



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**3D-Elektronenmikroskopie (3,5 Å) und gerichtete
Mutagenese des dodekaedrischen
Acetylcholin-Bindeproteins der Posthornschncke
*Biomphalaria glabrata***

DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
AM FACHBEREICH BIOLOGIE DER JOHANNES
GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ

vorgelegt von

Kristiane Ann Kathrin Rusitzka

geb. am 12.11.1986 in Worms

Mainz, 15. März 2016
Mainzer Dissertation (D77)

Dekan: [REDACTED]

Erster Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Markl

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Walter Stöcker

Tag der Prüfung: 19. Juli 2016

"Wissen bringt neues Unwissen hervor."
-Terry Pratchett

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
A Einleitung	1
1 Acetylcholin-Bindeproteine	1
1.1 Proteine der Cys-loop-Superfamilie	1
1.2 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren	2
1.3 Acetylcholin-Bindeproteine	3
1.4 Acetylcholin-Bindeproteine in der Familie der Planorbidae	5
2 Zielsetzung	6
B Material und Methoden	8
1 Forschungsobjekte	8
1.1 <i>Biomphalaria glabrata</i>	8
1.2 <i>Planorbarius corneus</i>	9
2 Verwendete Geräte und Chemikalien	10
3 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	11
4 Mikrobiologische Methoden	11
4.1 Bakterienstämme	11
4.2 Plasmidvektoren	11
4.3 Nährmedien	12
4.4 Plattenkultur	12
4.5 Flüssigkultur	12
4.6 Glycerinkultur	12
4.7 Herstellung kompetenter Bakterien	12
5 Molekularbiologische Methoden	13
5.1 Gesamt RNA-Präparation	13
5.2 Primer Design	13

5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
5.4	Gerichtete Mutagenese	15
5.5	DNA-Gelelektrophorese	17
5.6	DNA Extraktion aus Agarosegelen	18
5.7	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	19
5.8	Klonierung	19
5.9	Transformation der Bakterien	20
5.10	Plasmidisolierung	20
6	Proteinbiochemische Methoden	21
6.1	Rekombinante Proteinexpression in Bakterienzellen	21
6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	24
6.3	Hämolymphentnahme	25
6.4	Chromatographische Methoden	26
6.5	Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	27
6.6	Coomassiefärbung von Proteinen	28
6.7	Herstellung von Antiseren	29
6.8	Zweidimensionale Immunelektrophorese	29
6.9	Western-Blotting	31
6.10	Bindungstest mit amorphem Calcium Carbonat	33
7	Thermofluor	34
8	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	34
8.1	Elektronenmikroskope	36
8.2	Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie	36
9	Bioinformatische Methoden	39
9.1	Computerausstattung	39
9.2	Software	39
9.3	Transkriptomanalyse	41
9.4	Bildverarbeitende Methoden	41
C	Ergebnisse	50
1	Isolierung und Charakterisierung von Proteinen aus der Hämolymphe von <i>B. glabrata</i>	50
2	Rekombinante Expression von <i>BgAChBP1</i>	57
3	Rekombinante Expression von <i>BgAChBP2</i>	62

4	3D-Rekonstruktion der Apo-Struktur des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders	66
4.1	Einpassen eines pseudoatomaren Homologiemodells	73
5	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP2</i> -Dipentamers	76
5.1	3D-Rekonstruktion eines Dipentamers aus <i>BgAChBP1</i> mit 6x Histidin-Affinitäts-Tag (<i>His-Tag</i>)	79
6	Bindung von amorphem Calciumcarbonat an rekombinantes <i>BgAChBP</i> . .	83
7	Gerichtete Mutagenese von <i>BgAChBP1</i>	86
7.1	<i>BgAChBP1</i> -R2G und <i>BgAChBP1</i> -R2A	87
7.2	<i>BgAChBP1</i> -R3G und <i>BgAChBP1</i> -R3A	89
7.3	<i>BgAChBP1</i> -C16/C64G und <i>BgAChBP1</i> -C16/C64A	91
7.4	<i>BgAChBP1</i> -E24A	93
7.5	<i>BgAChBP1</i> -R63A	94
7.6	<i>BgAChBP1</i> -E70G und <i>BgAChBP1</i> -E70A	95
7.7	<i>BgAChBP1</i> -F71G und <i>BgAChBP1</i> -F71A	97
8	Gerichtete Mutagenese an <i>BgAChBP2</i>	100
8.1	<i>BgAChBP2</i> -C71F	100
9	Zweidimensionale Immunelektrophorese mit <i>BgAChBP</i>	101
10	Untersuchung der Hämolympheproteine von <i>Planorbarius corneus</i>	106
10.1	Transkriptomanalyse von <i>PcAChBP</i>	115
10.2	3D-Rekonstruktion des <i>PcAChBP</i>	117
D	Diskussion	120
1	Natives <i>BgAChBP1</i> und <i>BgAChBP2</i>	120
2	Unidentifiziertes Protein X aus <i>B. glabrata</i>	121
3	Rekombinantes <i>BgAChBP1</i>	121
4	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders	123
5	Mutagenese-Experimente	125
6	Rekombinantes <i>BgAChBP2</i>	130
7	Versuche zur Bindung von ACC an rekombinantes <i>BgAChBP1</i> und <i>BgAChBP2</i>	134
8	Untersuchung der Hämolympheproteine aus <i>Planorbarius corneus</i>	135
E	Zusammenfassung	143
F	Literaturverzeichnis	144

Danksagung	153
Abbildungsverzeichnis	156
Tabellenverzeichnis	159
Anhang	160
1 Verwendete Puffer und Lösungen	160
1.1 Mikrobiologische Methoden	160
1.2 Molekularbiologische Methoden	160
1.3 Proteinbiochemische Methoden	161
1.4 Polyacrylamidelektrophorese	164
1.5 Lösungen für die Elektronenmikroskopie	166
2 Verwendete Primer	166
3 Aminosäuresequenzen der <i>BgAChBP1</i> und <i>BgAChBP2</i> Mutanten	168
4 Überprüfung der Expression der <i>BgAChBP</i> -Mutanten	171
4.1 Agarosegel der Mutagenese-PCR des <i>BgAChBP1-R2G</i>	171
4.2 SDS-PAGE von <i>BgAChBP1-E70G</i>	172
4.3 SDS-PAGE von <i>BgAChBP2-C71F</i>	173
5 Sequenzen von <i>PcAChBP1</i> , <i>PcAChBP2</i> und <i>PcAChBP3</i> aus der Transkriptomanalyse	173

Abkürzungsverzeichnis

3D-EM	3D-Elektronenmikroskopie
ACC	amorphes Calciumcarbonat
ACCBP	amorphes Calciumcarbonat bindendes Protein
AChBP	Acetylcholin-Bindeprotein
<i>B. glabrata</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>
BSA	Rinderserumalbumin
C _s	sphärische Aberation
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (<i>charge-coupled device</i>)
CCF	Kreuz-Korrelations-Funktion (<i>cross correlation funktion</i>)
CTF	Kontrast-Transfer-Funktion (<i>contrast transfer function</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
FEG	Feldemissions-Elektronenquelle (<i>field emmission gun</i>)
FFT	schnelle Fourier-Transformation (<i>fast Fourier transformation</i>)
FSC	Fourier Schalen Korrelation (<i>Fourier Shell Correlation</i>)
Hb	Hämoglobin
Hc	Hämocyanin
His-Tag	6x Histidin-Affinitäts-Tag

kb	Kilobasen
LB	<i>lysogeny broth</i>
MMP	Magermilchpulver
MRA	Multi-Referenz-Alignment
MSA	Multivariate statistische Analyse (<i>Multivariate statistical analysis</i>)
nAChR	nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
Ni-Sepharose	Nickel-Sepharose
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OD	optische Dichte
<i>P. corneus</i>	<i>Planorbarius corneus</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered Saline Tween</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEV	Tabakätzvirus
TSS	<i>Transformation and storage solution</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis (<i>signal to noise ratio</i>)
SOC	<i>super optimal broth</i> mit Glucose
U	<i>Units</i>
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung

A Einleitung

1 Acetylcholin-Bindeproteine

Acetylcholin-Bindeproteine (AChBP) sind in Mollusken vorkommende Homologe der extrazellulären Domäne des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors (nAChR). Dieser wird aufgrund seiner zentralen physiologischen und medizinisch-pharmakologischen Bedeutung intensiv untersucht und die AChBPs spielen dabei aufgrund ihrer Wasserlöslichkeit eine große Rolle. AChBP und nAChR sind Pentamere (Abb. 1). Das von uns untersuchte AChBP aus der Posthornschnecke *Biomphalaria glabrata* weicht davon ab, indem hier 12 Pentamere zu einem Dodekaeder angeordnet sind (Saur et al., 2012). Diese Schneckenart dient dem Pärchenegel *Schistosoma mansoni*, dem Bilharzioseerreger, als Zwischenwirt (Review: Arneric et al., 2007; Review Sixma and Smit, 2003) und ist aufgrund dieser medizinischen Bedeutung sehr gut untersucht.

1.1 Proteine der Cys-loop-Superfamilie

Bei Proteinen der Cys-loop Superfamilie, zu denen auch der nikotinische Acetylcholin-Rezeptor und das Acetylcholin-Bindeprotein gehören, handelt es sich um eine große Gruppe ligandengesteuerter Ionenkanäle (Review: Karlin, 2002). Auch Serotoninrezeptoren Typ 3 (5-HT₃), γ -Aminobuttersäure-Rezeptoren Typ A (GABA_A) sowie Glycin-Rezeptoren (GlyR) gehören zu dieser Superfamilie (Review: Hucho and Weise, 2001). Allgemein spielen diese Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen Nervenzellen unter Zuhilfenahme von Transmittern oder bei der Übersetzung chemischer Signale in elektrische Signale (Review: Lester et al., 2004). Strukturell handelt es sich in der Regel um ringförmige Homo- oder Heteropentamere mit einem zentralen hydrophilen Kanal, wobei die einzelnen Untereinheiten nicht kovalent miteinander verbunden sind (Review: Sine and Engel, 2006). Der Aufbau gliedert sich in eine pentamere extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne mit 5x4

Transmembran-Helices sowie eine kleine intrazelluläre Domäne. Die namensgebende Cystein-Schleife liegt dabei in der extrazellulären Domäne und besteht aus zwei konservierten Cysteinen mit einem Abstand von 13 Aminosäuren (Review: Sine and Engel, 2006). Außerdem befinden sich fünf aktive Zentren in der extrazellulären Domäne (Review: Karlin, 1993; Review Miller and Smart, 2010). Diese liegen an der Kontaktfläche zwischen den einzelnen Untereinheiten. Innerhalb der *Cys-loop* Superfamilie werden die Ligandenbindungsstellen von der konservierten, "prinzipiellen Seite" aus aromatischen Aminosäuren sowie einer variablen "komplementären Seite" gebildet (Celie et al., 2005) (Abb. 2A).

1.2 Nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren

Die ligandengesteuerten und membranständigen nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren werden mit Krankheiten wie Alzheimer, Schizophrenie und Nikotinabhängigkeit in Verbindung gebracht und sind dadurch von großem medizinischen Interesse. Die präsynaptische Zelle schüttet Transmitter aus, welche durch den synaptischen Spalt diffundieren und an Rezeptoren der postsynaptischen Zellmembran binden. Infolgedessen öffnet oder schließt sich der zentrale Ionenkanal des Rezeptors, wodurch die Leitfähigkeit der Membran und das Potential der postsynaptischen Zelle reguliert wird. Die Ionenkanäle können durch ein breites Spektrum an Liganden gesteuert und durch viele Inhibitoren gehemmt werden. Zu den wichtigsten Liganden zählen Acetylcholin und Nikotin. Die wichtigsten Hemmstoffe sind verschiedene tierische Gifte.

Der bekannte nAChR an der neuromuskulären Endplatte besteht aus zwei α -Untereinheiten mit je einer Ligandenbindungsstelle und drei Untereinheiten vom Typ β , γ , δ oder ϵ . Während der Embryonalentwicklung wird die δ -Untereinheit im nAChR am Muskel durch eine ϵ -Untereinheit ersetzt. Bei nAChR des zentralen Nervensystems handelt es sich meist um Heteropentamere aus α - und β -Untereinheiten (Review: Karlin, 2002). Bisher sind beim Menschen insgesamt neun unterschiedliche α -Untereinheiten (α_2 - α_{10}) sowie drei unterschiedliche β -Untereinheiten (β_2 - β_4) bekannt. In einigen Fällen kommen auch Homopentamere aus α -Untereinheiten vor (Review: Leonard and Bertrand, 2001).

Die hochauflösende strukturelle Untersuchung der nAChR gestaltet sich als schwierig, da die Transmembrandomäne des Rezeptors hydrophobe Eigenschaften aufweist und

dadurch die Kristallisation erschwert wird. Die erste Strukturaufklärung mithilfe der 3D-Elektronenmikroskopie gelang am nAChR des Zitterrochens *Torpedo marmorata* (Unwin, 2005) (Abb. 1A). Die Gesamtlänge des Rezeptors beträgt 160 Å, wobei die extrazelluläre Domäne 60 Å misst. Der Eingang des zentralen hydrophilen Kanals hat einen Durchmesser von 25 Å.

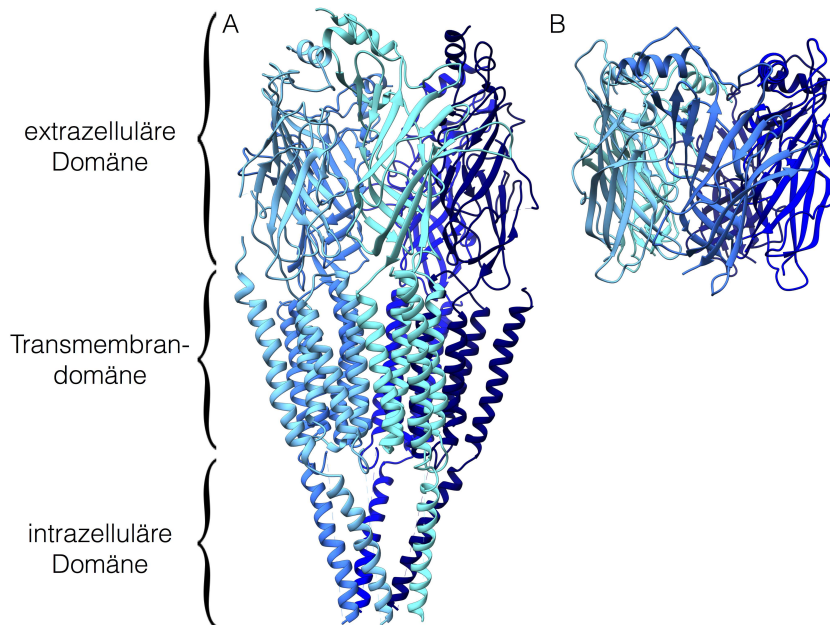


Abb. 1: Nikotinischer Acetylcholinrezeptor (nAChR) und Acetylcholin-Bindeprotein (AChBP). (A) Der membrangebundene nAChR des Zitterrochens *Torpedo marmorata* (PDB-ID: 2BG9). (B) Das wasserlösliche AChBP der Süßwasserschnecke *Lymnaea stagnalis*. Ein Homolog zur extrazellulären Domäne des nAChR (PDB-ID: 1I9B).

1.3 Acetylcholin-Bindeproteine

Die wasserlöslichen Acetylcholin-Bindeproteine sind homolog zur extrazellulären α_7 -Untereinheit des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors vom neuronalen Typ (Brejc et al., 2001; Smit et al., 2001). Daher sind strukturelle und funktionelle Untersuchungen am AChBP auf nAChR übertragbar (Review: Shahsavari et al., 2016). Die erste kristallographisch aufgeklärte Struktur stammt von der Spitzschlamm-Schnecke *Lymnaea stagnalis* (Abb. 1B) (*LsAChBP*) (Brejc et al., 2001; Smit et al., 2001). Dieses AChBP hat eine Sequenzidentität von nur 24% mit der α_7 -Untereinheit des neuronalen nAChR, aber eine ganz ähnliche Tertiärstruktur (siehe Abb. 1). Die Tertiärstruktur besteht aus

zehn β -Faltblättern, die durch die Schleifen L1-L10 miteinander verbunden sind. Die L3-Schleife, die auch als *MIR-loop* (engl: "main immunogenic region") bezeichnet wird, stellt im nAChR ein Epitop der neuromuskulären Autoimmunerkrankung Myasthenia gravis dar (Review: Tzartos et al., 1991). Die L7-Schleife bildet den *Cys-loop* und eine weitere cysteininhaltige Schleife findet sich in Form der L10-Schleife (*C-loop*). Im Gegensatz zu den nAChR, bei denen der *Cys-loop* die Verbindung zwischen extrazellulären Ligandenbindedomäne und Transmembrandomäne herstellt und einen hydrophoben Charakter aufweist (Kash et al., 2003; Unwin et al., 2002), weist der *Cys-loop* aufgrund des Fehlens der Transmembrandomäne einen hydrophilen Charakter auf (Hansen et al., 2004). N-terminal gelegen befindet sich eine α -Helix (Abb. 2A). Fünf dieser Untereinheiten bilden das für AChBP typische Pentamer (Abb. 2B).

