liegen, dass die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit gequenchet wird, oder das Protein in der Lösung während des Messvorganges durch Präzipitation entfernt wurde. Ein weiterer Grund könnte bei zunehmender Temperatur eine Abnahme in der Fluoreszenz sein, da diese bis zu einem bestimmten Grad von der Temperatur abhängig ist.

In Übereinstimmung mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen, angefertigt mit den Proben vor und nach dem Thermofluor-Lauf (*Abb. 17*), zeigte sich das native BgHb in dem von uns verwendeten Puffer schon vor einer Erhöhung der Temperatur als teilweise aufgeklappt. Durch den schnellen Anstieg in der Absorption ist ersichtlich, dass das Protein schon zu dem Startpunkt der Messung teilweise entfaltet vorlag, da dort direkt das Fluorophor gebunden wurde.

Bei Temperaturerhöhung sinkt die Fluoreszenz direkt wieder, da das Protein hier vollständig denaturiert vorliegt, und die dadurch herbeigeführte Aneinanderlagerung der nun freien OH-Gruppen die Bindung des Farbstoffes verhindert. Die Messung in dem Imidazolpuffer, der sich aus der Analyse als für die Stabilität des nativen *BgHb* als optimal herausstellte, zeigte einen dementsprechend anderen Verlauf (*Abb. 18*, blaue Kurve). Die gemessene Fluoreszenz war hier von Anfang an sehr viel höher, und erhöhte sich dann schrittweise weiter, was für eine langsame Entfaltung bei einer Temperaturerhöhung steht. Danach war aus der Kurve zu sehen, dass es hier länger in einem Übergangszustand verblieb, bis es bei 90°C dann vollständig denaturiert vorlag. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den danach angefertigten elektronenmikroskopischen Aufnahmen wieder (*Abb. 17B*). In den EM-Aufnahmen, in welchen das Protein in dem Imidazolpuffer vorlag, erscheint die Quartärstruktur wesentlich kompakter und stabilisiert. Das das Protein vor Beginn der Messungen noch in dem Standardpuffer vorlag und erst dann in den Imidazolpuffer überführt wurde könnte ein Grund für die anfänglich hohe gemessene Fluoreszenz sein. Wahrscheinlich konnten durch den Pufferwechsel nicht alle Proteinkomplexe der Probe stabilisiert werden. *Abb. 19* zeigt das *BgHb* in Imidazolpuffer und einer darauf folgenden Dichtegradientenzentrifugation und Glutaraldehydfixierung (Grafix, siehe *B 12*), durch welche die Quartärstruktur des Proteins noch weiter stabilisiert wurde.

**natives *BgHb*
in Imidazolpuffer nach Grafix**

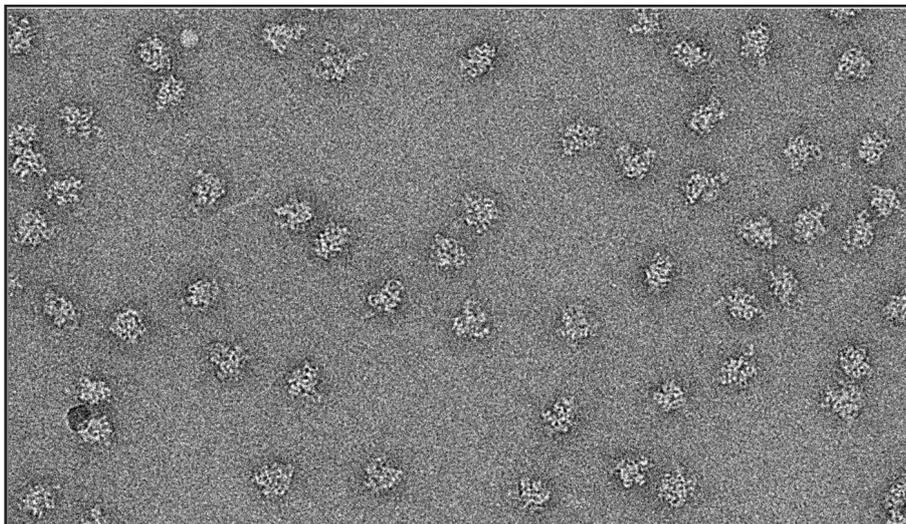


Abb. 19 Em-Aufnahme des *BgHb* nach Thermofluor und Grafix (Negativkontrastierung).

Die *BgHb*-Probe wurde in dem Imidazolpuffer gegen das Fixativ (Glyzerin) zentrifugiert und danach zum Vergleich negativkontrastiert und mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie analysiert.

1.6 Sauerstoffbindungsmessungen an der rekombinanten Untereinheit *BgHb1*

Das in Insektenzellen rekombinant exprimierte *BgHb1* wurde im Rahmen dieser Arbeit auch funktionell auf seine Sauerstoffbindungsfähigkeit überprüft. Dazu wurden von Frau Prof. Hellmann am Institut für Molekulare Biophysik Sauerstoffbindungsmessungen vorgenommen. Nach der Aufreinigung lagen die rekombinanten Proben häufig in der Met-Konformation (Fe^{3+}) vor, was sich durch eine Verschiebung des charakteristischen Oxy-Hämoglobin Gipfels im Absorptionsspektrum zeigte. Der Hauptpeak lag verschoben von 414nm bei 409nm und auch der typische Doppelgipfel zwischen 500-600nm zeigte sich im Gegensatz zu dem Oxy-Spektrum leicht abgeflacht. Aus diesem Grund mussten die rekombinanten Proben des *BgHb1* zuerst einer enzymatischen Reduktion unterzogen werden, um sie von der Met-Konformation in die Oxy-Konformation zu überführen (Dürr, 2008). Erst dann konnten die Proben auf ihre reversible Sauerstoffbindungsfähigkeit untersucht werden.

1.6.1 Reversible Sauerstoffbindung

Um die Sauerstoffdissoziationskinetik der rekombinanten *BgHb1* Untereinheit analysieren zu können, wurde die rekombinante Probe zuerst durch ein Absorptionsspektrum auf seine Funktionalität hin überprüft. Die oxygenierte Probe zeigte das für Hämoglobin charakteristische Maximum bei 414nm, und auch die typischen Doppelgipfel im längerwelligen Bereich zwischen 500 und 600nm auf. Somit war klar, dass die Proben erfolgreich oxygeniert werden konnten. Um sie nun zur Sauerstoffabgabe zu bringen, wurde den Proben Natrium-Dithionit (1mg/ml) zugegeben. Durch dieses Agens sollte der Sauerstoff in Sekundenbruchteilen aus der Lösung entfernt werden, und die Proben sollten nun ein anderes Absorptionsspektrum zeigen. Nach einer erneuten Messung zeigte sich, dass die rekombinanten *BgHb1*-Proben nun ein Deoxy-Spektrum aufwiesen. Das Maximum verschob sich deutlich nach rechts, von 414nm auf 427nm, und im hinteren Bereich zeigte sich nur noch ein kleinerer Gipfel bei 556nm. Somit konnte durch diese Analyse verdeutlicht werden, dass die aus dem Insektenzellüberstand aufgereinigten rekombinanten Hämoglobin Proben nicht nur in der Lage sind Sauerstoff zu binden, sondern diesen auch wieder abzugeben. *Abb. 20* zeigt die beiden Absorptionsspektren vor und nach der Zugabe von Natriumdithionit, und auch die deutliche Verschiebung der Kurve von oxy nach deoxy. Nach diesen Messungen konnten die Proben nicht mehr in den oxygenierten Zustand zurück überführt werden. Um die Kooperativität sowie O_2 -Affinität des rekombinanten Proteins zu überprüfen und mit der des nativen Hämoglobins zu vergleichen, sollten Sauerstoffbindungskurven gemessen werden, was durch zu geringe Probenmengen nach der Aufreinigung nicht möglich war. Jedoch konnten im Rahmen der Dr. Arbeit von Ralf Dürr, und in der Diplomarbeit von Ladan Sarraf-Zadeh an

unserem Institut Sauerstoffbindungskurven für das rekombinante *BgHb1* aus dem Insektenzellysat, und für eine Häm-Domäne des *BgHb2* aus *E.coli* (*BgHb2-a*) gemessen werden. Bei beiden Messungen zeigte sich hierbei keinerlei Kooperativität, was zu erwarten war, da es sich bei dem aus dem Insektenzellysat stammenden Untereinheit um ein Monomer handelte, und bei dem anderen rekombinanten Konstrukt lediglich um eine der 13 Häm-Domänen. Daten hierzu sind in Moeller et al., (2011) aufgeführt (siehe Anhang).

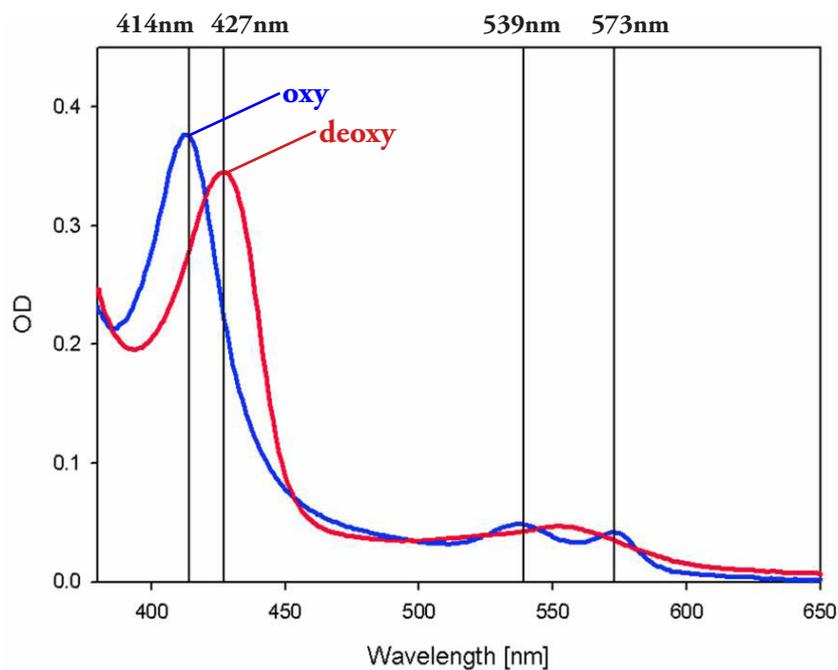


Abb. 20 Reversible Sauerstoffbindung der rekombinanten Untereinheit *BgHb1*.

In blau ist das typische Spektrum oxygenierter Proben dargestellt. Das Maximum der rekombinanten Probe liegt hier oxygeniert bei 414nm, mit den darauffolgenden typischen Gipfeln im längerwelligen Bereich. In hellrot ist das Deoxy-Spektrum zu sehen, mit dem dafür charakteristischen Peak bei 427nm, und nur einem weiter hinten liegenden Gipfel bei 556nm. Die Rechtsverschiebung der Kurve nach der Zugabe von Natriumdithionit ist deutlich zu erkennen. Die Messungen wurden von Prof. Nadja Hellmann (Institut für Molekulare Biophysik) durchgeführt.

2 *Bg*AChBP (*B. glabrata* Acetylcholin-Bindeprotein)

Ausgangspunkt für die nachfolgenden Analysen war die Identifizierung des Rosettenproteins in der Hämolymphe von *B. glabrata* (Lieb et al., 2006) als AChBP aufgrund Massenspektrometrischer Analyse der 31kDa Bande im SDS-Gel (siehe *Abb. 21A*). Es konnten 17 Peptidfragmente gewonnen werden (siehe *Abb. 21B*), welche als verwandt zu dem Acetylcholin-Bindeprotein von *Lymnea stagnalis* identifiziert wurden. Mit den zusammengesetzten Sequenzen aus diesen 17 Fragmenten führte ich im Rahmen meiner Arbeit Datenbankrecherchen durch.

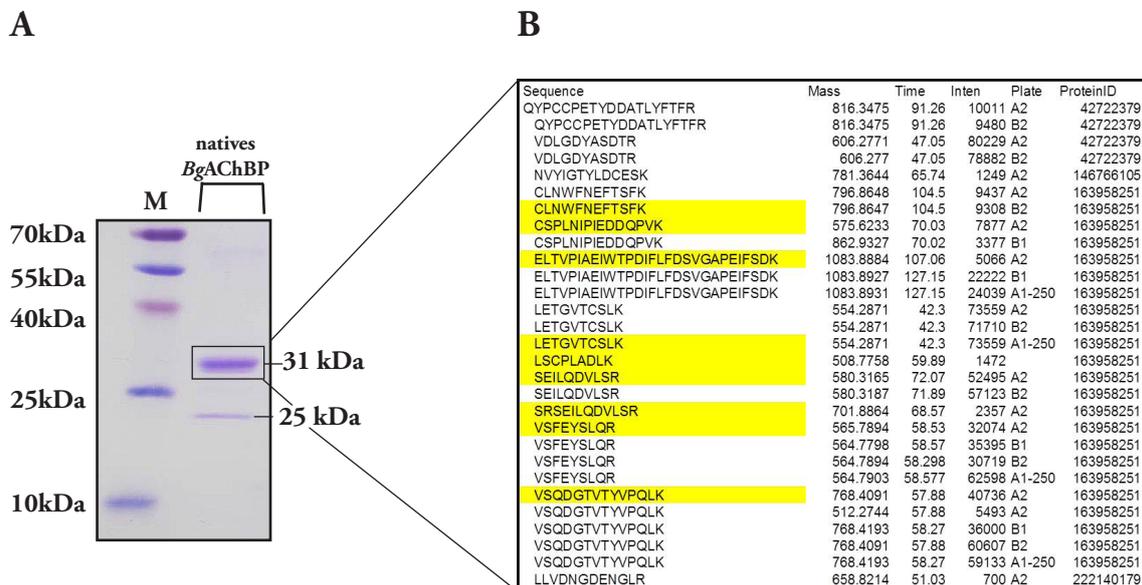


Abb. 21 15%ige SDS-PAGE des nativen *Bg*AChBP und massenspektrometrische Analyse.

(A) Die Hauptfraktion nach chromatographischer Trennung zeigt auf dem Gel zwei Banden, eine bei 31 kDa, eine andere bei 25 kDa. Es wurden ca. 10 µg Protein aufgetragen. M, Marker (ProSieve Quad Color Proteinmarker 4,6 - 300kDa, Biozym); (B) Ausschnitt der 17 durch die MS-Analyse erhaltenen Fragmente, die dem AChBP zugeordnet werden konnten. Die Analyse wurde von Dr. Stefan Tenzer (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt.

2.1 Ermittlung der Sequenzdaten

2.1.1 Identifizierung und Sequenzermittlung von *BgAChBP1*

Eine Datenbanksuche der EST-Datenbank (Expressed Sequence Tags) ergab zwei EST-Sequenzen (FC858241; CK768284), welche die Fragmente der MS-Analyse enthielten. Da sich die beiden EST`s überlappten, konnten sie zusammengefügt werden. Mit der zusammengeführten Sequenz wurden weitere Datenbankrecherchen durchgeführt. Ein Protein-Blast in der NCBI-Datenbank deckte auf, dass es sich bei dem 2006 als Rosettenprotein identifiziertem Protein um ein Acetylcholin-Bindeprotein handelt. Es wurde von uns *BgAChBP1* genannt. Mit der zusammengesetzten Sequenz wurde auch die genomische Datenbank von *Biomphalaria* (siehe B 6.3) durchsucht. Dadurch konnte ein "Scaffold" ermittelt werden, welcher neben der codierenden Sequenz der beiden zuvor zusammengesetzten EST`s auch die Intronsequenzen enthielt. Mit Hilfe der Programme Genewise (EMBL-EB) und Signal P (CBS) konnte so aus diesem Scaffold die komplette Genstruktur *BgAChBP1* ermittelt werden (Abb. 22). Es handelt sich um eine insgesamt 2792bp lange Sequenz, welche drei Exons und zwei Introns beinhaltet.

BgAChBP1

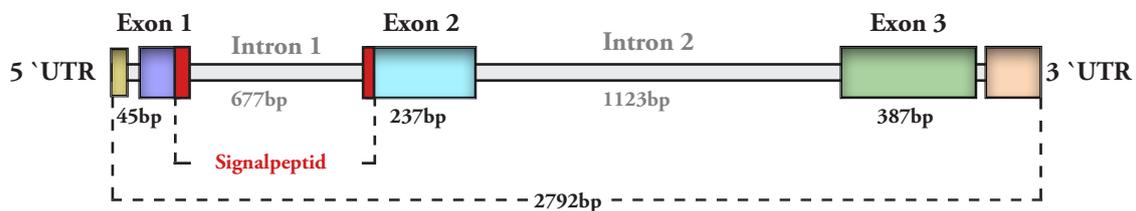


Abb. 22 Schematische Darstellung der Genstruktur von *BgAChBP1*.

Dargestellt ist das komplette Gen (2792bp), mit drei Exons und zwei Introns, sowie 5'-, und 3'UTR. Mit rot gekennzeichnet ist das Signalpeptid, dass von dem ersten Intron unterbrochen wird.

Zu Beginn der Sequenz liegt eine 5'UTR von 57bp. Daran anschließend folgt der offene Leserahmen mit 668bp, der das Signalpeptid (54bp) und die beiden für das Gen codierenden Exons enthält. Das Signalpeptid wird von dem ersten Intron, welches ein Phase 1 Intron ist, unterbrochen. Die c-DNA umfasst somit nur Exon 2 und 3, welche für 205 Aminosäuren codieren. Auf genomischer Ebene werden diese beiden Exons von dem zweiten, 1123bp langem Intron in Phase 0 getrennt. Beide Introns beginnen an der 5'-Splicestelle jeweils mit einem GT-Duplett und schließen am 3'-Intronende mit einem CAG-Triplett ab. Somit folgen beide Introns der so genannten GT-AG-Regel (Jackson, 1991; Long et al., 1998; Quiang et al., 1999; Wu & Krainer, 1999; Lund et al., 2002). Abschließend folgen die 3'UTR sowie der typische poly(A)-Schwanz.

Des Weiteren untersuchte ich mit der ermittelten Sequenz von *BgAChBP1* das SRS-Archiv (Sequence Read Archive) nach Transkriptomdaten. Alle zu dieser Sequenz passenden Daten wurden extrahiert. Da es sich bei den SRS-Daten um nur, ca. 400bp lange sequenzierte Fragmente handelt, wurde die große Datenmenge mit dem Programm Mira (<http://sourceforge.net/apps/mediawiki/mira-assembler>) komprimiert. Die von Mira erstellten Contigs wurden dann in Geneious geladen, um dort eine eigene Datenbank anzulegen, welche nur Contigs passend zu der Acetylcholin Bindeproteinsequenz enthielt. Durch einen “Customer Blast” konnte so für die Sequenz von *BgAChBP1* ein Contig erstellt werden, welches sich aus 117 SRS-Sequenzen zusammensetzte (Abb. 23). Letztendlich konnte so eine durchgehende Sequenz generiert werden, welche sich in ihrer Information mit der vorherigen, aus der genomischen Datenbank ermittelten Sequenz deckte. Anhand der aus den Datenbanken gewonnenen Sequenzinformation wurden spezifische Primer generiert. Durch diese war es möglich die c-DNA von *BgAChBP1* zu amplifizieren und somit die in den Datenbanken gefundene Sequenz zu verifizieren. Die vollständige Sequenz ist im Anhang unter 7.3 aufgeführt.



Abb. 23 Multiples Alignment.

Dargestellt ist ein Ausschnitt des Alignments der Sequenz des *BgAChBP1*, dem passenden Contig, und den 117 SRS-Sequenzen aus welchen sich das Contig zusammensetzt (in Geneious).

2.1.2 Sequenzermittlung *BgAChBP2*

Bereits 2004 war die 31kDa-Bande von unserer Arbeitsgruppe aussequenziert worden, und man hatte die Sequenz XKKSREEIVKEILGRAN erhalten. Da dieses Fragment sicher zu der 31kDa Bande des Proteins gehörte, aber in *BgAChBP1* nicht aufzufinden war, wurde damit die angelegte Contigdatenbank in Geneious durchsucht. Ich fand ein Contig, welches sich aus mehreren SRS-Sequenzen zusammensetzte und eine weitere Isoform (*BgAChBP2*) darstellte. Hierzu passend enthielten die MS-Daten Fragmente, die zuvor mit *BgAChBP1* nicht erklärt werden konnten. Durch eine weitere Suche mit der so ermittelten Sequenz in der genomischen Datenbank von *B. glabrata* konnte auch hier schließlich die komplette Exon- Intron-Struktur (Abb. 24) aufgedeckt werden.

BgAChBP2

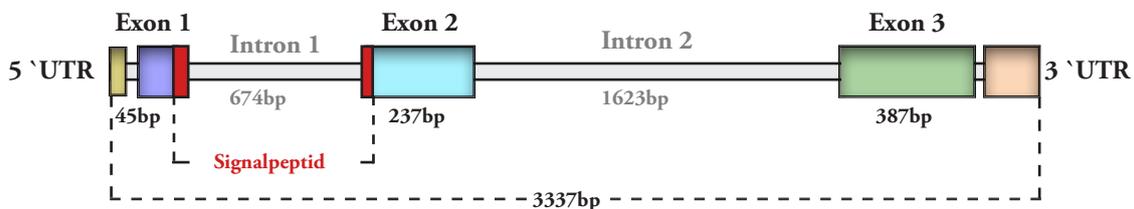


Abb. 24 Schematische Darstellung der Genstruktur von *BgAChBP2*.

Die schematische Abbildung zeigt die komplette genomische Sequenz der zweiten Isoform, welche insgesamt eine Größe von 3337bp hat. Auch hier ist das unterbrochene Signalpeptid rot dargestellt.

Wie bei *BgAChBP1* zeigt die Sequenz von *BgAChBP2* drei Exons, welche von zwei Introns getrennt werden. Auch hier beschränkt sich der codierende Bereich auf 205 Aminosäuren, welche in Exon zwei und drei enthalten sind. Downstream zu der 41bp großen 5' UTR folgt das Signalpeptid (57bp), welches mit dem SignalP 3.0 Server (Bendtsen et al., 2004) identifiziert werden konnte. Analog zu dem *BgAChBP1*-Gen wird es durch das erste Intron unterbrochen. Dieses Intron 1 befindet sich ebenfalls in Phase eins, gefolgt von dem zweiten nicht codierenden Bereich, bei welchem es sich um ein Phasenull-Intron handelt. Obwohl alle Exons in gleicher Größe wie bei dem *BgAChBP1*-Gen vorliegen, umfasst die komplette Sequenz hier 3337bp, da das zweite Intron hier 500bp länger ist. Auch hier wurden anhand der Sequenzdaten spezifische Primersequenzen ermittelt, mit welchen es möglich war, aus der RNA von *B. glabrata* die komplette cDNA zu amplifizieren und zu sequenzieren. Die Primersequenzen sowie die vollständige Sequenz sind im Anhang unter 3.2 bzw. 7.4 aufgeführt.

2.3 Amplifikation von *BgAChBP1* und *BgAChBP2*

Um die beiden Isoformen zu amplifizieren, wurden mit den aus der Datenbank erhaltenen Sequenzen spezifische Primer generiert. Nach der RNA-Extraktion konnte so in Kombination mit einem Oligo-dT-Primer durch reverse Transkriptase die c-DNA für beide Polypeptide synthetisiert werden. In anschließenden PCR-Reaktionen wurde dann die c-DNA für *BgAChBP1* und *BgAChBP2* amplifiziert. Dafür wurden die spezifischen Primerpaare so gewählt, da sie bei jeder Isoform im 5`-, und 3`UTR lagen, um so jeweils die kompletten kodierenden Sequenzen zu erhalten. Um die Reaktionen zu überprüfen, wurden sie auf ein Agarosegel aufgetragen.

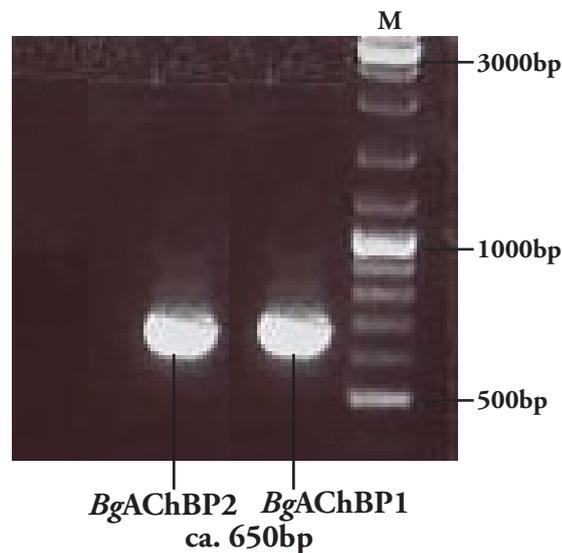


Abb. 26 Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate von *BgAChBP1* und *BgAChBP2*. Beide Amplifikate wiesen die erwartete Größe von ca. 650bp auf. Dicke Markerbanden sind rechts im Bild gekennzeichnet. 1%ige Agarose, M, Marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas).

Wie auf dem Gel in *Abb. 26* zu sehen ist, konnten die gewünschten Sequenzen amplifiziert werden. Die Banden beider Isoformen wiesen die erwartete Größe von ca. 650bp auf, was den je 615bp kodierenden Bereich zusammen mit den gewählten Primerpaaren (je ca. 20bp) entsprach. Die Banden wurden einzeln ausgeschnitten und wie unter *B 5.9* beschrieben aufgereinigt, kloniert und sequenziert. Nachdem die Sequenzen beider Polypeptide so verifiziert werden konnten, wurden die Plasmide aufgereinigt (siehe *B 5.12*), und mit Ihnen eine "Attachment PCR" (siehe *B 5.4.1* und *B 5.5.2*) als Vorbereitung für die Gatewayklonierung durchgeführt.

2.4 Generierung der *Attachment*-Produkte für die rekombinante Expression

Für eine erfolgreiche Gateway-Klonierung sollten die PCR-Produkte am 5'- und 3'-Ende *Attachment*-Sites aufweisen. Diese wurden in einem Amplifikationsschritt durch *Attachment*-Primer den DNA-Sequenzen angefügt. Abgesehen von den für die Rekombination notwendigen *Attachment*-Sites enthielten die Primer auch einen genspezifischen Abschnitt. Da sich in der Rekonstruktion des nativen *BgAChBP* der N-Terminus des Proteins als wichtig für die Oligomerisierung zur Quartärstruktur abzeichnete, wurde dem reverse Primer zudem noch ein für einen C-terminalen 6xHis-Tag kodierender Abschnitt zugefügt. Durch diese *Attachment*-Sites ließen sich später beide *BgAChBP*-Konstrukte in einer "BP-Reaktion" in den Eingangsvektor und dann in einer darauffolgenden "LR-Reaktion" in den Expressionsvektor klonieren.

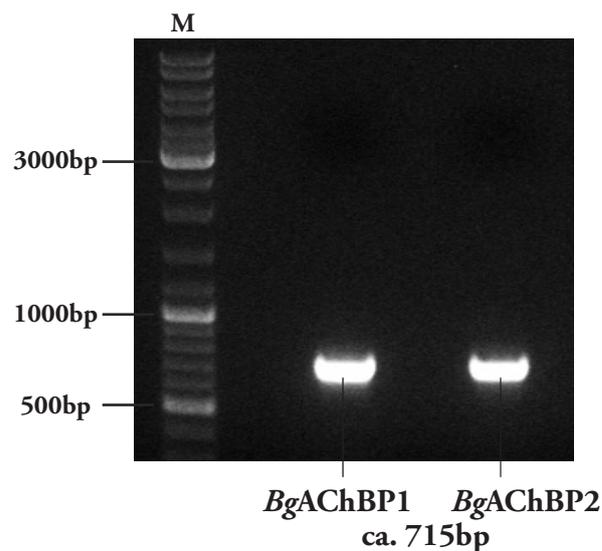


Abb. 27 Gelelektrophorese der *Attachment*-PCR mit C-terminalen His-Tag.

Auf dem 1%igen Agarosegel sind beide Isoformen (*BgAChBP*1- und -2) nach der att-PCR zu sehen. Da zu den 615bp der codierenden Sequenzen noch die Länge der att-Primer hinzugezählt werden muss, lag die Größe der Produkte bei ca. 715bp. 1%ige Agarose, M, Marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas).

Nach der *Attachment*-PCR wurden die Konstrukte beider Isoformen auf einem Agarosegel aufgetrennt (Abb. 27). Zusammen mit den Primern ergab sich für die *Attachment*-Produkte eine Größe von ca. 715bp, welche sich aus der 615bp langen genspezifischen Sequenz, den 46bp des *Attachment*-forward Primers, und den 54bp des *Attachment*-reverse Primers inklusive His-Tag-Sequenz zusammensetzte.

Außer den oben genannten, mit einem C-terminalem His-Tag versehenen Konstrukten, wurden in dieser Arbeit noch weitere *Attachment*-PCR-Produkte generiert. Dafür wurden die Sequenzen beider Isoformen mit einem N-terminalem 6xHis-Tag versehen. Um diesen His-Tag nach der Expression und Aufreinigung wieder von dem Protein entfernen zu können, wurde mittels des *Attachment*-forward Primers hinter die für den Tag kodierende Sequenz eine "TEV-Schnittstelle" für eine spezifische TEV-Protease hinzugefügt. Auch diese Fragmente wurden nach der Amplifikation zur Überprüfung gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe *Abb. 28*). In diesem Fall besaßen die Konstrukte eine Größe von ca. 750bp, welche sich aus der kodierenden Sequenzen der Isoformen (615bp), den 85bp der *Attachment*-forward Primer, und den 33bp des *Attachment*-reverse Primers zusammensetzten.

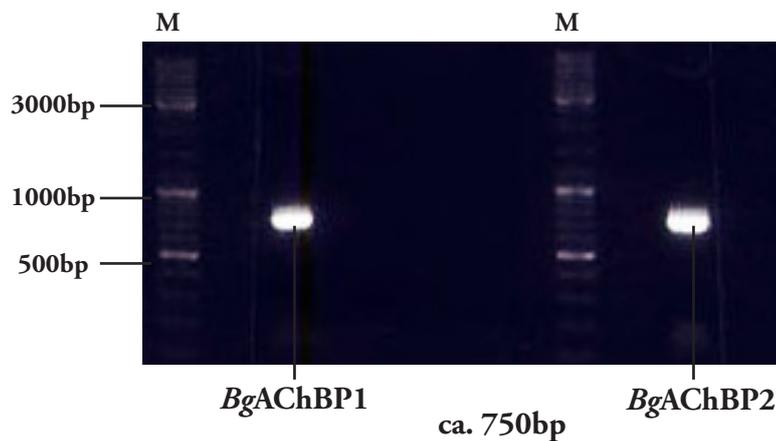


Abb. 28 Gelelektrophorese der *Attachment*-PCR mit N-terminalen His-Tag und TEV-Schnittstelle.

Abgebildet sind beide für *BgAChBP* kodierenden Konstrukte nach der *Attachment*-PCR. Angefügt wurden jeder Isoform ein N-terminaler His-Tag, und eine darauffolgende TEV-Schnittstelle, weswegen sich für beide Sequenzen eine Größe von ca. 750bp ergab. 1%ige Agarose, M, Marker (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Fermentas).

Alle Banden wurden ausgeschnitten, extrahiert und über homologe Rekombination (siehe B 5.10.2) in den Eingangsvektor (pDonor221) und anschließend in den Expressionsvektor (pDest14) eingebracht. Bevor ich die gewünschten Plasmide für die Expression zu den Expressionsbakterien gab, wurden alle erhaltenen Klone der LR-Reaktion (Konstrukte im Expressionsvektor) zur Überprüfung sequenziert. Ich verwendete nur die Klone, die fehlerfrei waren (*Abb. 29*).