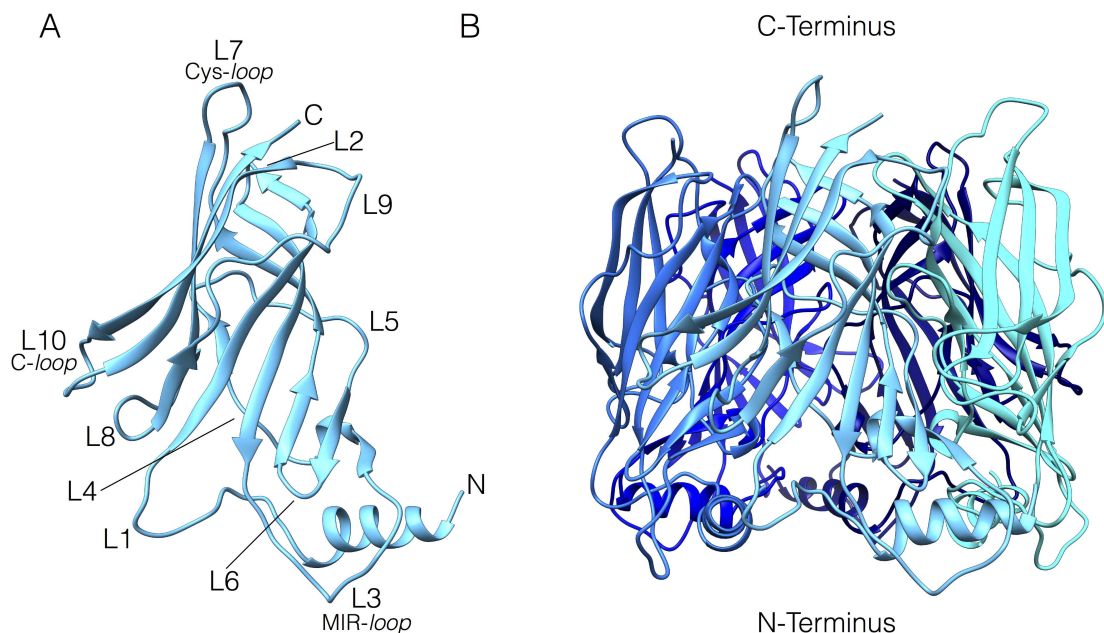


Abb. 2: Homologiemodell des BgAChBP1 (PDB-ID: 4AOD). (A) Homologiemodell einer Untereinheit mit Bezeichnung der einzelnen Schleifen L1-L10. (B) Seitenansicht eines Pentamers.

Acetylcholin-Bindeproteine wurden auch bei anderen Mollusken, bei dem Blutegel *Haementeria ghiliani*, der Spinne *Cupiennius salei* sowie bei einem Anneliden gefunden (Salgueiro et al., 1999; Brejc et al., 2001; Smit et al., 2001; Celie et al., 2005; Hansen et al., 2004; Huang et al., 2009; McCormack et al., 2010; Torkkeli et al., 2015).

Es gibt verschiedene Hypothesen über die biologische Funktion des AChBP bei

Mollusken. *In vitro* wurde gezeigt, dass AChBP als Regulator bei der synaptischen Übertragung dient. Die erregte Gliazelle sezerniert eine basale Konzentration an AChBP in den synaptischen Spalt. Acetylcholin erregt die Postsynapse sowie gliale nAChR. Dadurch sezerniert die Gliazelle in den synaptischen Spalt mehr AChBP, das Acetylcholin bindet. Die synaptische Signalübertragung kann auf diese Weise präzise reguliert werden (Smit et al., 2001).

Eine zweite Hypothese zur biologischen Funktion beruht auf histologischen Untersuchungen an *Lymnaea stagnalis*. Die AChBP produzierenden Zellen wurden hierbei in der Umgebung neuronaler Zellkörper gefunden (Banks et al., 2009). Dies bedeutet, dass das AChBP dort eine regulierende Funktion bei der nicht-synaptischen Übertragung hat.

Beim Seeohr *Haliothis discus hannai* und bei der Perlmuschel *Pinctada fucata* wurde ein Protein gefunden, das eng mit AChBP verwandt ist. Dieses Protein zeigt neben einer pentameren auch eine dipentamere Quartärstruktur. Es ist in der Lage, amorphes Calciumcarbonat zu binden und es damit an der willkürlichen Kristallisation in der Hämolymphe oder in der extrapallialen Flüssigkeit zu hindern (Huang et al., 2009; Ma et al., 2007). Die extrapalliale Flüssigkeit ist der dünne Flüssigkeitsfilm zwischen Mantel und Schale der Schnecke. Diese Form des AChBP, auch als Calciumcarbonat bindendes Proteine (ACCBP) bezeichnet, dient offenbar der Regulation der Schalenbildung.

Sowohl nAChR als auch AChBP binden selektiv an eine Vielzahl von Agonisten und Antagonisten (Brejc et al., 2001; Hansen et al., 2005). Dazu zählen auch Phytotoxine, wie sie in Algen vorkommen und dort dem Schutz vor Fraßfeinden dienen. AChBP könnte also der Schnecke einen evolutionären Vorteil bieten, indem das Protein ihr ermöglicht, eigentlich giftige Algen fressen zu können (Bourne et al., 2010).

1.4 Acetylcholin-Bindeproteine in der Familie der Planorbidae

Auch innerhalb der Familie der Planorbidae (Tellerschnecken) finden sich AChBPs. In der Unterfamilie Bulininae tritt es als Pentamer auf (Celie et al., 2005). Bereits 1975 wurde ein rosettenförmiges Protein in der zur Unterfamilie der Planorbinae gehörenden Schnecke *Planorbarius corneus* beschrieben (Wood and Mosby, 1975). Ebenso wurden dodekaederförmige Proteine in der Hämolymphe der Schnecken *Helisoma trivolvis* (Terwilliger et al., 1976; Illan et al., 1986; Herskovits and Hamilton, 1994) und *Planorbella duryi* (Herskovits and Hamilton, 1990) gefunden. Diese

Arten zählen alle wie *B. glabrata* zum gleichen Subtaxon (Jorgensen et al., 2004; Albrecht et al., 2007). Dieses etwa 20 nm große Protein wurde als extrazelluläres Hämoglobin aufgefasst (Terwilliger et al., 1976). Hierzu ist zu bemerken, dass die Planorbiden anders als alle anderen Schnecken als respiratorisches Protein anstatt Hämocyanin ein multimeres Hämoglobin besitzen (Wilbur and Yonge, 1966; Lieb et al., 2006). Unserer Arbeitsgruppe gelang es, in der Schnecke *Biomphalaria glabrata* mittels immunochemischer Untersuchungen und UV-Spektren zu zeigen, dass es sich bei dem "Rosettenprotein" nicht um Hämoglobin handelt (Lieb et al., 2006). Mit Sequenzvergleichen und 3D-Elektronenmikroskopie konnte dann gezeigt werden, dass es sich hier um ein dodekaedrisches Acetylcholin-Bindeprotein handelt (Saur et al., 2012). Bei *B. glabrata* kommt AChBP in zwei Isoformen mit jeweils 205 Aminosäuren und einer Molekülmasse von 25 kDa (31 kDa glykosiliert) vor. *BgAChBP1* stellt eine Besonderheit dar, weil es sich hierbei um eine ikosaedrische Assemblierung von zwölf Pentameren und damit von 60 Untereinheiten zu einem Dodekaeder handelt. Eine solche Struktur ist außerhalb der Planorbidae unter den Acetylcholin-Bindeproteinen nicht bekannt. *BgAChBP2* bildet Pentamere und ist möglicherweise in der Lage, Dipentamere zu bilden (Saur et al., 2012), wie es auch vom Amorphen Calciumcarbonat-Bindeprotein (ACCBP) bekannt ist (Ma et al., 2007; Huang et al., 2009). Das AChBP ist in der Hämolymphe von *B. glabrata* nur in kleinen Mengen vorhanden. 95 % der Hämolymphe bestehen aus Hämoglobin, bei nur 5% handelt es sich um AChBP und Hämocyanin (Lieb et al., 2006).

2 Zielsetzung

Im Bezug auf die dodekaedrische Struktur des AChBP aus *B. glabrata* sollte zuerst untersucht werden, ob es sich dabei um ein *BgAChBP1*-Homooligomer handelt oder ob *BgAChBP2* daran beteiligt sein kann. Auch sollte die Frage geklärt werden, welche Aminosäuren an der Ausbildung und Stabilisierung dieser Quartärstruktur beteiligt sind. Dabei wurden die von Saur et al. (2012) postulierten Interaktionsmöglichkeiten als Ausgangspunkt für Mutagenesestudien gewählt (Abb. 3). Der Dodekaeder mit seiner Größe und hohen Symmetrie bietet sich auch für die 3D-Elektronenmikroskopie an, anhand derer das bestehende pseudo-atomare Homologiemodell verfeinert werden sollte. *BgAChBP2* sollte ebenfalls genauer untersucht werden, insbesondere hinsichtlich seiner

Möglichkeit Dipentamere zu bilden. Gleichzeitig sollte das bestehende Protokoll zur Expression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins für beide Isoformen weiter verbessert werden, vor allem um die Bildung amorpher Aggregate des *BgAChBP2* zu verringern. Um Anhaltspunkte über die Funktion des AChBP in *B. glabrata* zu finden, sollte untersucht werden, ob die beiden Isoformen in der Lage sind, amorphes Calciumcarbonat zu binden und so am Schalenaufbau beteiligt sein könnten.

Ferner sollte geklärt werden, ob auch bei *Planorbarius corneus* als weiterem Vertreter der Planorbidae ebenfalls zwei Isoformen des Proteins in der Hämolymphe vorhanden sind.

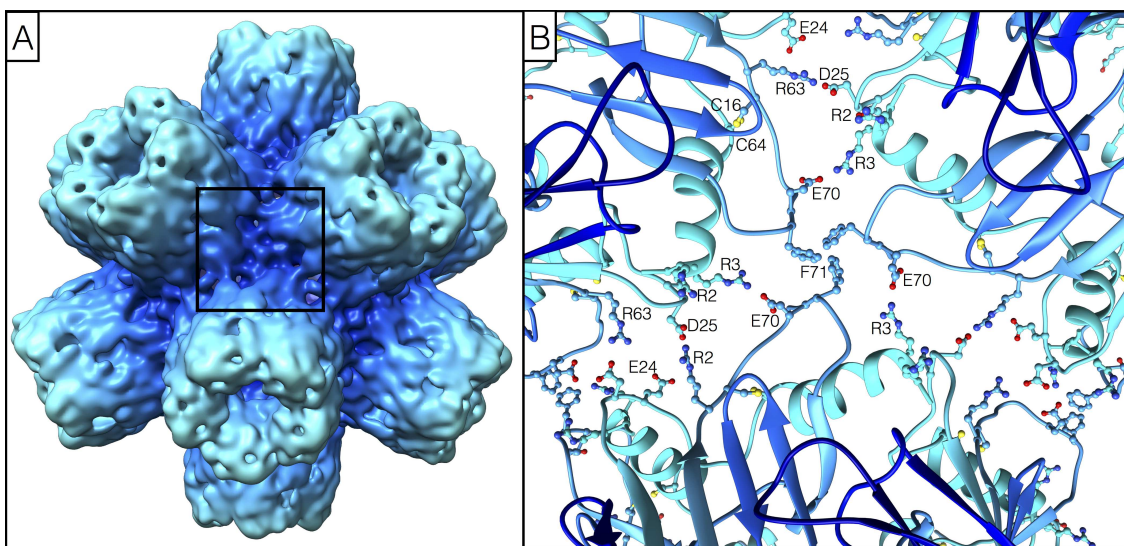


Abb. 3: 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP1*-Dodekaeders. (A) 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP1*-Dodekaeders (EMDB: 2055). Kontaktstelle zwischen drei Pentameren (schwarzer Kasten). (B) Aminosäuren innerhalb der Kontaktstelle zwischen drei Pentameren, die an der Bildung des Dodekaeders beteiligt sein könnten und als Grundlage für die Mutagenesestudien herangezogen wurden.

B Material und Methoden

1 Forschungsobjekte

1.1 *Biomphalaria glabrata*



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

Abb. 4: *Biomphalaria glabrata*

Bei *B. glabrata* handelt es sich um eine 1-2 cm große Süßwasserschnecke, die in ruhigen oder langsam fließenden, pflanzenreichen Sümpfen und Tümpeln subtropischer und tropischer Klimate beheimatet ist. Die Gewässer können auch zeitweise austrocknen. Hochwasserstände ermöglichen es den hermaphroditen Tieren neue Lebensräume zu besiedeln. Die Schnecken können neun bis zwölf Monate alt werden. Die rote Farbe und das linksgewundene, scheibenförmige Gehäuse sind charakteristisch für *B. glabrata*.

Durch den hohen Hämoglobingehalt in der Hämolymphe erscheinen die Tiere rot. Unter den *Gastropoda* (Schnecken) nutzen nur die *Planorbidae* (Tellerschnecken) Hämoglobin als respiratorisches Protein. Hämocyanin konnte nur in kleinen Mengen nachgewiesen werden und ist vermutlich nicht am Sauerstofftransport beteiligt (Lieb et al., 2006).

Als Zwischenwirt des Pärchenegels *Schistosoma mansoni*, dem Erreger der in den Tropen verbreiteten Bilharziose, erlangte *B. glabrata* auch medizinisches Interesse

(Smithers and Terry, 1965; Lemos, 1999). Der Parasit befindet sich in der Schnecke im Sporozystenstadium und bildet dort Zerkarien, die ins Wasser ausgeschieden werden. Als Endwirt dient hauptsächlich der Mensch, bei dem sich der Trematode nach Penetration der Haut und im Venensystem aufhält.

Die Schnecken wurden bei einer Wassertemperatur von 20 °C in Süßwasserbecken gehalten und 3-4 mal pro Woche gefüttert. Je nach Größe wurden sie in verschiedene Anzuchtbecken umgesetzt.

Zur Präparation wurden ausschließlich große (bis ca. 2 cm), adulte Tiere ausgewählt. Vor der Hämolymphentnahme wurden sie zur Betäubung auf Eis gelegt. Zur Gewinnung der Hämolymphe wurde der Fuß der Tiere mit einer Kanüle penetriert, sodass die austretende Hämolymphe mit einer Pipette abgesaugt werden konnte. Nach erfolgter Entnahme wurden die Tiere durch einen mechanischen Schlag getötet.

1.2 *Planorbarius corneus*



Stamm:	Molusca
Klasse:	Gastropoda
Überklasse:	Orthogastropoda
Unterklasse:	Heterobranchia
Überordnung:	Pulmonata
Ordnung:	Basommatophora
Familie:	Planorbidae
Gattung:	<i>Planorbarius</i>
Art	<i>Planorbarius corneus</i>

Abb. 5: *Planorbarius corneus*

Planorbarius corneus (*P. corneus*) lebt vorzugsweise in stehendem oder langsam fließendem Gewässer. Ihr dickwandiges Gehäuse ist linksgewunden und weist einen Durchmesser von bis zu vier Zentimetern auf. Damit handelt es sich um die größte einheimische Tellerschneckenart. Die Farbe des Schneckenhauses variiert zwischen verschiedenen Brauntönen. Die Schnecken können drei bis vier Jahre alt werden.

Die Tiere wurden in Süßwasserbecken bei einer Wassertemperatur von 20 °C gehalten und 2-3 mal pro Woche gefüttert. Zur Präparation wurden ausschließlich große, adulte Tiere ausgewählt. Vor der Hämolymphentnahme wurden sie zur Betäubung auf Eis

gelegt. Zur Gewinnung der Hämolymphe wurde der Fuß der Tiere mit einer Kanüle penetriert, sodass die austretende Hämolymphe mit einer Pipette abgesaugt werden konnte. Nach erfolgter Entnahme wurden die Tiere durch einen mechanischen Schlag getötet.

2 Verwendete Geräte und Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Biozym Scientific GmbH (Hessisch-Oldendorf), Fluka (Buchs), GE Healthcare (München), Gilson Inc. (Middleton, USA), Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München), Whatman GmbH (Dissel). Die 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäße wurden von Thermo Fisher Scientific (Schwerte), die 1,5 und 2 mL Reaktionsgefäße von Brand (Wertheim) und die Petrischalen und Falcons von der Firma Greiner (Heidelberg). Es wurden Tischzentrifugen der Firma Eppendorf (Hamburg; Modelle 5415R und 5424) verwendet. Für größere Volumina wurden eine Megafuge (1.0 R) von Heraeus (Fulda) und eine Sorvall (RC-5B) Zentrifuge von Du Pont Instruments (Bad Homburg) genutzt. Wägearbeiten wurden mit Analyse- und Laborwaagen der Firma Mettler (Giessen) durchgeführt. pH-Wert Bestimmungen wurden mit dem Digital-pH-Meter 646 der Firma Knick (Berlin) durchgeführt. Wasserbäder und Heizblöcke stammen von Julabo (Seelbach). Die Sonifikation der Proben erfolgte mit dem Ultraschallgenerator Labsonic 1510 von B.Braun (Melsungen) mit einer Titansonde. Die Elektrophoresekammern inklusive des Zubehörs stammen von der Firma Biotec Fischer (Reiskirchen), die Apparaturen zur Durchführung der Western-Blots von der cti (Idstein). Für die Durchführung der Immunelektrophorese wurden Geräte der Firma Pharmacia (Stockholm) benutzt. Alle photometrischen Messungen wurden mit einem Biophotometer von Eppendorf (Hamburg) sowie an einem Ultraspec 2100 Pro von Amersham Biosciences (Freiburg) vorgenommen. Desweiteren stand ein Nanodrop 1000 (Thermo Fisher scientific, Wilmington, USA) zur Verfügung. Es wurden die Thermocycler T Gradient 96 und T Personal Combi (Biometra GmbH, Göttingen) verwendet. Die Agarosegele wurden mit einem UV-transilluminator TFX-20 M (Vilber

Lorumat GmbH, Eberhart-Zell) und einer Sony XC-75E S/W camera (Sony, Berlin) dokumentiert.

Die Zusammensetzungen der beschriebenen Puffer und Lösungen sind im Anhang aufgelistet.

3 Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Alle molekular- und mikrobiologischen Arbeiten sowie Arbeiten in der Zellkultur wurden mit autoklavierten Geräten durchgeführt (120 °C, 1 bar Überdruck). Soweit notwendig wurde autoklaviertes, entmineralisiertes Wasser verwendet. Bei allen Arbeiten mit RNA wurde bidestilliertes Wasser mit 0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat), gestopfte Pipettenspitzen und RNase freie Plastikgefäße verwendet. Für Arbeiten mit Chemikalien wie Acrylamid oder Ethidiumbromid und den entsprechenden Gelen wurden Nitrilhandschuhe getragen.

4 Mikrobiologische Methoden

4.1 Bakterienstämme

E. coli XL1-Blue competent cells (Klonierungsbakterien, Agilent, Böblingen).

E. coli DH5 α TM (Klonierungsbakterien, Invitrogen, Darmstadt).

E. coli BL21-AITM (Expressionsbakterien, Invitrogen, Darmstadt).

4.2 Plasmidvektoren

pDONORTM 221 (Invitrogen, Darmstadt): 4,7 Kilobasen (kb); Kanamycin Resistenz; Gateway Eingangsvektor.

pDESTTM 14 (Invitrogen, Darmstadt): 6,4 kb; Ampicillin Resistenz; Gateway Expressionsvektor.

4.3 Nährmedien

Die Zusammensetzungen der Medien finden sich im Anhang (siehe Anhang 1.1). Alle Medien wurden vor ihrer Verwendung bei 1 bar und 120 °C autoklaviert. Nach dem autoklavieren wurde das noch flüssige LB-Agar in Petrischalen gefüllt. War das Medium auf ca. 55 °C abgekühlt, wurde es mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, um so ein selektives Wachstum der Bakterien zu ermöglichen. Die gegossenen Platten und Medien wurden bei 4 °C gelagert.

4.4 Plattenkultur

Die Bakteriensuspension aus einer Transformationsreaktion (siehe 5.9) oder einer Glycerinkultur (siehe 4.6) wurde unter sterilen Bedingungen auf eine LB-Agar Platte ausgestrichen. Die Platten waren mit Antibiotika (der Resistenz des Vektors entsprechend) versetzt worden. Die beimpften Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.5 Flüssigkultur

Für die Flüssigkultur wurden einzelne Bakterienkulturen mit einer sterilen Pipettenspitze von den über Nacht inkubierten Platten (siehe 4.4) gepickt und in 5 ml LB-Medium überführt. Dem Medium wurde Antibiotika passend zur Resistenz des Vektors beigemischt. Die Flüssigkultur wurde bei schräger Lage und 37 °C mit 200 *rounds per minute* (rpm) über Nacht geschüttelt.

4.6 Glycerinkultur

Zur Herstellung von Glycerinkulturen wurden 500 µL der Bakterienkultur mit der gleichen Menge Glycerin versetzt und gut vermischt. Diese Kulturen konnten über längere Zeit bei –80 °C gelagert werden.

4.7 Herstellung kompetenter Bakterien

Um *E. coli*-Stämme chemisch kompetent zu machen (Chung et al., 1989), wurde eine Flüssigkultur (siehe 4.5) bei 6000 rpm 20 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen

und das Pellet im gleichen Volumen an *Transformation and storage solution* (TSS) resuspendiert. Bei 37 °C und 200 rpm wurde die Kultur inkubiert, bis eine optische Dichte (OD) von ₆₀₀ von 0,3-0,4 erreicht war. Die Bakterien werden bei 6000 rpm 20 min abzentrifugiert und das resultierende Pellet in 1/10 Volumen an TSS-Medium resuspendiert. Die auf diese Weise kompetent gemachten Bakterien wurden in 100 µL Aliquots bei –80 °C aufbewahrt.

5 Molekularbiologische Methoden

5.1 Gesamt RNA-Präparation

Für die RNA-Präparation wurden die Tiere zur Betäubung etwa 30 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die Hämolymphe entnommen und die Schale vorsichtig entfernt. Nachdem das Gewicht der Tiere bestimmt wurde, wurden die Tiere in flüssigen Stickstoff (–196 °C) schockgefroren und in einem autoklavierten Keramikmörser pulverisiert. Das so gewonnene Gewebe wurde sofort weiter verwendet.

Gesamt RNA wurde mit dem RNA-Aufreinigungskit "Maxwell[®]16 Total RNA Purification Kit" (Promega, Madison, USA) nach dem Protokoll zur RNA-Extraktion aus Geweben im Maxwell 16-Gerät (Promega, Madison, USA) isoliert. Die so gewonnene RNA wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

Die Sequenzierung der Gesamt-RNA wurde von StarSEQ GmbH in Mainz durchgeführt.

5.2 Primer Design

Bei der Auswahl der Primersequenzen wurde darauf geachtet, dass die Oligonukleotide optimalerweise eine Länge von 15-25 Basen und einen GC-Gehalt von 40-60% aufwiesen. Die Primer sollten nicht selbstkomplementär sein oder stabile Haarnadelstrukturen ausbilden und es sollte auch keine Komplementarität zwischen dem *forward*- und dem *reverse*-Primer geben. Bei allen Primerpaaren wurde darauf geachtet, dass die *Annealing*temperaturen zueinander passen. Die Primer wurden mit dem OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) und dem Programm Geneious 5.6.7 (Drummond et al., 2011) überprüft.

Alle Primer wurden lyophilisiert von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Sie sind im Anhang 2 aufgelistet. Sie wurden in einer Konzentration

von 100 μM in bidestilliertem Wasser gelöst und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Für Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Reaktionen wurden jeweils 10 pmol *forward*- und *reverse*-Primer eingesetzt.

5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch die Methode der PCR lassen sich definierte Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Abschnitte amplifizieren. Künstlich hergestellte Oligonukleotid-Primer, die als Ausgangspunkt für die DNA-Polymerase dienen, definieren dabei den zu amplifizierenden Bereich.

Die Polymerase-Kettenreaktion besteht aus mehreren aufeinander abfolgenden Schritten. Im ersten Schritt wird zur Denaturierung die doppelsträngige *template*-DNA auf $95\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt, sodass sich die beiden Stränge voneinander trennen und die so einzelsträngig gewordene DNA für die Bindung der Primer zugänglich ist. Während des *annealings* wird die Temperatur auf $5\text{ }^\circ\text{C}$ - $10\text{ }^\circ\text{C}$ unter die Schmelztemperatur der Primer gesenkt, damit diese mit der DNA-Sequenz hybridisieren. Nun folgt die Elongation bei der die freien 3'-OH Enden der angelagerten Primer als Ausgangspunkt dienen. Die thermostabilen DNA-Polymerasen synthetisieren in Anwesenheit von Desoxynukleosidtriphosphat (dNTP) zur DNA-Matrize komplementäre Stränge. Je nach Polymerase variiert die Temperatur bei diesem Schritt zwischen $68\text{ }^\circ\text{C}$ und $72\text{ }^\circ\text{C}$, die Dauer dieses Schrittes wird der Geschwindigkeit der verwendeten Polymerase angepasst. Dieser dreistufige Zyklus wird 17-35 mal wiederholt. Nach dem letzten Zyklus erfolgt eine finale Elongation, die 7-10 min beträgt und bei der nicht vollständige Amplifikate aufgefüllt werden. Die verwendeten Polymerasen sind im Folgenden aufgeführt.

Phusion™ High-Fidelity DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt)

Diese Polymerase leitet sich von der DNA-Polymerase aus *Pyrococcus woesei* ab. Sie besitzt eine 3'-5' Exonuklease Aktivität (*proofreading*) sowie eine zusätzliche prozessivitätssteigernde Domäne. Die Polymerase verfügt über eine hohe Thermostabilität, sodass Denaturierungs-Temperaturen von $98\text{ }^\circ\text{C}$ (30 sec bis 1 min) verwendet werden können. Ebenso benötigt sie mit 30 sec/kb kurze Elongationszeiten. Die Amplifikate besitzen *blunt ends*. Durch ihre hohe Genauigkeit eignet sich diese Polymerase für die Amplifikation längerer Templates.

Taq™ DNA Polymerase Invitrogen (Darmstadt) Diese Polymrase wurde ursprünglich aus dem hitzestabilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 72 °C. Um die optimalen Bedingungen für die jeweilige Reaktion ermitteln zu können, wurden unterschiedliche Verhältnisse an Enzym-, MgCl₂- und dNTP-Konzentrationen eingesetzt.

5.4 Gerichtete Mutagenese

Der gerichteten Mutagenese liegt das Protokoll des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (La Jolla, Californien) zugrunde.

Primer Design zur gerichteten Mutagenese

Die Sequenzen der Mutagenese-Primer wurde so gewählt, dass die zu mutierende Stelle zentral in der Sequenz lag. Um die Bindung des Primers an den DNA Strang zu stabilisieren, sollten zu beiden Seiten der Mutation etwa 12 Basen liegen. Der Mutagenese Primer hat demnach eine Mindestlänge von 25 Basen und beginnt und endet vorzugsweise mit einem Guanin (G) oder Cytosin (C). Es wurde ein komplementäres Primerpaar ausgewählt. Die Auswahl der Primer erfolgte über das Web-basierte Programm PrimerX (<http://www.bioinformatics.org/primerx/>). Die dort vorgeschlagenen Primer wurden außerdem mit dem OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) überprüft und dessen Position mit dem Programm Geneious 5.6.7 validiert.

Alle Mutationen werden nach folgendem Schema benannt: z.B. BgAChBP1-R2G; BgAChBP1 mit einer Mutation an Position 2, an der im Wildtyp Arginin sitzt, welches durch Glycin ersetzt wird.

Mutagenese-PCR

Bei der Mutagenese-PCR wurde als *Template*-DNA ein Vektor mit einkloniertem Gen verwendet. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass diese DNA methyliert war um sie in einem späteren Schritt aus dem Ansatz entfernen zu können. Hierfür wurde auf den Bakterienstamm XL1-Blue zurückgegriffen. Die einzelnen Komponenten des PCR-Ansatzes waren abhängig vom verwendeten Template. Aufgrund ihrer Geschwindigkeit und ihrer hohen Genauigkeit wurde die Phusion™ High-Fidelity

B Material und Methoden

DNA-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt) für alle Mutagenesen verwendet. Im Folgenden ist ein allgemeingültiges Pippetierschema für alle durchgeführten Mutagenesen zu sehen.

Master-Mix (für 2 Ansätze)

5 x Phusion HF Puffer	22,5 μ L
10 mM dNTPs	2,25 μ L
Template DNA	2,25 μ L
DMSO (5 %)	3,37 μ L
H ₂ O	74 μ L

pro Ansatz 47,5 μ L Mastermix	
+ 1 μ L	1:10 for. Primer
+ 1 μ L	1:10 rev. Primer
+ 1 μ L	Phusion TM

Das PCR-Programm wurde abhängig von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts und der verwendeten Polymerase eingestellt. Im Folgenden ist ein Standard-PCR-Programm aufgeführt, einzig die *Annealing*-Temperatur (x in 5.4) wurde für jedes Primerpaar angepasst. Bei der Auswahl der *Annealing*-Temperatur wurden pauschal 5 °C-7 °C von der, vom Hersteller angegebenen, Schmelztemperatur des Primers abgezogen.

95 °C	1 min	
95 °C	30 sec	x 17
X °C	45 sec	
72 °C	5 min	
72 °C	7 min	
4 °C	∞	

Dpn1 Verdau

Um die *Template*-DNA aus dem PCR Produkt zu entfernen, wurde das Plasmid im Vorfeld in *E. coli* des Stammes XL1-Blue inkloniert und aus diesen präpariert. Somit war die *Template*-DNA methyliert und konnte durch das Restriktionsenzym Dpn1 (New

England Biolabs, Frankfurt) entfernt werden. Hierzu wurden 45 μL des PCR Produkts mit 1 μL Dpn1 für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Um die Mutagenese-PCR zu überprüfen, wurde das PCR-Produkt vor und nach der Behandlung mit Dpn1 auf ein Agarosegel aufgetragen. Abb. 6 zeigt eine schematische Zeichnung des Agarosegels nach erfolgtem Dpn1 Verdau.

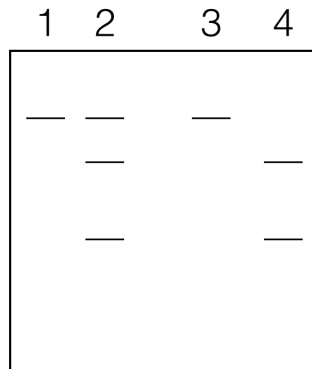


Abb. 6: Schematische Zeichnung des Agarosegels nach Dpn1-Verdau. 1%iges Agarosegel mit PCR-Produkt und PCR-Produkt nach Dpn1-Verdau. Spuren 1 und 3 PCR-Produkt vor Dpn1-Verdau. Spuren 2 und 4 PCR-Produkt nach Verdau. Erfolgreiche PCR durch eine Bande mit gleicher Größe wie Template gekennzeichnet, weitere Banden stammen von verdauten Fragmenten.

Die Spuren 1 und 3 in Abb. 6 zeigen das PCR-Produkt vor dem Dpn1-Verdau. In den Bahnen 2 und 4 liegt das Produkt nach dem Dpn1-Verdau vor. Bei einer erfolgreichen PCR ist eine der Banden im verdauten PCR-Produkt genauso groß wie das Template, außerdem sind im Gel weitere Banden zu sehen, die von verdauten Fragmenten des Templates stammen (vgl. Abbildung 6 Bahnen 1 und 2). Ist die Bande der unverdauten Kontrolle und des PCR-Produkts nicht auf der gleichen Höhe, sondern es sind nur die deutlich kleineren Fragmente im Gel aufgetrennt worden, so war die Mutagenese nicht erfolgreich (vgl. Abb. 6 Bahnen 3 und 4).

5.5 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese dient der Auftrennung und Isolierung linearer DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht. DNA ist aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückrats negativ geladen und wandert im elektrischen Feld zur Anode. Je nach Größe der Nukleinsäuren unterscheidet sich die Wandergeschwindigkeit, wobei

kürzere Fragmente schneller wandern als längere. In dieser Arbeit wurden horizontale Gele verwendet, deren Agarosekonzentration bei 1% lag. Bei Agarose, welche aus Rotalgen gewonnen wird, handelt es sich um ein Polysaccharid aus D-Galaktose und 3,6 Anhydro-L-Galaktose. Das Gel wirkt wie ein Molekularsieb. Um die DNA sichtbar machen zu können, wurden den Gelen Ethidiumbromid (Nachweisgrenze: 25-50 ng DNA) zugegeben. Die Ethidiumbromidmoleküle interkalieren mit den Basenpaaren des DNA-Doppelstrangs und verändern so das Anregungsspektrum des Ethidiumbromids. Die violette Fluoreszenz kann unter Ultraviolettstrahlung (UV-Strahlung) bei 254-366 nm sichtbar gemacht werden. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer gelöst und mit Ethidiumbromid versetzt. Die etwas abgekühlte Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in der Laufkammer (Biotec Fisher, Reiskirchen) mit Elektrophoresepuffer (1x TBE) bedeckt. Die Proben wurden mit Beladungspuffer (6x Loading Dye, Fermentas, St.Leon-Rot) versetzt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Zur Abschätzung der Größe wurde ein DNA-Marker als Größenstandard aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 500 mA. Die Dokumentation wurde mittels eines Geldokumentationssystems der Firma Peqlab (Erlangen) mit angeschlossener Kamera (Sony, Berlin) durchgeführt.

5.6 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA-Probe durch die Elektrophorese konnte die gewünschte Bande ohne Nebenprodukte aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA extrahiert werden. Hierzu wird die Bande mit einem Skalpell unter UV-Strahlung-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, wobei darauf zu achten ist zügig zu arbeiten, da die Strahlung durch seine kurze Wellenlänge die DNA schädigt. Zur Aufreinigung wurde das GeneJet™ Gel Extraction Kit der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Das Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet. Im ersten Schritt wird das ausgeschnittene Gelstück in der gleichen Menge Puffer bei 55 °C-60 °C im Wasserbad geschmolzen. Die entstandene Lösung wurde auf Säulen mit Silicatgel-Membran aufgetragen. An diese Membran wurde die DNA unter Hochsalzbedingungen reversibel gebunden. Nach mehrmaligen Waschschritten und der Trocknung der Membran konnte die DNA mit Wasser eluiert werden.

5.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Aussagen über Quantität und Qualität der vorliegenden DNA-Proben konnten über die gemessene Extinktion an einem Nanodrop 1000 (Thermo Fisher scientific, Wilmington, USA) getroffen werden. Hierzu wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen. Um Aussagen über die Qualität der Aufreinigung treffen zu können, wurde die Extinktion bei 280 nm gemessen. Eine Extinktionseinheit von A_{260} entspricht 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Das Verhältnis zwischen A_{280} und A_{260} gibt einen Wert für die Verunreinigung der DNA mit Protein an und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Das Verhältnis zwischen A_{260} und A_{230} sollte kleiner als 1,8 sein und gibt die Verunreinigung mit organischen Stoffen wie z.B. Phenolen oder Alkoholen an.

5.8 Klonierung

Durch Klonierung können DNA-Abschnitte in einen Vektor eingebracht werden (Ligation). Dieses Plasmid kann in eine Wirtszelle transformiert werden, um das gewünschte DNA-Fragment zu vervielfältigen.

Die Gateway™ Klonierung

Bei der Gateway™ Klonierung handelt es sich um eine universelle Klonierungsmethode, die auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ basiert (Landy, 1989). Homologe Sequenzen (*attachment-sites*) werden hierbei, unter Beibehaltung des richtigen Leserasters und der Orientierung, in unterschiedliche Vektoren einkloniert (Hartley et al., 2000).

Zusätzlich zur Gensequenz wurde N-terminal eine Erkennungssequenz für die Tabakäzavirus (TEV)-Protease sowie ein *His-Tag* einkloniert um nach erfolgter Proteinaufreinigung den *His-Tag* proteolytisch entfernen zu können. Plasmide mit dem Konstrukt für AChBP1-His-TEV sowie AChBP2-His-TEV stammten aus der Dissertation von Möller (2012) und wurden mir zur Verfügung gestellt.

5.9 Transformation der Bakterien

Die Transformation dient dazu, Plasmide in Bakterien einzubringen. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit Hitzeschock und chemisch kompetenten Bakterienzellen gearbeitet.