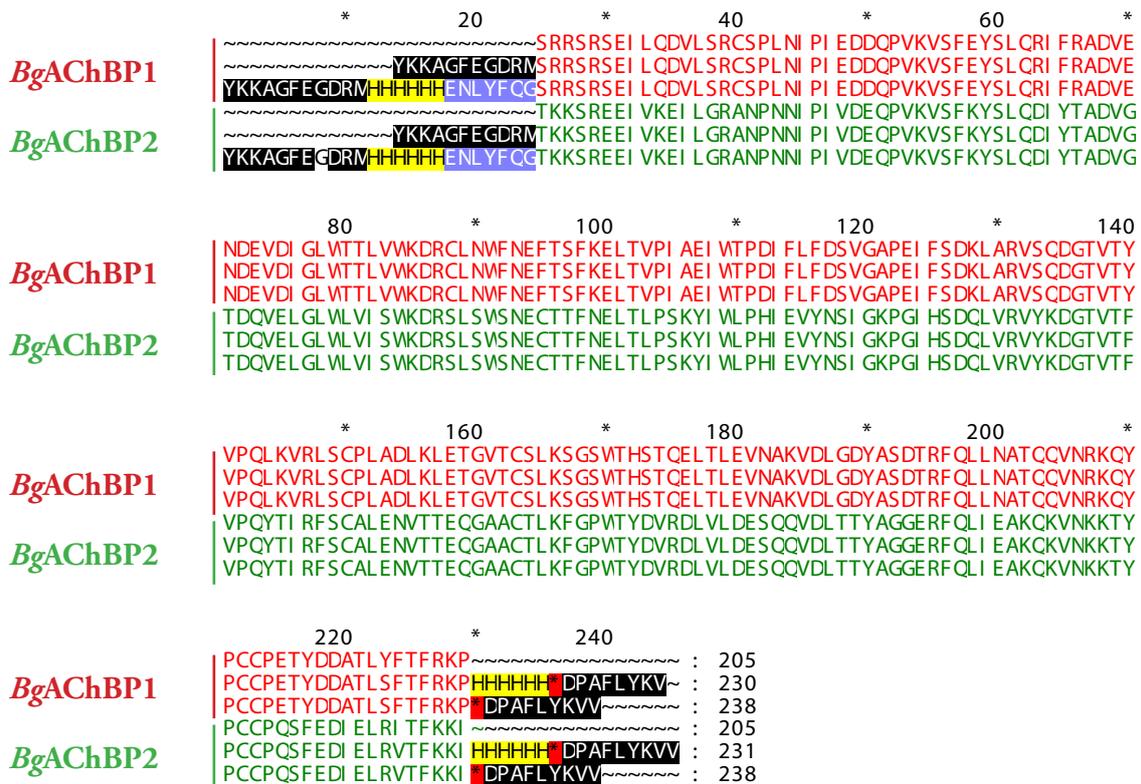


Abb. 29 Überprüfung der Sequenzen der Gateway-Konstrukten für die rekombinante Expression.

Dargestellt sind in rot die kodierende Sequenz für *BgAChBP1* und in grün die für *BgAChBP2*. Jeweils oben steht die Sequenz der c-DNA. Darunter steht jeweils die Sequenz im Expressionsvektor mit C-terminalem 6x His-tag (gelb) nach der LR Reaktion (LRHis*BgAChBP1*-Sequenz; LRHis*BgAChBP2*-Sequenz). Die jeweils dritte Sequenz stammt von dem generierten Klon mit N-terminalem 6xHis-tag (gelb) und der darauffolgenden, hier blau gekennzeichneten TEV-Schnittstelle (LRHisTEV*BgAChBP1*-Sequenz; LRHisTEV*BgAChBP2*-Sequenz). Die *Attachment*-Sites sind schwarz hinterlegt. Alignment mit Genious (Drummond et al., 2011) unter Verwendung von Clustal. Darstellung und Bearbeitung des Alignments mit Genedoc (Nicholas et al., 1997).

2.5 Proteinbiochemische Analyse der rekombinanten Expression in Bakterienzellen

Die generierten Expressionsvektoren mit den jeweiligen Zielsequenzen wurden zu den Bakterienzellen (BL21AI) gegeben, exprimiert, aufgereinigt und gefaltet (siehe B 7.1). Es wurden Expressionsansätze von 1 Liter mit 0,2% L-Arabinose bei gewünschter Bakteriendichte induziert, und über Nacht exprimiert. Als Negativkontrolle dienten in jeder Expression 200ml uninduzierte Bakterienansätze. Anhand von Coomassie Gelen wurden die Expression und die jeweiligen Reinigungsschritte überprüft.

2.5.1 Rekombinantes *BgAChBP1* und *BgAChBP2* mit C-terminalem His-Tag

Nach dem Abzentrifugieren der Bakterienkulturen erfolgten erste Reinigungsschritte um das Bakterienpellet aufzubrechen und das gewünschte Konstrukt zu erhalten. Danach wurde jeweils der Überstand und das abzentrifugierte Pellet der induzierten und uninduzierten Ansätze auf ein SDS-Gel aufgetragen. In *Abb. 30* ist die bakterielle Expression der beiden Isoformen (*BgAChBP1* und *BgAChBP2*) mit C-terminalem 6xHis-Tag dargestellt.

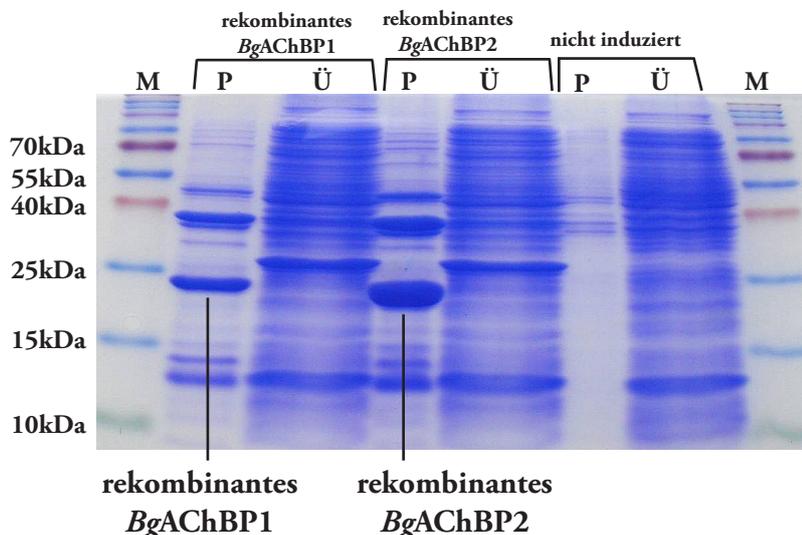


Abb. 30 Rekombinante Expression von *BgAChBP1* und *BgAChBP2* mit C-terminalem His-Tag.

15%iges SDS-Gel der Pellets und Überstände nach der Expression in BL21AI. Gekennzeichnet sind die Banden, die dem rekombinanten Protein entsprechen und sich im Pellet befinden. Es wurde zu 20µl Überstand 20µl 2xSDS-Probenpuffer gegeben. Die abzentrifugierten Pellets wurden in 1ml einfachen Probenpuffer gelöst. Auf ein 15%iges Gel konnten dann von den Überständen je 10µl, und von den gelösten Pellets je 5µl aufgetragen werden. M, Marker (ProSieve Quad Color Proteinmarker 4,6 - 300kDa, Biozym); P, Pellet; Ü, Überstand.

Knapp unter der 25kDa Markerbande waren die Proteinbanden von *BgAChBP1* und *BgAChBP2* zu sehen, welche bei den uninduzierten Proben fehlten. Bei ca. 24 kDa wandern die Proteinbanden somit auf der Größe des nativen, deglykosylierten Proteins. Da Bakterienzellen solche posttranslationalen Modifikationen nicht durchführen, war die Größe der rekombinanten Proteine so zu erwarten. Beide rekombinanten Proteine befinden sich offensichtlich nach Lyse und Zentrifugation im Pellet. Dies wies darauf hin, dass ihre DNA-Konstrukte beide in bakteriellen Einschlusskörpern (sog. *inclusion bodies*) exprimiert wurden. Die DNA-Pellets wurden dann in einem geeigneten Puffer resuspendiert und anschließend sonifiziert (siehe B 7.1). Nach dem Sonifizieren wurden die Membranbestandteile der jetzt aufgebrochenen Einschlusskörper abzentrifugiert. Ein Teil der nach diesem Zentrifugationsschritt erhaltenen Überstände wurde für ein weiteres SDS-Gel zur Überprüfung des Sonifizierungsergebnisses zusammen mit den Pellets aufgehoben. Der Rest der Überstände wurde auf eine Nickelmatrix aufgetragen um die His-getaggten Proteine weiter aufzureinigen. *Abb. 31* zeigt exemplarisch eine SDS-PAGE zur Aufreinigung der Isoform 1.

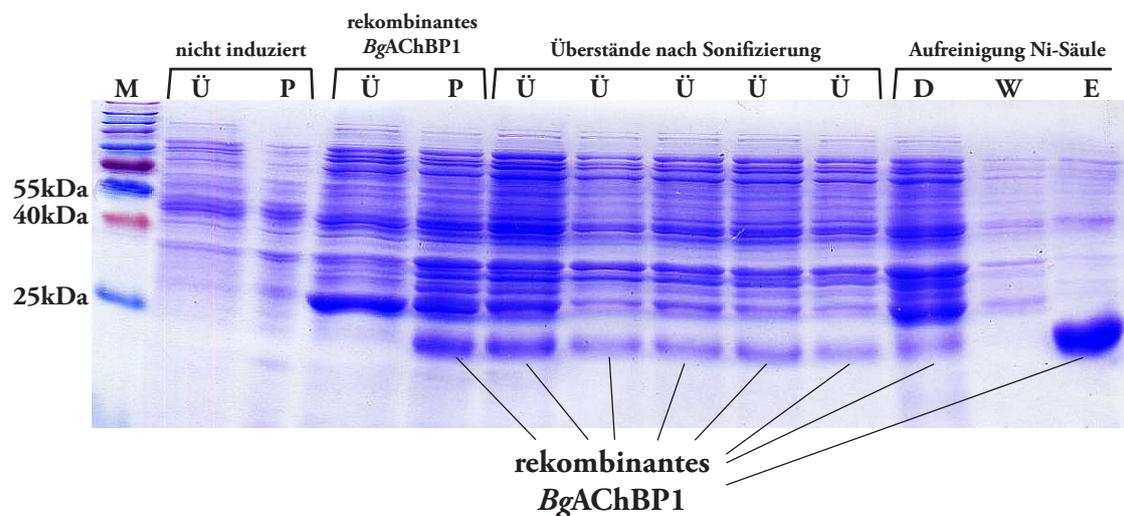


Abb. 31 Überprüfung des Resultats der Sonifizierung und Aufreinigung über die Ni-Matrix.

Um die Pellets aus Einschlusskörpern aufzubrechen, wurden sie in einem denaturierenden Puffer sonifiziert. Nach Abzentrifugieren der Membranbestandteile wurden 30µl dieser Überstände mit 10µl fünffachem Probenpuffer versetzt und 15µl davon aufgetragen. Alle Fraktionen der Aufreinigung wurden je nach Konzentration mit 5x Probenpuffer versetzt und 10-15µg auf das Gel aufgetragen. M, Marker (ProSieve Quad Color Proteinmarker 4,6 - 300kDa, Biozym); P, Pellet; Ü, Überstand; P, Pellet; W, Waschfraktion; E, Eluat.

Durch den Vergleich mit den nichtinduzierten Proben war die Proteinbande des rekombinanten *BgAChBP1* leicht zu erkennen. Um den Aufschluss der Einschlusskörper zu überprüfen, wurden zum Vergleich Überstand und Pellet vor der Sonifizierung aufgetragen, und daneben die Überstände danach. Es ist zu erkennen, dass sich die für das Protein typische Bande von 24kDa in den Überständen befindet, und somit der Aufschluss erfolgreich war. Daneben sind der Durchfluss, die Waschfraktion und das Eluat der Nickelsäule zu sehen. Das Gelbild zeigt, dass sich zwar ein kleiner Teil des rekombinanten Proteins im Durchfluss befindet, der größte Anteil jedoch von vielen bakteriellen Zellproteinen befreit im Eluat gelöst vorliegt.

2.5.2 Rekombinantes *BgAChBP1* und *BgAChBP2* mit N-terminalem 6x His und TEV-Schnittstelle

Um den N-terminalen 6xHis-Tag nach der Aufreinigung wieder entfernen zu können, wurden Konstrukte generiert, welche nach der Sequenz für den His-tag eine TEV-Schnittstelle (TEV=Tobacco Etch Virus) enthielten (Abb. 29).

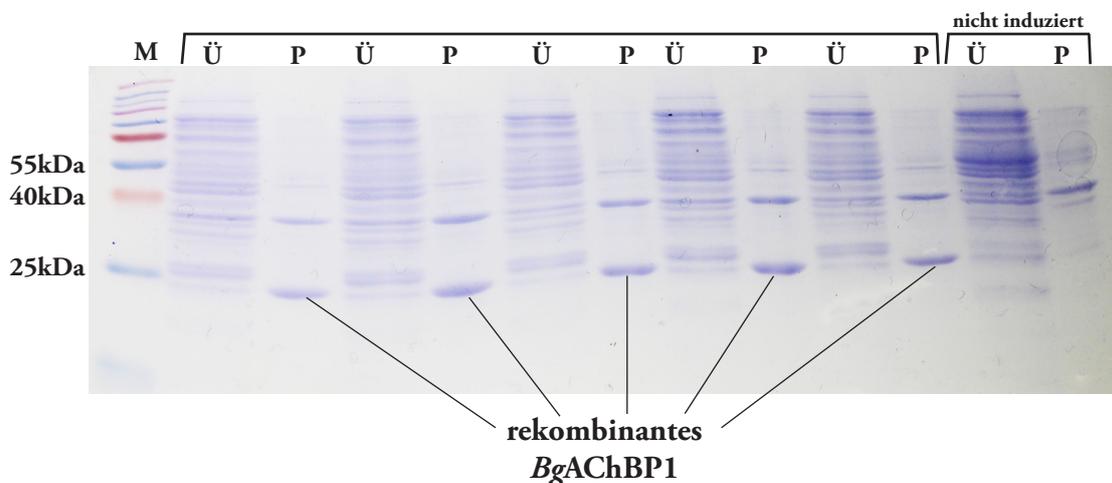


Abb. 32 Analyse der rekombinanten Expression von *BgAChBP1* mit N-terminalem His-tag, und TEV-Schnittstelle.

Nach der Expression bei 25°C über Nacht wurden die Bakterienzellen abzentrifugiert und lysiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde jeweils Überstand und Pellet auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Im Pellet war dann die für das rekombinante *BgAChBP* typische 24kDa Bande zu sehen. Zu 20µl des Expressionsüberstands wurden 20µl 2xSDS gegeben, und davon 10µl auf das Gel aufgetragen. Das Pellet nach der Lyse wurde in 1ml 1xSDS gelöst und 5µl davon aufgetragen. M, Marker (ProSieve Quad Color Proteinmarker 4,6 - 300kDa, Biozym); Ü, Überstand; P, Pellet.

Analog zu den mit C-terminalem 6xHis-Tag versehenen Konstrukten wurden auch diese mit der Erkennungssequenz für die TEV-Protease versehenen Isoformen des *BgAChBP* in den Expressionsvektor (pDest14) inkliniert, in BL21Ai exprimiert, und über eine Nickelmatrix aufgereinigt.

Jedoch mussten die rekombinanten Proteine nach der Rückfaltung umdialysiert werden, um durch diesen Pufferwechsel das richtige Milieu für die Protease zu schaffen. Danach wurde über Nacht bei Raumtemperatur ein Verdau angesetzt (siehe B 8.7).

In *Abb. 32* ist die Analyse der Expression von *BgAChBP1* mit N-terminalem 6xHis-Tag und TEV-Schnittstelle dargestellt. Wie die Konstrukte mit C-terminalem His-Tag wurden auch diese von den Bakterien in Einschlusskörpern exprimiert. Auch hier wurden die Einschlusskörper durch Zugabe eines denaturierenden Puffers und Sonifizieren aufgebrochen, die Membranbestandteile abzentrifugiert, und der Überstand dann auf eine Nickelsäule gegeben. In SDS-Gelen wurden die einzelnen Schritte überprüft. Als Ergebnis zeigte sich, dass es auch hier möglich war, das rekombinante *BgAChBP1* mit N-terminalem His-TEV aufzureinigen. Nach der Rückfaltung der im Eluat enthaltenen Monomere und dem zweimaligem Umdialysieren (Rückfaltungspuffer zu 20mM Tris, pH 8,0; 20mM Tris, pH 8,0 zu 20mM Tris, pH 7,5) um ein geeignetes Milieu für die TEV-Protease zu schaffen, wurden 200µg Protein mit 100µg Protease versehen, und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur verdaut. Die Fragmente sollten dann über einen Western Blot nachgewiesen werden.

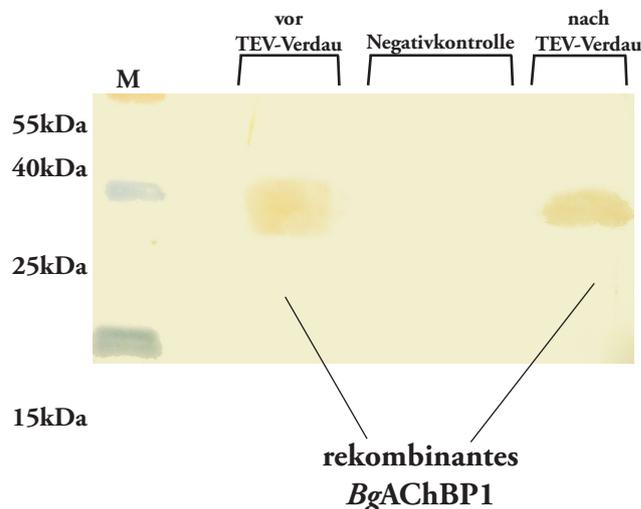


Abb. 33 Western Blot des rekombinanten *BgAChBP1* vor und nach dem TEV-Verdau.

Beide Proben wurden, zusammen mit dem nativen Protein als Negativkontrolle, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Es wurden jeweils 5µg Protein aufgetragen, und mit einer 1:1000 Verdünnung des α -Penta-His-Antikörpers inkubiert. M, Marker (ProSieve Quad Color Proteinmarker 4,6 - 300kDa, Biozym).

Dafür wurden ungeschnittenes und geschnittenes rekombinantes *BgAChBP1* zusammen mit nativen *BgAChBP* als Negativkontrolle einer SDS-PAGE unterzogen und dann geblottet (siehe B 8.10). Auf der Nitrocellulosemembran konnte dann das rekombinant exprimierte Protein mit einem α -Penta-His-Antikörper (siehe Anhang F 5.8) nachgewiesen werden. In *Abb. 33* ist zu sehen, dass sowohl geschnittenes als auch ungeschnittenes rekombinantes *BgAChBP1* mit dem Antikörper reagierten. Obwohl auf das Gel die gleiche Konzentration beider Proben aufgetragen wurde, detektierte der Antikörper das ungeschnittene rekombinante Protein wesentlich stärker, aber auch das geschnittene wurde eindeutig erkannt. Da der His-Antikörper beide Proben, vor und nach dem TEV-Verdau detektieren konnte, lag die Vermutung nahe, dass die Protease nicht bei allen Konstrukten den His-Tag abschneiden konnte.

2.5.3 Nachweis von Disulfidbrücken im rekombinanten *BgAChBP2*

Anhand der Aminosäuresequenzen der beiden Untereinheiten konnte festgestellt werden, dass *BgAChBP2* ein ungepaartes Cystein an der Stelle C71 besitzt (siehe *Abb. 25*). Da dieses Disulfidbrücken zwischen zwei Untereinheiten ausbilden könnte, wurde das rekombinant exprimierte *BgAChBP2* auch unter nicht reduzierenden Bedingungen im SDS-Gel überprüft (*Abb. 34*).

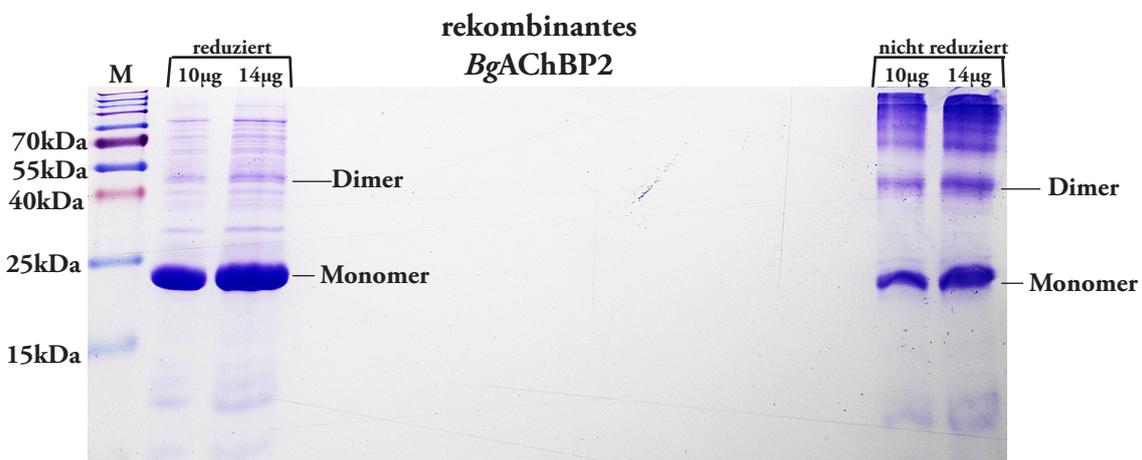


Abb. 34 15%ige SDS-Page des rekombinant exprimierten *BgAChBP2* mit reduzierendem und nicht reduzierendem Probenpuffer.

Das rekombinante *BgAChBP2* wurde in je zwei Konzentrationen (10µg und 14µg) mit β -Mercaptoethanol enthaltendem Probenpuffer (links reduziert) und in zwei Konzentrationen ohne β -Mercaptoethanol aufgetragen (rechts nicht reduziert). Monomer und Dimerbanden des *BgAChBP2* sind gekennzeichnet. M, Marker (ProSieve Quad Color Proteinmarker 4,6 - 300kDa, Biozym).

Durch die SDS-Page konnte diese Vermutung bestätigt werden. Unter reduzierenden Bedingungen war die für das rekombinante, aufgereinigte Protein typische 24kDa Bande ausgeprägt zu erkennen. Hierbei handelte es sich um die monomere Form des *BgAChBP2*. Unter nicht reduzierenden Bedingungen, d.h. ohne Zugabe des Disulfidbrücken spaltenden β -Mercaptoethanols, war über der Monomerbande deutlich eine Bande zwischen der 40kDa und der 55kDa Bande des Markers zu erkennen. Dies entspricht der Größe eines Dimers, das auf dem ungepaarte Cystein (C71) beruhen muss. Eine Bande gleicher Größe war auch unter reduzierten Bedingungen zu erkennen, was auf eine unvollständige Spaltung durch das reduzierende Agens beruhen sollte. Somit konnte durch diese Analyse bestätigt werden, dass es sich bei dem dimerisierten Material des nativen Proteins um *BgAChBP2* handelt, was auch durch die Sequenzanalysen (siehe 2.2) gestützt wird.

2.6 Elektronenmikroskopische Analyse der rekombinant exprimierten Untereinheiten *BgAChBP1* und *BgAChBP2*

2.6.1 Rekombinantes *BgAChBP1* und *BgAChBP2* mit C-terminalem His

Um die aus den Bakterienpellets aufgereinigten, gefalteten Proteine auf eine eventuell erfolgte Oligomerisierung untersuchen zu können, wurden beide Untereinheiten auch elektronenmikroskopisch analysiert. Alle hier gezeigten Aufnahmen wurden in unserer Arbeitsgruppe von Michael Saur erstellt.

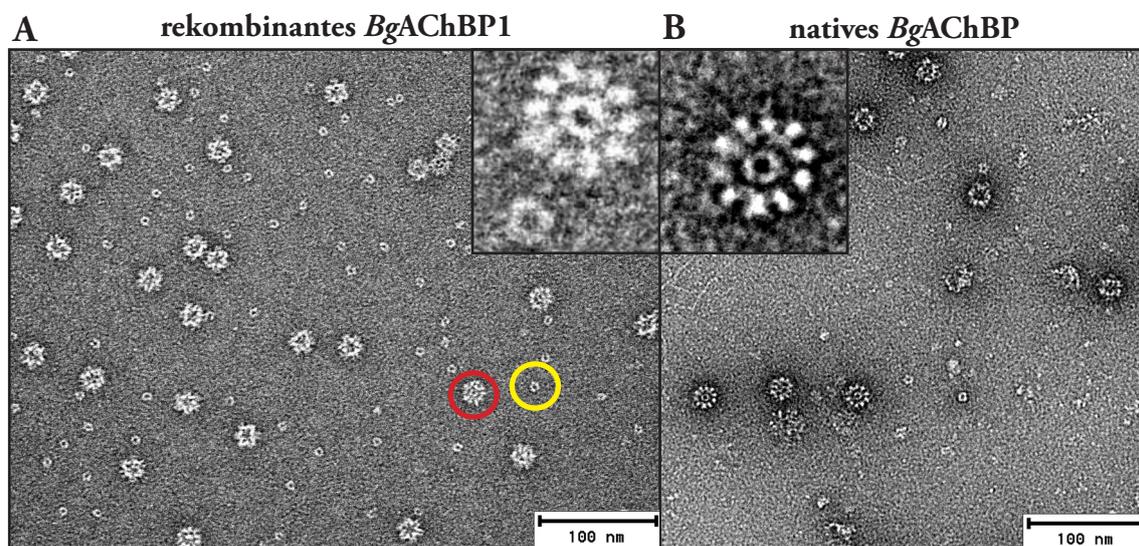


Abb. 35 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von rekombinanten *BgAChBP1* mit C-terminalem 6xHis-Tag und nativen *BgAChBP1*.

(A) Das rekombinant, in *E.coli* exprimierte *BgAChBP1* zeigt die typische dodekaedrische Quartärstruktur des Rosettenproteins (roter Kreis), aber auch nicht assemblierte Pentamere (gelber Kreis). Oben rechts sieht man eine Vergrößerung eines rekombinanten Dodekaeders, zusammen mit einem Pentamer. (B) EM-Aufnahme des nativen *BgAChBP1* mit einer Vergrößerung des nativen Dodekaeders oben links.

Wie auf *Abb. 35A* zu sehen ist, zeigte das mit einem C-terminalem His-Tag versehene, rekombinant in Bakterienzellen exprimierte *BgAChBP1* die für das Acetylcholin-Bindeprotein von *B. glabrata* typische Quartärstruktur. Bei einem Vergleich mit den Aufnahmen des nativen Proteins (*Abb. 35B*) wurde deutlich, dass das rekombinante *BgAChBP1* in der Lage ist zu 25nm großen, den nativen Rosetten ähnlichen Partikeln zu assemblieren. Weiterhin waren neben der charakteristischen dodekaedrischen Quartärstruktur einige kleinere Partikel zu sehen, welche von uns als noch nicht assemblierte Pentamere interpretiert wurden. Auch in den optischen Vergrößerungen (*Abb. 35A, B*) ist die strukturelle Ähnlichkeit der Proteine zu erkennen.

Die EM-Aufnahmen des in *E. coli* mit einem C-terminalen His-Tag exprimierten *BgAChBP2* zeigte ein anderes Ergebnis (Abb. 36). Hier waren keine Dodekaeder, sondern nur Pentamere zu sehen. Zudem scheinen auch Di-Pentamere vorhanden zu sein.

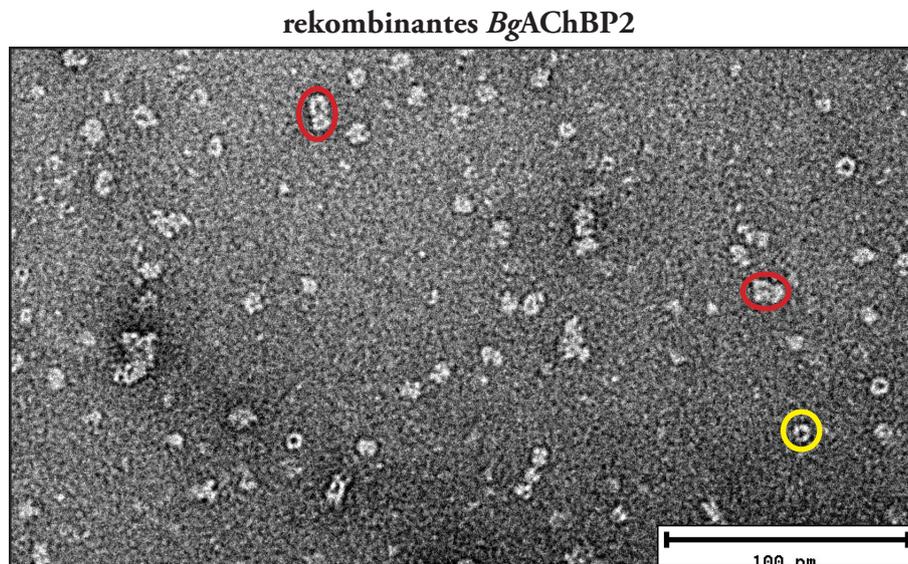


Abb. 36 Elektronenmikroskopische Aufnahme des rekombinanten *BgAChBP2* mit C-terminalem 6x His-Tag.

Es zeigen sich keine Dodekaeder, sondern nur einzelne Pentamere (gelb umrahmt), sowie möglicherweise Dipentamere (rote Kreise).

Um im rekombinanten *BgAChBP1* Pentamere von den Dodekaedern zu isolieren, wurden mehrere Aufreinigungsschritte durchgeführt. Einer davon war es, die beiden Strukturen durch Größenausschluss (siehe B Gelfiltration 8.4.2) voneinander zu trennen. Dafür wurden die rekombinant exprimierten Proben der Isoform 1 nach der Rückfaltung in einem geeigneten Puffer einer Gelfiltration unterzogen. Nach erfolgter Trennung wurden alle Fraktionen auch elektronenmikroskopisch analysiert (Abb. 37). Nach diesem Aufreinigungsschritt zeigten die Proben jedoch Cluster von akkumulierten Dodekaedern. Nach Zugabe von 50mM Imidazol zum Proben- und Elutionspuffer, lösten sich diese Aggregate weitgehend in einzelne überwiegend Dodekaeder auf (siehe Abb. 38). Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass das Zusammenlagern auf dem C-terminalen His-Tag beruhen dürfte. Jedoch waren neben den Dodekaedern auch noch Pentamere in den Proben zu erkennen, welche nicht durch den Größenausschluss entfernt worden waren. Da nun wahrscheinlich war, dass die Akkumulation der Dodekaeder durch den an den C-Terminus angefügten 6x His-Tag zurückzuführen war, wurden wie unter B 5.4.1 beschrieben neue Konstrukte für die rekombinante Expression generiert, bei welchen der 6x His-Tag N-terminal der Sequenz des Proteins vorangestellt wurde, und welche auf den His-Tag folgend eine TEV-Schnittstelle besaßen.