Um Plasmide in die Bakterien einzubringen, wurden je nach Bakterienstamm unterschiedliche Mengen an Bakteriensuspension verwendet (Tab. 4).

Je nach Konzentration des Plasmids wurden 1 μL -5 μL DNA zu den Bakterien gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec durchgeführt. Die Zellen wurde direkt für 2 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde mit SOC Medium versetzt (Tab. 4) und für 1 h-2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Es wurden unterschiedliche Mengen auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Klone, die das Plasmid aufgenommen hatten, konnten durch die enthaltene Antibiotikaresistenz wachsen und am nächsten Tag in einer Flüssigkultur (siehe 4.5) vermehrt werden.

Tab. 4: Übersicht über Transformation verschiedener Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Bakteriensuspension [μL]	SOC-Medium [μL]
<i>E. coli</i> XL1-Blue competent cells (Agilent, Böblingen)	100	900
<i>E. coli</i> DH5 α TM (Invitrogen, Darmstadt)	50	950
<i>E. coli</i> BL21-AI TM (Invitrogen, Darmstadt)	100	250

5.10 Plasmidisolierung

Die Plasmide wurden mit dem GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, St. Leon Rot) aus den Bakterien der Flüssigkultur isoliert. Diesem Protokoll liegt die alkalische Lyse der Bakterien sowie die reversible Bindung von DNA an die HiBind-Silikamenbranen zugrunde. Bakterielle DNA ist nach Denaturierung nicht in der Lage zu renaturieren und kann auf diese Weise gemeinsam mit bakteriellen Proteinen und Zellbestandteilen abzentrifugiert werden. Die Plasmid-DNA bindet unter Hochsalzbedingungen reversibel an die Membran. Nach mehrmaligen Waschschr

und der Trocknung der Membran konnte die Plasmid-DNA mit Wasser eluiert werden. Die DNA-Konzentration wurde anschließend, wie in Abschnitt B5.7 beschrieben, bestimmt.

6 Proteinbiochemische Methoden

6.1 Rekombinante Proteinexpression in Bakterienzellen

Expression in Bakterienzellen

Die rekombinante Expression von Proteinen bietet den Vorteil, dass man mit relativ geringem Zeit- und Kostenaufwand größere Mengen an Protein herstellen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Stamm des Darmbakteriums *E. coli* namens BL21-AI als Expressionsbakterium herangezogen. In diesem Bakterienstamm kann das Zielgen durch eine T7 Ribonukleinsäure (RNA)-Polymerase abgelesen werden, welche durch den T7-Promoter des Vektors kontrolliert wird. Die Bakterien verfügen chromosomal über das T7-RNA-Polymerase-Gen auf einem arabinosekontrolliertem Locus. Durch die Zugabe von L-Arabinose kann die Expression induziert werden (Lee et al., 1987).

Nachdem der Vektor mit dem gewünschten Gen in die Bakterien transformiert wurde (siehe 5.9), konnte die entstandene Flüssigkultur in einen Liter LB-Medium mit 0,5 % Ampicillin überführt werden. Die Bakterien wurden unter Schütteln mit 220 rpm bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert, bis die optische Dichte (OD₆₀₀) zwischen 0,75 und 0,8 lag. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 10 mL 20%-L-Arabinose induziert. Als Negativkontrolle wurde eine 200 mL Bakterienkultur unter den gleichen Bedingungen angesetzt, die nicht induziert wurde. Die Expression erfolgte unter Schütteln bei 25 °C über Nacht.

Ernte und Aufbrechen der Bakterienzellen

Die Bakterien wurden zur Ernte bei 5000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und vom Überstand getrennt. Das so gewonnene Bakterienpellet konnte bei -20 °C eingefroren oder direkt weiter bearbeitet werden. Um die Bakterienzellwände mechanisch aufzubrechen, wurden sie 5 mal abwechselnd in einem 42 °C Wasserbad aufgetaut und bei -80 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zu den Zellpellets wurden 100 mL

Lysispuffer mit 10 mg Lysozym gegeben und solange gevortext, bis das Pellet vollständig gelöst war. Anschließend wurde die Suspension für eine Stunde auf Eis inkubiert.

DNA und RNA-Verdau

In der Suspension enthaltene bakterielle DNA und RNA wurde durch die Zugabe von 2500 *Units* (U) Benzonase[®]Nuclease pro 100 mL Suspension und Inkubation für 15 min bei 37 °C und anschließende halbstündige Inkubation auf Eis enzymatisch abgebaut. Die Einschlusskörperchen, in denen das exprimierte Protein vorlag, konnten durch 40 minütiges zentrifugieren bei 5000 rpm und 4 °C pelletiert werden.

Aufbrechen der Einschlusskörperchen

Um die Einschlusskörperchen aufzuschließen, wurden die Pellets in je 30 mL Bindungspuffer unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff, 1 mM β -Mercaptoethanol) gelöst und sonifiziert. Die Sonifikation erfolgte durch Schallwellen mit einer hohen Amplitude durch einen Ultraschallgenerator mit Titansonde (Labsonic 1510 von B.Braun, Melsungen) bei einer Leistung von 200-300 V. Die Proben wurden 12 mal abwechselnd je 30 Sekunden sonifiziert und auf Eis gekühlt. Bei der Sonifikation entstehen durch die auf die Flüssigkeit übertragenen Schallwellen kleine Blässchen, die durch den Druckunterschied zerplatzen und so die Membranen aufreißen. Die hierbei entstehende Wärme wird durch die Inkubation auf Eis abgeführt. Membranfragmente und bakterielle Trümmer wurden durch 15 minütiges zentrifugieren bei 2500 rpm bei 4 °C pelletiert und konnten so entfernt werden.

Affinitäts-Chromatographie

Um das exprimierte Protein aus der Lösung zu extrahieren, verfügt das Konstrukt über einen N-terminalen *His-Tag*. Als Säulenmaterial wurde Ni-Sepharose[™] 6 Fast Flow (GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Hierbei handelt es sich um stark vernetzte polymere Agarose, die chelatierte Nickelionen trägt, an die Histidine reversibel binden können. Das Säulenmaterial wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. Die vorbereitete Proteinlösung (siehe 6.1) wurde mit der Nickel-Sepharose-Lösung vereint und 60-90 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken inkubiert. Diese Lösung wurde in eine Glassäule gegeben um so die Flüssigkeit abfließen zu lassen

(Durchfluss). Das an die Säulenmatrix gebundene Protein verblieb hierbei in der Säule. Um sicherzustellen, dass ungebundenes Protein vollständig aus der Säule ausgespült wurde, wurde die Säule mit dem fünffachen Volumen an Waschpuffer (= Bindepuffer) gewaschen. Um die Bindung des Proteins an die Trägermatrix zu lösen, wurden 40 mL Elutionspuffer zugegeben. Das in diesem Puffer enthaltene Imidazol verdrängt konzentrationsbedingt die Histidine von den Bindungsstellen an der Trägermatrix. Proben aller drei Schritte wurden nachfolgend mittels SDS-PAGE analysiert (B6.5).

Faltung

Da die Proteine nach Elution von der Nickel-Säule (siehe 6.1) als Monomere in denaturierendem Puffer vorliegen, ist es notwendig sie zu renaturieren und die Faltung zu unterstützen. Die kontrollierte Entfernung denaturierender Agenzien, die Schaffung spezifischer Faltungsbedingungen sowie die Vermeidung von Aggregationen sind wichtige Voraussetzungen für Bildung der nativen Konformation.

Die Proteinlösung wurde über eine Econo pump EP-1 (Bio-Rad, München) mit einer Geschwindigkeit von 0,2 mL/min in den Renaturierungspuffer eingetropft, sodass die Proteinendkonzentration am Ende bei 30 µg/mL lag. Hierbei war darauf zu achten, dass der Faltungspuffer ständig gerührt wurde, sodass sich beim Eintropfen keine großen, mit bloßem Auge sichtbaren, Proteinaggregationen bildeten.

Aufkonzentrierung der Proteinlösungen

Ultrafiltrationsrührzelle Für die meisten biochemischen Analysen ist eine Mindestkonzentration notwendig, die über der Endkonzentration nach der Faltung (B6.1) liegt. Aus diesem Grund wurde die Proteinlösung mit einer Ultrafiltrationsrührzelle (Modell 8400, Merck Millipore, Darmstadt) und Ultrafiltrationsscheiben mit einer Porengröße von 10 kDa unter Rühren in einer Stickstoffatmosphäre mit einem Gasüberdruck von 2-4 bar filtriert.

Filtrationsröhrchen Zur Konzentrierung der Proben nach der Auftrennung durch die Chromatographie-Säulen (siehe 6.4) wurde ein Amicon[®] Ultra 15 mL oder 0,5 mL Zentrifugenröhrchen mit 10-100 kDa verwendet. Hierbei wird die Probe auf eine Membran gegeben, die anschließend zentrifugiert wird. Die Probe wird gegen die Membran gedrückt und Partikel, die kleiner als die angegebene Porengröße sind,

gelangen hindurch.

Das Filtrationsröhrchen wurde 3x mit Tris-Puffer gewaschen. Dafür wird die Membran mit dem Puffer überschichtet und je 5 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Anschließend wird die Probe auf die Membran gegeben und ebenfalls bei 4 °C und 3000 rpm solange zentrifugiert, bis die Probe auf das gewünschte Volumen eingengt ist. Abschließend wird die optische Dichte (OD₂₈₀) gemessen.

Dialyse

Um einen schonenden Pufferaustausch vorzunehmen, wurden die Proben gegen den Aufbewahrungspuffer dialysiert. Der verwendete Visking Dialyseschlauch (Rotz, Karlsruhe) mit einer Ausschlussgröße von 14 kDa wurde vor der Verwendung aufgekocht. Die Dialyse erfolgte bei 10 °C, wobei der Dialysepuffer mehrfach gewechselt wurde.

Proteolytische Spaltung

Der einklonierte His-Tag könnte möglicherweise die korrekte Faltung des Proteins behindern. Aus diesem Grund wurde vorgelagert zu diesem Affinitätsanhang eine Erkennungssequenz (E-X-X-Y-X-Q-(G/S)) für eine TEV Protease gesetzt. Diese Cystein-Protease stammt ursprünglich aus dem Tabakäzvirus und ermöglicht eine spezifische, proteolytische Spaltung an der vorgegebenen Sequenz. Pro 100 µg Protein wurden 100 U TEV Protease (roboklon, Berlin) eingesetzt und für 1-1,5 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentration berechnen zu können, wurde zuerst die Absorbtion der Proteinlösung photometrisch bei 280 nm bestimmt (OD₂₈₀). Hierbei machte man sich zunutze, dass aromatische Aminosäurereste (Histidin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan) eine $\pi - \pi^*$ -Orbital-Absorbtion bei 280 nm zeigen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration bediente man sich nun dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$E = \log(I_0 / I) = \epsilon * c * d$$

E: Extinktion

*I*₀: Intensität vor der Probe

I : Intensität nach Passieren der Probe

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

c : Proteinkonzentration [mol/l]

d : Schichtdicke [cm] der Küvette

Dieses hängt von den Variablen des molaren Extinktionskoeffizienten, der Konzentration und der Schichtdicke der Probe ab. Die Schichtdicke der Küvette d beträgt 1 cm. Der theoretische molare Extinktionskoeffizient wurde anhand der Anzahl der Tyrosin- und Tryptophan-Reste sowie der intramolekularen Disulfidbrücken nach Grimsley and Pace (2004) berechnet und beträgt für *BgAChBP1* $35325 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und für *BgAChBP2* $41160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Das Lambert-Beer'sche Gesetz wird nun nach der Stoffmenge (c) aufgelöst und mit der relativen Molekularmasse von *BgAChBP2* (M_r) multipliziert um die Mengenangabe in mg/ml zu erhalten. Das Molekulargewicht von *BgAChBP1* beträgt 23456 Da, von *BgAChBP2* 23508 Da.

Die Massenkonzentration für *BgAChBP1* beträgt $c_m = 0,66 * E$ und für *BgAChBP2* $c_m = 0,57 * E$.

6.3 Hämolymphentnahme

Um das Acetylcholin-Bindeprotein (AChBP) der Schnecken *B. glabrata* und *P. corneus* aufzureinigen und das AChBP von den anderen Hämolympheproteinen zu separieren, musste den Tieren Hämolymphe entnommen werden. Hierfür wurden die Tiere vor der Hämolymphentnahme 10-15 Minuten zur Betäubung auf Eis gelegt. Zur Gewinnung der Hämolymphe wurde der vordere Teil des Gehäuses weggebrochen, um dann den Fuß der Tiere mit einer Kanüle zu penetrieren. Sodass die austretende Hämolymphe mit einer Pipette abgesaugt werden konnte. Die Probe wurde in einem Eppendorfgefäß auf Eis gesammelt. Um Proteaseaktivität zu hemmen, wurde die Hämolymphe mit Pefablocklösung versetzt, sodass dieses in einer Endkonzentration von 1 mM in der Probe vorlag. Nach erfolgter Entnahme wurden die Tiere durch schnelles Zerdrücken des Gehäuses getötet. Zellbestandteile, wurden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert.

6.4 Chromatographische Methoden

Anionenaustausch-Chromatographie

Durch die reversible Bindung funktioneller Gruppen des Proteins an Anionen der Säulenmatrix lässt sich eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Ladung erzielen.

Die Probe wird in die Probenschleife injiziert und von dort mit einer Pumpe auf die Säule gespült. Über einen Gradienten mit steigendem Ionengehalt kann die, an die Säule gebundene, Probe eluiert werden. Es wurde eine Fließgeschwindigkeit 0,5 mL/min und eine Laufzeit von 120 Minuten gewählt. Als Laufpuffer (Puffer A) wurde ein Puffer mit 50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7,4 verwendet. Der Gradient der Pufferlösung B (50 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 1M NaCl, pH 7,4) lief von 1-100%. Bei der Auftrennung der Hämolympheproteine aus *B. glabrata* wurde ein durchgehend ansteigender Gradient gewählt. Für die Fraktionierung der Hämolympheprobe aus *P. corneus* wurde ein stufenweise ansteigender Gradient gewählt, der so eingestellt wurde, dass sich alle 10 Fraktionen die Konzentration des Elutionspuffers erhöhte. Das Eluat durchläuft ein Photometer und wird mittels eines Fraktionssammlers aufgefangen. Anhand des aufgezeichneten Chromatogramms lassen sich später die einzelnen Fraktionen identifizieren.

Als Säulenmaterial wurde die Q-Sepharose von GE Healthcare (Freiburg) und eine HPLC-Pumpe und ein Fraktionssammler von Gilson (Limburg), verwendet.

Größenausschluss-Chromatographie

Um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, ließ sich eine Gelfiltration mit einer Säulenmatrix durchführen, die ein dreidimensionales Netzwerk mit einer fest definierten Porengröße ausbildet. Kleine Proteine dringen häufiger in die Poren ein und verfangen sich dort, wodurch sie einen längeren Weg durch die Säulenmatrix zurücklegen als größere, die die Säulenmatrix ungehindert passieren können. Als Säulenmaterial wurden die Bio-Gele[®]0.5M und 1.5M (BioRad, München) verwendet. Die Säule war 50 cm lang. Das Eluat durchlief ein Photometer (Gilson, Limburg), in dem die Absorption gemessen wurde und auf dieser Grundlage mit einem Flachbettschreiber (Kipp und Zonen, Delft) ein Chromatogramm aufgezeichnet werden konnte.

6.5 Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen und basiert auf der Eigenschaft von Proteinen sich entsprechend ihrer Ladung in einem elektrischen Feld bewegen zu können. Das Gel besteht aus Polyacrylamid, welches durch Bisacrylamid vernetzt wurde. Im oberen Teil des Gels befindet sich ein weitmaschigeres Sammelgel zur Fokussierung der Probe und im unteren Teil ein engmaschigeres Trenngel um die Probe aufzutrennen. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der einzelnen Komponenten konnten unterschiedlich stark vernetzte Trenngele hergestellt werden um jeweils für den Versuch ein optimales Auftrennungsergebnis erzeugen zu können.

Die Elektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) sowie unter nicht denaturierenden Bedingungen (native PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Gele liefen bei einer Stromstärke von 25-30 mA für ca 60 Minuten. Zur Auswertung konnten sie anschließend mit einer Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung angefärbt werden.

SDS-PAGE

Die Proben wurden zur Vorbereitung nach Zugabe von 2% β -Mercaptoethanol für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Durch Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine - unabhängig von ihrer Eigenladung - mit einer negativen Ladung behaftet. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken zu freien Thiolen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach dieser Vorbereitung einzig durch ihre Größe, wobei die kleineren Proteine schneller durch die Matrix des Gels wanderten als die Größeren (Laemmli, 1970). Im elektrischen Feld wandern sie von der Kathode zur Anode durch das Sammelgel und werden hierbei fokussiert. Im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine.

Es wurden 5-10 μ g Protein aufgetragen, die zuvor mit 25% Probenpuffer versetzt wurden. Als Marker zur Abschätzung der Größe wurde der ProSieve™ QuadColor™ von Lonza (Rockland, USA) für die Coomassie Färbung (siehe 6.6) sowie der MagicMark XP Western Protein Standard (Invitrogen, Karlsruhe) für die Immundetektion (siehe 6.9) verwendet.

Nicht reduzierende SDS-PAGE Bei dieser Variante der SDS-PAGE wurde ein Probenpuffer verwendet, der kein β -Mercaptoethanol enthielt, sodass Disulfidbrücken

erhalten blieben. Die Größe der Proteine wurde hier mithilfe eines Markerproteins abgeschätzt, oder ebenfalls mittels ProSieve™ QuadColor™ von Lonza (Rockland, USA), wobei hierbei darauf zu achten war, dass zwischen dem Marker und den Proben einige Geltaschen frei blieben, sodass nicht die Gefahr einer nachträglichen Reduktion der Proteine bestand.

Native PAGE

Im Gegensatz zur SDS-PAGE werden bei der nativen PAGE die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse, ihrer Eigenladung und ihrer Tertiärstruktur aufgetrennt. Es werden keine Detergenzien zur Denaturierung, wie z.B. SDS oder β -Mercaptoethanol zugegeben, sodass die Faltung des Proteins Einfluss auf das Laufverhalten nimmt. Der Probenpuffer enthält Glycerin um die Proben zu beschweren und so besser auftragen zu können und ein Ausschwemmen zu verhindern. Analog zur SDS-PAGE wurden 5-10 μ g Protein aufgetragen.

6.6 Coomassiefärbung von Proteinen

Zur Sichtbarmachung der Banden in den nach der PAGE wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung angefärbt. Hierbei kamen zwei verschiedene Färbelösungen zum Einsatz.

Standard-Coomassiefärbung Bei dieser Methode wurde das gesamte Gel angefärbt. Anschließend musste das Gel entfärbt werden. Erst dadurch werden die Banden sichtbar, da diese, im Gegensatz zum Hintergrund, nicht entfärbt wurden. Die Proteine wurden durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R 250 (Roth, Karlsruhe) im Gel fixiert.

Kolloidale Coomassiefärbung Der Farbstoff der kolloidalen, hintergrundfreien Coomassiefärbung nach Kang et al. (2002) bildet mit den Proteinen einen Chelatkomplex. Er lagert sich an die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren an und färbt die Proteine somit unspezifisch an, wobei basische Proteine stärker angefärbt werden können, als saure Proteine. Bei der kolloidalen Coomassiefärbung macht man sich zunutze, dass der Farbstoff Coomassie G250 in Anwesenheit von Aluminiumsulfat und Phosphorsäure Kolloide bildet, die als Farbstoffspeicher dienen.

Die Nachweisgrenze bei dieser Färbemethode liegt bei ca. 100 µg und erreicht in ihrer Sensitivität damit fast die einer Silberfärbung. Die Nachweisgrenze liegt hier bei 1 ng Rinderserumalbumin pro Bande (Kang et al., 2002). Das SDS-PAGE bleibt hierbei weitestgehend ungefärbt, da sich nur sehr geringe Mengen des kolloidalen Farbstoffs in der Gelmatrix verfangen. Durch die Coomassie Färbung werden die Proteine in der Gelmatrix fixiert, positiv geladen und können anschließend nicht mehr aus der Gelmatrix gelöst werden. Bei dieser Herstellung dieser Färbelösung musste unbedingt auf die Reihenfolge der zugegebenen Chemikalien geachtet werden, da es sonst zu keiner Kolloidbildung kommen konnte.

6.7 Herstellung von Antiseren

Die Immunisierung der Kaninchen für die Herstellung der beiden Antiseren wurde von der Firma Charles River-Laboratories (Kisslegg) durchgeführt. Dort wurden zwei Kaninchen über einen Zeitraum von ca. 2 Monaten mehrere Injektionen mit rekombinantem *BgAChBP2* gegeben. Die resultierenden Seren konnten dann auf ihre Spezifität bei der Detektion der beiden Isoformen von *BgAChBP* hin untersucht werden.

6.8 Zweidimensionale Immunelektrophorese

Die verschiedenen Proteine konnten mit einer zweidimensionalen Immunelektrophorese nach Laurell (1965, 1966) und Weeke et al. (1973) immunologisch charakterisiert werden.

In der ersten Dimension werden die Proteine in einem 1% Agarosegel aufgrund ihrer Ladung aufgetrennt. In der zweiten Dimension erfolgt die Wanderung durch ein 1% Agarosegel dem spezifische Antikörper zugegeben wurden. Die Proteine können soweit durch das Gel wandern, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Protein und Antikörper gebildet hat. Nach der Färbung ist dies durch ein charakteristisches gipfelförmiges Präzipitat zu erkennen. Strukturelle Verwandtschaften zwischen Proteinen in einem Proteingemisch lassen sich auf diese Weise klären.

In der ersten Dimension wurden 10 mL 1% Agarose (Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf) auf eine 10 x 7 cm große Glasplatte gegossen. Nach Aushärtung der Agarose wurden 2-4 mm große Löcher für die aufzutragende Probe ausgestanzt.

Als Marker für die Lauffront diente jeweils 1 μ L Bromphenol-Glycerin-Lösung, die in die beiden äußeren Löcher aufgetragen wurde. Die vorbereitete Glasplatte mit den aufgetragenen Proben wurde in eine Multiphor 2117 (Pharmacia, Freiburg) Elektrophoresekammer gelegt. Um elektrischen Strom leiten zu können, wurde eine Pufferbrücke aus Chromatographiepapier (3MM, Schleicher & Schuell, Dassel) zwischen Gel und Immunoelktroden-Puffer gelegt. Die Elektrophorese erfolgte bei 600 V für ca. 45-60 Minuten, wobei das Ende des Laufes mit Erreichen der Lauffront am Gelende angezeigt wurde.

Mithilfe einer Schablone wurden aus dem Gel der ersten Dimension Streifen ausgeschnitten und auf die hydrophile Seite einzelner GelBond[®]-Filme (4,2 x 5 cm, 0,2 mm Stärke, Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf) gelegt. 2 mL 58 °C warme Agarose wurden mit Antikörperserum vermischt und auf die freien Stellen des Films gegossen. Nach Aushärten der Agaroselösung konnten die Filmplättchen erneut in die Elektrophoresekammer gelegt und Chromatographiepapier angelegt. Die zweite Dimension lief bei 300 V über Nacht.

Damit ausschließlich die Proteine angefärbt wurden, die an den Antikörper gebunden hatten und dadurch präzipitiert sind, wurde das ungebundene Protein ausgesalzt. Die Plättchen wurden hierfür dreimal für 10 Minuten mit 0,6% HCl-Lösung gewaschen und anschließend unter angefeuchtetem Filterpapier für 5 Minuten gepresst. Nach dem zweiten Pressen wurden die Filmplättchen für 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Nach einem abschließenden 5 minütigem Pressen wurden die Gele auf den Filmplättchen mit einem Fön getrocknet und danach für 10 Minuten in Coomassie-Lösung (Coomassie Brilliant Blue G250, Roth, Karlsruhe) gefärbt. Die Gele wurden in Entfärber-Lösung entfärbt, bis der Hintergrund möglichst farblos war. Abschließend wurden die Plättchen mit destilliertem Wasser abgespült und mit dem Fön getrocknet.

Immunoelktrophorese mit geteilter zweiter Dimension Bei dieser Variante der Immunoelktrophorese wird die zweite Dimension horizontal aufgetrennt, sodass in unseren Teil ein anderer Antikörper verwendet werden kann wie im oberen Teil. Protein, welches nicht vom Antikörper im unteren Teil der zweiten Dimension gebunden wird, konnte weiter durch das Gel wandern und so in den oberen Teil des Gels gelangen, welches mit einem anderen Antikörper versehen war. Die zweite Dimension wurde

hierfür mittig horizontal getrennt und zuerst der untere Teil mit 1 mL Agarose und Antikörper gegossen. Nach Aushärtung dieses Teils wurde der obere Teil ebenfalls mit einem mL Agarose und einem anderen Antikörper gegossen.

Tandem-crossed Immunelektrophorese Bei der *tandem-crossed* Immunelektrophorese wurde neben dem Loch für die Proteinlösung in der ersten Dimension ein zweites Loch ausgestanzt um ein zweites Proteingemisch auftragen zu können. Für ein optimales Ergebnis musste empirisch der Abstand zwischen den beiden Löchern ermittelt werden, wobei die Ladung der Proteine einen ersten Hinweis gab. Die Durchführung der zweiten Dimension erfolgte wie in der zweidimensionalen Immunelektrophorese beschrieben.

Crossed-line-Immunelektrophorese Für die *crossed-line*-Immunelektrophorese wurde nach Aushärtung der zweiten Dimension an der Kante zwischen erster und zweiter Dimension ein Trog ausgeschnitten, sodass der Trog mittig zwischen beiden Dimensionen liegt. Das Fassungsvermögen des Trogs betrug 100 µL. Dieser konnte mit einem Gemisch aus 1% Immunagarose und einem anderen Protein luftblasenfrei befüllt werden um zu überprüfen, ob dieses Protein mit dem Protein, das in der ersten Dimension aufgetragen wurde, verwandt ist und der Gipfel dadurch verschmilzt. Die zweite Dimension wurde nach dem Protokoll der zweidimensionalen Immunelektrophorese durchgeführt, wobei ein Antikörpergemisch diente, welches sowohl Lochprotein als auch Trogprotein erkannte.

6.9 Western-Blotting

Proteine, welche mittels PAGE (Kapitel B6.5) aufgetrennt wurden, konnten elektrophoretisch mittels Western-Blotting im *semi-dry* Verfahren (verändert nach Kyhse-Andersen, 1984) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert werden um sie anschließend mit spezifischen Antikörpern detektieren zu können.

Vier Blätter Chromatographiepapier (Whatmann Papiere, Hartenstein, Würzburg) wurden mit Kathodenpuffer (40 mL Kathodenpuffer + 10 mL 99%iges Ethanol) befeuchtet und in eine *Blotting*-Apparatur (cti, Idstein) gelgt. Darauf wurde das ungefärbte PAGE-Gel platziert auf das die, mit Ethanol aktivierte PVDF-Membran

(Immobilon -P Transfer Membran, Millipore, Eschborn) folgte. Mit einem Glasröhrchen wurden vorsichtig alle Luftblasen zwischen Gel und PVDF-Membran herausgedrückt. Abschließend folgen vier Blatt Whatman-Papier, die zuvor in Anodenpuffer (40 mL Anodenpuffer + 10 mL 99%iges Ethanol) getränkt wurden. Durch erneutes rollen mit dem Glasröhrchen wurde sichergestellt, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Whatman-Papier befinden. Um den Kontakt zwischen den einzelnen Schichten sicherzustellen, wurde die Blotapparatur mit einem Gewicht beschwert. Der Proteinübertrag erfolgte bei konstant 80 mA pro Blot für 90 min.

Immundetektion und Dokumentation

Die Proteine konnten auf der PVDF-Membran mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen *BgAChBP1*, *BgAChBP2* (Kapitel B6.7) und den 6x Histidin-Tag indirekt detektiert werden. Die beiden Antikörper gegen *BgAChBP* waren polyklonal und stammen aus Kaninchen. Bei dem Antikörper gegen den His-Tag handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper der Firma Qiagen (Hilden) der spezifisch den *His-Tag* eines Proteins erkennt. Der antigenspezifische Primärantikörper wurde durch einen polyklonalen Sekundärantikörper detektiert an den eine Meeretichperoxidase und gekoppelt ist und durch eine Chemiluminiszenzreaktion nachweisbar ist.

Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C in Blockierungspuffer (10% Magermilchpulver in TBS-Puffer) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran zweimal mit TBST und einmal TBS-Puffer je 10 Minuten auf dem Schüttler gewaschen um überschüssigen Blockierungspuffer abzuspülen. Nun folgte eine einstündige Inkubation der Membran mit dem ersten Antikörper gegen *BgAChBP* in einer Verdünnung von 1:10000 in 20 mL TBS-Puffer mit 5% Magermilchpulver bei Raumtemperatur. Der His-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:7500 in 20 mL TBS-Puffer mit 5% Magermilchpulver angesetzt. Überschüssige oder unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit TBS-T-Puffer und einmaligem Waschen mit TBS-Puffer für je 10 Minuten entfernt. Zur Bindung des Sekundärantikörpers (Sekundärantikörper gegen Maus und Kaninchen der Firma Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, USA) wurde eine Verdünnung von 1:7500 in 20 mL TBS-Puffer mit 5% Magermilchpulver verwendet und erfolgte durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Um überschüssigen oder unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die oben beschriebenen Waschschritte erneut durchgeführt.

Als Chemilumineszenz-Substrat, das durch die Peroxidase umgesetzt wurde, diente Roti[®]-Lumin (Roth, Karlsruhe). Hierbei oxidierte die Meerrettich-Peroxidase mithilfe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) des Substrats, welches in oxidiertem Zustand lumineszierte. Die Elektronen des Rotilumins wurden durch die Oxidation energetisch angeregt ihren Grundzustand zu verlassen und gaben beim Zurückfallen in den energetischen Grundzustand die Energie in Form von sichtbarem Licht ab. Die Lumineszenz trat später nur an den Stellen auf, an denen der zweite Antikörper binden konnte und wurde in Form einer Schwarzfärbung auf dem Röntgenfilm (GE Healthcare, Freiburg) dokumentiert. Für die Substratreaktion wurden 750 µL Rotilumin Substrat A und 750 µL Rotilumin Substrat B zusammengegeben und auf Raumtemperatur angewärmt. In der Dunkelkammer wurde die Lösung auf die Membran gegeben und drei Minuten inkubiert. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit durch leichtes Schütteln entfernt und die Membran in einer Klarsichthülle in die Röntgenfilmkassette gelegt. Ein Röntgenfilm (GE Healthcare, Freiburg) wurde aufgelegt und für 30 Sekunden bis 1 Minute belichtet. Der Film wurde solange in Entwickler getaucht, bis sich eine Schwärzung zeigte und nachfolgend mit Wasser abgespült und für mindestens 2 Minuten in das Fixierbad gelegt. Hierdurch wurde der Film lichtunempfindlich und konnte später bei normalem Licht ausgewertet werden. Der Fixierer wurde ebenfalls mit Wasser abgespült. Die Filme wurden bei Raumtemperatur getrocknet.

6.10 Bindungstest mit amorphem Calcium Carbonat

Es konnte gezeigt werden, dass *BgAChBP* aus der Hämolymphe von *B. glabrata* in der Lage ist, amorphes Calciumcarbonat (ACC) zu binden (Saur et al., 2012). Nun sollte überprüft werden, ob auch das rekombinant hergestellte Protein hierzu fähig ist. Der Test wurde leicht abgewandelt und wie bei *BgAChBP* aus der Hämolymphe, nach dem Protokoll von Ma et al. (2007) durchgeführt.

Zu 200 µg rekombinant hergestelltem Protein wurde eine Spatelspitze amorphes Calciumcarbonat (zur Verfügung gestellt von Prof. Wolfgang Tremel, JGU Mainz) gegeben und für vier Stunden unter ständigem Rotieren bei 4 °C inkubiert. Das Calciumcarbonat (CaCO₃) wurde durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 1000 rpm und 4 °C sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und zur späteren Analyse aufgehoben. Zum Waschen des Pellets wurden 200 µL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 zugegeben, kurz invertiert und für 10 Minuten mit 1000 rpm und 4 °C

abzentrifugiert. Insgesamt wurde das Pellet drei Mal gewaschen. Die Überstände wurden zur späteren Überprüfung über ein 15%iges SDS-Gel aufbewahrt. Nach Zugabe von 200 μL 0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung, wurde die unter ständigem Schütteln für eine Stunde inkubiert. Die Lösung wurde anschließend auf ein Gesamtvolumen von 50 μL eingengt. Von allen Proben wurden je 10 μL abgenommen, mit 4 μL 5x SDS-Probenpuffer versetzt und vor dem Auftragen auf ein 15%iges SDS-Gel 5 Minuten auf 95 °C erhitzt.

7 Thermofluor

Zur Optimierung der Pufferbedingungen wurde die Thermofluor-Methode herangezogen (Niesen et al., 2007). Man macht sich dabei zunutze, dass korrekt gefaltete Proteine eine hydrophile Oberfläche besitzen. Prinzipiell ist es Proteinen möglich sich in wässriger Lösung spontan in ihre Quartärstruktur falten zu können. Wird die Temperatur erhöht denaturieren Proteine. Durch die Entfaltung werden hydrophobe Bereiche des Proteins zugänglich. Durch die Entfaltung ist es sog. Fluorophoren, die der Proteinlösung zugesetzt wurden, möglich über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Protein zu interagieren. Bei der Methode wird die Fluoreszenz über die gesamte Zeit gemessen und stetig die Temperatur erhöht. Entfaltet sich das Protein, kommt es zu einer messbaren Zunahme der Fluoreszenz bis alle Proteine denaturiert vorliegen. Das Ergebnis ist eine sigmoidale Kurve, die den Fluoreszenzgrad und dadurch auch die Stabilität des Proteins zeigt.

Auf diese Weise können in einer 96 *well*-Platte sehr schnell verschiedene Pufferbedingungen für ein Protein getestet werden. Mit dieser Methode wurden die Pufferbedingungen für den Dodekaeder des rekombinanten *BgAChBP1* am Institut für Biochemie des Max-Planck Institutes Göttingen in Zusammenarbeit mit Dr. Ashwin Chari optimiert.

8 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) durchdringt ein Elektronenstrahl die Probe und trifft anschließend auf eine Dokumentationseinrichtung wie beispielsweise eine CCD-Kamera oder einen *direct detector* auf der eine zweidimensionale Projektion

des durchstrahlen Objekts erzeugt wird.

Der Elektronenstrahl wird in einer kegelförmig geformten Kathode erzeugt, die durch die angelegte Beschleunigungsspannung aufgeheizt wird. Es gibt zwei Typen von Elektronenquellen: zum Einen die thermischen Elektronenquellen, bei denen Wolfram-Haarnadel-Kathoden oder kegelförmige LaB_6 Kristalle als Emitter verwendet werden und zum Anderen die Feldemissions-Elektronenquelle (*field emission gun*) (FEG), bei der ein hohes elektrisches Feld an einen geätzten Wolfram-Draht angelegt wird, der in einem elektrochemischen Prozess Elektronen emittiert. Bei diesem Prozess ist zusätzlich ein Ultra Hohes Vakuum nötig um einen Elektronaustritt überhaupt zu ermöglichen. Durch die hohen Temperaturen (2000-2700 K) bei denen die Elektronen bei der thermischen Elektronenquelle austreten, entsteht ein sehr inhärenter Elektronenstrahl, der die Auflösung begrenzt. Bei der Benutzung einer FEG kommt es nicht zu dieser Limitierung.