Durch diese Schnittstelle sollte es möglich sein, den Tag zu entfernen, um somit das Clustern der Proteine zu verhindern (eine entsprechendes System für den C-Terminus stand nicht zur Verfügung).

rekombinantes *BgAChBP1*

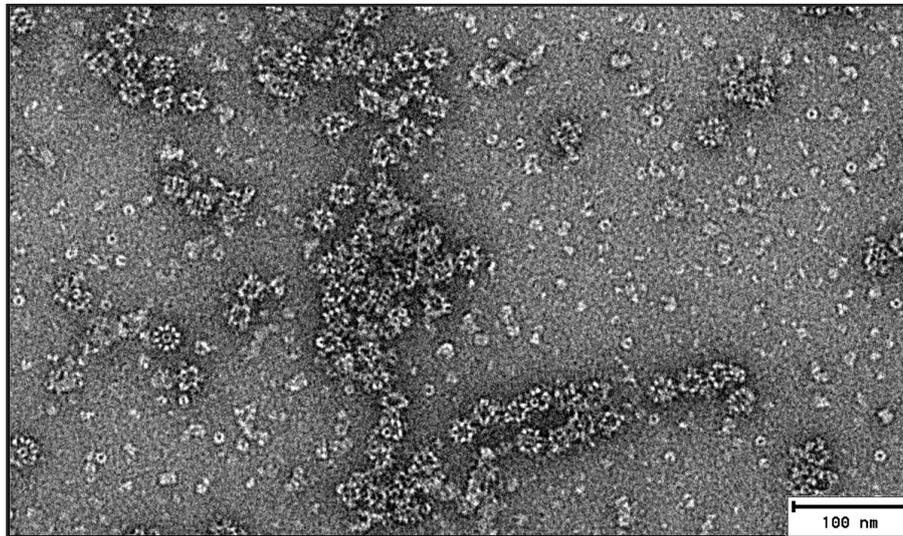


Abb. 37 Rekombinantes *BgAChBP1* mit C-terminalem His-Tag nach Gelfiltration. Es sind nur wenige einzelne und überwiegend nur zu Clustern akkumulierte Dodekaeder zu sehen.

rekombinantes *BgAChBP1*

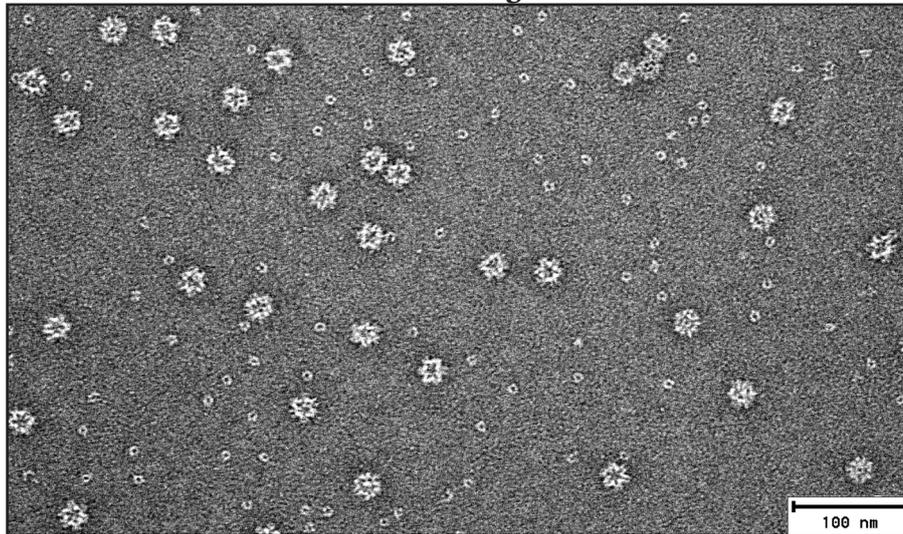


Abb. 38 Rekombinantes *BgAChBP1* mit C-terminalem His-Tag nach Gelfiltration und Zugabe von 50mM Imidazol.

Hier wurde die gleiche Probe wie in *Abb. 37* verwendet. Offenbar verhindert das Imidazol die Aggregation, die wahrscheinlich auf dem His-Tag beruht.

2.6.2 Rekombinantes *BgAChBP1* mit N-terminalem His-tag und TEV-Schnittstelle

BgAChBP1 wurde mit N-terminalem 6xHis-Tag und darauf folgender TEV-Schnittstelle in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und gefaltet. Nach der Faltung, wurden sie in den entsprechenden Puffer (20mM Tris, pH 7,5) umdialysiert und der Verdau durch die TEV-Protease über Nacht durchgeführt. Danach erfolgte eine weitere Dialyse der “geschnittenen” Proteine zu pH 8,0 (auch in 20mM Tris), um die Ergebnisse dieser Expression mit denen der vorherigen mit C-terminalem His-tag vergleichen zu können. In *Abb. 39* sind elektronenmikroskopische Aufnahmen von rekombinantem *BgAChBP1* vor und nach dem Verdau durch die TEV-Protease zu sehen.

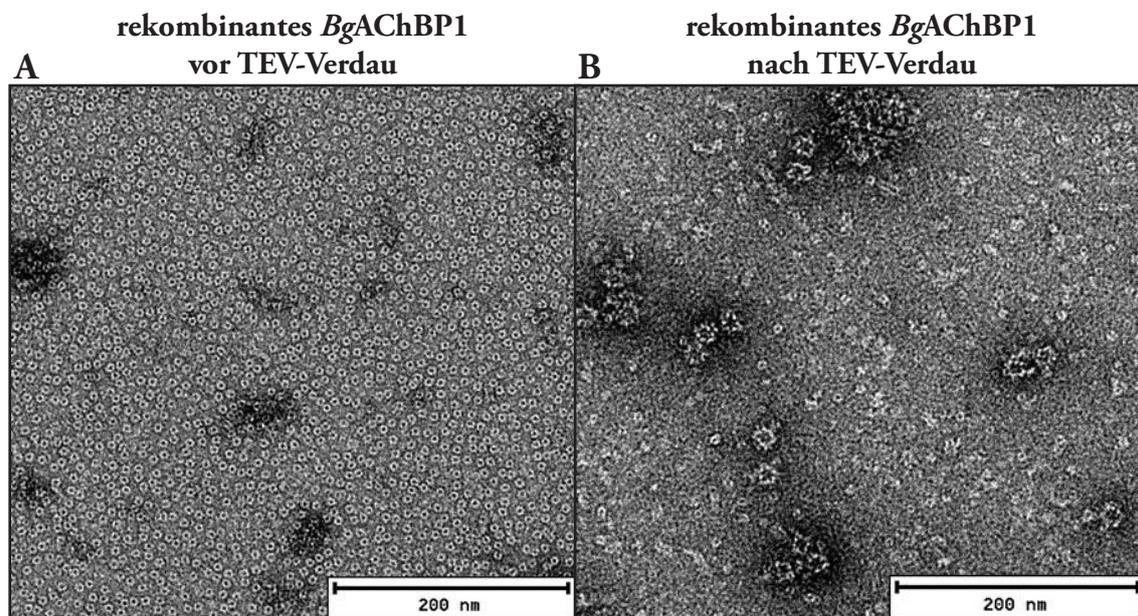


Abb. 39 Rekombinantes *BgAChBP1* mit N-terminalem His-tag und TEV-Schnittstelle vor und nach der Zugabe der TEV-Protease.

(A) Die Aufnahme zeigt das mit N-terminalem 6x His-Tag und TEV-Schnittstelle versehene *BgAChBP1* nach dem Refold. Es sind nur Pentamere Strukturen zu erkennen.

(B) Diese EM-Aufnahme zeigt das rekombinante *BgAChBP1* mit N-terminalem His-Tag und TEV-Schnittstelle nach dem TEV-Verdau und anschließender Dialyse. Es sind nach kurzer Assemblierungszeit vereinzelt Dodekeder zu sehen.

Vor der Abspaltung des N-terminalen His-tags zeigten sich ausschließlich Pentamere (*Abb. 39A*). Obwohl die Rückfaltung schon stattgefunden hatte, waren die Pentamere nicht in der Lage sich zu Dodekaedern zusammenzufinden. Das lag wohl daran, dass die entsprechenden N-terminal gelegenen Kontaktstellen durch den His-Tag blockiert waren. Diese Probe wurde dann umdialysiert und dem TEV-Verdau unterzogen. Nach dem Verdau war eine deutliche Dodekederbildung zu erkennen (*Abb. 39B*).

2.7 Whole mount *in-situ* Hybridisierung

Mit dieser Methode sollten adulte Tiere daraufhin untersucht werden, in welchen Organen von *B. glabrata* *BgAChBP1* und *BgAChBP2* exprimiert werden. Für die Negativkontrolle wurden ohne Zugabe der *BgAChBP1*- bzw. *BgAChBP2*-spezifischen DNA-Sonden hybridisiert.

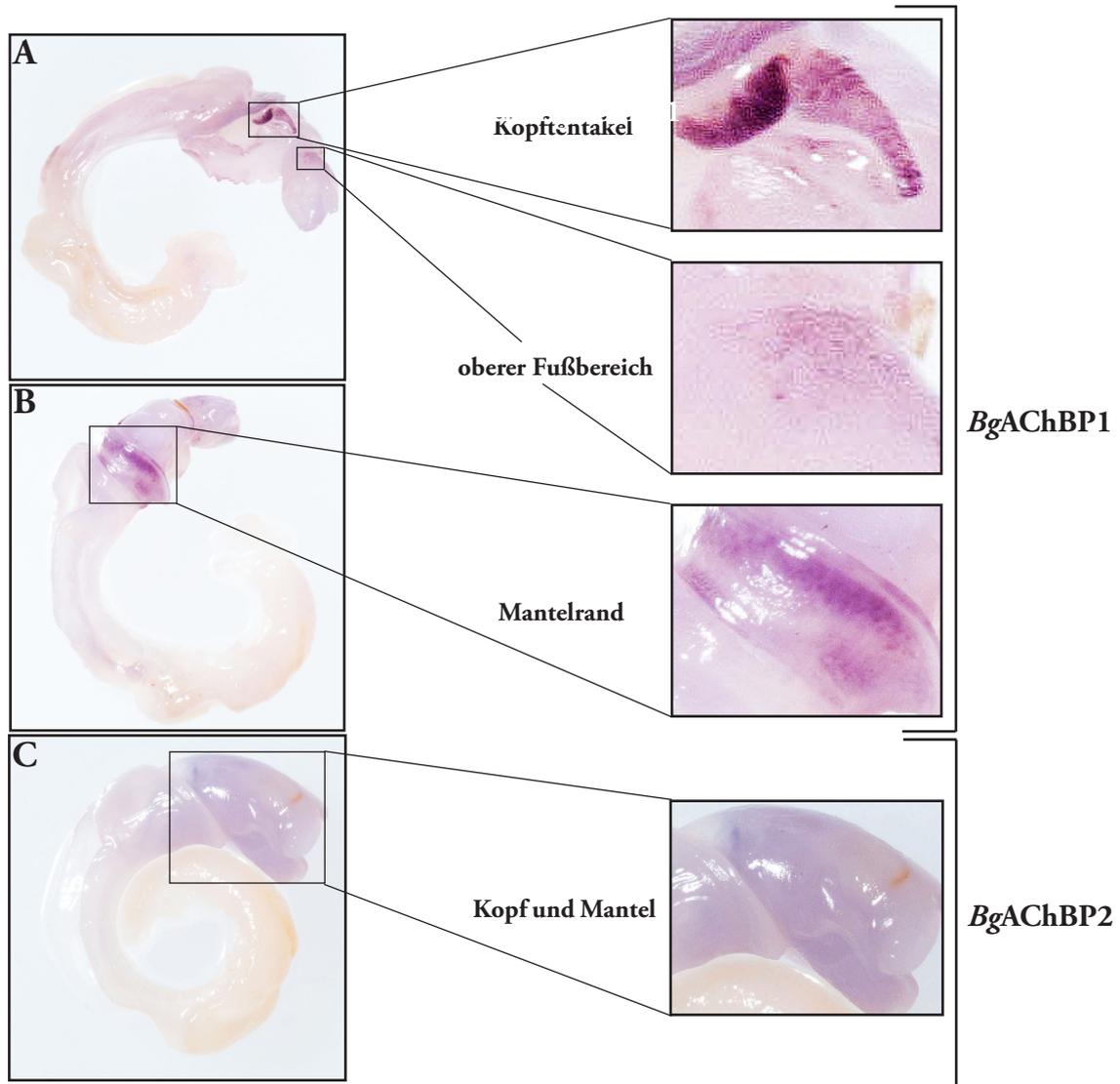


Abb. 40 Expression von *BgAChBP1* und *BgAChBP2* im adulten Tier.

Seitenansichten, der aus dem Haus entfernten Tiere ohne, welche mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden behandelt worden waren. (A) und (B), Inkubation mit einer *BgAChBP1*-Sonde, mit den Vergrößerungen auffällig detektierter Bereiche (rechts). (C) Inkubation mit einer *BgAChBP2*-Sonde.

Es wurden gewebespezifische Expressionsmuster der beiden Isoformen erkannt. Wie in *Abb. 40* zu sehen ist, wurde im adulten Tier im Kopf, Fuß und Mantel *BgAChBP1*-spezifische RNA detektiert. Besonders die Kopftentakel zeigten eine starke Färbung (siehe *Abb. 40A*). Aber auch der Mantelrand (siehe *Abb. 40B*) sowie ein lokaler Bereich des Fußgewebes waren stark angefärbt. Im Gegensatz dazu zeigte *BgAChBP2* ein mehr diffuses Expressionsmuster. Hier waren Kopf und Mantel angefärbt, jedoch war keine deutliche Pigmentierung einzelner Gewebe oder Organe zu erkennen (*Abb. 40C*).

D Diskussion

1 *BgHb*

Als Hauptprotein in der Hämolymphe des Tieres zu finden, welches Zwischenwirt des Bilharziose übertragenden Parasiten *Schistosoma mansoni* ist, steht die Aufklärung der Struktur und Funktion des *B. glabrata* Hämoglobins schon lange im Mittelpunkt der Forschung. Trotz dessen ist bis heute wenig bekannt über die Struktur dieses multimeren Hämoglobins. Viele niedermolekulare Invertebraten-Hämoglobine, unter anderem zwei intrazelluläre Muschel Hämoglobine, konnten in der Vergangenheit bereits erfolgreich in verschiedenen Zellsystemen exprimiert werden (Zafar et al., 1993; Kloek et al., 1993; Gambacurata et al., 1993; Summerford et al., 1995; Rosado-Ruiz et al., 2001; Collazo et al., 2004; Leon et al., 2004). Dagegen war die rekombinante Expression eines oligomeren, extrazellulären Hämoglobins bisher ohne Erfolg. Schon 2006 konnten die kompletten Untereinheiten zweier Isoformen des *B. glabrata* Hämoglobins in unserer Arbeitsgruppe kloniert und exprimiert werden (Lieb et al., 2006; Dissertation Dürr, 2008). Jedoch zeigten diese rekombinanten Konstrukte weder eine dem nativen ähnliche Struktur und Funktion. Daher sollten im Rahmen meiner Arbeit die Bedingungen zur Herstellung des *BgHb* in biologischer aktiver Form optimiert werden.

1.1 Sequenzanalyse der rekombinanten *BgHb1*- und *BgHb2*-Konstrukte

Die kompletten Sequenzen der Isoformen *BgHb1* und *BgHb2* lagen zu Beginn dieser Arbeit einkloniert in dem entsprechenden Eingangsvektor vor. Nachdem beide Konstrukte in den Expressionsvektor einkloniert worden waren, wurden die Sequenzen überprüft. Sie zeigten eine hohe Übereinstimmung mit den nativen Sequenzen. Auch die Glykosylierungsstellen sowie die für die Dimerisierung essentiellen Cysteine der plug-Domäne (Lieb et al., 2006), waren vorhanden. Im aktiven Zentrum zeigen die Domänen des *BgHb* eine Besonderheit. Durchweg vorhanden sind das proximale Histidin (F8), welches das Eisenatom an das Globin bindet, und zwei Phenylalanine, welche die prosthetische Gruppe stabilisieren. Eine Sequenzabweichung in allen Globin-Domänen des *BgHb* (Lieb et al., 2006), so auch bei dem Myoglobin von *B. glabrata* (Dewilde et al., 1998), ist der Austausch des distalen Histidins (E7) gegen ein Glutamin (*Abb. 41*).

```

BgHb1- a : EKFNAHCSDDEALKNDNEFVKOVKLIVGGLQSFIDNLENPGQLQATIERLASVHL
BgHb2- a : TKFNAECSSDALKNDAEFVKOVKLIKSGLNSFSNLNNPGQLQAIMERLAEVHL
BgHb1- b : TKFNARCSDDEALKTDAEFLKOVDAIIGGFETLINNLNDADLLLNRESLADEVHL
BgHb2- b : TKFNARESDDALKNAEFQKOVDVIIGGFETLINNLNDPALLQDRESLAEAHL
BgHb1- c : SKFNARCSDDNLRKDAEFVROVDLITGGESLVDNVNNPIFLQEALVRLADAHL
BgHb2- c : NKFNARCSDDNLKKDAEFRROVSLITGGESLINNLNNPDRLHDTFERLADAHL
BgHb1- d : TKFNAHSSDDEALRANNEFLROVDVIVGGLDSLINNVDNSDNFQAAIERLVDVHL
BgHb2- d : TKFNGHSSDDEALRKDTEFLKOVNITGGESLINNVNDADQLKAAIERLVEVHL
BgHb1- e : SKFDARKSEAELRNDAEFINOVNIVGGLDSILNNLDKPGQLQAAIERLADVHL
BgHb2- e : SKFNAFCSDEDLQKDAEFINORNNIRGLDSLINSLDKPGQLQKTENLADFHL
BgHb1- f : NKFDAKCSDAALQRDPEFLAOVDRIIGGVESLVNVNDDPVALKAAIDRLADAHL
BgHb2- f : SKFDANCPDSVLKENTEFLNOVDRIIGGESLVNTVNDPVALKAAIDKLADAHL
BgHb1- g : NKFNALCGDDALRADAEFVKOVERIAGGESLINNVDNQGLQAAIDRLVNAHL
BgHb2- g : TKFNGLCSDDDLRKDTEFIKOVNDIIAGGLVSLVNDIPGKLQAAIDRLVDVHL
BgHb1- h : TKFNAHCSDAALQDDEFRNOVRAIITRGESFVNVNNPAALQSSENLVDAHL
BgHb2- h : TKFNAFCSDDALRADQEFVNOVQRIITQGLSVDNVNNPAGLQSGERLVDAHL
BgHb1- i : TKFDAKCSDADLRRDPNFLKOVNNIINGVGDLVDSVNDPGKLQANERLTDVHL
BgHb2- i : TKFNARCSDNDLKRDAGFLKOVKKIIIGGLGSLVDSLNDPGQLQANERLAGVHL
BgHb1- j : TKFDANCADDALRADPEFQKOVNIVGGLKSFLDSVNDPIALQANEDRVAEAHL
BgHb2- j : TKFNANCPDDVLKADPEFLKOVDVIIIGGLKSFLDTVDDPIGLQTNEDRVAEAHL
BgHb1- k : TKFNANCPDDVLRNAEFLNOVNIIAGGESLVKNVNNPARFLDALERLSSAHL
BgHb2- k : TKFNANCPDDVLRNAEFLNOVNIIAGGESLVKNVNNPAGRLLDALERLSSAHL
BgHb1- l : TKFDATCSDEALRNDKEFRNOVNIVGGLELLINSVNEPGQLQANEKLVDDHL
BgHb2- l : TKFDATCSDNDNLKNDAEFIACSNRIIVGGLDSLVKSVNQPGELQANEKLVDVHL
BgHb1- nr : TKFNAYCPDSALRQDREFGAOVDRIITSGLESLVNNVNNPGQFQAAIERLSTLHK
BgHb2- nr : TKFNAFCPDVALVKDKGFIDOVNAIASGLESLVNNVNNPGQFQAAIERLSTLHK

```



Abb. 41 Ausschnitt aus einem Aminosäurealignment der 13 Häm-Domänen von *BgHb1* und *BgHb2*.

In dem Alignment sind hoch konservierte Bereiche schwarz hinterlegt (100%), weniger konservierte Bereiche grau (80%). Das in allen Globindomänen anstatt des üblichen distalen Histidins (E7) vorhandene Glutamin, sowie das durchweg konservierte proximale Histidin (F8) sind rot gekennzeichnet. Zur besseren Orientierung ist unter dem Alignment die vorhergesagte Sekundärstruktur der E- und F-Kette des Hämoglobins dargestellt. Die Aminosäure-Sequenzen beider Untereinheiten sind im Anhang F unter 7.1, bzw. 7.2 aufgeführt.

Dieses Histidin stabilisiert in Vertebraten-Hämoglobinen die gebundenen Sauerstoffmoleküle (Pesce et al., 2002). In den meisten anderen bisher analysierten Mollusken-Hämoglobinen und -Myoglobinen zeigt sich dieses distale Histidin hoch konserviert. Jedoch wurde die gleiche Mutation, der Austausch des distalen Histidins gegen ein Glutamin, auch bei den hochaffinen Hämoglobinen der Tiefseemuscheln *Calyptogena soyoae*, *Calyptogena kaikoi*, der Sulfid fixierenden Muschel *Lucina pectinata* und dem Nematoden *Ascaris suum* gefunden (Terwilliger & Terwilliger, 1983; Suzuki et al., 1989a; 1989b; 1999; Peterson et al., 1997; Kloek et al., 1993).

Bei humanem Hämoglobin wurde nachgewiesen, dass ein Glutamin an dieser Position zu einem Anstieg in der O₂-Affinität des Proteins führt (Nagai et al., 1987). *B. glabrata* ist in ihren aquatischen Lebensraum stark schwankenden Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt, möglicherweise könnte diese Substitution als evolutive Anpassung daran die Sauerstoffaffinität des BgHb noch weiter erhöht haben (Dewilde et al., 1998; Bugge & Weber, 1999; Weber & Vinogradov, 2001; Lieb et al., 2006).

Ein weiterer Sequenzaustausch, der sich nur in den Globindomänen von *B. glabrata* zeigt, ist in der B-Helix zu finden. Hier zeigt sich in Position B10 ein Valin. In anderen Invertebraten ist diese Stelle normalerweise durch eine größere hydrophobe Aminosäure besetzt. So zeigt sich bei den meisten Hämoglobin-Sequenzen hier ein Tyrosin. In *Ascaris suum* und *Lucina pectinata* ist dies durch ein Leucin ersetzt (Gibson et al., 1965; De Baere et al., 1994; Peterson et al., 1997; Dewilde et al., 1998). Hier konnte gezeigt werden, dass der Austausch dieser Aminosäure in der B-Helix Auswirkungen auf die Stabilität der Ligandenbindung und somit auf die O₂-Affinität hat (Peterson et al., 1997). Das Valin der *B. glabrata* Globin-Domänen zeigt in dieser Position auch zu der aktiven Seite der Proteine, ist aber nicht in der Lage, wie das Leucin in *Ascaris* eine Bindung zum Sauerstoff auszubilden.

1.2 Rekombinante Expression

Für die erfolgreiche Expression löslicher *BgHb*-Konstrukte in Insektenzellen war die Zugabe von Aminolävulinsäure zu dem Expressionsmedium von zentraler Bedeutung. Dabei handelt es sich um eine Häm-Vorstufe, aus welcher nach zwei Kondensationsreaktionen ein lineares Tetrapyrrol entsteht, welches dann wiederum zu einem Porphyrinring zyklisiert. Nach Modifikation der Seitenketten und Komplexierung mit dem Eisenatom entsteht so das Häm, die prosthetische Gruppe des Hämoglobins (Stryer, 1997).

Dass diese Häm-Vorstufe der limitierende Faktor der Häm-Synthese ist, konnte für die Expression verschiedener Hämoglobine gezeigt werden (Kloek et al., 1993; Summerford et al., 1995; Collazo et al., 2004; Leon et al., 2004; Hino & Ishida, 1973; Philipp-Dormston & Doss, 1973). Das trifft auch für *BgHb* zu (Dürr, 2008). Für eine korrekte Faltung und somit Stabilität des Hämoglobins ist die Ausbildung eines aktiven Zentrums elementar. Die dafür erforderliche Menge an Häm muss bei der Überproduktion einer rekombinanten Expression extern hinzugefügt werden, da weder *E. coli*-Zellen noch Insektenzellen in der Lage sind, die benötigte Menge zu produzieren (Verderber et al., 1997).

1.3 Proteinbiochemische Expressionsanalyse

Nach einer Expressionszeit von ca. 2-3 Tagen wurde der Insektenzellüberstand mit den darin gelöst vorliegendem rekombinanten Protein abgenommen, und über eine Nickelmatrix aufgereinigt. Nach der Auftrennung der rekombinanten Produkte via SDS-PAGE war auffällig, dass sie eine apparente Molekülmasse von ca. 180kDa aufwiesen obwohl aus der Aminosäuresequenz ca. 240kDa errechnet wird. Dieses irreguläre Wanderverhalten ist auch beim nativen *BgHb* zu beobachten (Lieb et al., 2006). Die exprimierte Proteinmenge aus dem Insektenzellüberstand an löslichem *BgHb2* war für genauere Analysen nicht ausreichend, weswegen sich diese Diskussion auf *BgHb1* konzentriert. Jedoch konnten in unserer Arbeitsgruppe einige Segmente von *BgHb2* erfolgreich in Bakterienzellen exprimiert werden (Dürr, 2008; Sarraf-Zadeh, 2007).

Der Insektenzellüberstand der Expression von *BgHb1* wies schon kurz nach Transfektion und Zugabe von Aminolävulinsäure eine rote Farbe auf, was auf eine erfolgreiche Expression löslicher Konstrukte schließen ließ. Unter nicht reduzierenden Bedingungen ließ sich die Dimerisierung der exprimierten *BgHb1*-Untereinheiten mittels SDS-PAGE nachweisen. Dafür verantwortlich zeigt sich die plug-Domäne, eine nicht Häm-Domäne, in welcher sich drei Cysteine befinden (Lieb et al., 2006). Der Anteil an dimerisiertem rekombinanten Material lag bei ca. 40%, der Rest zeigte die typische Monomerbande bei 180kDa und war somit nicht in der Lage zu dimerisieren. Durch die Sezernierung der rekombinanten Produkte in den Überstand, in welchem oxidierende Bedingungen vorherrschen, konnte zwar die

Dimerisierung erreicht werden, jedoch wurde durch die in der rekombinanten Expression hervorgerufene Überexpression die Kapazität überschritten Disulfidbrücken auszubilden.

Der immunologische Vergleich des rekombinanten *BgHb1* mit dem nativen *BgHb* *via* Tandem-Immunelektrophorese ergab ein komplettes Verschmelzen der beiden Präzipitate. Zu erwarten gewesen wäre jedoch nur eine teilweise Verschmelzung, da es sich bei dem nativen Protein wahrscheinlich um ein Gemisch der Isoformen handelt.

Diese hohe Strukturidentität zwischen dem rekombinanten und dem nativen Protein lässt darauf schließen, dass der gegen die Hämolympheproteine von *B. glabrata* gerichtete polyklonale Antikörper bei den beiden *BgHb*-Isoformen keine Strukturunterschiede erkannte. Möglicherweise liegt in der Hämolymphe von *B. glabrata* auch nur *BgHb1* vor. Die erfolgreiche Dimerisierung des rekombinanten Materials des *BgHb1* wies darauf hin, dass diese Untereinheit alleine im Stande sein könnte, die Quartärstruktur zu bilden. Um die Struktur des rekombinanten *BgHb1* mit dem nativen zu vergleichen wurden elektronenmikroskopische Analysen angefertigt (siehe 1.4).

1.4 Quartärstruktur des rekombinanten *BgHb1*

Das aus dem Insektenzellüberstand aufgereinigte und aufkonzentrierte Material, für welches via SDS-PAGE die Dimerisierung nachgewiesen werden konnte, wurde elektronenmikroskopisch analysiert. Die Aufnahmen des rekombinanten *BgHb1* zeigten zwei charakteristische Ansichten, die sich in Größe und Struktur mit dem nativen Protein vergleichen ließen (siehe *Abb. 16*). Somit wurde aufgeklärt, dass das rekombinante *BgHb1*, welches in dimerisierter Form vorlag (480kDa) in der Lage ist, 20nm große Partikel zu bilden die der Quartärstruktur des nativen *BgHb* ähneln.

Da die komplette cDNA-Sequenz von zwei Isoformen des *BgHb* identifiziert wurde (Lieb et al., 2006), stellte sich die Frage, ob diese Untereinheiten beim nativen *BgHb* zusammen in einem Heterooligomer vorliegen, oder sie klar getrennt voneinander Homooligomere bilden. Als Heterooligomer, wie es für viele Arthropoden Hämocyane nachgewiesen werden konnte (Review: Markl & Decker, 1992; Beispiel: Markl et al., 2009), sollte ein Untereinheitentyp alleine nicht im Stande sein, eine dem nativen Protein ähnliche Quartärstruktur zu bilden. Ein anderer Fall zeigt sich bei den Hämocyaninen von Mollusken, diese liegen als homooligomere Strukturen vor (Review: Van Holde & Miller, 1995; Beispiel: Gatsogiannis et al., 2009). Unser Ergebnis am Hämoglobin von *B. glabrata* zeigt, dass die *BgHb*-Untereinheit einer Isoform allein in der Lage ist, die Quartärstruktur des oligomeren Moleküls zu bilden, was aber das Vorhandensein von heterooligomerem *BgHb* in der Schnecke nicht ausschließt. Einige Mollusken-Hämoglobine konnten bereits rekombinant exprimiert werden, jedoch handelt es sich hierbei durchweg um intrazellulär vorkommende, niedermolekulare Hämoglobine mit einer einzigen Häm-Domäne (Gambacurata et al., 1993; Summerford et al., 1995; Rosado-Ruiz et al., 2001; Collazo et al., 2004; Leon et al., 2004).

Das extrazelluläre Planorbiden-Hämoglobin stellt durch die Größe der Polypeptidkette von 240kDa eine Herausforderung dar. Für weitere elektronenmikroskopische Analysen wäre eine größere Menge der rekombinanten *BgHb*-Moleküle in hoher Reinheit wünschenswert. Versuche größere rekombinante dimerisierte Partikel von kleineren durch Ultrazentrifugation, oder Gelfiltration zu trennen scheiterten. Zwar führte der Größenausschluss via Gelfiltration zu einem höheren Reinheitsgrad des monomeren Anteils, aber der Anteil an dimersierten *BgHb1* konnte dadurch nicht erhöht werden.

1.5 Stabilisierung des nativen *BgHb*

Zur Quartärstruktur des *BgHb* existieren mehrere Modelle, von denen bis heute keines bestätigt werden konnte. Eine zuerst vorgeschlagenen pentamere Ringstruktur (Arndt & Santoro, 1998) konnte durch Untersuchungen des *BgHb* durch Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) ausgeschlossen werden (Arndt et al., 2003). Diese Daten unterstützten für das native *BgHb*-Molekül ein tetrameres Modell. Bei diesem sollten acht Polypeptidketten mit 180kDa zu einer 4x2meren Quartärstruktur assoziieren (1,75MDa/D2-Symmetrie). Im Gegensatz dazu wurden von Lieb et al. (2006) eine erste 3D-Rekonstruktion anhand elektronenmikroskopischer Bilder angefertigt, welche darauf schließen ließ, dass es sich bei der Quartärstruktur des Proteins um ein 3x2mer handelt, also einem aus drei Untereinheiten-Dimeren zusammengesetzten Molekül, wobei die Polypeptidkette nun mit 240kDa festgelegt werden konnte (1,4MDa/D3-Symmetrie). Basierend auf diesem Modell sollten drei *BgHb*-Untereinheiten-Dimere (je 480kDa) zu einer Quartärstruktur mit 78 Häm-Domänen und 6 plug-Domänen assoziieren.

In meiner Arbeit zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen des rekombinanten *BgHb1* zwei für das native *BgHb* charakteristische Ansichten (*Abb. 16*). Jedoch war es durch die strukturelle Instabilität des nativen *BgHb* bisher nicht möglich, eine 3D-Rekonstruktion in hoher Auflösung zu erstellen. Um für die 3D-Elektronenmikroskopie eine Verbesserung in der Stabilität zu erreichen, wurde der Komplex Thermofluormessungen unterzogen (Niesen et al., 2007; siehe auch Material und Methoden B 11, Ergebnis C 1.5). Das Ergebnis zeigte, dass die *BgHb*-Moleküle in einem Imidazol enthaltenen Puffer wesentlich stabiler in ihrer Quartärstruktur vorlagen (siehe *Abb. 17, 18 und 19*). Diese stabilisierende Wirkung des Imidazolpuffers scheint sich durch Betrachtung des Sauerstoffbindungszentrums des Hämoglobins zu erklären (*Abb. 42*). Das zentrale Eisenatom ist in der Lage sechs Ligandenverbindungen einzugehen. Vier Bindungen entstehen dabei mit den Stickstoffmolekülen des Porphyrinrings. Über seine fünfte Bindungsstelle ist das Eisenatom an das proximale Histidin (F8) des Globins gebunden, während die sechste Bindungsstelle von gasförmigen Liganden, insbesondere Sauerstoff, besetzt werden kann. Da das Imidazol des proximalen Histidins den Proteinteil mit der Häm-Gruppe koordiniert, könnte der Imidazolpuffer darauf einen stabilisierenden Effekt haben (*Abb. 42A*).

Zudem wurde die komplette Hämolymphe von *B. glabrata* von Dr. Ashwin Chari auf ihre niedermolekularen Bestandteile hin untersucht. Dabei fand sich unter anderem freies Imidazol (unpubliziert). Wie bereits erwähnt (1.1), zeigt sich in der Sequenz aller *B. glabrata* Globindomänen ein Valin in Position 10 der B-Helix. Dieses ist durch seine geringe Größe nicht in der Lage, einen stabilisierenden Effekt auf das aktive Zentrum auszuüben. Ein freies Imidazol könnte an dieser Stelle überbrückend auf Struktur und Stabilität einwirken (Abb. 42B).