Die Linsensysteme des Elektronenmikroskops sind ein weiterer wichtiger Faktor, der die mögliche Auflösung bestimmt. Das magnetische Linsensystem, dessen elektromagnetisches Feld mittels Spulen erzeugt wird, kann über den Spulenstrom reguliert werden.

Nach Austritt des Elektronenstrahls aus der Elektronenquelle durchläuft der Strahl die erste und zweite Kondensorlinse und wird dort gebündelt. Der Strahl wird dort zunächst ausgerichtet, sodass die Probe gleichmäßig und geradlinig durchstrahlt werden kann. Anschließend folgen die obere Objektivlinse, das Objekt und die untere Objektivlinse. Beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf das Objekt kommt es zu elastischen und inelastischen Streuungen. Bei der elastischen Streuung, verursacht durch die Anziehung der Kernladungen in der Probe, kommt es zu einer hohen Winkelablenkung des Strahls. Auf diese Weise gestreute Elektronen treffen teilweise nicht mehr auf den bildgebenden Schirm und verursachen den sogenannten Streukontrast. Bei der inelastischen Streuung treffen Elektronen des Strahls auf Elektronen in Hülle oder Kern der Probe, verlieren dadurch an Energie und erfahren eine Phasenverschiebung. Auf diese Weise verlangsamte Elektronen erzeugen Amplitudenkontrast. Wechselwirkungen zwischen den Elektronen des Strahls und der Probe erzeugen Wärme innerhalb der Probe, welche insbesondere bei Kryo-Proben zu einer Verformung der Partikel führt. Das nachfolgende Linsensystem dient der Abbildung auf dem Detektor und der Vergrößerung. Der Leuchtschirm besitzt eine fluoreszierende Beschichtung, sodass die

Elektronen sichtbar gemacht werden.

Biologische Proben sind anfällig für Strahlenschäden und müssen vor den Einflüssen des EM geschützt werden (Schatz, 1992). Hierzu lassen sich biologische Proben mit Schwermetallen fixieren (Brenner and Horne, 1959) oder in Eis einbetten (Dubochet and McDowell, 1981; Dubochet, 2012).

8.1 Elektronenmikroskope

Tecnai G² 12 BioTWIN (FEI, Eindhoven) Dieses Elektronenmikroskop ist mit einer LaB₆ Elektronenquelle ausgestattet und wurde bei 120 kV betrieben. An diesem Gerät wurden alle negativ kontrastierten Aufnahmen erstellt. Die sphärische Aberration (C_s) des Mikroskops beträgt 6,3, wodurch ein guter Kontrast in den Bildern erzielt werden kann, die Auflösung jedoch beschränkt ist. Die Aufnahmen wurden mit einer TVIPS TemCam-F416 4K-CCD Kamera (TVIPS, Gauting) bei einer nominellen Vergrößerung von 49000x (dies entspricht einer tatsächlichen Vergrößerung von 71540x) und einer Pixelgröße von 4,36 Å aufgenommen.

Titan KriosTM (FEI, Eindhoven) Die Aufnahmen für die Apo-Struktur des BgAChBP1 Dodekaeders wurden am Titan KriosTM des Max-Planck-Instituts (MPI) für biophysikalische Chemie in Göttingen aufgenommen. Dieses Mikroskop ist mit einem C_s -Korrektor, einer Falcon II Kamera und einem *direct electron detector* ausgestattet. Die Beschleunigungsspannung beträgt 300 kV. Die Aufnahmen wurden bei einer Vergrößerung von 112100x aufgenommen und haben eine Pixelgröße von 1,25 Å.

8.2 Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie

GraFix

Bei dieser Dichtezentrifugation handelt es sich um eine Methode der Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie. GraFix (Kastner et al., 2008; Stark, 2010) verbindet hierbei eine Auftrennung durch Dichtezentrifugation mit einer gleichzeitigen Fixierung des Proteins um dessen Stabilität zu erhöhen. Zwei Lösungen mit unterschiedlichem Sucrose-Gehalt (10% und 30%) wurden angesetzt. Die 10%ige Lösung wurde in den unteren Teil eines Zentrifugenröhrchens gefüllt. Der 30%igen Lösung wurden 25% Glutaraldehyd zugesetzt. Mit einer Kanüle wurde anschließend die 30%ige

Lösung unter die erste Sucrose-Lösung unterspritzt. Der Gradient wurde mithilfe eines Gradientenmixers eingestellt. Die Proteinlösung wurde luftblasenfrei auf den Gradienten gegeben und die Proben 16 Stunden bei 30000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Zur Fraktionierung wurden jeweils 200 µL vom obersten Rand der Lösung abgenommen. Von jeder Fraktion wurden 2 µL auf eine Nitrocellulosemembran getropft, diese kurz getrocknet und mit Amido-Schwarz angefärbt. Alle Fraktionen, die Protein enthielten konnten auf diese Weise benannt und für die weitere Probenvorbereitung verwendet werden. Alle Fraktionen die so identifiziert wurden, wurden zusätzlich mit Uranylacetat negativ kontrastiert und elektronenmikroskopisch untersucht.

Diese Methode wurde am Institut für Biochemie des Max-Planck Institutes Göttingen in Zusammenarbeit mit Dr. Ashwin Chari durchgeführt.

Glimmentladung zur Hydrophilisierung des Objektträgers

Als Probenträger dient ein mit einem Kohlenstofffilm beschichtetes Kupfergitter (*Grid*). Da dieser Kohlenstofffilm überwiegend hydrophob ist, wird er mittels einer diffusen Ladungswolke (*negative Glow Discharge*) bei 25 mV für 30 Sekunden hydrophilisiert (Aebi and Pollard, 1987). Der Objektträger wird dadurch zu einer reaktiven Oberfläche an den die Proteine besser adsorbieren können. Hierzu wurde der Objektträger in einem Gerät der Marke Emitech K100X (Quorum Technologies, Ontario, Kanada) unter Vakuumbedingungen einem Plasma ausgesetzt. Bei diesem Vorgang werden Ladungen aufgebracht sowie Verunreinigungen an der Oberfläche entfernt.

Negativkontrastierung

Bei der Negativkontrastierung werden die Proteine mit einer Schwersalz-haltigen Lösung vollständig eingebettet und dann getrocknet um so den Kontrast der Proteine zum Hintergrund zu erhöhen und sie im elektronenmikroskopischen Bild besser sichtbar zu machen. Als Kontrastmittel werden häufig Uranylacetat, Uranylformat und Ammoniummolybdat verwendet (Harris, 1991). Durch die Schwersalze liegt die Auflösungsgrenze dieser Methode bei 15 Å-20 Å (Ohi et al., 2004). Die Proben lassen sich schnell vorbereiten und sind, im Gegensatz zur Kryo-Fixierung, einfach zu handhaben.

Es wurden 5 µL des Proteins auf ein Elektronenmikroskopie-*Grid* aufgetragen und für 30 Sekunden inkubiert. Nachdem überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier

(Whatman No. 1) abgezogen wurde, wurden 3 μL 1% Uranylacetat aufgetragen und 4 Sekunden inkubiert, bevor auch diese abgesaugt wurden. Der Kontrastierungsschritt wurde noch zwei weitere Male wiederholt. Abschließend wurde das *Grid* für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Bei allen Arbeitsschritten ist darauf zu achten, dass keine Flüssigkeit auf die Rückseite des *Grids* gelangt, da dies im Mikroskop als diffuser Hintergrund zu sehen sein würde.

Das Kontrastmittel legt sich wie ein Mantel um das Protein und umhüllt es optimalerweise ohne dabei auf dem *Grid* Unebenheiten zu bilden, die nicht vom Protein herrühren. Da die Schwermetallatome vom Elektronenstrahl nur sehr schwer durchdrungen werden können, erscheinen die Proteine später von einem dunklen Hof umgeben. Je dicker die Schicht aus Kontrastmittel, desto dunkler erscheinen die jeweiligen Bereiche im späteren Bild. Bei der Negativkontrastierung wird somit vor allem der Streu- und Amplitudenkontrast erhöht. Die spätere Auflösung der Rekonstruktion wird durch die Größe der Schwermetallionen limitiert, da diese nicht in die feinen Zwischenräume des Proteins eindringen können.

Kryo-Fixierung

Bei der Kryo-Fixierung wird die Proteinprobe in einem dünnen Flüssigkeitsfilm schockartig vitrifiziert (Dubochet et al., 1988). Bei dieser Vorgehensweise werden die Proteine in ihrer natürlichen Konformation fixiert. Im Gegensatz zur Negativkontrastierung kommt hier kein Kontrastmittel zur Anwendung, sodass es nicht zur Limitierung der erreichbaren Auflösung durch ein solches kommt. Auf diese Weise lassen sich Auflösungen $< 3 \text{ \AA}$ erreichen (Bartesaghi et al., 2015). Gleichzeitig haben die Proteine aber nur einen geringen Dichteunterschied zum Puffer, sodass es nur zu einem geringen Phasenkontrast kommt und die Partikel schwerer zu erkennen sind. Zudem sind die Proteine deutlich empfindlicher gegenüber Strahlenschäden und können nur mit einer geringen Strahlendosis untersucht werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Kryo-Aufnahmen des *BgAChBP1* wurden am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stark mit präpariert. Um die Sucrose nach der GraFix-Fixierung zu entfernen, wurde mithilfe eines Zeba-Spin Entsalzungsröhrchens (Invitrogen, Darmstadt) der Puffer ausgetauscht. Die Proteinlösung wurde für eine Minute auf ein Kohlestofffilmchen gegeben und anschließend auf ein dickes Quantifoil-*grid* mit gleichmäßigem Lochabstand

im Kohlestofffilm adsorbiert. Die Probenpräparation erfolgte mit einem Vitrobot (FEI, Eindhoven). Auf die Oberfläche des *grids* wurden 4 μL Puffer gegeben und anschließend die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Die Luftfeuchte betrug 100% und die Temperatur 4 °C. Die Proben wurden schockartig in flüssigem Ethan eingefroren, sodass sich glasartiges Eis bildete. Die *grids* wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

9 Bioinformatische Methoden

9.1 Computerausstattung

Da die durchgeführten Berechnungen zur 3D-Rekonstruktion von Proteinen sehr rechenintensiv sind, wurden sie auf dem Rechnerverbund des zoologischen Instituts durchgeführt. Der Rechnerverbund setzt sich aus acht AMD Opteron 6136 (2,4 GHz), 20 AMD Opteron 2220 (2,8 GHz) und zwei Intel Xeon E5402 (2,0 GHz) Prozessoren zusammen. Derzeit verfügt der Rechnerverbund über insgesamt 372 Rechenkernen (*Cores*).

9.2 Software

Appion Hierbei handelt es sich um ein web-basiertes, modular aufgebautes Programm, das der Automatisierung der 3D-Rekonstruktion dient (Lander et al., 2009). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten in die Datenbank geladen werden und von dort aus weiter verarbeitet werden.

Bfactor (v1.4) ist ein frei erhältliches Programm, welches der Amplituden-Korrektur in 3D-Dichtekarten dient. Hierzu werden höhere Frequenzen mit einem Wert multipliziert, der sich auf dem Temperatur-Faktor ableitet. Bei 3D-Dichtekarten, die eine deutlich bessere Auflösung als 10 Å haben, kann das Vorgehen von Rosenthal and Henderson (2003) zugrunde gelegt werden.

Ctfind3 (Mindell and Grigorieff, 2003) berechnet Defokus und Astigmatismus elektronenmikroskopischer Aufnahmen um sie anschließend für die Korrektur der Intensität der Aufnahmen durch die Kontrast-Transfer-Funktion (CTF) heranzuziehen.

EMAN1 (v1.9) EMAN1 (Ludtke et al., 1999) ist ein, größtenteils kommandozeilenbasiertes Programm zur Einzelpartikelanalyse. Ihm liegt ein nicht gewichteter, korrelationsbasierter Algorithmus zugrunde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde es sowohl zur 2D-Klassifizierung als auch zur 3D-Rekonstruktion herangezogen.

EM-Menu Diese Software wird für die Steuerung der TemCam-F416 4K-CCD Kamera (TVIPS, Gauting) am Tecnai G² 12 BioTWIN benötigt.

Frealign 9 (Grigorieff, 2007; Lyumkis et al., 2013) ist ein kostenloses Programm, dass der Verbesserung einer vorhandenen 3D-Rekonstruktion dient. Alle Alignments und 3D-Rekonstruktionen werden bei diesem Programm im Fourier Raum berechnet.

Geneious (v.5.6.7), Geneious R9 (Kearse et al., 2012; Drummond et al., 2011) ist eine, kommerziell angebotene, Plattform, die verschiedene Funktionen zur Auswertung von DNA und RNA Sequenzdaten vereint. Die Software wurde beispielsweise genutzt um Sequenzdaten auszuwerten, Primer zu generieren, das Transkriptom von *Planorbarius corneus* zu analysieren und phylogenetische Bäume zu berechnen.

IMAGIC-5 Bei IMAGIC-5 (ImageScience, Berlin) (van Heel and Keegstra, 1981; van Heel et al., 1996) handelt es sich um ein kommerziell vertriebenes Programm. Die Arbeitsschritte der 3D-Rekonstruktion sind hier weniger automatisiert als z.B. bei EMAN1, sodass viele Parameter der Berechnung selbst variiert werden können.

Relion (v1.3) ist ein frei erhältliches Software Packet, welches zunehmend automatisiert die 3D-Rekonstruktion von Proteinen ermöglicht (Scheres, 2012, 2015). Im Gegensatz zu EMAN oder IMAGIC, findet ein Bayes'scher Algorithmus Anwendung, der auf maximum-a-posteriori Wahrscheinlichkeiten basiert.

UCSF Chimera (v1.9) ist ein kostenloses Programm zur 3D-Visualisierungsprogramm (Goddard et al., 2007; Pettersen et al., 2004). Es können sowohl Kristallstrukturen als auch Dichtekarten dargestellt und mit unterschiedlichen Modulen analysiert werden.

9.3 Transkriptomanalyse

Der vorhandene RNA-Datensatz von *Planorbarius corneus* wurde in Geneious R9 importiert. Als Referenz für das Alignment wurden jeweils die DNA-Sequenzen von *Biomphalaria glabrata* verwendet (Dissertation Möller 2012; (Saur et al., 2012)). Aus den vorhandenen Daten wurde eine Datenbank generiert. In einem initialen Schritt wurden die Referenzsequenzen des AChBP aus *Biomphalaria glabrata* mithilfe des BLAST-Algorithmus mit dieser Datenbank verglichen. Aus den resultierenden Daten ließ sich ein erstes Sequenzmodell des AChBP aus *Planorbarius corneus* erstellen. Ausgehend von dieser Startsequenz wurden die Parameter iterativ angepasst. Ziel war es, dass alle Basen durch mehrere RNA-Sequenzen abgesichert waren, die miteinander überlappten. Die durchschnittlich zulässige Abweichung einzelner Basen während des Alignments betrug 20-30% bei einer geforderten Überlappung von mindestens 60-80 Basen.

9.4 Bildverarbeitende Methoden

Ziel der 3D-Rekonstruktion ist es, aus verschiedenen zweidimensionalen Ansichten eines Proteins eine 3D-Dichtekarte zu berechnen. Um einen dreidimensionalen Körper zu beschreiben, werden mindestens drei Projektionen aus verschiedenen Raumrichtungen benötigt (Crowther et al., 1970; van Heel, 1987). Dadurch, dass die Proben ein schlechtes Signal-zu-Rausch Verhältnis aufweisen, benötigt man jedoch weit mehr Partikel als theoretisch notwendig wären.

Einzelpartikelselektion

Die elektronenmikroskopischen Bilder enthielten in aller Regel viele Partikel, die, im besten Fall, die biologische Probe aus verschiedenen Ansichten zeigten. Die einzelnen Partikel mussten selektiert werden um anschließend verarbeitet werden zu können. In dieser Arbeit wurden die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des BgAChBP2-Dipentamers (siehe C5), des BgAChBP1-Dipentamers (siehe C5.1) und des AChBP aus *Planorbarius corneus* (siehe C10.2) hierzu in das Programm Appion (Lander et al., 2009) geladen um dort einen Partikelstapel zu erstellen. Der Datensatz der BgAChBP1 Apo-Struktur wurde in Relion 1.3 geladen und dort bearbeitet.

Die einzelnen elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die in Appion geladen wurden,

wurden inenrhalb dieses Programms automatisch in eine Datenbank eingepflegt. Alle mikroskop-, partikel- und aufnahmespezifischen Informationen wurden hier hinterlegt. Die Aufnahmen wurden zuerst visuell überprüft um Bilder mit schlechter Partikelverteilung auszuschließen. Die schnelle Fourier-Transformation (*fast Fourier transformation*) (FFT) erlaubt es, Bilder mit Bewegungsunschärfe leichter zu erkennen und von der weiteren Prozessierung auszuschließen. Ein solcher Bildfehler äußert sich dadurch, dass die Thon-Ringe (Thon, 1966) der FFT nicht vollständig oder verformt sind.

Zur Selektion der Einzelpartikel wurden die beiden Module *manual picker* sowie *template picker* aus Appion (Lander et al., 2009) verwendet. Beim *manual picker* wurden sämtliche Partikel angewählt, die in der Aufnahme keinen Kontakt zu anderen Partikeln hatten. In Appion werden die Koordinaten der Partikel abgespeichert, sodass später die Partikel mit beliebiger Boxgröße ausgeschnitten werden können. So ist es beispielsweise möglich, die Boxgröße nachträglich zu ändern, ohne, dass alle Partikel erneut selektiert werden müssen. Überlicherweise sollte die Boxgröße 1,5-2,0 mal die maximale Partikelabmessung betragen (Downing and Glaeser, 2008). Das manuelle Auswählen der Partikel ist zwar zeitintensiv, bringt aber den Vorteil, dass bei jedem Partikel eine visuelle Qualitätskontrolle stattfindet. Der *template picker* hingegen arbeitet mit, vom Nutzer erstellen, Vorlagen, die als Grundlage für die Partikelselektion verwendet werden. Hier können beispielsweise 2D-Klassensummen eingepflegt werden. Im Rahmen der 3D-Rekonstruktion des BgAChBP1 Dodekaeders wurde die automatisierte Partikelselektion von Relion 1.3 (Scheres, 2012) verwendet. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen *template picker*. Bei diesem werden per Hand einige Partikel selektiert und aus diesen 2D-Klassensummen erstellt. Aus diesen werden die besten Klassensummen ausgewählt, die als Vorlagen für den automatisierten Selektions-Prozess dienen.