In diesem Zusammenhang wäre es auch von Interesse in diesem stabilisierenden Puffer die Sauerstoffbindungseigenschaften des *BgHb* erneut zu überprüfen, da es im Gegensatz zu dem Hämoglobin von *L. terrestris* eine geringe Kooperativität zeigt (siehe Tab. 1). Untersuchungen an anderen Hämoglobinen deuten darauf hin, dass die charakteristische Zusammenlagerung der Globinketten einen entscheidenden Beitrag zur Kooperativität leistet (Krebs et al., 1996; Royer et al., 2001; Ackers et al., 2002; Kavanaugh et al., 2005).

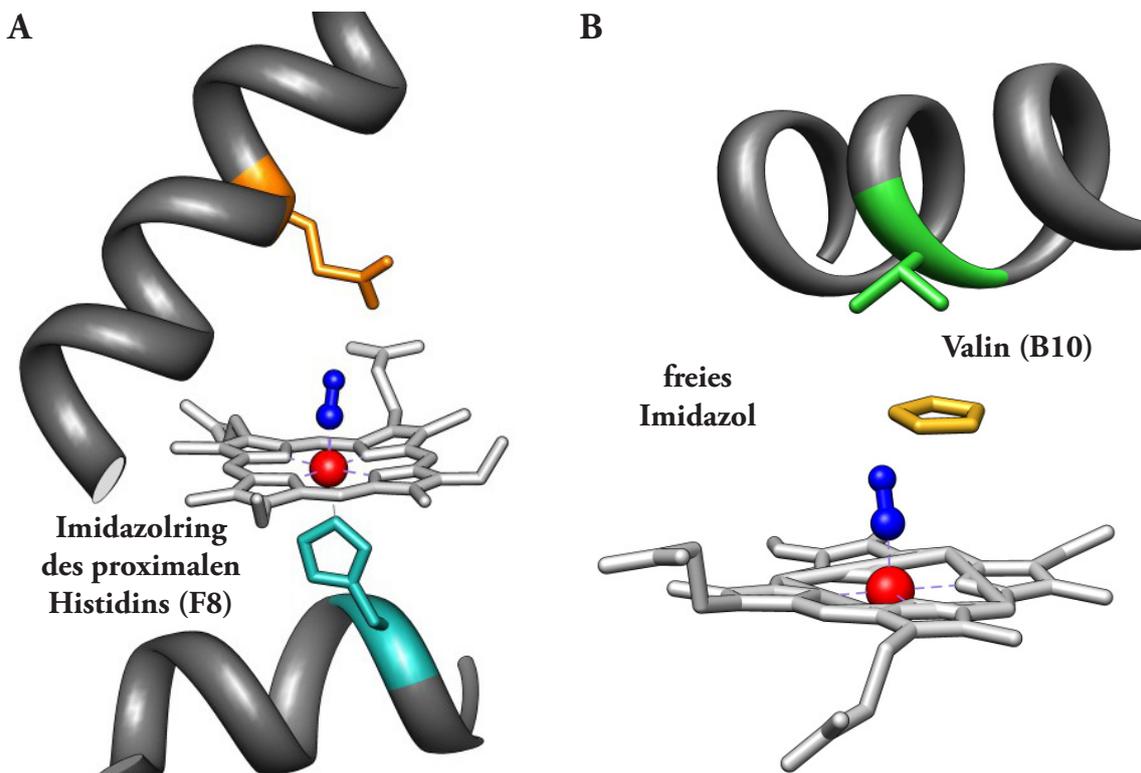


Abb. 42 Aktives Zentrum einer Domäne des *BgHb* (*BgHb1-a*) und des *BgMb*, mit hypothetischem Imidazolring.

(A) Aktives Zentrum von *BgHb1-a*. Das zentrale Eisenatom (rot) bindet die Liganden (hier CO, in blau) und ist über den Imidazolring des proximalen Histidins (grün) mit dem Globin verbunden.

(B) Aktives Zentrum von *BgMb*. Ein freies Imidazol (orange) könnte überbrückend einen stabilisierenden Effekt auf das aktive Zentrum haben, da sich in allen *B. glabrata* Globindomänen in der B-Helix an Position B10 ein Valin (grün) zeigt. Modelliert mit PDB-ID 1ASH.

1.6 Funktionelle Analyse zur Sauerstoffbindung des rekombinanten *BgHb1*

Zusätzlich zu den proteinbiochemischen und strukturellen Analysen der rekombinanten *BgHb1*-Moleküle war auch die Ermittlung der Sauerstoffbindungseigenschaften von Interesse. Bei Analyse der Absorptionsspektren des rekombinanten *BgHb1* fiel zunächst auf, dass das für *Oxy*-Hämoglobin charakteristische Maxima von 414nm auf 409nm verschoben war. Diese "Linksverschiebung" des Gipfels deutete auf eine Oxidierung der aktiven Zentren hin. In diesem Fall liegt das zentrale Eisen-Ion im Fe^{3+} -Zustand vor. Im Falle von Häm-Proteinen beeinflusst dieser Zustand entscheidend, welche Liganden an das zentrale Eisenatom gebunden werden. Während CN^- und OH^- Liganden der oxidierten Fe^{3+} -Form sind, binden O_2 , CO und NO an Fe^{2+} (Kiger & Marden, 2001).

Somit ist Hämoglobin, dessen zentrales Eisen-Ion zu Fe^{3+} oxidiert ist (Methämoglobin) nicht in der Lage, Sauerstoff zu binden oder zu transportieren (Shikama & Matsuoka, 2004). Zudem führt die Oxidation des Eisen-Ions zunächst zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxidationen und dann Wasserstoffperoxid), welche für den Organismus schädlich sein können (Rifkind et al., 1991; Hsia & Everse, 1996). Obwohl in Globinen das zentrale Eisen-Ion schwer zugänglich ist, kann diese Oxidation bei spontanem Kontakt mit Sauerstoff erfolgen. Um dies zu vermeiden, besitzen *in vivo* humane Erythrozyten die Methämoglobin-Reduktase, welche entstandenes Fe^{3+} innerhalb weniger Minuten zu Fe^{2+} reduziert (Kuma, 1981). Da das rekombinante *BgHb1* offenbar in dieser Met-Hb-Form vorlag, musste auch hier ein Reduktionssystem eingesetzt werden. Es beruhte auf der Reduktion des Fe^{3+} mittels Ferredoxin und NADPH (Hyashi et al., 1973).

Nach Überführung der rekombinanten *BgHb1*-Moleküle in den reduzierten Zustand (Fe^{2+}), wurde ihre reversible Sauerstoffbindung überprüft (siehe *Abb. 20*). Die Zugabe von Natriumdithionit ergab hierbei eine irreversible Deoxygenierung des rekombinanten *BgHb1*, was durch die Messung eines Absorptionsspektrums bestätigt wurde. Danach waren die Moleküle nicht mehr in der Lage Sauerstoff zu binden, da das Dithionit eine Denaturierung des Hämoglobins bewirkt (Dalziel & O'Brien, 1957). Aufgrund der geringen Mengen an vollassemblierten, rekombinanten *BgHb1* konnten keine Sauerstoffbindungskurven zur Überprüfung der Affinität und Kooperativität gemessen werden. Dafür wurden in unserer Arbeitsgruppe die Sauerstoffaffinität des rekombinanten *BgHb1*-Monomers ermittelt, sowie die einer Domäne (*BgHb2-a*) und zweier Domänen-Segmente des *BgHb2* (*BgHb2-pa*; *BgHb2-p* bis *BgHb2-g*) (Dürr, 2008; Sarraf-Zadeh, 2007). Dabei zeigten sich für alle rekombinanten Proteine relativ hohe O_2 -Affinitäten, charakterisiert durch einen geringen Halbsättigungsdruck (P_{50}). Alle P_{50} -Werte lagen bei einem pH-Wert von 7,8 in einem Bereich zwischen 6-7 Torr.

Damit sind diese für die rekombinanten *BgHb*-Konstrukte gemessenen O_2 -Affinitäten vergleichbar zu dem des nativen *BgHb* (Bugge & Weber, 1999). Allerdings konnte bei den Messungen der rekombinanten *BgHb*-Moleküle keine pH-Abhängigkeit der Sauerstoffaffinität festgestellt werden.

Dagegen zeigen Messungen des nativen *BgHb* von Bugge & Weber (1999) eine deutliche pH-Abhängigkeit des P_{50} -Wertes. Hier steigt mit zunehmendem pH-Wert auch die Affinität zu Sauerstoff. Dieser Bohr-Effekt zeigt sich auch in der Kooperativität. Mit einem maximalen Hill-Koeffizient von $n_{50} = 2$ weist das native *BgHb* zwar eine verhältnismäßig geringe Kooperativität auf, aber auch dieser Faktor variiert pH-abhängig. Bei steigendem pH-Wert ist auch hier ein Anstieg in der Kooperativität zu beobachten.

Der Umstand, dass beide Maxima die (O_2 -Affinität und Kooperativität) im leicht basischen (physiologischen) Bereich liegen, deutet darauf hin, dass dadurch der Sauerstofftransport *in vivo* unterstützt wird (Van Aardt & Naude, 1990; Bugge & Weber, 1999). Diese pH-Abhängigkeit in Sauerstoffaffinität und Kooperativität konnte auch für die Hämoglobine der Planorbiden *Helisoma trivolis* (Terwilliger et al., 1976) und *Planorbis corneus* (Zaaijer & Wolvekamp, 1958) beobachtet werden.

Die rekombinanten *BgHb*2-Fragmente, und sogar das aus 13 Häm-Domänen aufgebaute *BgHb*1-Monomer zeigten in den Messungen keine Kooperativität (Dürr, 2008; Sarrafzadeh, 2007; siehe auch Moeller et al., 2011). Offenbar findet zwischen den Häm-Domänen innerhalb einer Untereinheit keine allosterische Wechselwirkung statt, und für die Kooperativität ist die Wechselwirkung mehrerer Untereinheiten erforderlich. Dabei bleibt offen, ob schon eine Dimerisierung zweier Untereinheiten ausreicht um Kooperativität zu erzeugen. Messungen am extrazellulären *Lumbricus terrestris*-Hämoglobins ergaben, dass ein einzelnes Dodekamer (213kDa) nur 50% der Kooperativität des für die Gesamtstruktur (12 Dodekamere, 3,5MDa) gemessenen Wertes erreicht, während sich die P_{50} -Werte der Messungen kaum unterscheiden (Krebs et al., 1996). Ob Ähnliches auch für *BgHb* gilt, könnte durch Messungen an dimerisiertem rekombinanten Material festgestellt werden. Obwohl es in dieser Arbeit gelang *BgHb*1-Dimere zu exprimieren, steht solches Material momentan noch nicht in gereinigter Form zur Verfügung.

1.7 Vergleich der funktionellen Eigenschaften des BgHb mit anderen Hämoglobinen

Invertebraten-Hämoglobine zeigen, angepasst an den Lebensraum des Tieres, eine hohe Diversität in Struktur und Funktion. Die funktionellen Eigenschaften des BgHb sind im Detail von Bugge & Weber (1999) untersucht worden. Dabei zeigten sich Abweichungen in den Sauerstoffbindungseigenschaften zu anderen extrazellulären Invertebraten-Hämoglobinen. Ein Vergleich der Messdaten des BgHb, anderer extrazellulärer Hämoglobine und dem gut untersuchten humanen Hämoglobin ist in *Tab. 1* aufgeführt.

Als offensichtliche Anpassung an die enormen Schwankungen der Temperatur und der Sauerstoffkonzentration ihrer Umgebung zeigt das Hämoglobin von *B. glabrata* eine hohe Sauerstoffaffinität (Bugge & Weber, 1999). Eine weitere Erhöhung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins sowie Myoglobins von *B. glabrata* lässt sich beim Absenken der Temperatur von 25°C auf 15°C, oder gar 5°C beobachten (Dewilde et al., 1998; Bugge & Weber, 1999).

Spezies	Temperatur °C	pH-Wert	P ₅₀ (Torr)	n ₅₀	pH abhängiger n ₅₀	Referenz
<i>Biomphalaria glabrata</i>	25	7,8	6,1	2,0	+	Bugge & Weber, 1999
<i>Planorbis corneus</i>	21,3	7,3	5,0	2,3	+	Wood & Mosby, 1975
<i>Lumbricus terrestris</i>	25	7,5	11,5	4,5 - 4,9	+	Krebs et al., 1996
<i>Arenicola marina</i>	15	7,4	2,6	2,5	+	Rousselot et al., 2006
<i>Homo sapiens</i>	37	7,4	26 - 30	2,7	-	Antonini & Brunori, 1970

Tab. 1 Vergleich der Sauerstoffaffinitäten und Kooperativitäten verschiedener Globine.

Aufgelistet sind die Sauerstoffbindungseigenschaften der Planorbiden *B. glabrata*, *P. corneus*, die der Anneliden *L. terrestris* und *A. marina*, sowie im Vergleich die des humanen Hämoglobins.

Ähnliche Sauerstoffbindungseigenschaften lassen sich auch bei anderen Invertebraten-Hämoglobinen, beispielsweise bei den Anneliden *Arenicola marina* und *Lumbricus terrestris* finden. All diese extrazellulären großen Hämoglobine weisen im Vergleich zu dem humanen Hämoglobin eine hohe Sauerstoffaffinität auf (siehe *Tab. 1*). Als ektotherme Tiere ist ihnen die Temperaturabhängigkeit der Sauerstoffaffinität gemein. Mit der Temperatur steigt auch der Stoffwechsel und die Sauerstoffaffinität verringert sich, da dadurch die Sauerstoffabgabe an die Gewebe erleichtert wird. Da dieser Prozess aber gleichzeitig die effiziente Sauerstoffaufnahme in Gefahr bringt, gibt es auch hier je nach Lebensraum Anpassungen. Beispielsweise zeigt das Hämoglobin des in der Gezeitenzone lebenden Wattwurms *A. marina* einen weniger ausgeprägten Temperatureffekt, dafür aber einen wesentlich höheren Bohr-Effekt, im Vergleich zu dem Hämoglobin des in tieferen Wasser lebenden Wattwurms *Abarenicola clapedii* (Weber, 1970).

Im Gegensatz zu der hohen Sauerstoffaffinität des *BgHb* steht die geringe Kooperativität des Proteins. Andere Invertebraten-Hämoglobine, wie das von *L. terrestris*, weisen mit einem Hill-Koeffizienten zwischen 4,5 und 4,9 (pH 7,5) eine wesentlich höhere Kooperativität auf als die Planorbiden-Hämoglobine. Andererseits konnte für beide Planorbiden-Hämoglobine, gleich den anderen extrazellulären Hämoglobinen, ein deutlicherer Bohr-Effekt beobachtet werden. Während bei Säuger-Hämoglobinen lediglich die Sauerstoffaffinität durch den pH-Wert reguliert wird (Antonini & Brunori, 1970), konnte für die extrazellulären Planorbiden- und Anneliden-Hämoglobine zudem bei steigendem pH-Wert auch eine Zunahme in der Kooperativität beobachtet werden (Zaaijer & Wolvekamp, 1958; Terwilliger et al., 1976; Bugge & Weber, 1999; Krebs et al., 1996; Rousselot et al., 2006).

Gleich den Vertebraten-Hämoglobinen zeigen auch die großen extrazellulären Invertebraten-Hämoglobine heterotrope Wechselwirkungen. Dabei wird die Sauerstoffaffinität des Vertebraten-Hämoglobins durch das Binden anorganischer und organischer Anionen gesenkt, während die Sauerstoffaffinität der multimeren extrazellulären Anneliden-Hämoglobine sowie des *B. glabrata* Hämoglobins durch anorganische Kationen oder Protonen gesteigert wird (Everaarts & Weber, 1974; Imai & Yoshikawa, 1985; Weber, 1981; Fushitani et al., 1986; Numoto et al., 2008; Bugge & Weber, 1999). Nach Bugge und Weber (1999) unterscheidet sich jedoch der Regulationsmechanismus. Bei den Anneliden-Hämoglobinen binden Kationen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) und Protonen bevorzugt an den für Liganden hochaffinen R-Zustand und steigern durch Erhöhung des K_R -Wertes (Sauerstoffassoziationskonstante von Hb in hochaffinen R-Zustand) Sauerstoffaffinität und Kooperativität (Fushitani et al., 1986; Tsuneshige et al., 1989; Weber, 1981; Numoto et al., 2008).

In *BgHb* führt die Bindung von Ca^{2+} -Ionen zu einer Erhöhung der Sauerstoffaffinität des deoxy-(T)-Zustandes, wodurch dessen Oxygenierung gefördert wird, wohingegen Protonen an den R-Zustand binden (Bugge & Weber, 1999). Die Daten von Bugge & Weber (1999) deuten darauf hin, dass wie bei den Anneliden-Hämoglobinen die Konzentration

der Protonen die Sauerstoffaffinität des oxygenierten *BgHb* beeinflussen, während die Affinität des Deoxyhämoglobins sich nur bei sehr hohen, die physiologischen Bedingungen überschreitenden Bedingungen ändert. Dies impliziert, dass die Protonen spät im Oxygenierungsprozess gebunden werden, und dass der Bohr-Effekt hier abhängig von dem pH-Wert und der Sauerstoffsättigung des Proteins ist. Im Gegensatz zu dem Vertebraten-Hämoglobin bei welchem ein Anstieg des pH die Sauerstoffaffinität sinken lässt, begünstigt hier eine Erhöhung des pH-Wertes die Sauerstoffaufnahme (Bugge & Weber, 1999). Der Grund, warum das *BgHb* im Gegensatz zu dem Hämoglobin von *Lumbricus terrestris* eine geringe Kooperativität zeigt, bleibt fraglich. Auch der Mechanismus der Kooperativität in dem gesamten *BgHb*-Molekül ist noch ungeklärt. Jedoch zeigte sich die komplette Oligomerisierung des aus 12 Dodekameran aufgebauten *L. terrestris* Hämoglobins für essentiell. Hier wies ein einzelnes Dodekamer nur die Hälfte an Kooperativität des Gesamtmoleküls auf (Krebs et al., 1996).

2 BgAChBP

Acetylcholin-Bindeproteine sind wasserlösliche Homologe der extrazellulären Ligandenbindedomäne der gut untersuchten nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR). Die Entdeckung und Strukturaufklärung eines AChBP in der Spitzschlamm Schnecke *Lymnea stagnalis* (Smit et al., 2001; Brejc et al., 2001) stimulierte den gesamten Forschungsbereich. Bis heute konnte die Existenz mehrerer AChBP in Mollusken, einem Anneliden und in dem Blutegel *Haementeria ghilianii* nachgewiesen werden (Hansen et al., 2004; Celie et al., 2005; Huang et al., 2009; McCormack et al., 2010; Salgueiro et al., 1999). Mehrere hoch aufgelöste Kristallstrukturen des AChBP sind erhältlich und geben einen Einblick in strukturelle sowie funktionelle Aspekte der Ligandenbindung der gesamten Rezeptorenfamilie. Da diese außer endogenen Liganden auch diverse andere Substanzen binden, primäre Ziele vieler Pharmazeutika darstellen und in Verbindung mit einer Reihe von Krankheiten gebracht werden, ist das AChBP als gut zugängliches Homolog der Ligandenbindedomäne von besonderer Interesse. In meiner Arbeit wurden Sequenz-, Gen-, und Quartärstruktur zweier Isoformen des AChBP von *B. glabrata* aufgeklärt und erfolgreich exprimiert (*BgAChBP1*, *BgAChBP2*). In Hinsicht darauf, dass es sich bei der Struktur der bisher analysierten AChBP um Homo-, oder Dipentamere handelt, stellt die Assemblierung von 12 Pentameren zu einer Viruspartikel ähnlichen Quartärstruktur des *BgAChBP* eine Besonderheit dar.

2.1 Sequenzanalyse

Durch Datenbankrecherchen mit den aus der Massenspektrometrie erhaltenen Fragmenten konnten letztlich die Sequenzen zweier Isoformen des Rosettenproteins gefunden werden, welche für jeweils 205 Aminosäuren kodieren. Ein Protein Blast mit diesen Sequenzen ergab eine nahe Verwandtschaft zu dem Acetylcholin-Bindeprotein von *Lymnea stagnalis* (Smit et al., 2001; Brejc et al., 2001). Als zwei Isoformen des Acetylcholin-Bindeproteins in *B. glabrata* identifiziert (*BgAChBP1*, *BgAChBP2*), konnten die Sequenzen analysiert und mit denen anderer AChBP verglichen werden. In einem Alignment der *BgAChBP* mit den bisher bekannten Mollusken AChBP, dem *CtAChBP* (*Capitella teleta*) und einer Ligandenbindedomäne des humanen nAChR ($\alpha 7$ -Untereinheit) sind einige Sequenzähnlichkeiten zu finden (*Abb. 43*). In allen Sequenzen zeigen sich zwei hochkonservierte interne Disulfidbrücken (C137-C151; C203-C204 im Alignment *Abb. 43*). Eine davon (C137-C151) erzeugt den für die Rezeptoren-Familie charakteristischen, namengebenden Cys-Loop. Bei den membrangebundenen nikotinischen Rezeptoren hat dieser einen hydrophoben Charakter und stellt die Verbindung zwischen der extrazellulären Ligandenbindedomäne und der Transmembrandomäne her (Kash et al., 2003; Unwin et al., 2002). Alle AChBP alignieren sich nur mit der N-terminalen Liganden bindenden Domäne des Rezeptors.

Da die Transmembrandomäne hier fehlt, hat der Cys-Loop in den AChBP einen hydrophilen Charakter (Hansen et al., 2004).

Abweichend von den Sequenzen der anderen AChBP zeigt *BgAChBP1* eine dritte Disulfidbrücke (C20-C73, siehe Alignment *Abb. 43*). Diese könnte an dieser Position eine zusätzlich stabilisierende Funktion auf die Quartärstruktur des Proteins haben.

Dagegen zeigt *BgAChBP2* ein einzelnes Cystein (C81). An dieser Stelle ungewöhnlich, könnte dieses ungepaarte Cystein eine Disulfidbrücke zwischen zwei Untereinheiten ausbilden. Durch die rekombinante Expression war es möglich die Isoformen getrennt voneinander zu exprimieren. Für *BgAChBP2* konnte die Dimerisierung proteinbiochemisch nachgewiesen werden (siehe *Abb. 34*). Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte sich auf dem Gel eine Bande in der Größe eines Dimers (50kDa). Tatsächlich sind auch auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen des rekombinanten *BgAChBP2* vereinzelt Dipentamere zu erkennen (*Abb. 36*). In allen bisher bekannten AChBP ist die pentamere Quartärstruktur homolog, AChBP als Dekamer ist möglicherweise auch bei der Posthornschncke *Bulinus truncatus* vorhanden, welche wie *B. glabrata* zur Familie der Planorbiden gehört (Celie et al., 2005). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich die *BtAChBP*-Pentamere mit ihrer N-terminalen Seite zusammenlagern könnten. Ein Arginin (R9) und ein Glutamat (E19) in der Proteinsequenz von *B. truncatus* wären in der Lage zehn Salzbrücken auszubilden die diese Struktur unterstützen würden (Celie et al., 2005). In der Sequenz beider *BgAChBP* sind ebenfalls mehrere Möglichkeiten für intermolekulare Salzbrücken gegeben (z.B. in *BgAChBP1*, R9-D31; in *BgAChBP2*, K6-E31). Diese könnten die Assemblierung der Pentamere zu einer höheren Quartärstrukturen unterstützen.

Die aktiven Zentren der AChBP, verantwortlich für die Bindung der Liganden liegen zwischen den Kontaktflächen der Untereinheiten und zeigen zwei Seiten. Ähnlich zu den Ligandenbindedomänen der Rezeptoren werden sie von einer innerhalb der Cys-Loop Familie in der Aminosäuresequenz hoch konservierten "prinzipiellen Seite" und einer wenig konservierten "komplementären Seite" gebildet (Celie et al., 2005). Angenommen wird, dass die geringe Konservierung in der Sequenz der "komplementären Seite" verantwortlich ist für Ausbildung der Affinitäten zu verschiedensten Liganden (Brejc et al., 2001; Celie et al., 2005). Hoch konservierte Reste in den ligandenbindenden "Schleifen" der "prinzipiellen Seite" sind die Aminosäuren Tyrosin (Loop A, Y102, in Loop C, Y201 und Y208 des Tyr-x-Cys-Cys-X-Tyr Motifs), Tryptophan und Glycin (Loop B, W158; G156) und die zwei Cysteine (Loop C, C203, C204). Auffällig ist, dass in den Proteinsequenzen der *B. glabrata* Acetylcholin-Bindeproteine zwei dieser Tyrosine (in *BgAChBP1* Y102, in *BgAChBP2* Y208) durch Phenylalanin (F) substituiert sind. Dieser Austausch in Loop A (Y102) zeigt sich außer in *BgAChBP1* auch für die AChBP des Anneliden *Capitella teleta* und des Seehasen *Haliotis discus hannai* (McCormack et al., 2010; Huang et al., 2009).

Die “komplementäre Seite” zeigt sich bei allen Proteinen variabel in der Aminosäuresequenz. Die Aminosäuresequenzen der beiden *BgAChBP* zeigen eine Sequenzidentität von 52% zueinander. Gemessen an den Sequenzidentitäten zeigen sich beide Isoformen des *BgAChBP* näher verwandt zu dem AChBP von *Lymnea stagnalis* (33-36%), als zu den anderen Acetylcholin-Bindeproteinen (siehe *Abb. 44A*).

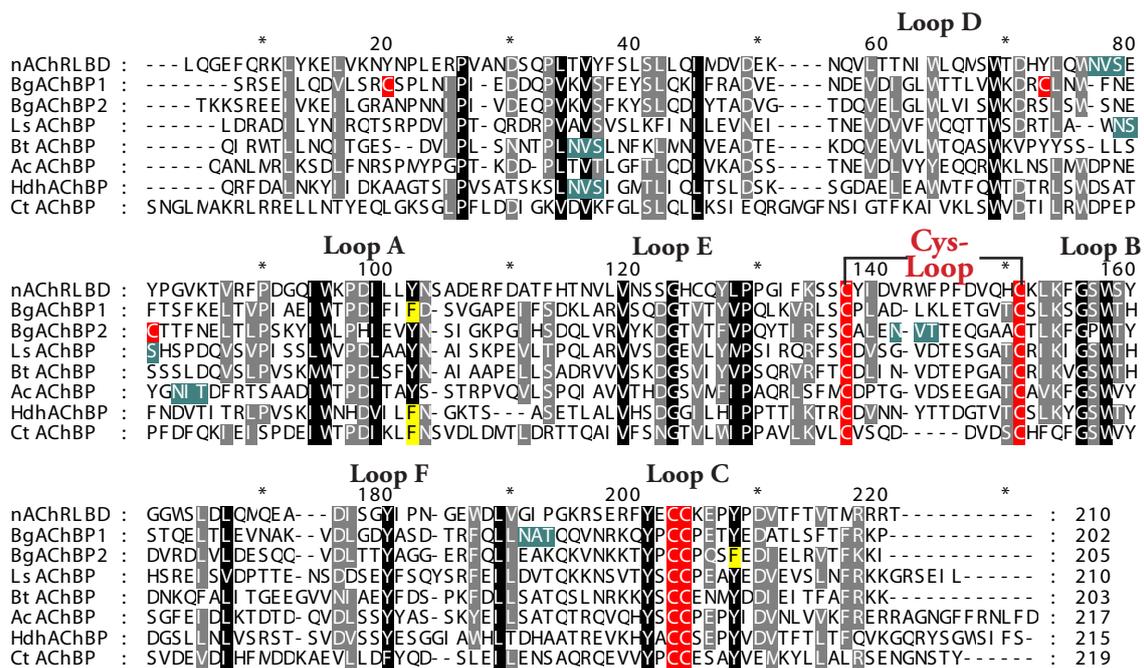


Abb. 43 Vergleich von *BgAChBP1* und *BgAChBP2* mit anderen AChBP und der Ligandenbindenden Domäne des nAChR.

Der Cystein-Loop und die an der Ligandenbindung beteiligten Loops der “prinzipiellen Seite” (Loops A, B, C) und die der “komplementären Seite” (Loops D, E, F) sind an entsprechender Stelle hervorgehoben. Hochkonservierte Bereiche (100%) sind schwarz, weniger konservierte (80%) grau hinterlegt. Rot gekennzeichnet sind alle Cysteine (C), gelb hinterlegte Reste zeigen Sequenzunterschiede an. Die Glykosylierungsstellen sind grün gekennzeichnet. nAChRLBD, Ligandenbindedomäne der alpha-7 Untereinheit des humanen nikotinischen Rezeptors (NM0007465); *BgAChBP1*, *BgAChBP2*, *Biomphalaria glabrata*; *LsAChBP*, *Lymnea stagnalis* (AF364889); *BtAChBP*, *Bulinus truncatus* (CAC69294); *AcAChBP*, *Aplysia californica* (AF322877); *HdAChBP*, *Haliotis discus hannai* (EF565223); *CtAChBP*, *Capitella teleta* (EY637248). Die Sequenzen wurden mit Genious (Drummond et al., 2011) unter Verwendung von Clustal (Larkin et al., 2007) aligniert, und mit Genedoc (Nicholas et al., 1997) bearbeitet.

Die niedrigste Identität zeigen beide *BgAChBP* zu dem Protein des Polychaeten *C. teleta*, was bei Betrachtung der Identitätswerte aller Mollusken-AChBP zu der Ligandenbindedomäne des humanen nAChR erstaunlich ist, aber darauf hinweisen könnte, dass dieses Protein in Anneliden und Mollusken unterschiedlich evolvierte (McCormack et al., 2010). Erstaunlicherweise zeigt sich die Sequenzidentität zwischen den *BgAChBP* zu *Bulinus truncatus* niedriger (35%), verglichen mit der Identität der AChBP von *Lymnea* und *Bulinus* zueinander (43%). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der in *Abb. 44B* gezeigten Stammbaumanalyse wieder. Obwohl *B. truncatus* sowie *B. glabrata* Mitglieder der gleichen Familie (Planorbidae) sind, welche *L. stagnalis* (Lymnaeidae) ausschließt, zeigen sich die AChBP von *Lymnea* und *Bulinus* mit hohem Unterstützungswert als eigene Gruppe. Ein Grund dafür könnte in der Struktur der Proteine liegen. Im Gegensatz zu der pentameren Quartärstruktur der anderen Mollusken AChBP assemblieren in *B. glabrata* 12 Pentamere zu einem Dodekaeder. Dies reflektiert sich auch in den gefundenen Sequenzunterschieden und stellt die beiden Isoformen phylogenetisch abgetrennt als eigene Gruppe dar. Obwohl *B. glabrata* und *B. truncatus* Mitglieder der gleichen Familie sind, zeigen Strukturvergleiche eine größere Ähnlichkeit des *BtAChBP* zu dem AChBP von *L. stagnalis*. Interessanterweise zeigen sich Dodekaeder auch in der Hämolymphe anderer Planorbiden (Wood & Mosby, 1975; Terwilliger & Terwilliger, 1976; Ilan et al., 1986; Herskovits & Hamilton, 1990; 1994), jedoch gehören diese zusammen mit *B. glabrata* zu einem anderen Subtaxon als *B. truncatus* (Jorgensen et al., 2004; Albrecht et al., 2007).

Trotz dieser hohen Diversität in den Sequenzen der AChBP, liegen alle Identitäten im Vergleich zu der extrazellulären Domäne des humanen Rezeptors in einem ähnlichen Bereich (20-25%). Dies deutet darauf hin, dass der Selektionsdruck mit hohem Konservierungsgrad bestimmte Sequenzabschnitte erhalten hat (Celie et al., 2005).

A

	nAChR LBD	<i>Bg</i> AChBP1	<i>Bg</i> AChBP2	<i>Ls</i> AChBP	<i>Bt</i> AChBP	<i>Ac</i> AChBP	<i>Hdb</i> AChBP	<i>Ct</i> AChBP
nAChR-LBD	100	25,2	25,8	21,9	21,5	25,2	29,5	22,6
<i>Bg</i> AChBP1	25,2	100	52,2	36,3	35,3	32,4	25,7	23,2
<i>Bg</i> AChBP2	25,8	52,2	100	33,2	35,1	30,1	27,5	17,8
<i>Ls</i> AChBP	21,9	36,3	33,2	100	43,2	33,5	23,5	16,9
<i>Bt</i> AChBP	21,5	35,3	35,1	43,2	100	32,5	25,5	13,7
<i>Ac</i> AChBP	25,2	32,4	30,1	33,5	32,5	100	25,2	23,3
<i>Hdb</i> AChBP	29,5	25,7	27,5	23,5	25,5	25,2	100	20,5
<i>Ct</i> AChBP	22,6	23,2	17,8	16,9	13,7	23,3	20,5	100

B

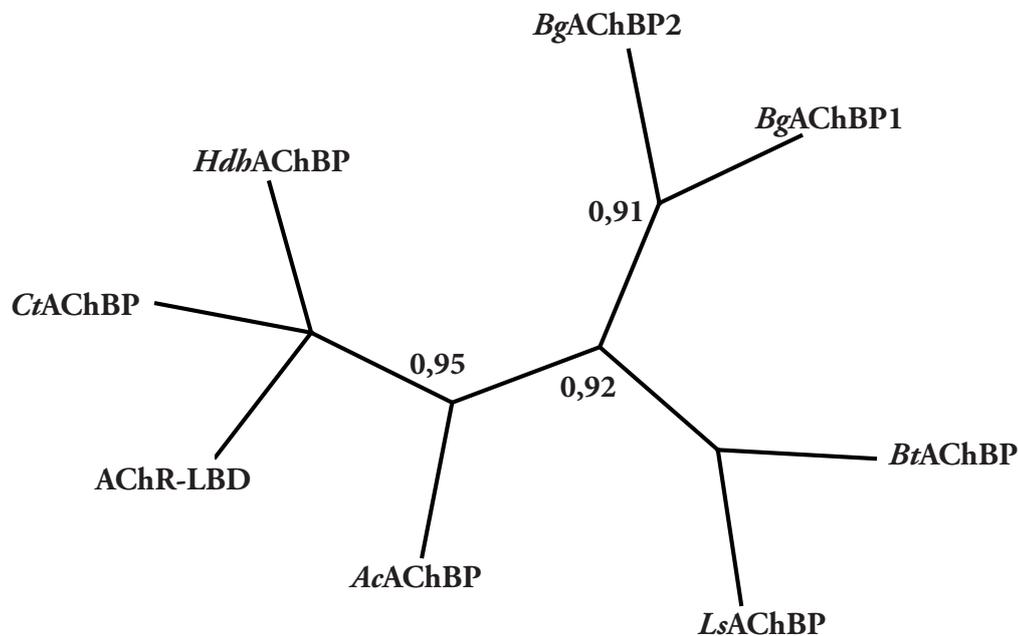


Abb. 44 Vergleich *Bg*AChBP1 und *Bg*AChBP2 mit anderen AChBP und der Ligandenbindedomäne des humanen nAChR.

(A) Sequenzidentitäten anhand identischer Aminosäurereste an korrespondierenden Stellen der AChBP und der Ligandenbindedomäne des humanen nAChR (in %). Die Werte wurden anhand des Alignments (siehe Abb. 43) berechnet. (B) Radialer Stammbaum der AChB. *Maximum-likelihood* Analyse (Mega 5, Tamura et al., 2011). *Bootstrap*-Werte sind angegeben (1000 replicates, cut off 50%). nAChB, Ligandenbindedomäne der alpha-7 Untereinheit des humanen nikotinischen Rezeptors (NM0007465); *Bg*AChBP1, *Bg*AChBP2, *B. glabrata*; *Ls*AChBP, *L. stagnalis* (AF364889); *Bt*AChBP, *B. truncatus* (CAC69294); *Ac*AChBP, *A. californica* (AF322877); *Hdb*AChBP, *H. discus hannai* (EF565223); *Ct*AChBP, *C. teleta* (EY637248).

2.2 Rekombinante Expression

Das Rosettenprotein stellt mit einem Anteil von ca. 5% einen sehr geringen Proteinanteil in der Hämolymphe von *B. glabrata* dar (Lieb et al., 2006). Dies erschwerte die Aufreinigung und machte es für weitere Analysen unerlässlich das Protein rekombinant zu exprimieren. Beide Isoformen des BgAChBP wurden mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert, und in den entsprechenden Expressionsvektor inkloniert. Beide generierten rekombinanten BgAChBP-Konstrukte zeigten eine 100 %ige Aminosäureidentität zu den Sequenzen der nativen BgAChBP-Untereinheiten (siehe Alignment der Konstrukte, Ergebnisteil Abb. 29). Für die Aufreinigung wurden den Konstrukten ein C-terminaler 6xHis-Tag, und späteren Konstrukten ein N-terminaler 6xHis-Tag mit darauffolgender TEV-Schnittstelle angefügt. Für die rekombinante Expression in *E. coli* wurde ein Temperaturoptimum von 25°C bestimmt. Niedrige Expressionstemperaturen führen zu einem langsameren Verlauf molekularer Prozesse und dies kann bei einigen Proteinen zu einer erhöhten Expressionsrate führen (Niiranen et al., 2007). SDS-PAGE Analysen ergaben, dass sich der größte Anteil beider rekombinanten Zielproteine nach Bakterienlyse und Zentrifugation im Pellet befanden. Durch die Überexpression in einem heterologen System werden bakterielle Einschlusskörper gebildet, welche akkumulierte Proteinintermediate enthalten die aber mit Denaturierungsmitteln aus diesen aufgereinigt werden können (Hartley & Kane, 1988). In der Sequenzanalyse zeigte sich, dass beide BgAChBP mehrerer Cysteinreste enthalten, was die Expression in bakterielle Einschlusskörper fördert (Wilkinson & Harrison, 1991). Anders als bei dem nativen Protein zeigte sich auf dem SDS-Gel für die rekombinanten Proteine lediglich eine Bande bei 25kDa, was der Molekülmasse des unglykosylierten BgAChBP entspricht. Da Prokaryoten nicht zu posttranslationellen Modifikationen wie der Glykosylierung befähigt sind, war eine Bande dieser Größe für die rekombinanten Proteine zu erwarten. Ein bedeutender Unterschied in der Aufreinigung der beiden rekombinanten BgAChBP war, dass BgAChBP2 oft zu unlöslichen Aggregaten akkumuliert, welche nicht oder nur schwierig in Lösung zu bringen waren. Das ungepaarte Cystein (C72) in BgAChBP2 könnte der Grund dafür sein. Einen Unterschied in der Löslichkeit wurde auch für die rekombinante Expression beider Isoformen von *B. truncatus* beobachtet (Celie et al., 2005).

2.3 Strukturanalyse des rekombinanten *BgAChBP*

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass das rekombinante *BgAChBP1* zu Homooligomeren assembliert, welche der Quartärstruktur des nativen Proteins gleichen (siehe *Abb. 35*). Neben Pentameren waren die für das native *BgAChBP* charakteristischen Dodekaeder zu sehen. Ausgehend von diesen elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde von Sandra Braukmann eine Kryo-3D-Konstruktion (*Abb. 45*) angefertigt, die in hoher Auflösung (nominell unter 10Å) die reguläre, pentagonale Struktur des Dodekaeders zeigt (Diplomarbeit Braukmann, 2012). Im Vergleich mit der 3D-Rekonstruktion, angefertigt aus kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen des nativen *BgAChBP* (siehe *Abb. 4*, Saur et al., 2012), zeigt auch das rekombinante *BgAChBP1* die Assemblierung der 12 Pentamere zu der rosettenartigen Struktur mit einem Durchmesser von 22nm. Dabei hat jedes dieser Pentamere eine Höhe von 6-7nm und die Monomere jedes Pentamers bilden in der Mitte eine zentrale Pore mit einem Durchmesser von ca. 2nm. Mit der Struktur eines regelmäßigen Pentagondodekaeders ähnelt die Quartärstruktur des *BgAChBP1* dem Kapsid mancher Viruspartikel (Fuschiotti et al., 2006).

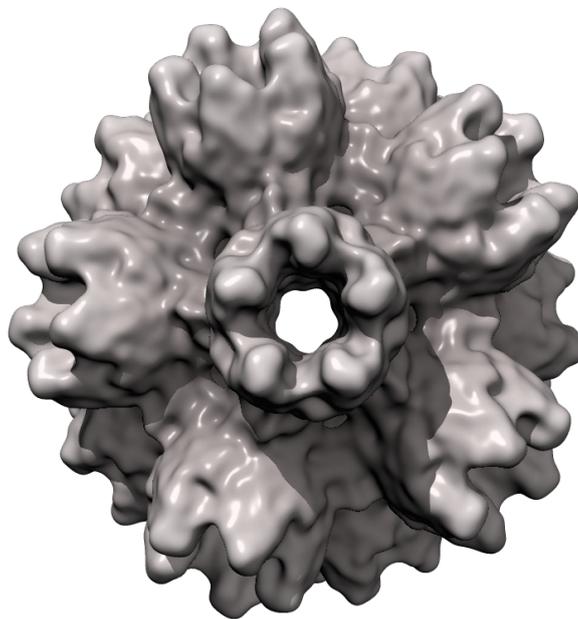


Abb. 45 3D-Rekonstruktion des rekombinanten *BgAChBP1*.

Rekonstruktion des Dodekaeders aus ca. 2000 aus Kryo-EM-Aufnahmen des rekombinanten *BgAChBP1*. Ansicht entlang der fünffach Symmetrie des Dodekaeders (Auflösung nominell unter 10Å, 3D-Rekonstruktion nach Braukmann, 2012).

Um die Reinheit der Proben des rekombinanten *BgAChBP1* für Kryoelektronenmikroskopische Analysen noch weiter zu erhöhen wurde mittels Größenausschluss versucht, die Pentamere von den Dodekaedern zu trennen. Dafür wurden die Proben einer Gelfiltration unterzogen. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zur Überprüfung dieses Aufreinigungsschrittes zeigten eine Trennung der Strukturen, jedoch zeigten sie auch ein clustern von akkumulierten Dodekaedern (siehe *Abb. 37*). Als Ursache dafür stellte sich der C-terminale 6xHis-Tag heraus, welcher der *BgAChBP1*-Sequenz für erste Aufreinigungsschritte angefügt wurde. Nach der Zugabe von Imidazol lösten sich diese Akkumulationen auf (*Abb. 38*). Der C-Terminus wurde anfänglich als Ansatzpunkt des His-Tags gewählt, da er sich in der Modellierung des Monomers nach oben frei herausragend zeigte (siehe *Abb. 46A*). So sollte sicher gestellt werden, dass dieser weder die Faltung zur Quartärstruktur störte, noch das er verdeckt für die Aufreinigung unbrauchbar sein würde. Da an jedes Monomer sechs Histidine angefügt wurden, zählen diese im Pentamer 60, was bedeutet das sich in dem Dodekaeder 360 Histidine an den Oberflächen zeigen. Da durch die Zugabe von Imidazol die Akkumulationen aufgelöst werden konnten, ist wohl diese große Anzahl an geladenen Histidinen an der Oberfläche jedes Dodekaeders der Grund für die Zusammenlagerungen.

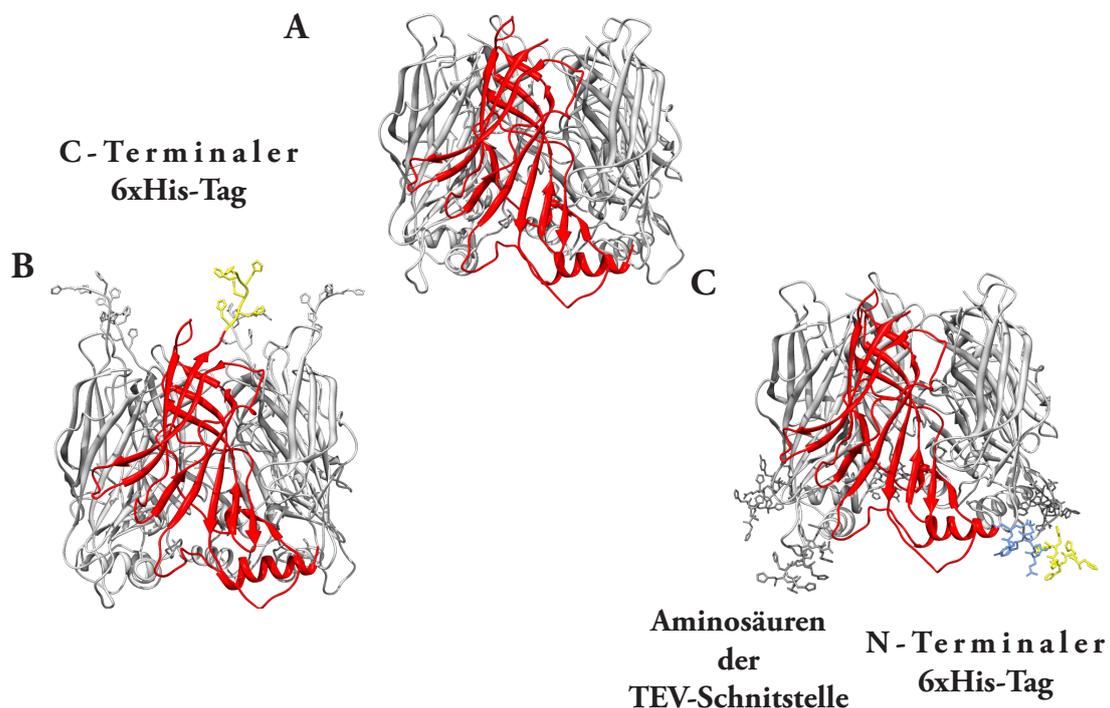


Abb. 46 Molekulare Modelle der Pentamere des *BgAChBP*.

(A-C) Seitenansichten molekulares Modell eines *BgAChBP* Pentamers. Je ein Monomer ist rot hervorgehoben. (A) Pentamer ohne His-Tag. (B) Pentamer mit C-Terminalem His-Tag. Eines der C-terminalen Histidin-Reste ist gelb hervorgehoben. (C) Pentamer mit N-terminalem His-Tag. Der Histidirest ist gelb, die Aminosäuren der TEV-Schnittstelle blau.

Um diesem Effekt zu entgehen wurden neue Konstrukte mit einem N-terminalem His-Tag generiert, welchen zur Entfernung des Tags eine TEV-Schnittstelle vorangestellt wurde (siehe Konstrukte, Ergebnisteil C, *Abb. 29*). Nach Expression und Aufreinigung wurden vor und nach dem TEV-Verdau elektronenmikroskopische Aufnahmen gefertigt (siehe *Abb. 39* Ergebnisse). Auf diesen waren vor dem TEV-Verdau nur Pentamere zu erkennen. Erst nach der Entfernung des His-Tags assemblierten diese zu Dodekaedern. Der Grund dafür liegt in der N-terminalen Position des His-Tags (siehe *Abb. 46C*). Es wird angenommen, dass N-terminal gelegenen Reste (R2, R3 in *BgAChBP1*) die intermolekulare Verbindung der Pentamere, und damit die Bildung der Quartärstruktur stabilisieren (Saur et al., 2012). Zudem findet sich in der *BgAChBP1*-Sequenz eine zusätzliche Disulfidbrücke (C16-C64), welche als bedeutendstes stabilisierendes Element für die Assemblierung der Pentamere angesehen werden kann. Diese findet sich weder in anderen Acetylcholin-Bindeproteinen, noch in *BgAChBP2*.

Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen des rekombinanten *BgAChBP2* sind vorwiegend Pentamere zu sehen. Zwar zeigt dies auf, dass auch hier die Assemblierung zu einer höheren Strukturordnung stattgefunden hat, aber die typischen rosettenartigen Ansichten des Dodekaeders fehlen (siehe *Abb. 36* Ergebnisse). Zudem scheinen einzelne Dipentamere vorhanden zu sein. Ob es sich dabei um zufällige Aneinanderlagerungen oder um echte Dipentamere handelt, konnte bisher nicht geklärt werden.

Um diese Ergebnisse der rekombinanten Expression zu bestätigen, müsste man nativ die beiden *BgAChBP*-Untereinheiten voneinander trennen. Da das AChBP nur einen sehr geringen Teil der Hämolymphe von *B. glabrata* ausmacht (Lieb et al., 2006) ist es schwierig aus der Aufreinigung eine für solche Versuche adäquate Menge zu erlangen. Die Ergebnisse der rekombinanten Expression sind eindeutig, schließen aber das Vorkommen einer Kombination der beiden Untereinheiten zu einem Heterooligomer in dem nativen Protein nicht aus.

2.4 Expressionsanalyse

In dem Seeohr *Haliotis discus hannai* wurde das Vorkommen von zwei AChBP beschrieben (Huang et al., 2009). Obwohl zuerst angenommen wurde, dass es sich bei beiden Proteinen um zwei Isoformen eines amorphen Calciumcarbonat bindenden Proteins (ACCBP) handelt, welches ein Regulatorprotein der Schalenbildung ist, stellte sich nach Sequenz-, und Expressionsanalysen heraus, dass es sich bei einer der beiden Isoformen um ein reines Acetylcholin -Bindeprotein handelt (*HdhAChBP*).

Das Andere, *HdhACCBP* kommt gleich seinem in der Perlmuschel *Pinctada fucata* gefundenen Homolog (*PfACCBP*) in der extrapallialen Flüssigkeit vor und wird im Mantel exprimiert (Ma et al., 2007; Huang et al., 2009). Das *HdhAChBP* dagegen wird wie die anderen Mollusken-AChBP in Ganglienzellen exprimiert (Smit et al., 2001; Celie et al., 2005; Banks et al., 2009 ; Huang et al., 2009).

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigten, dass auch *BgAChBP* in der extrapallialen Flüssigkeit existiert, und zudem lässt es sich, wie die ACCBP von *P. fucata* und *H. discus hannai*, durch die Zugabe von amorphen Calciumcarbonat aus dem Überstand fällen (Saur et al., 2012). Das *HdhACCBP* zeigt eine homodekamere Quartärstruktur, im Gegensatz zu *HdhAChBP*, das wie andere AChBP nur ein Pentamer aufweist (Smit et al., 2001; Brejc et al., 2001; Huang et al., 2009). Der Grund für die Zusammenlagerung zweier Pentamere des *HdhACCBP* ist ein ungepaartes Cystein, das eine intermolekulare Disulfidbrücke bildet. Dieses zeigt sich auch in der Sequenz von *BgAChBP2*, fehlt aber bei allen anderen Mollusken-AChBP.

Aus diesen Gründen war es auch in meiner Arbeit von Interesse, die Expression, bzw. die Orte der Expression der beiden *BgAChBP*-Isoformen zu überprüfen. Und tatsächlich zeigten die Ergebnisse der Wholemout *in-situ*-Hybridisierung verschiedene Expressionsmuster für *BgAChBP1* und *BgAChBP2* (siehe *Abb. 40*).

BgAChBP1-spezifische RNA wurde vor allem in den Kopftentakeln und dem oberen Fußbereich detektiert. Da diese Bereiche reich an Ganglienzellen sind, stimmt dieses Expressionsmuster mit dem anderer AChBP überein (Smit et al., 2001; Celie et al., 2005; Banks et al., 2009). Zudem zeigte sich aber auch ein Expressionsnachweis für *BgAChBP1* im Mantelgewebe, bzw. dem Mantelrand. Dieser Expressionsort für AChBP, außerhalb des Nervensystems wurde bisher ausschließlich für das AChBP von *H. discus hannai* nachgewiesen (Sixma & Smit, 2003; Huang et al., 2009). *HdhAChBP* wird in Gobletzellen des Mantels exprimiert, welche Schleim produzieren der die Mantelepidermis umgibt (Westermann et al., 2005).

Für *BgAChBP2* zeigt sich ein diffuses Expressionsmuster. Hier ließ sich eine Färbung im anterioren Bereich bis zur Mantelfalte nachweisen, jedoch ohne deutliche Abgrenzung, der Eingeweidetasack blieb ungefärbt. Obwohl keine deutliche Anfärbung bestimmter Bereiche zu erkennen war, lässt sich dieses Expressionsmuster teilweise mit dem der ACCBP von *P. fucata* und *H. discus hannai* vergleichen. Diese zeigten eine ACCBP-spezifische Expression im Mantelgewebe aber auch eine deutliche Detektion im Viscus (Ma et al., 2007; Huang et al., 2009). Auffällig war zudem, dass sich für beide *BgAChBP* eine intensive Färbung der Kalkfalte abzeichnete. Diese Kalkleiste wird teilweise durch eine Art Hautlappen bedeckt sie hat vermutlich eine stützende Funktion im Kopf, unterstützt die Radula in ihrer Stabilität und bietet ebenfalls den dahinter liegenden Ganglien Schutz.

Ein Aminosäurealignment der ACCBP mit den AChBP-Sequenzen von *B. glabrata* und *H. discus hannai* zeigt für alle Proteine die für die Cys-Loop Familie charakteristischen internen Disulfidbrücken (Abb. 47).

Neben dem bereits erwähnten ungepaarten Cystein, ist ein weiteres Kennzeichen der ACCBP ist die hohe Glykosylierung (Ma et al., 2007; Huang et al., 2009). Das native *BgAChBP* zeigt in der SDS-PAGE Analyse zwei Banden (31kDa, 25kDa). Durch eine Deglykosylierung wurde gezeigt, dass es sich bei der 25kDa Bande um die deglykosylierte Form des Proteins handelt (Saur et al., 2012). Dies deutet darauf hin, dass auch *BgAChBP* ein hoch glykosyliertes Protein ist, jedoch läßt sich im Gegensatz zu den ACCBP in den *BgAChBP*-Sequenzen beider Isoformen nur je eine N-glykosylidische Bindungsstelle finden.

Demnach finden sich in *B. glabrata*, wie in *H. discus hannai* zwei der Ligandenbindedomäne der Rezeptoren ähnlichen Proteine. Ob es sich aber bei *B. glabrata* wie in *H. discus hannai* um zwei Proteine mit völlig unterschiedlichen biologischen Funktionen handelt bleibt ungeklärt. Da in bisherigen Studien zusammen mit dem in dieser Arbeit analysierten *BgAChBP* erst fünf AChBP und nur zwei ACCBP analysiert wurden, ist es trotz der Sequenzidentitäten schwierig Hypothesen zu dem Ursprung dieser Proteine aufzustellen.

Um dies aufzuklären, sollte die Coexistenz von ACCBP und AChBP auch in anderen Molluskenspezies überprüft werden.

```

pf_ACCBP : MRKTM*EGFLSY20SFCVLFSAVVA- - K*QDYPEAKLLKFL40LLDDYEKLV*RPV*PKDGNAT60- VVSMGF*S
Hdh_ACCBP : MGASTAVLVI VMASYLATA- - EDVNVQ*QRYDPLYKELMSREAKNTI - PVDGKDEAL*NVTI*NLT*
Hdh_AChBP : MYYTRAI VGLLALCAVAQC- - - - - QRF DALNKYI I DKAAGTSI - PVSATS*KS*NVSI*GMT*
Bg_AChBP1 : MDSFLV*VLI*LCF*L*TQGS- - - - - YGSR*RSRSEI LQDVL*SR*SPLN- I - - PI*EDD- QP*VKVS*F EYS*
Bg_AChBP2 : MDSLKVV*LI*VCL*LI*YGS- - - - - HGTK*KSR*EEI VKEI LGRANPNN- I - - PI*VDE- QP*VKVS*F KYS*

pf_ACCBP : LNH*DDY80DS*DS*V*MELKSN80AVLSL*KW*NP*RL*TW*NKDGGPF*GN*VKALH*LP*PSD*W*PDV*VL*NGL*QPF*
Hdh_ACCBP : LLK*ITSL*NL*RT*GDAV*LD*WV*HYE*WED*SR*LAW*- - - - - DP*SDY*KGI*TVM*NLP*HS*NI*WT*PDI*V*PI*RG*- - - -
Hdh_AChBP : LL*QL*TSL*DS*KS*GDAE*LE*AW*TF*QW*DT*RL*SW*- - - - - DS*AT*FND*V*TI*TRL*PV*SKI*WN*H*DV*IL*F*NG*- - - -
Bg_AChBP1 : LQK*IF*RA*DVE*NDE*VD*GL*WT*LV*WK*DR*L*NWF*NE*FT*SF*KELT*- - - - - V*PI*AEI*W*TP*DI*FI*FDS*VGA*-
Bg_AChBP2 : LQD*I*YT*ADV*GT*DQV*EL*GL*WL*VI*SW*KDR*SL*S*WS*NE*CT*TF*NELT*- - - - - LP*SKY*IL*PH*IE*VY*NSI*GK*

pf_ACCBP : QPQF140PD*RL*TAL*VK*DT*GDI*Y*LI*TP*SV*LE*TR*CT*PKADGDKA- T*CR*FK*F*MS*WT*YD*GGE*VE*LD*GF*GG*
Hdh_ACCBP : HTV140V*T*DV*PA*V*F*NS*GL*VY*YI*P*PTI*I*K*TR*- CD*VS*NY*TT*DGT*VT*CS*L*KI*GS*WT*Y*NG*NI*LD*VQ*NK*GP*E
Hdh_AChBP : KTS140ASE*T*L*AL*V*HS*DG*GL*HI*P*PTT*I*K*TR*- CD*VNNY*TT*DGT*VT*CS*L*KY*GS*WT*Y*DG*SL*NL*VSR*STS
Bg_AChBP1 : PEI140F*SD*KL*AR*V*SOD*GT*V*TY*VP*QL*KV*RL*S- C*PL*AD*L*K*LE*T*GVT*CS*L*KS*GS*WT*H*ST*QE*LT*LEV*NAK*V
Bg_AChBP2 : PGI140HS*DQ*L*V*RY*K*DG*T*VT*F*VP*QY*TI*R*FS- CA*LE*N*V*TI*EQGAA*CT*L*K*F*GP*WT*Y*DV*RD*VL*DES*QQ*

pf_ACCBP : LSF200SEYKSTPGLTI*LG*NS*SN*NSRF- YD*CC*PE*PY*Y*DI*EF*NI*NI*EH*NDKDK- - - - - : 240
Hdh_ACCBP : I DV200SEYHDN*QWDI*TE*HSM*QRR*V*HH- YD*CC*PE*PY*PA*IT*AS*V*TL*KAK*RH*GL*L*GWS*L*FH- - : 240
Hdh_AChBP : VD200VSS*YES*GGI*AWH*TD*HAAT*REV*KHY*ACC*SEP*Y*VD*V*FT*LT*F*QVK*Q*RY*SG*SI*FS- - : 234
Bg_AChBP1 : DLGD200- - YAS*DTR*F*QL*L*NAT*QQV*NR*KQ*YP*CC*PET*YE*DAT*LS*FT*FR*KP- - - - - : 224
Bg_AChBP2 : DLT200I*- - YAG*GER*F*QL*E*AK*Q*V*N*K*K*YP*CC*POS*FE*DI*EL*RV*T*FK*KI- - - - - : 224

```

Abb. 47 Sequenzvergleich der BgAChBP mit den ACCBP von *P. fucata* und *H. discus hannai*.

Das Aminosäurealignment zeigt Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Isoformen des BgAChBP und des HdhAChBP zu den amorphen Calciumcarbonat bindenden Proteinen (PfACCBP, HdhACCBP). Hochkonservierte Sequenzbereiche (100%) wurden schwarz, weniger konservierte (80%) grau gekennzeichnet. Einzelne Cysteine, sowie die der typischen Disulfidbrücken sind rot hinterlegt, Glykosylierungsstellen wurden ebenfalls hervorgehoben (grün). BgAChBP1, BgAChBP2, *B. glabrata*; HdhAChBP, HdhACCBP *H. discus hannai* (EF565223; EF583843); PfACCBP, *P. fucata* (DQ473430). Alignment Geneious (Drummond et al., 2011), Clustal (Larkin et al., 2007). Bearbeitung und Illustration Genedoc (Nicholas et al., 1997).

2.5 Hypothesen zur Funktion des *BgAChBP*

AChBP wurde erstmals 2001 aus dem Zentralnervensystem der Spitzschlammschnecke *L. stagnalis* isoliert (Smit et al., 2001; Brejc et al., 2001). *In vitro* Kulturen von Neuronen und Gliazellen zeigten, dass es in Gliazellen exprimiert, in Vesikeln gespeichert und bei Ausschüttung von ACh der präsynaptischen Zelle ebenfalls in den synaptischen Spalt abgegeben wird. Diese Daten führten zu der Hypothese, dass AChBP durch die Bindung des Neurotransmitters ACh die Erregungsweiterleitung zu der postsynaptischen Zelle *in vivo* beeinflusst, was das postsynaptische Potenzial vermindert oder terminiert (Smit et al., 2001). Banks et al. (2009) konnten zeigen, dass *LsAChBP* vor allem in Gliazellen exprimiert wird, welche neuronale Zellkörper umgeben, die nicht Teil des synapsenreichen Neuropils sind. Demnach wird vermutet, dass AChBP *in vivo* die nicht-synaptische Transmission cholinergischer Neuronen reguliert.

Expressionsmuster des *HdhAChBP* in verschiedenen Larvalstadien deuten darauf hin, dass das Protein neben der regulatorischen Funktion der Erregungsweiterleitung auch an der Entwicklung nicht nervöser Strukturen beteiligt sein könnte (Huang et al., 2009). Die Expression von *BgAChBP1* konnte neben Ganglienreichen Bereichen auch im Mantelrand nachgewiesen werden.

Bindungsstudien des *LsAChBP* zeigen, dass das Protein wie die extrazelluläre Ligandenbindedomäne der nAChR, neben dem Neurotransmitter ACh weitere Agonisten (Nikotin, Epibatidin) aber auch Antagonisten (α -Bungarotoxin, Tubacarin) bindet (Smit et al., 2001).

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die verschiedenen AChBP gerade diese Antagonisten mit unterschiedlichen Affinitäten binden. So bindet *LsAChBP* das Schlangengift α -Bungarotoxin im Gegensatz zu *BtAChBP* mit hoher Affinität (Smit et al., 2001; Celie et al., 2005). Dafür verantwortlich könnte eine Substitution in der Sequenz des *BtAChBP* sein (Celie et al., 2005). Mutageneseexperimente an den Ligandenbindedomänen humaner nAChR zeigen, dass ein einzelner Aminosäureaustausch genügt um die Affinitäten dieser zu verändern (Levandoski et al., 1999; Zeng et al., 2001; Harel et al., 2001).

Ligandenbindungsstudien am *BgAChBP* stehen noch aus. Jedoch zeigt die Sequenz der *BgAChBP* die charakteristischen konservierten Motive der extrazellulären Ligandenbindedomäne der nAChR.

Daneben zeigt sich durch die Fähigkeit mit hoher Affinität auch Phycotoxine zu binden, eine weitere Funktion der AChBP mit biologischer Relevanz. Diese Toxine mariner Algen wirken bereits im subnanomolaren Bereich toxisch auf nAChR der Muskel- und Nervenzellen und zeigen auch für die aktiven Zentren der AChBP von *L. stagnalis* und *A. californica* eine außergewöhnliche hohe Passgenauigkeit (Richard et al., 2001; Gill et al., 2003; Bourne et al., 2010). Demzufolge könnte eine Funktion der AChBP in der Hämolymphe ein Schutzmechanismus gegen diese Toxine sein. Umgekehrt könnten die Phycotoxine als Antagonisten, die an das AChBP binden, als Schutz der Algen gegen Algenfresser angesehen werden.

Für das *B. glabrata* AChBP können ähnliche Funktionen angenommen werden. Auffällig ist die Quartärstruktur des *BgAChBP*. Obwohl als pentagonaler Dodekaeder die in allen AChBP homologe pentamere Struktur zu finden ist, assemblieren im *BgAChBP* 12 Pentamere zu der 1,8MDa Struktur. In Hinsicht auf die Funktion Phycotoxine zu binden und zu neutralisieren könnte diese Präsentation von 60 Ligandenbindestellen des *BgAChBP*-Dodekaeders einen entscheidenden Vorteil bieten.

Zudem gelang es modifizierte *LsAChBP* Pentamere mit (dem C-Terminus) der Transmembrandomäne des 5HT₃ Serotonin-Rezeptors zu einem chimären Rezeptor zu koppeln. Die ACh bindende, aktivierende Funktion dieser Hybride blieb erhalten (Bouzat et al., 2004). Solche Studien wären auch mit dem *BgAChBP* möglich. In Anbetracht der Quartärstruktur wäre es vorstellbar, dass zwei gegenüberliegende Pentamere desselben Dodekaeders binden und somit direkt benachbarte Ionenkanäle verbinden. Mit einer Größe von 22nm könnte der Dodekaeder durch diesen Zusammenschluss die Aussparung zwischen angrenzenden Zellmembranen überbrücken (Saur et al., 2012).