Bei der Verwendung eines automatischen Selektionsalgorithmus ist es notwendig, dass anschließend Partikel aussortiert werden, die fälschlicherweise selektiert wurden. Hierzu lässt sich beispielsweise eine 2D-Klassifizierung durchführen.

Bevor der Einzelpartikelstapel zur weiteren Bearbeitung erstellt werden konnte, mussten vorhandene Bildfehler die durch Astigmatismus und das Defokussieren entstanden sind korrigiert werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden anschließend normalisiert, sodass alle Aufnahmen miteinander vergleichbar wurden, die einzelnen

Partikel in der gewählten Boxgröße aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgeschnitten und in einer Datei zusammengefasst.

CTF-Korrektur

Da Proteine nur einen geringen Kontrast haben und im fokussierten Zustand im Elektronenmikroskop nicht zu erkennen sind, wurden die Aufnahmen im Defokus gemacht. Hierdurch kommt es zu einem Bildfehler der in Fourierraum durch die Kontrast-Transfer-Funktion (*contrast transfer function*) (CTF) beschrieben wird und nachträglich herausgerechnet werden muss. Dabei handelt es sich um die Faltung der Punktspreizfunktion (*point spread function*) (PSF) der Objektivlinse auf die Bildfunktion. Die CTF limitiert die erreichbare Auflösung auf den ersten Nulldurchgang und verfälscht die korrekte Massenverteilung von Makromolekülen. In der Fourier-Transformation lassen sich anhand der Thon-Ringe und der Mikroskop-Parameter die Defokus-Werte bestimmen. Mithilfe des Programms Ctfind3 (Mindell and Grigorieff, 2003), welches sowohl in Appion als auch in Relion 1.3 eingebunden ist, wurden Diagnosebilder erstellt, mit deren Hilfe alle Aufnahmen aussortiert wurden, die Astigmatismus aufwiesen, oder bei denen der Defokus nicht korrekt bestimmt werden konnte.

Abhängig von der Raumfrequenz der Aufnahmen, ergab sich durch das Defokussieren durch die CTF eine Änderung der Intensität. Die Funktion beschreibt sowohl positive als auch negative Werte, wobei die negativen Werte als Fehlinformationen zu sehen sind. Zur deren Korrektur, wurden die Mikroskop-Parameter (Astigmatismus, Vergrößerung, Beschleunigungsspannung, sphärischen Aberation und Wellenlänge des Elektronenstrahls) sowie der bestimmte Defokus-Wert benötigt. Die Bildinformationen werden in den Fourier-Raum transformiert um dann mit der CTF multipliziert zu werden und somit alle negativen Werte zu invertieren (Zhu et al., 1997).

Referenzfreies Alignment

Dadurch, dass die Aufnahmen ein, für die Interpretation, schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweisen, ist es notwendig, die Information aus vielen Einzelpartikeln miteinander zu verrechnen. Zuerst wurde hierbei eine referenzfreie Ausrichtung anhand des Masseschwerpunkts durchgeführt. Der durchschnittliche Massenschwerpunkt wurde durch translationale Verschiebung und Aufsummierung aller

Einzelbilder ermittelt. Somit soll vermieden werden, dass durch falsche Referenzen zu einer fehlerhaften Ausrichtung der Einzelpartikel kommt (Penczek et al., 1992).

Multivariate statistische Analyse

Die Information über die Beschaffenheit eines Partikels ist aus einer Raumrichtung immer die Gleiche. Das Rauschen hingegen ist statistisch verteilt. Werden viele Einzelpartikel aufsummiert, die die gleiche Ansicht des Proteins zeigen, wird die Information dadurch deutlicher, dass sich das Rauschen herausmittelt. Wichtig ist es, dass nur Partikel in einer Klasse zusammengefasst werden, die die exakt gleichen Ansichten des Proteins zeigen, da sich sonst Strukturinformationen ebenso herausrechnen würden wie das Rauschen.

Die Multivariate statistische Analyse (*Multivariate statistical analysis* (MSA)) gruppiert Einzelpartikel hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit und klassifiziert sie sodass sie danach zu Klassensummen aufaddiert werden können. Hierzu werden die Grauwertverteilung der einzelnen Bilder miteinander verglichen, wobei ein höherer Grauwert für eine höhere Elektronendichte in diesem Bereich steht. Jedes Einzelbild wird als Punkt innerhalb eines multidimensionalen Raums Aufgetragen, dessen Anzahl der Dimensionen der Pixelzahl der Einzelpartikel entspricht. Bei einer Kantenlänge von 96x96 Pixeln verfügt der Hyperraum demnach über 9216 Achsen. Im Hyperraum gruppieren sich Partikel mit ähnlichen Grauwerten näher zusammen. Je besser die Orientierung der Partikel auf den Einzelbildern ist, desto präziser kann die Gruppierung erfolgen (van Heel, 1984).

Ein zweites Koordinatensystem wird über das erste gelegt. Bei den Achsen handelt es sich um Einheitsvektoren (Eigenvektoren). Der erste Eigenvektor spannt sich hierbei über der größten Ausdehnung der gruppierten Partikel auf und markiert die somit die größte Distanz zwischen zwei Punkten. Dies stellt den größtmöglichen Abstand in der Grauwertverteilung zwischen zwei Partikeln dar. Die zweite Achse steht orthogonal zur ersten und markiert die zweitgrößte Distanz etc. Die Gesamtvarianz des Datensatzes wird durch die Gesamtsumme der Eigenvektoren beschrieben. Im Vergleich zur Anzahl der Partikel handelt es sich um eine geringe Anzahl an Vektoren, die den Datensatz beschreiben, wodurch die Berechnung innerhalb der MSA beschleunigt wird. Eine kreisförmige Maske gibt den Bereich der Einzelpartikel an, der miteinander verglichen werden soll. Diese Maske kann entweder den ganzen Partikel einschließen, oder aber nur einzelne Teile davon.

Die Klassifizierung unterteilt die gruppierten Partikel in einzelne Klassen. Anfänglich beschreibt jeder Einzelpartikel im Hyperraum eine eigene Klasse. Jeweils zwei Einzelpartikel mit der kleinsten Varianz zueinander werden in der folgenden Berechnung zu einer Klasse zusammengefasst, sodass am Ende eine hierarchisch ansteigende Klassifizierung steht. Dieser Baum beschreibt alle Partikel und deren Varianzen zueinander, er beginnt damit, dass jeder Einzelpartikel eine eigene Klasse repräsentiert und endet damit, dass alle Partikel in einer einzelnen Klasse zusammengefasst werden. Anschließend werden die Einzelpartikel des Datensatzes, anhand der berechneten Gruppierung, zu einer vorgegebenen Menge an Klassensummen zusammengefasst. Die Klassifizierung wird anhand der Klassengröße anstelle der Varianz vorgenommen, sodass die Größe der einzelnen Klassen nicht zu stark variiert. Innerhalb einer Klasse sollte die Varianz möglichst klein sein, wohingegen sie zu Nachbarklassen möglichst groß sein sollte. Die Einzelpartikel werden nun aufsummiert, sodass jede Klasse schließlich durch ein einziges Bild (Klassensumme) repräsentiert wird. In einer Klassensumme sollten, bei kleineren Datensätzen mindestens 10 Einzelbilder verrechnet sein. Bei sehr großen Datensätzen können auch weit mehr Einzelbilder zu einer Klasse zusammengefasst werden. Je größer die Anzahl an Klassen ist, desto ähnlicher sehen sich die Klassensummen, werden jedoch zu wenige Klassensummen gewählt, werden Partikel aufaddiert, die unterschiedliche Ansichten des Proteins zeigen und so gehen wichtige Informationen verloren.

Multi-Referenz-Alignment

Während, im referenzfreien Alignment eine translationale Verschiebung durchgeführt wurde, kann mithilfe des Multi-Referenz-Alignments (MRA) eine rotationale und translationale Ausrichtung stattfinden. Hierzu wurden alle Partikel an den ausgewählten Referenzen ausgerichtet. Partikel, die zwar die gleichen Ansichten zeigen, jedoch ursprünglich gegeneinander verdreht waren, können so ausgerichtet und verrechnet werden.

Aus den Klassensummen, die aus dem vorausgegangenen referenzfreien Alignment bzw. der Multivarianten statistischen Analyse hervorgegangen sind, wurden einzelne Klassensummen ausgewählt, die als Referenz für eine neue Ausrichtung dienen. Die Referenzen wurden hierbei so gewählt, dass möglichst eine Klassensumme aus jeder vorhandenen Raumrichtung ausgewählt wurde.

Die Einzelpartikel werden zunächst am ersten Referenzbild ausgerichtet und ein Korrelationskoeffizient berechnet, der angibt, wie hoch die Übereinstimmung ist. Nach und nach wird jeder Partikel mit jeder Referenz verglichen und jeweils die Korrelationswerte bestimmt. Nachdem die Einzelpartikel an zwei Referenzen ausgerichtet wurden, kann ein kleinerer Datensatz ermittelt werden, der die höchsten Korrelationskoeffizienten beinhaltet ("*Best of two*"). Die Multi-Referenz-Alignment (MRA) basiert darauf, diese Werte zu berechnen und miteinander zu vergleichen. Die Kreuz-Korrelations-Funktion (*cross correlation funktion*) (CCF) findet im Fourier-Raum statt.

Iterativ können die Klassensummen durch eine mehrfache Wiederholung von MSA und MRA verbessert werden. Wobei die MRA jeweils die Partikelorientierung verbessert und in der MSA eine neue Klassifizierung aufgrund der verbesserten Ausrichtung durchgeführt werden kann.

Winkelzuweisung

Eine große Herausforderung in der Einzelpartikelanalyse besteht darin, aus den zweidimensionalen Aufnahmen ein dreidimensionales Modell zu errechnen. Die Orientierung der 2D-Projektionen im Raum ist unbekannt und muss ermittelt werden, ebenso wie die Orientierung der Partikel zueinander.

Mittel der *common line*-Methode lassen sich diese Winkel errechnen. Hierbei wird davon ausgegangen, dass alle 2D-Projektionen eines dreidimensionalen Körpers im Realraum eine eindimensionale Projektion durch ihr Zentrum gemein haben (Crowther et al., 1970). Ein dreidimensionaler Körper kann im Raum durch drei Projektionen vollständig beschrieben werden (van Heel, 1987).

3D-Rekonstruktion

Nachdem den Einzelpartikel Winkel zugewiesen wurden, können die Klassensummen in den Fourierraum transformiert und anhand der vorgegebenen Winkel in den Raum projiziert werden. Auf diese Weise werden alle Grauwerte miteinander multipliziert und es kommt zu einer Überlagerung der Frequenzen. Kommt es zu einer konstruktiven Überlagerung, wird diese hell dargestellt, Frequenzen, die sich auslöschen werden dunkel dargestellt. Nachdem die Positionen normiert wurden, entsteht eine Dichtekarte, in der Bereiche mit höherer Dichte hell und geringere Dichten dunkel dargestellt werden.

Um ein initiales 3D-Modell zu errechnen, können drei Klassensummen ausgewählt werden. Von diesen werden dann die Euler-Winkel bestimmt und eine erste 3D-Dichtekarte errechnet. Diese dient nachfolgend als Grundlage für alle weiteren 3D-Rekonstruktionen.

Um die, so entstandene, Dichtekarte zu verfeinern, werden Rückprojektionen erstellt, anhand derer die Qualität der 3D-Rekonstruktion beurteilt werden kann. Im Idealfall sind die Klassensummen und die Rückprojektionen identisch. In vorgegebenen Winkeln können Projektionen erstellt werden, die nachfolgend als Referenzen für eine erneute Ausrichtung der Einzelpartikel dienen. Die Winkel werden immer kleiner gewählt und somit werden immer mehr Rückprojektionen und damit auch Referenzen erstellt. Die Einzelpartikel werden demnach an immer mehr Referenzen ausgerichtet und die berechnete Dichtekarte kann sich immer weiter verfeinern.

3D-Rekonstruktion in Relion

Innerhalb des Projekts der Strukturberechnung des *BgAChBP1* Dodekaeders in Relion diente die referenzfreie 2D-Klassifizierung dazu, fälschlicherweise selektierte Partikel des automatischen Selektionsalgorithmus auszusortieren. Es wurden zuerst referenzfreie 2D-Klassensummen gebildet, welche in einem iterativen Verfahren verbessert wurden, sodass schließlich nur die Einzelpartikel in die nächste Berechnung einfließen, welche den Dodekaeder des *BgAChBP1* zeigten. Anschließend wurde eine, ebenfalls referenzfreie, 3D-Klassifizierung vorgenommen, bei der aus dem vorhandenen Datensatz an Einzelpartikeln eine gewünschte Anzahl an 3D-Rekonstruktionen berechnet werden. In einer ersten 3D-Rekonstruktion wurden vier Modelle ohne Symmetrievorgabe berechnet. Aus diesen wurde ein Modell ausgewählt, welches einen vollständigen und bestmöglich aufgelösten Dodekaeder zeigte. Mit diesen Partikeln wurde eine automatisierte 3D-Rekonstruktion berechnet. Hierbei wird in Relion, im Gegensatz zu den meisten anderen Rekonstruktionsprogrammen, nicht vorgegeben, wieviele Iterationen durchgeführt werden sollen. Relion teilt den Datensatz in zwei Hälften, rekonstruiert diese getrennt voneinander und berechnet in jeder Iteration eine gold-standard Fourier Schalen Korrelation (*Fourier Shell Correlation*) (FSC) (Henderson et al., 2012). Die erreichte Auflösung sowie die Veränderung zur zuvor berechneten Dichtekarte werden miteinander verglichen und solange weiter gerechnet, bis die Auflösung über mehrere Iterationen nicht mehr verbessert werden kann. In einer finalen

Iteration werden die beiden Hälften des Datensatzes zusammengefasst, sodass es in der Regel noch einmal zu einer deutlichen Verbesserung der Auflösung kommt. Die angegebene Auflösung bezieht sich auf die ungefilterte und ungeschärfte Dichtekarte. Durch Maskieren und Schärfen kommt es in der Regel zu einer weiteren Verbesserung der Auflösung.

3D-Rekonstruktion in Frealign

Bei Frealign handelt es sich um ein Programm, welches speziell dafür entwickelt wurde, 3D-Rekonstruktionen zu verbessern, welche mit anderen Programmen berechnet wurden. Alle Alignments zur 3D-Rekonstruktion werden im Fourier-Raum berechnet.

Filtern der Dichtekarte

Maskieren Das Molekül in der berechneten Dichtekarte ist deutlich kleiner als die Boxgröße. Somit liegt zwischen der berechneten 3D-Rekonstruktion und der Limitation durch die Boxgröße Rauschen, welches um die Struktur herum verteilt ist. Damit die Einzelpartikel in den folgenden Iterationen jeweils an der Masse der Dichtekarte und nicht etwa am Rauschen ausgerichtet werden, wird die 3D-Rekonstruktion maskiert. Auf diese Weise wird möglichst viel Rauschen eliminiert, ohne die Masse der 3D-Rekonstruktion zu beschneiden oder zu verändern.

Schärfen Das geringe Signal-zu-Rausch-Verhältnis bringt es mit sich, dass Auflösungen, bei denen Sekundärstrukturelemente sichtbar werden, nicht mehr die gleichen Intensitäten in hohen und niedrigen Raumfrequenzen vorhanden sind. Diese Intensitätsunterschiede müssen nachträglich angepasst werden um α -Helices und β -Faltblätter sichtbar zu machen (Glaeser and Downing, 1992; Rosenthal and Henderson, 2003). Bei Auflösungen, die deutlich besser als 10 Å sind, kann die Berechnung des *b-factors* nach Rosenthal and Henderson (2003) durchgeführt werden, welche in dieser Form ursprünglich bei kristallographischen Daten Anwendung fand.

Auflösungsbestimmung

Um die Auflösung einer Dichtekarte zu bestimmen, wird die FSC verwendet (Harauz and M, 1986; Orlova et al., 1997). Hierzu wird der Datensatz in zwei Hälften

getrennt und aus jeder Hälfte eine Dichtekarte berechnet. Durch Transformation in den Fourierraum können Schalen spezifischer Frequenz miteinander korreliert werden. Die FSC zeigt dann die Korrelation beider Dichtekarten zueinander. Anhand der FSC gibt es verschiedene Kriterien, nach denen die Auflösung einer Dichtekarte bestimmt werden kann. Das 0,5 Kriterium, welches am restriktivsten ist, markiert den Punkt, an dem die Korrelation zwischen den beiden Dichtekarten bei 50% liegt, dieses Kriterium wurde im Rahmen dieser Arbeit herangezogen. Das 0.143-Kriterium (Rosenthal and Henderson, 2003) hingegen ist am wenigsten restriktiv und kommt zum Einsatz, wenn zwei völlig voneinander getrennt Datensätze miteinander verglichen werden sollen.