Sicher ist, dass die wasserlöslichen Acetylcholin-Bindeproteine als funktionelle Homologe der schwer zugänglichen Ligandenbindedomäne der nAChR wichtige Erkenntnisse über diese gewinnen lassen. Welche Rolle der Dodekaeder des *BgAChBP* dabei spielt ist noch unklar.

E Zusammenfassung

Die tropische Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* gehört zu der Familie der Planorbidae, welche als einziges Taxon der Gastropoden Hämoglobin als Sauerstofftransportprotein verwenden. Als Zwischenwirt des Bilharzioseerregers *Schistosoma mansoni* ist *B. glabrata* von tropenmedizinischer Interesse. Das extrazelluläre BgHb zeigt sich mit einem Anteil von 95% als Hauptprotein in der Hämolymphe. Dieses setzt sich aus Polypeptidketten mit je 240kDa zusammen. Diese wiederum lassen sich in 13-Häm-Domänen und eine deutlich kleinere N-terminalen nicht Häm-Domäne untergliedern. Die Sequenzierung von zwei der drei Untereinheiten des BgHb (BgHb1, BgHb2) ermöglichte die rekombinante Expression ganzer Untereinheiten in Insektenzellen, und die Expression einiger BgHb2-Konstrukte in *E. coli* Zellen. Im Rahmen meiner Arbeit gelang es, BgHb1 in biologisch aktiver Form in Insektenzellen zu exprimieren. Das aus dem Überstand der Insektenzellen aufgereinigte rekombinante BgHb1 zeigte eine immunologische Identität mit nativen BgHb. Strukturelle Analysen belegten zudem die Assemblierung des rekombinanten BgHb1 zu einer dem nativen Protein gleichenden Quartärstruktur. Demnach konnte in meiner Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass eine einzelne Isoform in der Lage ist, zur Quartärstruktur zu assemblieren. Zusätzlich ergaben Sauerstoffbindungsanalysen, dass das rekombinante BgHb1 reversibel Sauerstoff binden kann.

In den restlichen 5% der *B. glabrata* Hämolymphe zeigt sich ein rudimentäres Hämocyanin, welches für den Sauerstofftransport keine Rolle zu spielen scheint, und ein rosettenförmiges Protein, das es aufzuklären galt. Durch massenspektrometrische Analysen erhaltene Peptidfragmente zeigten eine hohe Sequenzähnlichkeit zu den löslichen Acetylcholin-Bindeproteinen anderer Mollusken. Diese AChBP zeigen eine hohe Sequenzähnlichkeit zur Ligandenbindedomäne von Rezeptoren der Cys-Loop-Proteinfamilie.

Datenbankrecherchen deckten die Existenz zweier Isoformen auf, die ich beide sequenzieren, inklonieren und rekombinant in *E. coli* Zellen exprimieren konnte. Rekombinantes BgAChBP1 zeigte in EM-Aufnahmen gleich dem nativen Protein die Assemblierung zu einem Dodekaeder. Zudem habe ich mit der kompletten Genstruktur beider BgAChBP die ersten Exon/Intron-Strukturen von Acetylcholin-Bindeproteinen aufgedeckt und die Expression der beiden BgAChBP-Isoformen mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht.

F Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

1.1 Allgemeine Abkürzungen

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
cDNA	„Copy“ oder „complementary“-DNA
Da	Dalton
ddH₂O	Bidestilliertes Wasser (H ₂ O bidest)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
for	forward
FU	Functional Unit (funktionelle Einheit)
g	Erdbeschleunigung (Mittelwert: $g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
H₂O	Wasser
IPTG	Isopropyl- β -D-1-Thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen (1000 Nukleotide)

kDa	Kilodalton (1000 Dalton)
LB	lysogeny broth (Nährmedium)
MCS	Multiple cloning site
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-Hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame (offener Leserahmen)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription oder Raumtemperatur
SP	Signalpeptid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Unit
UTR	Untranslated region (Untranslatierter Bereich)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid

1.2 Abkürzungen in der Proteinforschung

Abkürzungen	Tierart	Protein
<i>AcAChBP</i>	<i>Aplysia californica</i>	Acetylcholin Bindeprotein
<i>AmHb</i>	<i>Arenicola marina</i>	Hämoglobin
<i>BgAChBP</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Acetylcholin Bindeprotein
<i>BgHb</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Hämoglobin
<i>BtAChBP</i>	<i>Bulinus truncatus</i>	Acetylcholin Bindeprotein
<i>CtAChBP</i>	<i>Capitella teleta</i>	Acetylcholin Bindeprotein
<i>HdbAChBP</i>	<i>Haliotis discus hannai</i>	Acetylcholin Bindeprotein
<i>HdbACCBP</i>	<i>Haliotis discus hannai</i>	Amorphes Calciumcarbonat Bindeprotein
<i>HsHb</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hämoglobin
<i>LtHb</i>	<i>Lumbricus terrestris</i>	Hämoglobin
<i>LsAChBP</i>	<i>Lymnea stagnalis</i>	Acetylcholin Bindeprotein
<i>HsnAChR</i>	<i>Homo sapiens</i>	nikotinischer Acetylcholin Rezeptor
<i>PfACCBP</i>	<i>Pinctada fucata</i>	Amorphes Calciumcarbonat Bindeprotein
<i>PcHb</i>	<i>Planorbis coreus</i>	Hämoglobin

1.3 IUPAC-Nomenklatur für Aminosäuren

Trivialname	Abkürzung	Symbol		Trivialname	Abkürzung	Symbol
Alanin	Ala	A		Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R		Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N		Mathionin	Met	M
Aspartat	Asp	D		Prolin	Pro	P
Cystein	Cys	C		Phenylalanin	Phe	F
Glutamat	Glu	E		Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q		Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G		Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H		Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I		Valin	Val	V

1.4 IUPAC-Nomenklatur für Nukleotide

Symbol	Nukleotid		Symbol	Nukleotid
A	Adenin		R	Adenin oder Guanin
C	Cytosin		S	Cytosin oder Guanin
G	Guanin		T	Thymin
K	Guanin oder Thymin		U	Uracil
M	Adenin oder Cytosin		W	Adenin oder Thymin
N	alle Nukleotide möglich		Y	Cytosin oder Thymin

2 Mikrobiologische Methoden

2.1 Nährmedien und Agarplatten

LB-Medium (pro Liter)

10g NaCl
10g Trypton
5g Hefeextrakt
pH 7,0

LB-Agar (pro Liter)

20g Agar-Agar werden vor dem Autoklavieren auf einen Liter LB-Medium gegeben.

SOC-Medium (pro Liter)

20g Trypton
5g Hefeextrakt
0,5g NaCl
2,5ml 1M KCl
10ml 1M MgCl₂
20ml 1M Glukose
pH 7,0

Antibiotika (pro Liter LB-Medium)

100mg Ampicillin
50mg Kanamycin

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Vektorspezifische Primer

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Länge	Vektor
M13 for	GTAAAACGACGGCCAG	16	pDonr221
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	17	pDonr201
T7 for	TAATACGACTCACTATAGGG	20	pDest14 (E. coli-Expr.)
T3 reverse	AATTAACCCTCACTAAAGGGAA	22	pDest14 (E. coli-Expr.)
OpIE2 (Inssel) for	CGCAACGATCTGGTAAACAC	20	pIZ/V5-His (InsectSelect)
OpIE2 (Inssel) rev	GACAATACAACTAAGATTTAGTCAG	26	pIZ/V5-His (InsectSelect)

3.2 Genspezifische Primer

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Länge	Gen
BgAChBP1 for1	CCGAGTCAGAAATAAACACAAA	23	<i>BgAChBP1</i>
BgAChBP1 for2	TCCTACGGCTCCAGAAGAAGCAGAAG	26	<i>BgAChBP1</i>
BgAChBP1 for3	GCAACGCTTTCCTTTACGTTTAGAAAACCA	30	<i>BgAChBP1</i>
BgAChBP1 rev1	CTTCTGCTTCTTCTGGAGCCGTAGGA	26	<i>BgAChBP1</i>
BgAChBP1 rev2	GGAAAGCGTTGCATCTTCAT	20	<i>BgAChBP1</i>
BgAChBP1 3'UTR rev1	GATCATGGTTTCAITTAAGGG	22	<i>BgAChBP1</i>
BgAChBP1 3'UTR rev2	GATTCTATCCAATGGGAGCTG	21	<i>BgAChBP1</i>
BgAChBP2 5'UTR for1	GGCTTTTCTACCAATTGAGAC	21	<i>BgAChBP2</i>
BgAChBP2 for1	ACCAAAAAGAGCAGGGAGGAAATAG	25	<i>BgAChBP2</i>
BgAChBP2 rev1	TATTTTTTTGAAGGTGACACGAAGCTCTAT	30	<i>BgAChBP2</i>
BgAChBP2 3'UTR rev1	CCAGGGTTCGTTTTATCCAG	20	<i>BgAChBP2</i>
BgAChBP2 3'UTR rev2	CGTTTTATCCAGGGGTTTCG	20	<i>BgAChBP2</i>

3.3 *attachment*-Primer

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Länge	Gen
AChBP1 att-B1-for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT _{tc} GAAGGAGATAGAAT- GTCCAGAAGAAGCAGAAGTGAGAT	69	<i>BgAChBP1</i>
AChBP1 att-B2-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGTGATGGTGATG- GTGATGTGGTTTTCTAAACGTAAAGGAAAGCGTTGC	84	<i>BgAChBP1</i>
AChBP2 att-B1-for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT _{tc} GAAGGAGATAGAAT- GACCAAAAAGAGCAGGGAGGAAATAG	71	<i>BgAChBP2</i>
AChBP2 att-B2-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAGTGATGGTGATG- GTGATGTATTTTTTTGAAGGTGACACGAAGCTCTAT	81	<i>BgAChBP2</i>
AChBP1 His-TEV att-B1-for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT _{tc} GAAGGAGATAGAATG- CATCACCATCACCATCACGAAAACCTGTATTTTCAGGGCTCCAGAA- GAAGCAGAAGTGAGAT	108	<i>BgAChBP1</i>
AChBP1 His-TEV att-B2-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATG- GTTTTCTAAACGTAAAGGAAAGCGTTGC	63	<i>BgAChBP1</i>
AChBP2 His-TEV att-B1-for	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT _{tc} GAAGGAGATAGA ATGCATCACCATCACCATCACGAAAACCTGTATTTTCAGGGCAC- CAAAAAGAGCAGGGAGGAAATAG	110	<i>BgAChBP2</i>
AChBP2 His-TEV att-B2-rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATTTTTTTTGAA- GGTGACACGAAGCTCTAT	63	<i>BgAChBP2</i>

3.4 Gelelektrophorese

3.4.1 DNA-Gelelektrophorese

1 × TBE-Puffer	0,9M Tris/Cl 0,9M Borsäure 20mM EDTA
10 × Probenpuffer	10% Glycerin 0,4% Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Stammlösung	10mg/ml
Marker	GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Roth)

3.4.2 RNA-Gelelektrophorese

1 x Elektrophoresepuffer (MOPS)	200mM MOPS (3-(N-Morpholino))-2-Hydroxypropansulfonsäure-Natriumsalz 50mM Natrium-Acetat 10mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat) pH 7,0 im Dunkeln lagern
10 x Probenpuffer	50% Glycerol 0,4% Bromphenolblau 1mM EDTA 25%Formaldehyd 0,5µg/ml Ethidiumbromid
RNA-Minigel	4ml 10 x xMops-Puffer 30ml H ₂ O bidest 0,4g Agarose aufkochen, auf 50°C abkühlen lassen 6ml Formaldehyd zufügen Gel sofort gießen

3.5 Southern Blot

3.5.1 Puffer-Rezepte

20 x SSC	3M NaCl 0,3M NaCitrat
Denaturierungslösung	0,5M NaOH 1,5M NaCl
Neutralisierungslösung	1,5M NaCl 1M Tris/Cl pH 7,4
Äquilibrierungslösung	0,3M NaCl (2 x SSC) 0,03 MNaCitrat pH 7,0
Hybridisierungspuffer	5 x SSC 0,1% N-Laurylsarcosin 0,02% SDS 1% (w/v) Blockingreagenz (zum Lösen auf ~ 50°C erwärmen)
Waschpuffer	0,15M NaCl 0,1M Tris/Cl pH 7,5
Blockierungslösung	Waschpuffer 1% (w/v) Blockingreagenz
AP-Puffer	0,1M Tris 0,1M NaCl 0,05M MgCl ₂ pH 9,5
Substrat NBT	50mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid (NBT = p-Nitrobluetetrazoliumchlorid)

Substrat BCIP 50mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid
(BCIP = 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz)

Färbelösung 66µl NBT
33µl BCIP
in 10ml AP-Puffer

3.6 Analyse der Sequenzierungen

3.6.1 Internetadressen

Programm	Internetadresse
CLUSTALX / CLUSTALW	http://www.clustal.org/
EXPASY PORTAL	http://expasy.org/
GENEDOC	http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/
GENEIOUS	http://www.geneious.com/
MEGA5	http://www.megasoftware.net/
NCBI BLAST®	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
NETNGLYC 1.0 SERVER	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
Primer-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
SIGNALP 3.0 SERVER	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
TREEILLUSTRATOR	http://www.bioinformatics.be/geert/index.php
TREEVIEW	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html

4 rekombinante Expression

4.1 rekombinante Expression in Bakterienzellen

4.1.1 Proteinpräparation

Lysis Puffer

- 10mM Tris/HCl
- 100mM NaCl
- 1mM EDTA
- 2mM MgCl₂
- 1mM DTT
- 100µM Leupeptin

Puffer B

- 20mM Na₂HPO₄
- 0,5M NaCl
- 20mM Imidazol
- 8M Harnstoff
- 1mM β-Mercaptoethanol
- pH 7,4

4.2 rekombinante Expression in Insektenzellen

4.2.1 Kultivierung von Insektenzellen

High Five™-Zellmedium (serumfrei) Express Five® SFM Insektenmedium

- 4mM Glutamin
- 50U/ml Penicillin,
- 50µg/ml Streptomycin

5 Proteinbiochemische Methoden

5.1 Polyacrylamidgelelektrophorese

Acrylamidlösung	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel 30; Roth, Karlsruhe)
Polymerisationsstarter	10% (w/v) APS (Ammoniumperoxodisulfat) in Aqua dest. TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenethyl endiamin)
Coomassie-Lösung	0,2% Coomassie-Brilliant-Blau R250 40% Ethanol 10% Essigsäure
Entfärberlösung	20% Isopropanol 7,5% Essigsäure
5.1.1 SDS-PAGE	
Trenngel-Puffer	1,5mol/l Tris/HCl 0,4 % SDS pH 8,8
Sammelgel-Puffer	0,5mol/l Tris/HCl 0,4% SDS pH 8,8
Elektrophorese-Puffer	0,023mol/l Tris/HCl 0,19mol/l Glycin 0,2% SDS pH 8,3
4 x Probenpuffer	4,6ml Stabilisierungs-Puffer (s. Kap. B4.1) 4ml SDS (20 %-ig)

0,4ml β -Mercaptoethanol (10 %-ig)
2ml Glycerin in Wasser
1 Spatelspitze Bromphenolblau

5.1.2 Native PAGE

Trenngel-Puffer

1,5mol/l Tris/HCl
pH 8,8

Sammelgel-Puffer

0,5mol/l Tris/HCl
pH 6,8

Elektrophorese-Puffer

0,023mol/l Tris/HCl
0,19mol/l Glycin
pH 8,3

Probenpuffer

90% Glycerin
10% Stabilisierungs-Puffer
1 Spatelspitze Bromphenolblau

5.2 Chromatographische Methoden

5.2.1 Affinitätschromatographie an eine Nickelmatrix

Proteinpräparation Expression in Insektenzellen

Bindungspuffer

20mM Na₂HPO₄
0,5M NaCl
20mM Imidazol
pH 7,4; sterilfiltriert

Elutionspuffer

20mM Na₂HPO₄
0,5M NaCl
500mM Imidazol
pH 7,4; sterilfiltriert

5.5 Dialyse

Dialysepuffer (E. coli Expression) 20mM Tris
pH 8,0

5.6 Western-Blot

5.6.1 Proteintransfer

Transferpuffer 25mM Tris
150mM Glycin
10% Methanol
pH 8.3

5.6.2 Immunodetektion

1x Tris-Buffered Saline (TBS) 10mM Tris
0,14M NaCl
pH 8,0

1x Tris-Buffered-Saline + Triton / Tween (TBST/T) 10mM Tris
0,14M NaCl
0,1% Tween 20 (w/v)
0,2% Triton
pH 8,0

Färbelösung 5µl NBT, 3,75µl BCIP pro ml AP-Puffer

5.7 Immunelektrophorese

5.7.1 Verwendete Lösungen

Immunoelktroden-Puffer (5 x)	19mM Na-Diethylbarbiturat 0,1M Diethylbarbitursäure pH 8,6
1 % Agarosegel	1% (w/v) Agarose M (Amersham Pharmacia, Freiburg) in 1 x Elektrodenpuffer
Waschlösung	0,6% NaCl
Färbelösung	Methanol /Eisessig / Wasser (4:1:5 v/v/v) 0,2% Coomassie Brilliant Blue G 250
Entfärbelösung	Isopropanol / Eisessig / Wasser (4:1:5 v/v/v)

5.8 Verwendete Antikörper

verwendete 1. Antikörper

- anti-Penta-His-Antikörper (Maus; 1 : 2 000 in 3% BSA / TBS-Lösung; Qiagen, Hilden)
- anti-BgHb-(nativ)-Antikörper (Kaninchen; 1 : 106 in 3% BSA / TBS-Lösung; Charles River, Sulzfeld / Kisslegg)
- anti-BgHb-(denaturiert)-Antikörper (Meerschweinchen; 1 : 106 in 3% BSA / TBS-Lösung; Charles River, Sulzfeld / Kisslegg)

verwendete 2. Antikörper

- Ziege Anti-Maus, Peroxidase-gekoppelt (1 : 7 500 in 3% BSA / TBS-Lösung; Dianova, Hamburg)
- Ziege Anti-Maus, Alkalische Phosphatase-gekoppelt (1 : 7 500 in 3% BSA / TBS-Lösung; Dianova, Hamburg)
- Ziege Anti-Meerschweinchen, Alkalische Phosphatase-gekoppelt (1 : 7 500 in 3% BSA / TBS-Lösung; Dianova, Hamburg)

6 In Situ Hybridisierung

6.1 Whole Mount

6.1.1 Vorbereitung der Larven

Relaxinglösung	7% MgCl ₂
Fixativ	2ml 5 x Salz 5ml 8%PFA 3ml H ₂ O
5 x Salz	0,5M MOPS 10mM MgSO ₄ 5mM EGTA 2,5M NaCl pH 7,5
6.1.2 Tag 1 Pigmententfernung und Hybridisierung	
1 x PBS	140mM NaCl 2,7mM KCl 8,1mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1,5mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBT	1 x PBS 0,1% Tween20
PPE	1 x PBS 4% Paraformaldehyd
Hybridisierungsmix	50% Formamid 5 x SSC 5mM EDTA 1 x Denhardt's Lösung 100µg/ml Heparin 100µg/ml Heringssperma 0,1% Tween20

Proteinase K 20µg pro ml PBT

6.1.3 Tag 2 Blockierung und Inkubation mit Sekundärantikörper

4 x Waschpuffer 4 x SSC
50% Formamid
0,1% Tween20

2 x Waschpuffer 2 x SSC
50% Formamid
0,1% Tween20

1 x Waschpuffer 1 x SSC
50% Formamid
0,1% Tween20

Maleinsäurepuffer 0,1M Maleinsäure
0,15M NaCl
0,1% Tween20
pH 7,5

Blockierungslösung 2% Blockingreagenz in Maleinsäurepuffer

6.1.4 Tag 3 Farbreaktion

AP-Puffer 100mM Tris/HCl pH 9,5
100mM NaCl
50 M MgCl₂

Substrat NBT 50mg/ml NBT in 70% Dimethylformamid
(NBT = p-Nitrobluetetrazoliumchlorid)

Substrat BCIP 50mg/ml BCIP in 100% Dimethylformamid
(BCIP = 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz)

Färbelösung 5µl NBT 3,75µl BCIP pro ml AP-Puffer

7 Sequenzen

7.1 *BgHb1*

BgHb1-p

ATGTTTGTGTTTGAAGGGAAGTGTGGTGCAAGCATTCGTGCTCTTGAGCATTGTTTGTCTT-
GAGATCACTATTGCCGATGATGGAGTTCGCTACGTAAACGCCAATGGAAAAGACCAG-
AACAAAGTCAAGAAGGACGCCACTCCTGCACTGCCAGACGTCTAGAGGACAACAGCG-
AAGAAGTAGCCTGCAGCACTGAGGTCAAGTTCAGACAGAGGGCTCCTGCTGAGTACG-
CCAACAAGATCAAGAAAGCCAAGGACAAGCTGAGGCGGCTGGAGTCTCAATTCGAT-
GACTGCCAGCAGGAGAATGACCGCAAGGACAGGCTCATTCACTTCAGGCTAACCTTGACA

BgHb1-a

GATACCATCCACAGACTTGTAACAGATAGCGACATCCAGGCTCTAAGAAGTTCCTGGGCTA-
CACTCACTGCTGGCGCTGATGGCAGAAAACAATTTTGAAACAACCTTGTCTCTGGTTGTTG-
AACACTATCCCCAACATCCGAGAAAGATTCGAGAAATTC AACGCTCACCAATCTGATGAGG-
CCCTGAAGAACGACAACGAGTTTGTCAAGCAAGTGA AACTCATTGTTGGAGGCCTG-
CAGTCCTTCATTGACAACCTAGAAAACCCTGGCCAGCTTCAAGCTACCATTGAGAGACTC-
GCCTCTGTCCACTTGAAAATGAGACCAACCATTGGATTGGAATATTTCAAGGCCTCTC-
CAAGAGAACATTGCCAGTACGTGCTAGTGCTCTTGGCGTCGGTGCTGACGATG-
CAGCTCCTAAAGCCTGGGAACGTCTTCTGAATGCCTTCAACGAGGTCCTGAATAGCTTT

BgHb1-b

GCCAACTACAACATTGGTCTTTCTGATACCGACAAAAGTCGCTCTCCAGAGCTCATGGAG-
CAGACTGACTGCTGGCGCTGATGGTAAGAGAAAACGCTGGAGTTAGACTTGTTCTTTG-
GATGTTCAACAATGTGCCAACATGCGTGAGAGATTCACCAAATTC AATGCTCGCCAGTCT-
GACGAAGCCCTCAAGACCGACGCTGAGTTCCTAAAACAGGTTGATGCCATCATTGGAG-
GATTTGAAACACTTATCAACAACCTGAATGACGCTGATCTGCTGCTCAACCGTCTGGA-
GAGTCTTGCCGATGAGCATTGGA AAAAGAAACCAGCCATCAGCTCTAATTA CTTTGGACCTC-
TACAGAAAAACATTCACTTGTTCAATGAAGGCACTCTCAATTTTGGCTCAGACAGTGAC-
GAGGCTCGCGCCTGGACTCACTTGGTTGGCGCTTTGAACAAAGTTATTAAGATCAT

BgHb1-c

GCTATTCACAACCTGGGTCTATCTGACATTGACAGAGATGCTTTGGTCAGTTCCTGGAAC-
CAACTCACTGGTCGTGCTGGTGGAAGCAGGAATGCTGGTACTAATCTGGTCCTCTGGATG-
CTGGAGAACGTGCCAACATGCGCGACCAGTTCTCCAAATTC AACGCCCAGTCA-
GATGACAATCTGAGAAAGGATGCTGAGTTTGTGAGACAAGTGGACCTCATCACTGGTGG-
CCTTGAGTCATTGGTCGACAATGTTAATAACCCAATTTTCCTTCAGGAGGCCCTGGTCA-
GACTGGCCGATGCTCACTTGAACCTGAAACCAAGAGTTGGTCTTGAATACTTCGGTCCTCTT-
CAACGCTACATCCACGCCTACATTGAGAAAGCCCTGGGTGTTTCTGCTGACAGTGCTG-
CACCAGAGCCTGGACAGACCTACTGACTGCCTTCAACAACGTGCTGAAAGACCGT

BgHb1-d

ACTTTCCTTAGAATTGTCTCTGACGATGACAGAAGAGCTCTCCAGAGTTCATGGAGCAGG-
CTGCAGAGTCAAGCAGGCAACAAACAGGAAGCTGGAATTA AATTTGGTGACCTGGCTGTT-
TGACAATGTCCCCAACATGCGCGACAGATTCACCAAATTC AACGCCCAGTCTTCTGATG-
AAGCCCTAAGAGCTAACAACGAGTTCC TAAGACAAGTCGATGTCATTGTTGGAGGTC-
TAGATTCATTGATCAACAATGTGGACAACAGTGACA ACTTCCAAGCTGCTATCGAGA-
GACTTGTGGATGTTCACTTGCACATGTCCCCAAGTGTGGCCTGGAATATTTCCGGTCCTCTG-
CAACAAAACATCAGATCTTACATCCAGAACGCCCTTGGAGTCGCTGCTGACAGTGCTG-
GAGGCCAGATCCTGGACAAAACCTATTTACCGCCTTCAATGAGTTCCTTGCTGATCAC

BgHb1-e

ACTATT CAGAAGATCGGACTCTCCCCAACCGACAGAAAAGTCCTTGACAGAACATGGAAG-
CAGCTGACAAGTGGTGGCAAACAGGAAGCTGGAGTTAAACTAGTTTTGTGGATGTTG-
GATCAAGTTCCCAACATGCGCGACCAGTTCTCCAAATTCGACGCCCGCAAATCCGAAG-
CTGAGCTGAGAAACGACGCTGAGTTCATCAACCAAGTCAACAACATTGTTGGAGGTCTG-
GACTCCATCTTGAACAATTTAGACAAACCTGGTCAACTGCAGGCTGCCCTGGAGCGTCT-
CGCCGACTACCATCTTGACCATAAACCAAGAATCGGACTTGAATTTTTCGGCCCTC-
TACAAAAGTACATCCATCTCTACATTGAGAGTGCCCTGAATGTTGCTGTTGGCAGT-
GAGGAATCTAGAGCTTGGACAGATCTATTGACTGCTTTGAACAAAGTCATCAGAGATCAT

BgHb1-f

GCCATTGACAGACTTGGACTTTCAGATAACGACAGAGAAGCAATTGACAGTTCCTGG-
AAGAACTCAGATCTGGAGCTGGTGGCAGAAGGAATGCTGGTATTAAGCTTGTTCAATG-
GATGTTGAGGACTATCCCCAACATGCGCGATCGCTTCAACAAATTCGACGCCAAGCAAT-
CAGACGCAGCTCTTCAACGTGACCCAGAATTCCTTGGCCAAGTTGACCGCATCCTTG-
GAGGCGTTGAGTCCCTGGTCAACAATGTCGACGACCCTGTTGCCCTTAAAGCCGCCATC-
GATAGACTGGCAGATGCCATCTGAGTTTCGATCCAAGAGTTGGCCTTGATTATTTTG-
GACCTCTCCAAACTTACATCCACGACTACATCGAGGAAGCTCTAGGCGTCGGTGCTGACAGT-
GACGAAGCTAAAGGCTGGACTGATCTCTTCGCTGCCTTCAACAAGGTCCTCAAAGAACGC

BgHb1-g

ACTGTTCTCAAGATTGTGTCAGACAATGAGAGGGCTGCTCTCAGAAGTTCATGGGATT-
CACTTAAAAGTGCTGCTGGTGGAAACCAAGAGGCTGGAGTCAGGCTTGACTCTG-
GATGTTGCAAAACGTGCCAACATGCGTGAAAGATTCAACAAGTTCATGCCCTCCAAG-
GAGACGACGCTCTTAGAGCCGACGCAGAGTTCGTCAAAACAAGTTGAACGCATCGCTG-
GAGGACTGGAATCTCTGATCAACAACGTAGACAACCAAGGCAAGCTCCAAGCTGCTATT-
GATAGACTGGTAAATGCTCACTTGAACCTTTAGACCCAGCGTTGGACTTGAGTATTTCCAG-
CCACTACAAGAGAACATCTACAAATACCTTGAGTCTGCTCTTATTGTTGCCGCTGATAG-
CAATGAGGCTAAAGCCTGGACACATCTACTGAGTGCCTTCAACACAGTCCTTAGAGAACAC

BgHb1-h

TCTCTTGAGAAAATTGGCCTTTCAGATGTCGACAGAAAAGCTCTTGAAAG-
CTCTTGGA AAAA ACTGACAGATGCTGCTGGTGGAAAGCGAGAACGCTGGAA-
CAAACCTTGTCTTCTGGTTGTTGGACAATGTCCCCAACATGAGAGACAGATT-
CACCAAATTCACGCCACCAATCCAATGCTGCCCTCCAAGACGATGACGAGTTC-
CGTAACCAGGT CAGGGCCATCACCCGTGGTATCGAGTCATTTGTGAACAATGT-
CAACAACCCCGCTGCTCTCCAGTCCAGCATTGAGAATCTGGTTCGATGCTCATT-
TGAACCTCCAACCCAGCATTGGTCTTTCCTACTTTGGATCCGTCCAACAATA-
CATCCATCTCTACATCGCCAAAGCTCTCGGTGTTGCTTCTAACAGTGATGAGG-
CCAAATCATGGACTAACTTGTTTCGCTGCCTTCAACAAAGTCTTGAAAGAGCAT

BgHb1-i

TCCCTCGAGAAAATCGGTATTTTCAGATAGCGATAAAAGAGCACTTGTCAGCTCCTGG-
AAGAACTAACTGCTGGTGGCAGACAAAACCTTCGGTGTGATCTTGTTCTTTGGATGTT-
CAACAATGTTCCCAACATGCGAGAACAATTCACCAAGTTTGACGCTAAACAATCTGATG-
CTGATCTGAGAAGAGACCCCAACTTCTTGAAACAAGTCAACAATATCATCAATGGAGTTG-
GAGACTTGGTAGATAGCGTGAATGATCCTGGCAAACCTCAGGCCAATCTGGAGAGACT-
CACTGATGTCCACTTGCAATTCGTACCAAGTGTGGCCCAAGATTCTTTGGTCCACTC-
CAAAAGAACATTCACACCTTCAATGAACAAGCCCTTGGTGTCCGGTGCTGATAGTGAT-
GAGCCCAAAGCCTGGACTGATTTGATTGGTGCCTTTAACAAGTCTTAATGACCAT

BgHb1-j

GCCATTCAACACATTGGACTCTCTGAAACTGACAGAAGAGCTCTAGACAGTTCCTGGAAGAGG-
CTCACAGCTGGTGAAAACGGAGTCCAGAAAGCAGGAGTAACTTGGTTCTCTGGTTTTT-
CAACAATATCCCCAACATGCGTGAACGATTACCAAATTTGACGCCAATCAAGCTGAT-
GATGCTCTGAGAGCTGACCCCGAATTCAAAAACAGGTCAATGTCATCGTTGGAG-
GACTTAAATCTTTCTTGGATAGTGTTAACGACCCCATCGCACTCCAGGCCAACATGGA-
CAGAGTCGCTGAAGCTCACTTGAACATGGATCCAGTTGTTGGTGTTCATACTTCTCTG-
CCCTTTCCAGAAATATCCATCGCTTCATTGAAATCTCCTTGGGTGTTACCGCAGACAGC-
GATGAATCCCAGGCTTGGACTGACCTTTTGGCTGGCTTTACTAGAGTCGTTAGAAACAGA

BgHb1-k

GCTGTTCTCAGAAAAGTGTCTGACAGTGACAAGAGTGCTTTTGTGAGCTCCTGGAAT-
GAGCTGATTAGAAAGGCTGCCAGCAGACGCAATGCTGGAGTCAATCTAGTTCTCTGG-
CTGTTTAAACAATGTACCCAACATGCGCAACCATTTACCAAATTCATGGCAACCAGCCA-
GACGCTGCCCTCAGAAATGACCAAGAGTTCCTCAATCAGGTAGACCGTATTGCTGGTGG-
CCTAGAATCTTTGGTTAAGAATGTGAACAACCCCGCCCGTTTCTTGGACGCCCTGGA-
GAGACTCAGTTCTGCTCACTTGAACATGAAGCCAAGTATTGGACTGGAATATTTCCGGC-
CACTACAACAGAACATCCACACTTACATTGAGTCCGCTCTGGGTGTTGCTGCTGGAAGT-
GATGAAGCTAACGCTGGACAGACGTCTTCGGAGCTTTCAATGAGATTCTGAAATACAGC

BgHb1-l

TCAGTTGAGAAAATTGGACTTTTCAGACAGTGATAAACAAGCTTTGACCAGTTCCTGGAG-
CAGTTTAAATTGCCGAGGGAAAAGATACCGCTGGAGAAAATTGGTACTTTGGATGTTT-
GACAATGTCCCCAACATGAGAGCTAGATTCACCAAATTCGACGCCACCCAGTCAGACG-
AAGCCCTCAGAAACGACAAAGAGTTCGTAATCAGGTCAACGTCATTGTTGGAGGTCTA-
GAGCTACTGATCAACAGCGTCAATGAACCTGGTCAACTCCAGGCCAACCTTGAGAAAC-
TAGTGGATGACCACTTGACATGGTACCAAGTGTGGTCTTGAATACTTCGGACCTCTC-
CAAAAATACATTCACCTCTTCATTGAGAAAGCTCTCGGAGTAAGCTCAAACAGTGTG-
GAGTCCAAGTCTCGGACCAATCTGCTTCGTGCCTTCAACAAAGTCTCAAGGAACAT

BgHb1-m

TCCGTCAAGAAAATCGGTCTTTTCAGAAGAAGACAGGAAGGCCATTGTTAGCTCCTGGAGG-
AAACTGGTCGGCAGAGCTGGAGGTAGAGACAATGCTGGAACCAATCTTGTCTCTG-
GATGTTTGAGAATGTGCCAACATGAGAGACAGATTCACCAAGTTCAATGCTTACCAACCT-
GACTCAGCCCTGAGACAAGACAGAGAGTTTGGAGCCCAAGTTGACCGCATCACATCTGG-
CCTGGAATCCCTGGTCAACAATGTAGAGAACCCTGGTCAGTTCCAGGCTGCCTTAGA-
GAGACTGTCCACCCTTCACAAGAACAAGACCCCTAGTGTGGACTTCAATACTTTGGGC-
CACTCCAGAGGTACATCCACCTGTATATCGAACAGAATCTGAACGTTGCATCTGACAGCGTT-
GAATCCAGAGCCTGGACCAACCTGTTTGCTTCCTTCAATGAAGTTCTCAAGAAAGCATAA

7.2 *BgHb2*

BgHb2-p

GTTCTTCTTAGTATTGTTTGTCTAAGTAATTCTATAGCCGACAGCGCTCGCTACGCCAATGCT-
GACTGGAAAAGATCAGAACAAAATCAAGGGGGAAGTCACTCCTGCGTGGCCAGACGACTGG-
AAGAACAGTGAAGAAGTCTCGTGCAAGACATTAGTCACATTCAGACAAAAGTCGCCAGAG-
GAGTATGCCAACAAAGTCAGACAAGCGGAGAACAACCTCGGGCAGTTAGAATCACAGTAT-
GATGACTGCACAGGAGACTGAACGCAAAGGAAGACTCATTAGGACTCGAGCCTTGCTAACA

BgHb2-aq

GATTC AATTCATAGGCTTGTA ACTGAGGAAGATATTAACGCTCTTCAGAATAG-
CTGGGATCTGTTGAACTCTTCACCAGAGTTCGCAACCGATCTGGTTATCTG-
GATGTTGGACAACATTC CCAACACGTGCTAGATT CACCAAGTTCAATGCT-
GAGCAGTCTTCTGATGCACTTAAGAATGATGCAGAGTTTGTCAAGCAGGTG-
AACTAATTA AAAAGTGGTCTTA ACTCTTTCATCTCAAACCTGAACAATCGGACA ACTTCAGG-
CAACAATGGAGAGACTTGCAGAGGTT CATCTTCGAATGCAACCTAGCATCGGTCTTGAA-
TACTTTAAGCCATTGCAAGAAAAATCGCCAGTTTCTTGTGCTGAAAACTTGGAGGAT-
GATACTCCAAAATCATGGGAACGTTTACTGGCTGCCTTCAACGAGGTTCTCAATAGCTAT

BgHb2-b

ACTAATTTCAACATTGGACTTTCAGAAGCTGACAAAAGCAGCTCTTCAGAGTTCTTGAG-
CAGACTTACAGCTGGAGCCAACGGAAAAAGAAATGCTGGAGTTAGACTTGTCTCTG-
GATGTTTCGACAGTTCCCAACATGCGTGAAAGATT CACCAAATTTAATGCAAGAGAGT-
CAGACGATGCTTTGAAAAACAATGCAGAGTTCCAGAAAACAGGTGGATGTCATTATAG-
GAGGATTTGAGACTCTTATCAACACTGAATGATCCAGCCCTGCTTCAAGATCGTCTGG-
AAAGTTTAGCTGAAGCTCATT TGAATAAGAAGCCAGCCATCGGCAATAACTACTTTGTG-
CCACTCCAGAAGAAAATTAATTTGTTTATTGAACGCACTTGGTGTGAGTTCTGACAGTG-
AAGAAGCCAAGGCCTGGTCTAATTTGGTGGGTGCAT TGAACAGAGTCATCAAAGATCAT

BgHb2-c

GCCGTCAATGCATTTGGCCTTTCAAA CTTAGACAGGGAGTCACTGGT CACATCATGG-
AATCAACTAAAAGCTCGTGATGGCGGAAGTCAA AATGCTGGA ACTAATCTTG TACTT-
TGGATGCTAGAGAGTTCCCAACATGCGTAGCAGGTTTAAACAAGTTCAACGCACGC-
CAGTCAGATGACAACCTGAAGAAAGACGCTGAGTT CAGGAGACAGGTGTCTCTCAT-
CACTGGTGGTCTCGAGTCTTTGATCAACACTCAACAACCCTGATAGACTCCATGACACTTT-
CGAAAGACTAGCCGATGCCCATTTGAACTTGA AACCAAGAGTTGGCCTTGAATACTTCGGG-
CCCCTGCAACAGAGCATCAATGTCTACATTGAAATCTCTTGGTGTCTCATCTGACAGCG-
CGGTCTCTAGATCCTGGACAAGTCTTATCACTGCTTTC AATAACTTCTTGGGAGATAGA

BgHb2-d

ACTGCCTTAAGGATTGTTTTTCGACGACGACAAAAAGGCGCTACAGAGCTCATGGAA-
CAGACTAACAAGTCAAGCTGGAAGCAGCCAGAATGCTGGAATCAACCTTGTACTTTG-
GATGTTGGACAATGCCAACATGCGTGACAGATT CACCAAGTTCAACGGCCACTCTTCT-
GATGAGGCACTGAGGAAAGATA CCGAGTTCC TTAACAAGTGAATGTCATAACAG-
GAGGTCTCGAGTCTCTGATTAACA ACTAACGACGCTGATCAACTCAAGGCAGCTATTG-
AAAGACTGGTGGAAAGTTCATCTGCACATGACACCAAGTGT TGGTCTGGAATATTTCCGGAC-
CACTCCAACAGAACATCAGATTTTACATT CAGAGGCCTTGAAGTCGCGTCTGACAGTGTG-
AAGCCAGAGCCTGGTCACGTGTGCTTCAAGTTTTT AATGAATTCCTTGTGACCCGA

BgHb2-e

ACAATTCAGAAGATTGGACTTTCAGCTACAGATAGGAACTTCTGGCTTCATCTTGG-
AAGCAGTTGAAAGGAAATGGCAATGATCTTGTATTCTGGATGCTCAACAATGTTTCCTAA-
CATGCGGGGACTTTTCCAAATTCAATGCTTTCCAATCTGATGAAGATCTCCAAAAG-
GATGCCGAATTTATTAATCAGAGGAACAACATTATTAGAGGTCTGGATTCCTT-
GATAAACAGCCTGGACAAACCAGGTCAGTCAGAAGACACTTGAGAACCTTGCT-
GATTTCCATTTGGATAAGAAACCAAGAGTCGGACTAGAATTTTTTGGTCCACTA-
CAAAAGTATTCACACCTCTATATTGAGAGCACTCTTAATGTAGCTCCGGAGTGCTG-
AAGCCAGAGCCTGGACCAACTTACTACTGCTTTGAATAATGTCATTAGAGACCAT

BgHb2-f

GCTATTGAAAGACTTGGTCCCACTGCCAATGACAGAAAAGCTCTTGACAGTTCCTGGAG-
AAAACCTCAGATCAGGAGCTGGTGGCAGAAAGAATGCTGGTACTAATCTGGTCCTCTGGATG-
CTGTCCAGTTCCTAACATGCGCAGCCAGTTCAGCAAATTTGATGCTAATCAGCCAGACTC-
CGTCTGAAAGAAAATACTGAGTTTCTGAACCAGGTGGACCGTATTCTTGGGGGCATT-
GAGTCATTGGTCAATCGTCAATGATCCTGTTGCACTTAAAGCAGCCATTGATAAACTGG-
CTGATGCTCATTTGAGCATGCCATCTAGGATTGGTCTTGACTTTTTTCGGACCACTC-
CAACAAAACATTTGCTCAGTACATCCACAGAACTTGGTGTTAGTGCTGACAGTGAT-
GAGTCAAAGGCCTGGCCAGATTTATTTGCTGCCTACAACCTTGTCTTAAAGAACGT

BgHb2-g

ACTGTACTGAAAATTATTTCTGACAATGAAAAAGTTGCACTCAAGAGTTCTTGGAAAG-
CACTTGTGATGCTGCTGGAAGCCAAGAAGGTGCTGCAGTCAATCTGGTTCTCTG-
GATGTTTAAAAATACCCAAAATGCCTGAAAGATTCACAAAATTC AATGGTCTA-
CAATCTGATGATGACCTTAGAAAAGACACTGAGTTTATCAAGCAAGCAAATGATATTG-
CTGGTGGTCTTGTCTTTGGTCAACAACCTGACATCCCAGGCAAACCTCCAGGCAG-
CTATTGACAGACTAGTTGATGTTCAATTTAAATATGAGACCAAGTGTTGGACTGGAATATTT-
TGGGCCACTAGAAGAGAAAATTTGCTCAATACCTGGTTAGGCCTGGGTGCTACTGAAGA-
CAGTAATGAAGCTAAATCATGGACACATTTATTAATGCTTTTAACACAGTCCCTCAGAGAAGAT

BgHb2-h

TCCTTACAAAAAATTGGCCTCTCTGCTATTGATAGGAAATCTCTTGAGAG-
CTCATGGAAACAACTTGCAGATGTTGCTGGAGGAAAGGACAAAGCTGGCA-
CAAACCTTGTTCTCTGGTTGTTGGACAATTGCCAAAATGAGAGAGCGATT-
CACTAAATTC AACGCTTTTTCAGTCAGATGATGCCTTGAGAGCTGATCAAGAATT-
TGTAACCAAGTACAAAGAATTA CT CAGGGAATTGATTCTCTCGTTGACAGT-
CAACAACCCAGCAGGTTTACAATCTGGTATTGAGAGATTGGTTGATGCTCATT-
TGAACATGCAGCCCAGCATTGGCCTTGCTTATTTTGGGTCTGTCCAACAATA-
CATCCATCTTTATGTTGCATACTCTTGGTGTGGCTGCCAACAGTGATGAAGC-
TACATCCTGGACTAACCTTTGGGCTGCTTTCAATAAAGTTCTCAAAGAGCAT

BgHb2-i

TCTCTAGAAAAACTTGG AATCACTGACAATGAAAGAAAAAATCTGGTTAGTTCTTGG-
AAAAGATTGACAACTGAAGCCAATGGTCAGCAAAGTCTCGGAGTCAA ACTAGTTCTCTG-
GATGTTGGACAGTGCCCAATATGCGTGACCAATTCACAAAGTTCAATGCACGCCAATC-
CAATGATGATTTGAAGAGAGATGCTGGCTTTCTGAAACAAGTTAAGAAAATTATTGGAGG-
CTTGGGCTCCTTGGTGGACGTTGAATGATCCTGGACAACCTCAGGCTAACTTGGAGA-
GATTAGCTGGGGTACATTTGAATTTCAATCCCAAGTGTCGGTGTTGAATTTTTTGGAG-
CCTTTAGAAAGTCAAATGGTTCCTTCATTGACAACCTCTTCGTGTGGATAGTAATAGTG-
CCGAGTCTAAGGCCTGGACAAGACTCATTGGTGCCTTTAACAGAGTTCTTAAGGAACAA

BgHb2-j

GCCCTCCAACAGATTGGTATCTCTGACAGTGACAGAAAAGCACTTGCCAGTTCCTGG-
AAGCTATTGACTGCTGGTGAAGATGGTGTCCAAAAGGCTGGAATTAGTTTGGTACTTTG-
GATGTTCAACAGTGCCCAACATGCGCCAAAGATTCACAAAGTTTAAATGCAAACCAGCCA-
GATGATGTTCTGAAAGCTGACCCTGAATTCCTAAAACAGGTGGATGTCATCATTGGTGG-
CCTCAAGTCTTTCTTGGATCGTTGATGATCCAATTGGACTGCAGACCAACATGGATA-
GAGTTGCTGAAGCTCACTTAAGTATGGAGCCAACTGTTGGTGTACCTACTTTAAGG-
CACTTGCTCAGAAGATTGATGCTTTCATTGAAAATCTCTTGGTGTGCCAGGATAGT-
GATGAGTCCCAAGCATGGACAAACTTGCTAACTGCTCAAGAGAATCCTTAGAAACCGT

BgHb2-k

AAAGTACTTAGAAGCATTCTGACAACAATAAATCAGACTTGACAGCTTCCTGGAA-
CAGACTTGTTGAAAAAGCTGGCAGCAGACAAAATGCTGGAGTCAATCTGGTTCTT-
TGGATGTTAGACAATGCCAAACATGCGCAATAAATTTACAAAGTTCAATGCCAACCA-
CCTGACGATGCTTAAGAAACAATGCTGAGTTCCTCAATCAGGTAAACCTTATTGCTG-
GAGGTCTGGAGTCATTGGTCAAGAATTAACAACCCTGGACGTCTCCTTGATGCTCTAG-
AAAGACTTAGTTCTGCTCACTTGAACATGCAGCCAAGTGTGGCCTGGAATATTTCCAG-
CCACTACAACAAAAGATTGCCAGCTACATTGCCAAGCCTTGGAGTGGCTGTAGACAGT-
GATAAAGCTAAGGCATGGTCCAATGTATTGGGTGCTTTTAATACAATCCTTGAATTT

BgHb2-l

AGTTCAGTTGAGAAAATTGGTCTTTCAGACTCTGACAAAGATGCTTTGGTTCAGTTCCTGG-
AACACATTGACAGTTTCAGGTCTAGAAAAAGCTGGAGTTGATTTGGTTTTATGGATGTT-
TGAAAATACCAAACATGAGAAGAAGATTCACCAAGTTTGATGCCACCCAGTCTAATGA-
CAATCTTAAAAATGATGCTGAATTCATTGCCCAATCCAACCGCATTGTGGGAGGACTC-
GACTCTCTGGTTAAAAGTTAACCAACCTGGTGAACCTCCAGGCCAACCTCGAGAAACTTGTG-
GATGTTCACTTGCACCTTGTACCAAGTGTGGTTTTGGAATATTTTGAACCTCTC-
CAACAATACATTCATCTGTATATTGAGAATCCTTGGAGTAAGCTCAAACAGTGTTG-
AAGCCAAGGCCTGGCCTGGCTTGATTCGTGCTTTCACAAAGTTCTCAGGGAACAT

BgHb2-m

TCAGTCAAGAAAATTGGACTTTCAGATTCAGACAGAAAATCTATAGTTAGCTCATGG-
AAAAAAGTTCGCAAGCAGAGCTGGTAGCAAATGAATGCTGGTATTAACCTTGTTCTTTG-
GATGTTGAAAAGTCCCAAGGCACGTGAAAGATTTACAAAATTCATGCTTCCAACCT-
GATGTCGCGTTGGTTAAAGACAAAGTTTTATTGACCAAGTCAATGCCATTGCTAG-
CGGACTAGAGAGTCTGGTCAACAGTAGAAAACCCTGGTTCAGTTCAGGCTGCCTTA-
GAGAGACTGTCCACCCTTCACAAGAACAAGACACCTAGCATTGGACTTGAATACTTTG-
GACCATTCAAAAATACATTCATCTCTATATTGAAAAGTCTGAATGTTGAGCCTGACAGC-
CAAGAACCTAGAGCTTGGTCTAATATGTTTGGCTTCCTTCAACGAAGTTCTCAAACAGTCA

7.3 *BgAChBP1***5'UTR**

AACTCTTTGCTTTGTTATTCTTCCAATTGG

Exon 1

ACCGAGTCAGGAAATAAACACAAAATGGATTTCGTTTCTAGTGGTTCTGATTCTTTGTTTTCTGACACAA

Intron 1

GTAATTTTTATAATATCATTTGTTTGTTCATGAAATAATTTTGAATAATTTATAGAAAG-AATGTTTTCAACTAGTAACAAAACAATCGAAATATTTGTTTTAAAATACTAAAAAACAAAAAC-GACGCATGCATATTGGAAAGAATACTGCAGGAATAAGCTCCTTTTTTTTTATAGAAAA-CAAAAAATTAATTAATATCATTAACATAATTGCTTATTTTATTACTATATTATTATTTAATGT-CATGTAGTGGTATTGACTTTGAATAATTATGCAAAATTTTAACTTCACATATATATTTATT-TACCAGCTGAATATGTTACGACCCGCGCCCTACGACCTTAGTTTGGGTATTGATAATC-TACTGGATTGAATTTAGATCTATGTCAAACCTTGACAATGTTCACTTTATATTTTTTTTATTT-TGCCACGAAAATATTCATATCCAATATAAAAATACTGTGAAAACGGGTTTACCCGATTTGTT-TAAAGGAGTTTCGTTCTTTAATAGAGATACAGTTAGACACTTTTTGTCTATTTTTGGGG-CCCTCCGGTTGTGGGAGGGGCATTAACATGCATTACGGTCTCCGCCACGATCTGAGG-AACTTGCATCCCCCTGAAAATATTAATATATATATATTTATTAATGTATCTCTTTGAACAG

Exon 2

GGATCCTACGGCTCCAGAAGAAGCAGAAGTGAGATTCTTCAAGATGTCCTCAGCAGGTGTAG-CCCTTTAAACATCCCATTGAAGATGACCAGCCAGTCAAAGTGTCAATTTGAATATCCCTG-CAGAAAATTTCCGAGCAGACGTGGAAAACGATGAGGTTGACATTTGGTTTGTGGAC-GACCTTGGTCTGGAAGGACAGATGTCTCAACTGGTTAATGAATTCACCTCCTCAAAGAG

Intron 2

GTTAATCACATAGACTAGTTTTACTATTTGAGAATTGTTTCGATGCATGTTGTG-GATAAGTATCTTTATGTGTCTGAACGAATGGTTTGTCTTTTACATAGAATAATAG-CTTAAATGTTGTAGTTTTTTTTAAATCTATCCCCCTTTCAATTTAAAATCCATTTCT-CAATTTCTTTATTTCTTGTGTGCTTCCACTATTGCAAGGAGACTTCCCGTTGAGCTT-TGCACCATCAAGCACTCCTATTGTCAGTTCATCTAATGATTTCTATACAATTTGTGCG-CAAAAGGTTTCATACGGGTCTTGTATTAATTCAACCCGATGTTGAATACAAAGAAACATT-CAAAGTGAGAAACATTGGAGTTGAGGGATGAAATTCCCGCGTTTTAAAATAATTAGACG-AAAGCCAAATTTCAATCTAAGATTTTACATTTTGAACATTACAACCTAGTCGTGGTGG-CCGAGTGGTAAACGCTTGGCTGCCGAACCGGGTTCGAATCCTGGTGAAGATTTT-GATTTTACTTTGGGGATCTTAAGGGCGCCTCTGAGTCCAACCAGCTCTAACGGGTACCT-GACAATAGTTGGGGAAAGTAAAGGTGGTTGGTTCGTTGTGCTTGCCACATGACACCCT-CGTTAACCTTGGGCCACAGAAACAGATGAACTTTACATCATCTGCCCAAAGATCA-CAAGGTTTGAAGGAGAACTTTACTTAATCTAACGGTCAAACCACAGTTTTTACTGTGG-CTAATTAGGTAGTTATTTTTTAGGTATTTTTTTTAGATATACATAAAATAAATAGGATGACCAT-TAGAGCCGTTTTCGAAATCCCTGTGCATTGCCACTCTCTAATTAACCCACGAAGAGTGTG-CAAGCGAATCTGCTTTAAATACAAAATATAATATTTTTCAAGTACAATGTATAATCTTTGATG-AAACTGGATACAATTTAGCCTTTGTCTTATCTTTGCTATAATCTTTTTTTAATGTCAT-TATAAAAGCTTTGTTTCATGTTTTTTTTAAATCATTTCTTCATATTATAAATAAATAAAGTTAAT-TACTTGTAATAATATATATTTCTAAACAATACAGTATACTTAATATATTTCTTTTTTTTTTCATCAG

Exon 3

TTGACTGTGCCAATTGCAGAAATCTGGACACCAGACATATTCATTTTTGATTCAGTTGG-
CGCCCCGAAATATTTTCAGATAAACTAGCTAGGGTCAGCCAAGATGGTACAGTAACT-
TACGTACCCCAGCTTAAAGTTCGCCTCTCGTGTCCCCTGGCCGACCTGAAGCTTG-
AAACGGGCGTCACTTGCAGCCTTAAGTCCGGATCCTGGACGCACAGTACTCAA-
GAGCTGACCTTGGAGGTTAACGCGAAGGTAGATCTGGGAGACTACGCCTCGGATA-
CAAGATTTTCAGCTGCTGAATGCTACCCAGCAGGTCAACAGGAAACAGTACCCCTG-
CTGCCAGAGACGTATGAAGATGCAACGCTTTCCTTTACGTTTAGAAAACCA

3'ÚTR

TAAAAAAGATTAAATAAATAAAATATCACAAATATCAGAATCGAATT-
CGTTGTATATTATGATGAACGTTGTAAAACGTATCAAATAAAGTTAACCCCTT-
TAAATGAAACCATGATCTAAGAGTCACGACTTCTCACTTTTTATTAAAGAACTT-
CACATAAAATCTTAAGACTAAACATACTTGTATAATACATCTAGAGCTCAG-
CTCCCATTGGATAGAATCTATGTCTATAGACCAGCATTGATTGCAATTCCTATGGAC

Codierender Bereich *BgAChBP1*

TCCAGAAGAAGCAGAAGTGAGATTCTTCAAGATGTCCTCAGCAGGTGTAGCCCTTTAAA-
CATCCCCATTGAAGATGACCAGCCAGTCAAAGTGTCATTTGAATATTCCTGCAGAAAATTTTC-
CGAGCAGACGTGAAAACGATGAGGTTGACATTGGTTTGTGGACGACCTTGGTCTGGAAG-
GACAGATGTCTCAACTGGTTAATGAATTCACTTCCTTCAAAGAGTTGACTGTGCCAATTG-
CAGAAATCTGGACACCAGACATATTCATTTTTGATTCAGTTGGCGCCCCGAAATATTTTCA-
GATAAACTAGCTAGGGTCAGCCAAGATGGTACAGTAACTTACGTACCCCAGCTTAAAGTTCG-
CCTCTCGTGTCCCCTGGCCGACCTGAAGCTTGAAACGGGCGTCACTTGCAGCCTTAAGTC-
CGGATCCTGGACGCACAGTACTCAAGAGCTGACCTTGGAGGTTAACGCGAAGGTAGATCTGG-
GAGACTACGCCTCGGATACAAGATTTTCAGCTGCTGAATGCTACCCAGCAGGTCAACAGGAAA-
CAGTACCCCTGCTGCCAGAGACGTATGAAGATGCAACGCTTTCCTTTACGTTTAGAAAACCA

Aminosäuresequenz *BgAChBP1*

SRRSRSEILQDVLSRCSPLNIPIEDDQPVKVSFEYSLQKIFRADVENDEVDIGLWTTTLVW
KDRCLNWFNEFTSFKELTVPIAEIWTDPDIFIFDSVGAPEIFSDKLARVSQDGTVTYVPQL
KVRLSCLADLKLETGVTCSLKSWSWTHSTQELTLEVNAKVLDLGDYASDTRFQLLNATQQ
VNRKQYPCCPETYEDATLSFTFRKP

7.4 *BgAChBP2***5'UTR**

TGGTCCAGGCTTTTCTACCAATTGAGACTTTGCCTTGAAC

Exon 1

ATG GATTCACTCAAAGTAGTTCTCATTGTTTGTGTTAATATAC

Intron 1

GGTAAAAAAAACATTTTCCATTTTATCAAAGTGTTTCTTAATTCTCACCAATG-
 AAATGTGAACCACCAACATATTGTTGTAACCTCCGCTCCCTCGCCACACTGATAGTG-
 CGCATGAGAGCACCATTGAACACATGAGAAGACATGTTGATATAAGACAGGAAGAAG-
 GACTGTTGTGGATCCGGCTAAAGTGATGGAAGTCTCGAGAGAACGTCCTTTGTGC-
 TATCTATGAACTGTGGACCTGGAGCGGCACTGGGAAGTGTGTCGGTGTCTGTATTGG-
 TAGTTAGGTAGGAAAGGACTGGTTTCACTTGAGATAGGAAATTCTGGGACTT-
 GATGGCTGAAGTCCATGCCTGTTTGTAGTGTAATAAATACCTAGCTTATTCATTGT-
 TACCTACTGCCTTTAGTTGAGTGCCTACCTTAGAGTTACAACAATTGAATGA-
 CAGGTCTGGAAACCACAAATCTCGACCTGTATTCTGACATGTATGCACACTACGCAAGA-
 CAGCAGGGTTTCTGTCCAGGGCTTTTGCAAGAGAGGATTTGAACTTCTCAAGTCCT-
 CACTCTAATTGACTTTAAATAATGATGATGATGATCCGGACTGGTCGTGCCATTTACATA-
 CGGTTGTTTACTGTCCAAATGTTTGTAGCCCATGCTAAAAAGACTCTTCTTTTACAGGC

Exon 2

GGCTCCCATGGCACCAAAAAGAGCAGGGAGGAAATAGTGAAAGAGATTC-
 TAGGCAGAGCTAACCCTAACAAACATTTCCCATTTGTTGACGAGCAGCCTGT-
 CAAAGTGAGTTTCAAGTATTTCCCTGCAAGACATTTACACAGCAGATGTGG-
 GAACTGATCAAGTCGAGCTTGGCCTGTGGTTGGTTCATTAGCTGGAAG-
 GACAGGTCTCTAAGCTGGTCCAACGAGTGCAACCACCTTCAATGAG

Intron 2

GTTAGTTGATATAGAGAACACTAGATTACACTCAACTTTAAACTTAGTTGCTTTACG-
 TACGAAGACAAAGATTGAGAAAATTGAAGCCTCCATTTGGAGCTACTAGATATGGG-
 AAAATATTTAAATGACAGTATATGTTACTGATATCCTGCATTATATATAATGTCTAGGCA-
 TACTGTCTTACTCAGGCGAATCGGGCAATAACATTTTGTCTATGTTCTATTATAAAAT-
 TAGGGCGCTCAGTAGTTGAGTGATTAAGCGCATGGCTTCCGAACCTGGGTCCCTGGGTT-
 CGAATCTCGGTGAAGACTGGGATTTTGAATTTCCGGATTTTAAAGGCGCCCCTGAG-
 CCCACCTAACTCTAATGGGTACCTGACTTTAGTTGGGGAAAGTAAAAGGGGTTGGT-
 CGTTGTGGTGGGCACATGACACGCTGCTCGTTCACCGTTGGCTTTAAAAACAGAT-
 GACCTTAACATCAAGGTCTGAAAGGGGAAACTTTACTTTAACTCTATTTGAACAAGA-
 CAGAGTGCACACTCGAAATAAAGACAGAAAAGTTCAGACTCTTTATTAAGTGATGGC-
 CAATCTATAGCCTCCTCAAACACTGGCCATGTAATTTCCATAGAGTTAAGTCTCTTTAC-
 CGATGTGAATCCTTACAAAATAATCCCTGTTGTCACAATAATAAAGAAAAATGCAATAG-
 CAGTTTCAGCAGTGTATACACTCATGGGCGTAGCCAGGGGGGGGGGGGGGATCCCCC-
 TCCCCAAAAACCCTCCCCGAAAAAAAATCCTGGCTACGCCTATGTATACACTTACTC-
 GATTTGTGCCTCGTAGTCTATTATTCTAATCTTTTTTCCCTCAAGTTTACCCTAAATTTTG-
 CTATTTTAGCGACTAAAAAACATAGAATTTTAGTTTTCTCACTAACTTAGAGGCAGAGTA-
 TAGCTAAGTAAATGCCATGATTTAGTCGCATTTAAAAAATCAAATACAATAAAATTAACGTATT-
 TATCTTTATTAATAGACTTGTCAATTATTTTTCAAAGCTCATATTAACCTCGCTCTGTCTGT-
 CAGTAGGTTAAAAGTTTGAACATGTTTTTTTCTCCCATTTTCCATTTTAAATCAAG-
 CTAGAAGTTTGTACAATTATTCATTGAACATGACAAGACATTAATAAAATTAATGTAA-
 CAATTAGAGGTTAAGTTTATTAATTGCTTGTGATTTGTTTGACATCGAAATAAG-
 GAGAATAAATGCTACTTAATGATAGATGTGTAATGTGTATATATATATATATATATG-
 GATTTTGTCCCCCTATAACGTTTTTGACACGTTTTTTCTCCCTCTTCCCATTCT-
 CGGATCAATTTCAAATTTTGATAATTAATTCATAGTCGATAATAATGCACAAAT-
 CAATCCAATTATTAACCAGTTTTTTAAAAAATCATTTAGTACAAATTAATTAATTT-
 TGTTTTACATAAGAAAAAGGGAGCTAAACCCTGTAATTTTCAGATAAATGGCAG-

TAGTGGTTATTTCCCCTTAAATAAGCTTTGGTTTAAATAAGTATTCATTTTTTTCTATTG-
CTTGTTTTTTTCCCTTGGTATACTTGACTGATACAGTTTCATCTTTTTTTTGTTTAAG

Exon3

TTGACTTTGCCATCAAATACATCTGGTTACCCACATTGAGGTCTACAACCTCTATTGG-
CAAACCGGGGATCCACTCCGACCAACTCGTCAGAGTTTACAAAGATGGCACTGT-
CACCTTCGTCCCGCAGTACACCATACGTTTCTCCTGCGCCTTAGAAAATGTCACCA-
CAGAACAGGGCGCCGCTTGCACCTTAAAGTTTGGACCTTGGACGTACGACGTT-
CGTGACTTGGTCCTGGACGAGAGCCAGCAGGTCGACTTGACCACCTATGCTGG-
CGGGAAAGGTTTTCAGCTGATAGAAGCCAAGCAGAAAGTCAACAAGAAGACCTATC-
CATGCTGCCCCGAGTCTTTCGAGGATATAGAGCTTCGTGTCACCTTCAAAAAATA

3'UTR

TAACTGTAACCTTAGATAAAAACGAAACCCCTGGATAAAAACGAAACCCCTG-
GATAAAAACGAACCCTGGATAAAAACGAAACCTGGATAAAAACGAACCCTGGATAAAAACG-
AACCTGGATAAAAACGAGCACTATCTATTTTGTGTTATAGTGGTGGAT-
CATGTTTGAGGATTCCTACAACCAAGCTGTGAAAACAGTTGCTTCAAACCTTAA-
CAATGTAATCAGCAAAATGTGTAATCAATGTAATACACACTTGTAAGCAATA-
CAATCAACTGAAGCACAGCATAAAVAAAATGTTTGCAAAATTATTTTATACT

Codierender Bereich BgAChBP2

ACCAAAAAGAGCAGGGAGGAAATAGTGAAAGAGATTCTAGGCAGAGCTAACCTAACAA-
CATTCCCATTGTTGACGAGCAGCCTGTCAAAGTGAGTTTCAAGTATTCCTGCAAGA-
CATTACACAGCAGATGTGGGAACTGATCAAGTCGAGCTTGGCCTGTGGTTGGTCAT-
TAGCTGGAAGGACAGGTCTCTAAGCTGGTCCAACGAGTGCACCACCTTCAATGAGTT-
GACTTTGCCATCAAATACATCTGGTTACCCACATTGAGGTCTACAACCTCTATTGG-
CAAACCGGGGATCCACTCCGACCAACTCGTCAGAGTTTACAAAGATGGCACTGT-
CACCTTCGTCCCGCAGTACACCATACGTTTCTCCTGCGCCTTAGAAAATGTCAC-
CACAGAACAGGGCGCCGCTTGCACCTTAAAGTTTGGACCTTGGACGTACGACGTT-
CGTGACTTGGTCCTGGACGAGAGCCAGCAGGTCGACTTGACCACCTATGCTGG-
CGGGAAAGGTTTTCAGCTGATAGAAGCCAAGCAGAAAGTCAACAAGAAGACCTATC-
CATGCTGCCCCGAGTCTTTCGAGGATATAGAGCTTCGTGTCACCTTCAAAAAATA

Aminosäuresequenz BgAChBP2

TKKSREEIVKEILGRANPNNIPVDEQPVKVSFKYSLQDIYTADVGTDQVEL-
GLWLVISWKDRSLSWSNECTTFNELTLPSKYIWLPHIEVYNSIGKPGIHS-
DQLVRVYKDGTVTFVPQYTIRFSCALENVTTTEQGAAC TLKFGPW TYDVRD-
LVLDESQQVDLTTYAGGERFQLIEAKQKVNKKTYPCCPQSFEDIELRVTFKKI

G Literaturverzeichnis

- Ackers, Gary K.; Dalessio, Paula M.; Lew, George H.; Daugherty, Margaret A.; Holt, Jo M. (2002): Single residue modification of only one dimer within the hemoglobin tetramer reveals autonomous dimer function. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (15), S. 9777–9782.
- Afonso, A. M.; Arrieta, M. R.; Neves, A. G. (1976): Characterization of the hemoglobin of *Biomphalaria glabrata* as a glycoprotein. In: *Biochim. Biophys. Acta* 439 (1), S. 77–81.
- Albrecht, C. Kuhn K. Streit B. (2007): You have full text access to this content A molecular phylogeny of Planorbioidea (Gastropoda, Pulmonata): insights from enhanced taxon sampling. In: *Zoologica Scripta*, 2007 (36 (1)), S. 27–39.
- Almeida, A. P. Neves A. G. A. (1974): The hemoglobin of *Biomphalaria glabrata*: Chemical composition and some physicochemical properties. In: *Biochim. Biophys. Acta*, 1974 (371), S. 140–146.
- Antonini, E.; Brunori, M. (1970): Hemoglobin. In: *Annu. Rev. Biochem.* 39, S. 977–1042.
- Arndt, M. H. L. Santoro M.M (1998): Structure of the extracellular haemoglobin of *Biomphalaria glabrata*. In: *Comp. Biochem. Physiol., B*, 1998 (119), S. 667–675.
- Arndt, Márcio H. L.; Oliveira, Cristiano L. P. de; Régis, Wiliam C. B.; Torriani, Iris L.; Santoro, Marcelo M. (2003): Small angle x-ray scattering of the hemoglobin from *Biomphalaria glabrata*. In: *Biopolymers* 69 (4), S. 470–479.
- Baere De, I.; Peutz, M. F.; Kiger, L.; Marden, M. C.; Poyart, C. (1994): Formation of two hydrogen bonds from the globin to the heme-linked oxygen molecule in *Ascaris* hemoglobin. In: *PNAS* (Vol. 91, No. 4), S. 1594–1597.
- Bailly, Xavier; Vanin, Stefano; Chabasse, Christine; Mizuguchi, Kenji; Vinogradov, Serge N. (2008): A phylogenomic profile of hemerythrins, the nonheme diiron binding respiratory proteins. In: *BMC Evol. Biol.* 8, S. 244.
- Banks, G. Kemenes I. Schofield M. O'Shea M. Korneev S. (2009): Acetylcholine binding protein of mollusks is unlikely to act as a regulator of cholinergic neurotransmission at neurite-neurite synaptic sites in vivo. In: *FASEB J*, 2009 (23), S. 3030–3036.
- Bendtsen, Jannick Dyrlov; Nielsen, Henrik; Heijne, Gunnar von; Brunak, Søren (2004): Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. In: *J. Mol. Biol.* 340 (4), S. 783–795.
- Bourne, Yves; Radic, Zoran; Araújo, Rómulo; Talley, Todd T.; Benoit, Evelyne; Servent, Denis et al. (2010): Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (13), S. 6076–6081.

- Bouzat, Cecilia; Gumilar, Fernanda; Spitzmaul, Guillermo; Wang, Hai-Long; Rayes, Diego; Hansen, Scott B. et al. (2004): Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. In: *Nature* 430 (7002), S. 896–900.
- Brejc, K.; van Dijk, W. J.; Klaassen, R. V.; Schuurmans, M.; van der Oost, J.; Smit, A. B.; Sixma, T. K. (2001): Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. In: *Nature* 411 (6835), S. 269–276.
- Bugge, J.; Weber, R. E. (1999): Oxygen binding and its allosteric control in hemoglobin of the pulmonate snail, *Biomphalaria glabrata*. In: *Am. J. Physiol.* 276 (2 Pt 2), S. R347-56.
- Celie, Patrick H. N.; Klaassen, Remco V.; van Rossum-Fikkert, Sarah E.; van Elk, René; van Nierop, Pim; Smit, August B.; Sixma, Titia K. (2005): Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors. In: *J. Biol. Chem.* 280 (28), S. 26457–26466.
- Collazo, Evys; Pietri, Ruth; Jesús, Walleska de; Ramos, Cacimar; Del Toro, Ana; León, Ruth Gretchen et al. (2004): Functional characterization of the purified holo form of hemoglobin I from *Lucina pectinata* overexpressed in *Escherichia coli*. In: *Protein J.* 23 (4), S. 239–245.
- Dalziel, K. O'Brian J. R. P. (1957): Side reactions in the deoxygenation of dilute oxyhaemoglobin solutions by sodium dithionite. In: *Biochem. J.*, 1957 (67 (1)), S. 119–124.
- Dewilde, S.; Winnepeninckx, B.; Arndt, M. H.; Nascimento, D. G.; Santoro, M. M.; Knight, M. et al. (1998): Characterization of the myoglobin and its coding gene of the mollusc *Biomphalaria glabrata*. In: *J. Biol. Chem.* 273 (22), S. 13583–13592.
- Dissous, C.; Grzych, J. M.; Capron, A. (1986): *Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails. In: *Nature* 323 (6087), S. 443–445.
- Drummond, A. J. Ashton B. Buxton S. Cheung M. Cooper A. Duran C. (2011): Geneiousv5.4. Available from <http://www.geneious.com>, 2011.
- Dürr, R. (2008): Rekombinantes Hämocyanin und Hämoglobin aus Schnecken: Herstellung und Analyse von Keyhole limpet-Hämocyanin (KLH) und *Biomphalaria glabrata*-Hämoglobin (BgHb). Dissertation. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Insitut für molekulare Tierphysiologie.
- Everaarts, J. M.; Weber, R. E. (1974): Effects of inorganic anions and cations on oxygen binding of haemoglobin from *Arenicola marina* (Polychaeta). In: *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 48 (3), S. 507–520.
- Fuschiotti, P.; Schoehn, G.; Fender, P.; Fabry, C. M. S.; Hewat, E. A.; Chroboczek, J. et al. (2006): Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. In: *J. Mol. Biol.* 356 (2), S. 510–520.
- Fushitani, K.; Imai, K.; Riggs, A. F. (1986): Oxygenation properties of hemoglobin from the earthworm, *Lumbricus terrestris*. Effects of pH, salts, and temperature. In: *J. Biol. Chem.* 261 (18), S. 8414–8423.
- Gambacurta, A.; Piro, M. C.; Ascoli, F. (1993): Cooperative homodimeric hemoglobin from *Scapharca inaequalis*. cDNA cloning and expression of the fully functional protein in *E. coli*. In: *FEBS Lett.* 330 (1), S. 90–94.

- Gatsogiannis, Christos; Markl, Jürgen (2009): Keyhole limpet hemocyanin: 9-A CryoEM structure and molecular model of the KLH1 didecamer reveal the interfaces and intricate topology of the 160 functional units. In: *J. Mol. Biol.* 385 (3), S. 963–983.
- Gibson, Q. H.; Regan, R.; Olson, J. S.; Carver, T. E.; Dixon, B.; Pohajdak, B.; Sharma, P. K.; Vinogradov, S. N. (1993): Kinetics of ligand binding to *Pseudoterranova decipiens* and *Ascaris suum* hemoglobins and to Leu-29-->Tyr sperm whale myoglobin mutant. In: *JBC* 1993 (268), S. 16993–16998.
- Grisolia, M. L.; Freitas, J. R. de (1985): Physical and chemical characteristics of the habitat of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). In: *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80 (2), S. 237–244.
- Hansen, S. B. Sulzenbacher G. Huxford T. Marchot P. Taylor P. Bourne Y. (2005): res of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. In: *EMBO Journal* 2005, 2005 (24), S. 3635–3646.
- Hansen, Scott B.; Talley, Todd T.; Radic, Zoran; Taylor, Palmer (2004): Structural and ligand recognition characteristics of an acetylcholine-binding protein from *Aplysia californica*. In: *J. Biol. Chem.* 279 (23), S. 24197–24202.
- Hardison, R. C. (1996): A brief history of hemoglobins: plant, animal, protist, and bacteria. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (12), S. 5675–5679.
- Harel, M.; Kasher, R.; Nicolas, A.; Guss, J. M.; Balass, M.; Fridkin, M. et al. (2001): The binding site of acetylcholine receptor as visualized in the X-Ray structure of a complex between alpha-bungarotoxin and a mimotope peptide. In: *Neuron* 32 (2), S. 265–275.
- Harris, Horne (1991): Negative staining. In: Harris J. R. (Ed.): *Electron Microscopy in Biology*. IRL Press., 1991, S. 203–228.
- Hartley, D. L.; Kane, J. F. (1988): Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. In: *Biochem. Soc. Trans.* 16 (2), S. 101–102.
- Hartley, J. L.; Temple, G. F.; Brasch, M. A. (2000): DNA cloning using in vitro site-specific recombination. In: *Genome Res.* 10 (11), S. 1788–1795.
- Hayashi, A.; Suzuki, T.; Shin, M. (1973): An enzymic reduction system for metmyoglobin and methemoglobin, and its application to functional studies of oxygen carriers. In: *Biochim. Biophys. Acta* 310 (2), S. 309–316.
- Herskovits, T. T.; Hamilton, M. G. (1990): The hemoglobin of the aquatic snail, *Planorbella duryi* (Wetherby). In: *Comp. Biochem. Physiol.*, B 95 (2), S. 321–326.
- Herskovits, T. T.; Hamilton, M. G. (1994): The molecular weight and subunit organization of *Helisoma trivolvis* (Say) hemoglobin: light-scattering and scanning transmission electron microscopic studies. In: *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 107 (3), S. 433–441.
- Hino, S.; Ishida, A. (1973): Effect of oxygen on heme and cytochrome content in some facultative bacteria. In: *Enzyme* 16 (1), S. 42–49.

- Hsia, N.; Everse, J. (1996): The cytotoxic activities of human hemoglobin and diaspirin crosslinked hemoglobin. In: *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 24 (5), S. 533–551.
- Huang, Jing; Wang, Hongzhong; Cui, Yu; Zhang, Guiyou; Zheng, Guilan; Liu, Shiting et al. (2009): Identification and comparison of amorphous calcium carbonate-binding protein and acetylcholine-binding protein in the abalone, *Haliotis discus hannai*. In: *Mar. Biotechnol.* 11 (5), S. 596–607.
- Ilan, E. Hammel I. David M. M. Daniel E. (1986): Erythrocrucorin from the aquatic snail *Helisoma trivolvis*. Quaternary structure and arrangement of subunits. In: *Biochemistry*, 1986 (25 (21)), S. 6551–6554.
- Imai, K.; Yoshikawa, S. (1985): Oxygen-binding characteristics of *Potamilla chlorocruorin*. In: *Eur. J. Biochem.* 147 (3), S. 453–463.
- Jackson, Daniel J.; Macis, Luciana; Reitner, Joachim; Degnan, Bernard M.; Wörheide, Gert (2007): Sponge paleogenomics reveals an ancient role for carbonic anhydrase in skeletogenesis. In: *Science* 316 (5833), S. 1893–1895.
- Jones, J. D. (1964): Respiratory gas exchange in the aquatic pulmonate, *Biomphalaria glabrata* (12).
- Jørgensen, Aslak; Kristensen, Thomas K.; Stothard, J. Russell (2004): An investigation of the „Ancyloplanorbidae“ (Gastropoda, Pulmonata, Hygrophila): preliminary evidence from DNA sequence data. In: *Mol. Phylogenet. Evol.* 32 (3), S. 778–787.
- Kantelhardt, Sven R.; Wührer, Manfred; Dennis, Roger D.; Doenhoff, Michael J.; Bickle, Quentin; Geyer, Rudolf (2002): Fuc(α1→3)GalNAc-: the major antigenic motif of *Schistosoma mansoni* glycolipids implicated in infection sera and keyhole-limpet haemocyanin cross-reactivity. In: *Biochem. J.* 366 (Pt 1), S. 217–223.
- Kash, Thomas L.; Jenkins, Andrew; Kelley, Jill C.; Trudell, James R.; Harrison, Neil L. (2003): Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. In: *Nature* 421 (6920), S. 272–275.
- Kastner, Berthold; Fischer, Niels; Golas, Monika Mariola; Sander, Bjoern; Dube, Prakash; Boehringer, Daniel et al. (2008): GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. In: *Nat. Methods* 5 (1), S. 53–55.
- Kavanaugh, Jeffrey S.; Rogers, Paul H.; Arnone, Arthur (2005): Crystallographic evidence for a new ensemble of ligand-induced allosteric transitions in hemoglobin: the T-to-T(high) quaternary transitions. In: *Biochemistry* 44 (16), S. 6101–6121.
- Kiger, L.; Marden, M. C. (2001): Electron transfer kinetics between hemoglobin subunits. In: *J. Biol. Chem.* 276 (51), S. 47937–47943.
- Kloek, A. P.; Yang, J.; Mathews, F. S.; Goldberg, D. E. (1993): Expression, characterization, and crystallization of oxygen-avid *Ascaris* hemoglobin domains. In: *J. Biol. Chem.* 268 (24), S. 17669–17671.
- Krebs, A.; Kuchumov, A. R.; Sharma, P. K.; Braswell, E. H.; Zipper, P.; Weber, R. E. et al. (1996): Molecular shape, dissociation, and oxygen binding of the dodecamer subunit of *Lumbricus terrestris* hemoglobin. In: *J. Biol. Chem.* 271 (31), S. 18695–18704.

- Kuma, F. (1981): Properties of methemoglobin reductase and kinetic study of methemoglobin reduction. In: *J. Biol. Chem.* 256 (11), S. 5518–5523.
- Landy, A. (1989): Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. In: *Annu. Rev. Biochem.* 58, S. 913–949.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H. et al. (2007): Clustal W and Clustal X version 2.0. In: *Bioinformatics* 23 (21), S. 2947–2948.
- LAURELL, C. B. (1965): ANTIGEN-ANTIBODY CROSSED ELECTROPHORESIS. In: *Anal. Biochem.* 10, S. 358–361.
- Lee, N.; Francklyn, C.; Hamilton, E. P. (1987): Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (24), S. 8814–8818.
- León, Ruth Gretchen; Munier-Lehmann, Hélène; Barzu, Octavian; Baudin-Creuz, Véronique; Pietri, Ruth; López-Garriga, Juan; Cadilla, Carmen L. (2004): High-level production of recombinant sulfide-reactive hemoglobin I from *Lucina pectinata* in *Escherichia coli*. High yields of fully functional holoprotein synthesis in the BLi5 *E. coli* strain. In: *Protein Expr. Purif.* 38 (2), S. 184–195.
- Levandoski, M. M.; Lin, Y.; Moise, L.; McLaughlin, J. T.; Cooper, E.; Hawrot, E. (1999): Chimeric analysis of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor reveals amino acids conferring sensitivity to alpha-bungarotoxin. In: *J. Biol. Chem.* 274 (37), S. 26113–26119.
- Lieb, B.; Altenhein, B.; Markl, J. (2000): The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). In: *J. Biol. Chem.* 275 (8), S. 5675–5681.
- Lieb, B.; Altenhein, B.; Markl, J.; Vincent, A.; van Olden, E.; van Holde, K. E.; Miller, K. I. (2001): Structures of two molluscan hemocyanin genes: significance for gene evolution. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (8), S. 4546–4551.
- Lieb, Bernhard; Boisguérin, Valesca; Gebauer, Wolfgang; Markl, Jürgen (2004): cDNA sequence, protein structure, and evolution of the single hemocyanin from *Aplysia californica*, an opisthobranch gastropod. In: *J. Mol. Evol.* 59 (4), S. 536–545.
- Lieb, Bernhard; Dimitrova, Konstantina; Kang, Hio-Sun; Braun, Sabrina; Gebauer, Wolfgang; Martin, Andreas et al. (2006): Red blood with blue-blood ancestry: intriguing structure of a snail hemoglobin. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (32), S. 12011–12016.
- loek, A. P.; Sherman, D. R.; Goldberg, D. E. (1993): Novel gene structure and evolutionary context of *Caenorhabditis elegans* globin. In: *Gene* 129 (2), S. 215–221.
- Loewe, R. (1978): Hemocyanins in Spiders V: fluorimetric recording of oxygen binding curves, and its application to the analysis of allosteric interactions in *Eurypelma californicum* hemocyanin. In: *J. Comp. Physiol.*, 1978 (128), S. 161–168.
- Long, M. Souza S. J. Gilbert W. de (1995): Evolution of the intron-exon structure of eukaryotic genes. In: *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1995 (5), S. 774–778.
- Lund, M. Kjems J. (2002): Defining a 5' splice site by functional selection in the presence and absence of U1 snRNA 5' end. In: *RNA*, 2002 (8), S. 166–179.

- Ma, Zhuojun; Huang, Jing; Sun, Juan; Wang, Guannan; Li, Changzhong; Xie, Liping; Zhang, Rongqing (2007): A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. In: *J. Biol. Chem.* 282 (32), S. 23253–23263.
- Markl, J.; Nour el Din, M.; Winter-Simanowski, S.; Simanowski, U. A. (1991): Specific IgG activity of sera from Egyptian schistosomiasis patients to keyhole limpet hemocyanin (KLH). In: *Naturwissenschaften* 78 (1), S. 30–31.
- Markl, J. & Decker, H. (1992). Molecular structure of the arthropod hemocyanins. In: *Adv Comp Environ Physiol* 13. S. 325-376.
- Markl, Jürgen; Moeller, Arne; Martin, Andreas G.; Rheinbay, Judith; Gebauer, Wolfgang; Depoix, Frank (2009): 10-A cryoEM structure and molecular model of the Myriapod (*Scutigera*) 6x6mer hemocyanin: understanding a giant oxygen transport protein. In: *J. Mol. Biol.* 392 (2), S. 362–380.
- McCormack, Thomas; Petrovich, Robert M.; Mercier, Kelly A.; DeRose, Eugene F.; Cuneo, Matthew J.; Williams, Jason et al. (2010): Identification and functional characterization of a novel acetylcholine-binding protein from the marine annelid *Capitella teleta*. In: *Biochemistry* 49 (10), S. 2279–2287.
- Miyada, C. G.; Stoltzfus, L.; Wilcox, G. (1984): Regulation of the *araC* gene of *Escherichia coli*: catabolite repression, autoregulation, and effect on *araBAD* expression. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81 (13), S. 4120–4124.
- Moeller, Vanessa; Dürr, Ralf; Sarraf-Zadeh, Ladan; Keller, Sabrina; Heinz, Stefanie; Hellmann, Nadja et al. (2011): Recombinant functional multidomain hemoglobin from the gastropod *Biomphalaria glabrata*. In: *IUBMB Life* 63 (5), S. 323–328.
- Nagai, K.; Luisi, B.; Shih, D.; Miyazaki, G.; Imai, K.; Poyart, C. et al. (1987): Distal residues in the oxygen binding site of haemoglobin studied by protein engineering. In: *Nature* 329 (6142), S. 858–860.
- Nicholas, K. B. Nicholas H. B. (1997): Genedock: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. www.psc.edu/biomed/genedoc, 1997.
- Niesen, Frank H.; Berglund, Helena; Vedadi, Masoud (2007): The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. In: *Nat Protoc* 2 (9), S. 2212–2221.
- Niiranen, Laila; Espelid, Sigrun; Karlsen, Christian R.; Mustonen, Milla; Paulsen, Steinar M.; Heikinheimo, Pirkko; Willassen, Nils P. (2007): Comparative expression study to increase the solubility of cold adapted *Vibrio* proteins in *Escherichia coli*. In: *Protein Expr. Purif.* 52 (1), S. 210–218.
- Numoto, Nobutaka; Nakagawa, Taro; Kita, Akiko; Sasayama, Yuichi; Fukumori, Yoshihiro; Miki, Kunio (2008): Structural basis for the heterotropic and homotropic interactions of invertebrate giant hemoglobin. In: *Biochemistry* 47 (43), S. 11231–11238.
- Pesce, Alessandra; Bolognesi, Martino; Bocedi, Alessio; Ascenzi, Paolo; Dewilde, Sylvia; Moens, Luc et al. (2002): Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. In: *EMBO Rep.* 3 (12), S. 1146–1151.

- Peterson, E. S.; Huang, S.; Wang, J.; Miller, L. M.; Vidugiris, G.; Kloek, A. P.; Goldberg, D. E.; Chance, M. R.; Wittenberg, J. B.; Friedman, J. M. (1997): A Comparison of Functional and Structural Consequences of the Tyrosine B10 and Glutamine E7 Motifs in Two Invertebrate Hemoglobins (*Ascaris suum* and *Lucina pectinata*). In: *Biochemistry* (36), S. 13110–13121.
- Philipp-Dormston, W. K.; Doss, M. (1973): Comparison of porphyrin and heme biosynthesis in various heterotrophic bacteria. In: *Enzyme* 16 (1), S. 57–64.
- Read: *Physiologie of Mollusca*. New York Academic Press, Vol. II, 209-291, 1966.
- Rifkind, J. M.; Zhang, L.; Levy, A.; Manoharan, P. T. (1991): The hypoxic stress on erythrocytes associated with superoxide formation. In: *Free Radic. Res. Commun.* 12-13 Pt 2, S. 645–652.
- Rosado-Ruiz, T.; Antommattei-Pérez, F. M.; Cadilla, C. L.; López-Garriga, J. (2001): Expression and purification of recombinant hemoglobin I from *Lucina pectinata*. In: *J. Protein Chem.* 20 (4), S. 311–315.
- Rousselot, Morgane; Delpy, Eric; La Drieu Rochelle, Christophe; Lagente, Vincent; Pirow, Ralph; Rees, Jean-François et al. (2006): *Arenicola marina* extracellular hemoglobin: a new promising blood substitute. In: *Biotechnol J* 1 (3), S. 333–345.
- Royer, W. E.; Knapp, J. E.; Strand, K.; Heaslet, H. A. (2001): Cooperative hemoglobins: conserved fold, diverse quaternary assemblies and allosteric mechanisms. In: *Trends Biochem. Sci.* 26 (5), S. 297–304.
- Salgueiro, S.; Potts, S.; McIlgorm, E. A.; Ansell, K. H.; Hemberger, J.; Güssow, D. (1999): A protein from the salivary glands of the giant Amazon leech with high sequence homology to a nicotinic acetylcholine receptor subunit. In: *Z. Naturforsch., C, J. Biosci.* 54 (11), S. 963–971.
- Sandra Braukmann (2012): 3D-Elektronenmikroskopie des rekombinanten Acetylcholin-Bindeproteins aus der Tellerschnecke *Biomphalaria glabrata*. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für molekulare Tierphysiologie.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12), S. 5463–5467.
- Sarashina, Isao; Yamaguchi, Haruyo; Haga, Takuma; Iijima, Minoru; Chiba, Satoshi; Endo, Kazuyoshi (2006): Molecular evolution and functionally important structures of molluscan Dermatopontin: implications for the origins of molluscan shell matrix proteins. In: *J. Mol. Evol.* 62 (3), S. 307–318.
- Sarraf-Zadeh, L. (2007): Rekombinante Expression von funktionellem Hämoglobin der Posthornsnecke *Biomphalaria glabrata*. Diplomarbeit. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz. Institut für molekulare Tierphysiologie.
- Saur, Michael; Moeller, Vanessa; Kapetanopoulos, Katharina; Braukmann, Sandra; Gebauer, Wolfgang; Tenzer, Stefan; Markl, Jürgen (2012): Acetylcholine-binding protein in the hemolymph of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* is a pentagonal dodecahedron (60 subunits). In: *PLoS ONE* 7 (8), S. e43685.

- Shikama, Keiji; Matsuoka, Arika (2004): Structure-function relationships in unusual nonvertebrate globins. In: *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39 (4), S. 217–259.
- Sixma, Titia K.; Smit, August B. (2003): Acetylcholine binding protein (AChBP): a secreted glial protein that provides a high-resolution model for the extracellular domain of pentameric ligand-gated ion channels. In: *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32, S. 311–334.
- Smit, A. B.; Syed, N. I.; Schaap, D.; van Minnen, J.; Klumperman, J.; Kits, K. S. et al. (2001): A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. In: *Nature* 411 (6835), S. 261–268.
- Smit, August B.; Brejc, Katjusa; Syed, Naweed; Sixma, Titia K. (2003): Structure and function of AChBP, homologue of the ligand-binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 998, S. 81–92.
- Stryer (1997): *Biochemie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Summerford, C. M.; Pardanani, A.; Betts, A. H.; Poteete, A. R.; Colotti, G.; Royer, W. E. (1995): Bacterial expression of Scapharca dimeric hemoglobin: a simple model system for investigating protein cooperatively. In: *Protein Eng.* 8 (6), S. 593–599.
- Suzuki, T. Takagi T. Ohta S.: Primary structure of a dimeric haemoglobin from the deep-sea cold-seep clam *Calyptogena soyoe*. In: *Biochem. J.* 1989 (260(1)), S. 177–182.
- Suzuki, T. Kawamichi H. Ohtsuki R. Iwai M. Fujikura K. (1999): Isolation and c-DNA-derived amino acid sequences of hemoglobin and myoglobin from the deep-sea clam *Calyptogena kaikoi*. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1478 (2000), 1999, S. 152–158.
- Suzuki, T.; Takagi, T.; Ohta, S. (1989): Amino acid sequence of the dimeric hemoglobin (Hb I) from the deep-sea cold-seep clam *Calyptogena soyoe* and the phylogenetic relationship with other molluscan globins. In: *Biochim. Biophys. Acta* 999 (3), S. 254–259.
- Tamura, Koichiro; Peterson, Daniel; Peterson, Nicholas; Stecher, Glen; Nei, Masatoshi; Kumar, Sudhir (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. In: *Mol. Biol. Evol.* 28 (10), S. 2731–2739.
- Terwilliger, N. B. (1998): Functional adaptations of oxygen-transport proteins. In: *J. Exp. Biol.* 201 (Pt 8), S. 1085–1098.
- Terwilliger, N. B.; Terwilliger, R. C.; Schabtach, E. (1976): The quaternary structure of a molluscan (*Helisoma trivolvis*) extracellular hemoglobin. In: *Biochim. Biophys. Acta* 453 (1), S. 101–110.
- Terwilliger, R. C.; Terwilliger, N. B.; Arp, A. (1983): Thermal Vent Clam (*Calyptogena magnifica*) Hemoglobin. In: *Science* 219 (4587), S. 981–983.
- Tsuneshige, A.; Imai, K.; Hori, H.; Tyuma, I.; Gotoh, T. (1989): Spectrophotometric, electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies on the hemoglobin from the marine polychaete *Perinereis aibuhitensis* (Grübe): comparative physiology of hemoglobin. In: *J. Biochem.* 106 (3), S. 406–417.

- Unwin, N.; Miyazawa, A.; Li, J.; Fujiyoshi, Y. (2002): Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits. In: *J. Mol. Biol.* 319 (5), S. 1165–1176.
- van Aardt, W. J. Naude K. (1990): Effects of buffer composition, pH and temperature on oxygen binding by planorbis snail haemoglobins. In: *South African Journal of Zoology*, 1990 (25 (1)), S. 18–25.
- van Holde, K. E.; Miller, K. I. (1995): Hemocyanins. In: *Adv. Protein Chem.* 47, S. 1–81.
- van Holde, K. E.; Miller, K. I.; Decker, H. (2001): Hemocyanins and invertebrate evolution. In: *J. Biol. Chem.* 276 (19), S. 15563–15566.
- Verderber, E.; Lucast, L. J.; van Dehy, J. A.; Cozart, P.; Etter, J. B.; Best, E. A. (1997): Role of the hemA gene product and delta-aminolevulinic acid in regulation of *Escherichia coli* heme synthesis. In: *J. Bacteriol.* 179 (14), S. 4583–4590.
- Vinogradov, S. N.; Walz, D. A.; Pohajdak, B.; Moens, L.; Kapp, O. H.; Suzuki, T.; Trotman, C. N. (1993): Adventitious variability? The amino acid sequences of nonvertebrate globins. In: *Comp. Biochem. Physiol., B* 106 (1), S. 1–26.
- Weber, R. E. (1970): Relations between molecular and functional properties of annelid haemoglobins. In: *L. Comp. Biochem. Physiol.*, 1970 (35), S. 179–189.
- Weber, R. E. (1981): Cationic control of O₂ affinity in lugworm erythrocrurin. In: *Nature*, 1981 (292), S. 386–387.
- Weber, R. E.; Vinogradov, S. N. (2001): Nonvertebrate hemoglobins: functions and molecular adaptations. In: *Physiol. Rev.* 81 (2), S. 569–628.
- Weeke, B. (1973): Crossed immunoelectrophoresis. In: *Scand J Immunol Suppl* 1, S. 47–56.
- Westermann, B. Schmidtberg H. Beuerlein (2005): Functional morphology of the mantle of *Nautilus pompilius* (Mollusca, Cephalopoda). In: *Journal of Morphology*, 2005 (264 (3)), S. 277–285.
- Wilkinson, D. L.; Harrison, R. G. (1991): Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. In: *Biotechnology (N.Y.)* 9 (5), S. 443–448.
- Wood, E. J.; Mosby, L. J. (1975): Physicochemical properties of *Planorbis corneus* erythrocrurin. In: *Biochem. J.* 149 (2), S. 437–445.
- Wu, Q.; Krainer, A. R. (1999): AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. In: *Mol. Cell. Biol.* 19 (5), S. 3225–3236.
- Yin, S.; Bushman, W.; Landy, A. (1985): Interaction of the lambda site-specific recombination protein Xis with attachment site DNA. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (4), S. 1040–1044.
- ZAAIJER, J. J.; WOLVEKAMP, H. P. (1958): Some experiments on the haemoglobin-oxygen equilibrium in the blood of the ramshorn (*Planorbis corneus* L.). In: *Acta Physiol Pharmacol Neerl* 7 (1), S. 56–77.
- Zafar, R. S.; Weber, R. E.; Sharma, P. K.; Vinogradov, S. N.; Walz, D. A. (1993): Purification and characterization of recombinant polymeric hemoglobin P1 of *Glycera dibranchiata*. In: *Protein Expr. Purif.* 4 (6), S. 547–551.

Zeng, H.; Moise, L.; Grant, M. A.; Hawrot, E. (2001): The solution structure of the complex formed between alpha-bungarotoxin and an 18-mer cognate peptide derived from the alpha 1 subunit of the nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. In: *J. Biol. Chem.* 276 (25), S. 22930–22940.

Zeugin, J. A. Hartley J. L. (1985): Ethanol Precipitation of DNA. In: *focus*, 1985 (7 (4)), S. 1–2.

H Danksagung

I Erklärung und Copyright

1 Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz niedergelegt sind, eingehalten.

Datum, Ort

Vanessa Möller

2 Copyright

Die Inhalte dieser Arbeit sind urheberrechtliches Eigentum des Instituts für Zoologie im Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