Zusätzlich lässt sich die Auflösung auch visuell abschätzen. Ab einer Auflösung von 8 Å lassen sich Sekundärstrukturelemente wie α -Helices erkennen. Diese sollten ab 5 Å deutlich zu erkennen und von β -Faltblättern unterscheidbar sein (Jiang and Ludtke, 2005). Bei einer Auflösung von 4,5 Å wird das C_{α} -Rückrad sowie β -Faltblätter erkennen. Wird die Auflösung besser als 4 Å werden immer mehr Seitenketten von Aminosäuren erkennbar, beginnend bei den aromatischen (Zhou, 2008). Ab einer Auflösung von etwa 3,8 Å werden die β -Faltblätter langsam als zwei nebeneinander liegende Aminosäureketten mit ihren Seitenketten erkennbar, ebenso sind ab dieser Auflösung die Windungen der α -Helices zu erkennen (Baker et al., 2013). Bei einer Auflösung von 2 Å müssten hypothetisch die aromatischen Aminosäureseitenketten vollständig aufgelöst sein, wobei der Aromatische-Ring deutlich zu erkennen sein müsste (Zhou, 2008).

Einpassen atomarer Modelle

Beim Einpassen atomarer Modelle in eine Dichtekarte gibt es zwei verschiedene herangehensweisen. Zum einen lässt sich ein atomares Modell (beispielsweise eine Kristallstruktur aus der Röntgenkristallographie) in die Dichtekarte einpassen ohne die Tertiärstruktur zu verändern (*rigid body fitting*). Das atomare Modell wird hierzu solange translational und rotational verschoben, bis es zu einer maximalen Korrelation kommt. Alternativ kann die Konformation des atomaren Modells beim flexiblen Einpassen verändert werden, um beispielsweise Seitenketten der Aminosäuren in die Dichtekarte einzupassen. Auf diese Weise kann die Korrelation zusätzlich verbessert wird. Beide Techniken können miteinander kombiniert werden.

C Ergebnisse

1 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen aus der Hämolymphe von *B. glabrata*

Aus *B. glabrata* wurde Hämolymphe entnommen und die Proteine über eine Anionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt (Abb. 7).

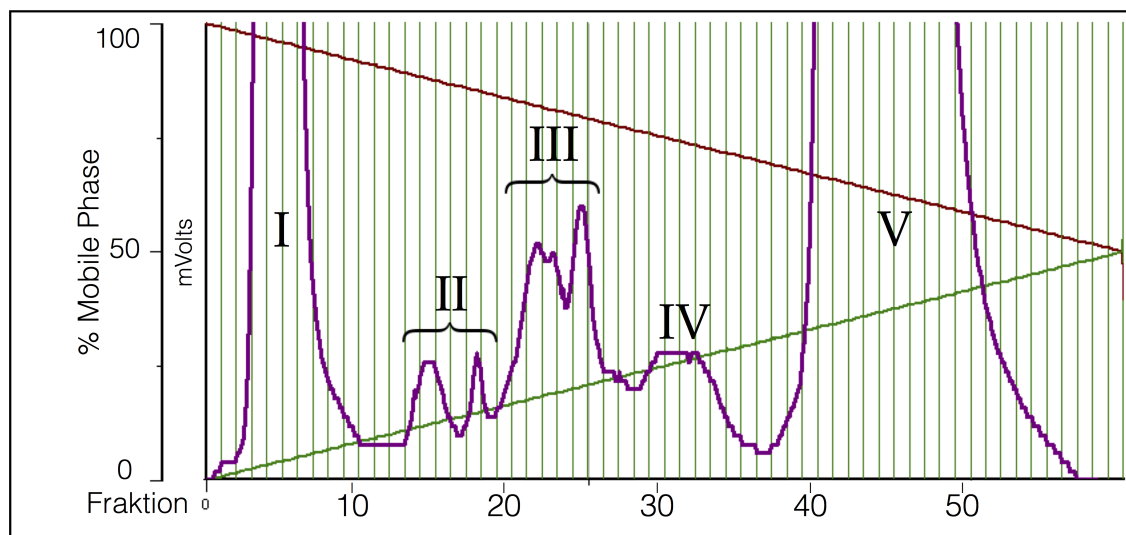


Abb. 7: Elutionsprofil der Anionenaustausch-Chromatographie der Hämolympheproteine aus *B. glabrata*. Es wurden zwei Milliliter Hämolymphe aufgetragen und mit einem NaCl-Gradient (Ansteigende Salzkonzentration im Puffer in grün) bei 0,5 mL/min über 120 Minuten eluiert.

Aus den Gipfeln wurden einzelne Fraktionen ausgewählt und die darin enthaltenen Proteine elektronenmikroskopisch untersucht. Der schmale Gipfel I enthielt keine Proteine, die groß genug waren, um in den elektronenmikroskopische Aufnahme (EM-Aufnahme) sichtbar zu sein. In Gipfel II waren Partikel unterschiedlicher Größe zu sehen, die aber keine eindeutigen Ansichten des AChBP, Hämoglobin oder Hämocyanin

1 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen aus der Hämolymphe von *B. glabrata*

zeigten (Abb. 8A). Zusätzlich waren dichtgepackte Aggregate in unterschiedlichen Größen zu sehen. Diese Aggregate waren in allen untersuchten Fraktionen (außer in Gipfel I) vorhanden. Aus Gipfel III wurden die Fraktionen 21 und 24 untersucht (Abb. 8B, C). Darin waren kleine würfelförmig aussehende Partikel zu finden, welche visuell keinem bisher untersuchten Protein zugeordnet werden konnten. In beiden Fraktionen waren zusätzlich unterschiedlich große, dichtgepackte Aggregate vorhanden. Das *BgAChBP* befand sich in Gipfel IV. In diesem Gipfel waren deutliche Ansichten von Dodekaedern und Hämocyanin-Dekameren zu finden (Abb. 8D). Der prominente Gipfel V von Fraktion 37-55 war kräftig rot gefärbt und enthielt erwartungsgemäß Hämoglobin sowie vereinzelte Dodekaeder.

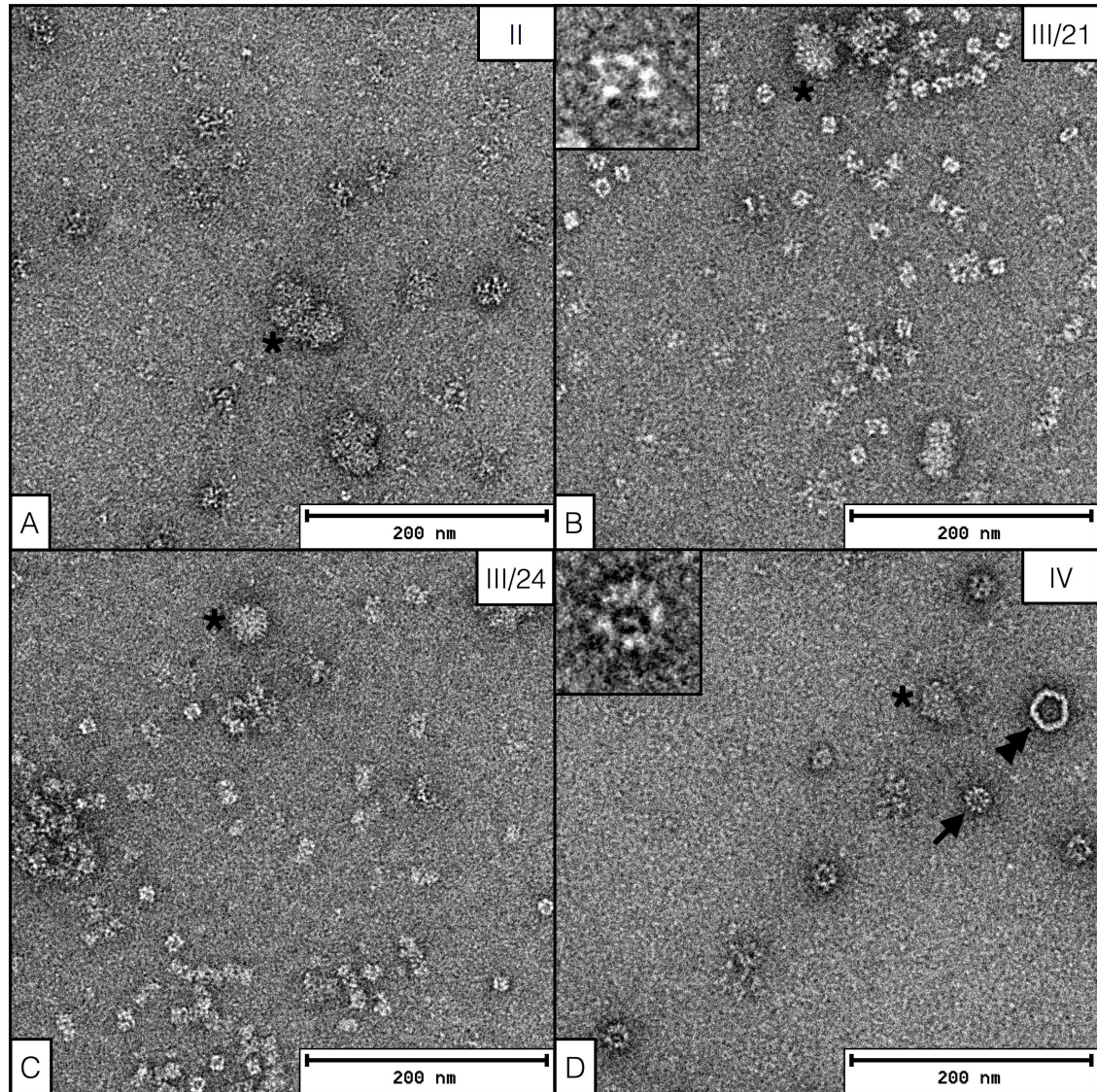


Abb. 8: EM-Aufnahmen einzelner Gipfel der Anionenaustausch-Chromatographie mit *B. glabrata*. (A) Gipfel II, Fraktion 17: Die dichtegepackten Aggregate (Stern) waren in den Fraktionen II, III und IV zu finden. Zusätzlich waren verschieden große Partikel zu sehen. (B) Gipfel III, Fraktion 21: Die Partikel waren etwas größer als Pentamere zeigten aber nicht deren typische Form. (C) Kein visueller Unterschied zwischen den Fraktionen 21 und 24. (D) Gipfel IV, Fraktion 30: Die typischen Ansichten der *BgAChBP*-Dodekaeder und Hämocyanin-Dekamere waren zu sehen.

1 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen aus der Hämolymphe von *B. glabrata*

Bei der Aufreinigung der Hämolympheproteine fielen würfelförmige Proteine ins Auge, die bisher nicht beschrieben wurden. Mithilfe von SDS-PAGE (Abb. 9) und Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen *BgAChBP1* und *BgAChBP2* sowie mit einem Antikörper gegen *B. glabrata*-Hämoglobin (*BgHb*) (Abb. 10) wurde versucht dieses Protein einer bekannten Struktur zuzuordnen.

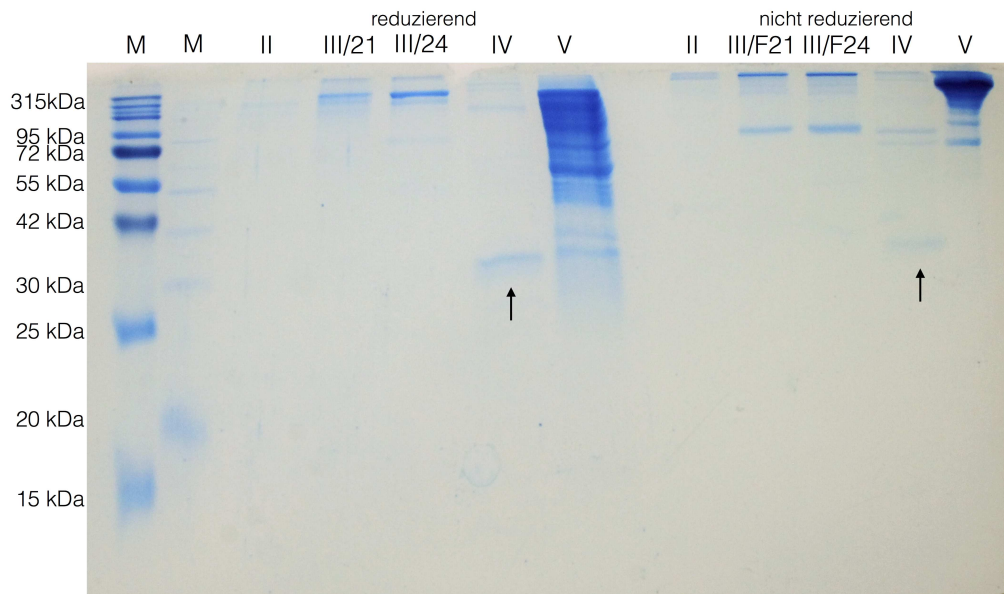


Abb. 9: SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen einzelner Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie. Reduzierend: Gipfel III, Fraktion 21 und 24 mit einer Bande bei leicht über 300 kDa. In Gipfel IV war die typische *BgAChBP*-Bande bei 30 kDa (Pfeil) und eine 300 kDa-Bande des Hämocyans zu sehen. In Gipfel V bildeten die Hämoglobinuntereinheiten einen kräftigen Schmier mit einzelnen Banden. Nicht reduzierend: Gipfel II, Gipfel III Fraktion 21 und Fraktion 24 zeigten eine Bande deutlich oberhalb der 315 kDa-Bande des Markers; Gipfel III Fraktion 21 und Fraktion 24 und Gipfel V waren Banden bei 100 kDa. In Gipfel IV lag die typische *BgAChBP*-Bande bei 30 kDa (Pfeil) und Gipfel V zeigte einen Schmier im oberen Bereich des Gels.

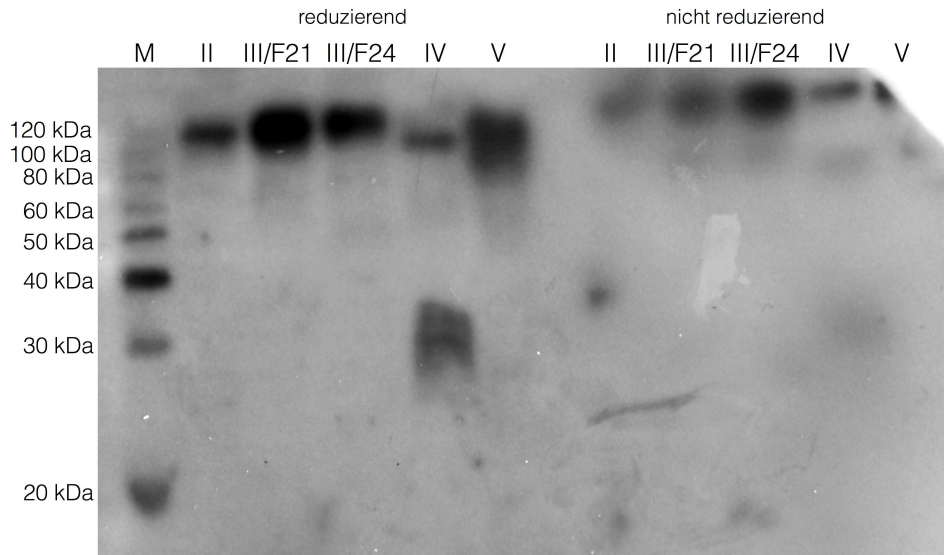
Unter reduzierenden und unter nicht reduzierenden Bedingungen war in Gipfel II eine schwache Bande oberhalb der 300 kDa-Markerbande zu sehen. Die EM-Aufnahme des Gipfel III mit den Fraktionen 21 und 24 zeigten würfelförmige Partikel, die bisher keinem bekannten Protein zugeordnet werden konnten (Abb. 8B, C). Beide Fraktionen zeigen unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen ein fast identisches Bandenmuster. Unter reduzierenden Bedingungen fand sich eine Bande bei leicht über 300 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen kam es zu einer Bande oberhalb der

315 kDa-Bande des Markers sowie einer weiteren Bande bei etwa 100 kDa. Gipfel IV mit AChBP und den Hämocyanin-Dekameren bildete eine Bande bei 30 kDa und eine weitere bei etwa 300 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen verschwanden diese Banden erwartungsgemäß und wurden durch Banden der jeweiligen Dimere ersetzt. Gipfel V zeigte in den EM-Aufnahmen Hämoglobin. Unter reduzierenden Bedingungen ergab dies einen langen Bandenschmier, unter nicht reduzierenden Bedingungen sammelte sich fast das gesamte Material knapp unterhalb der Auftragungstasche.

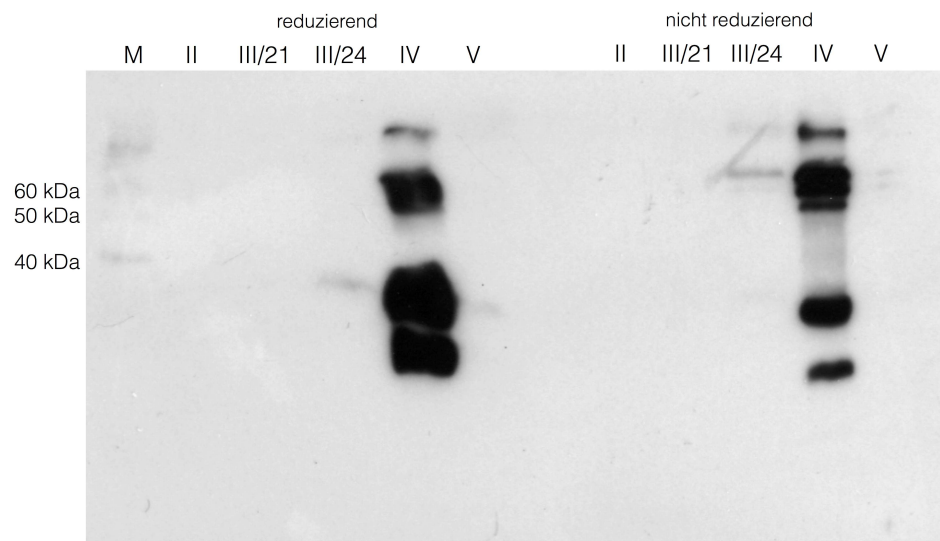
Anti-BgAChBP1-Antikörper zeigte in Western-Blots oberhalb der 120 kDa-Bande in jeder Fraktion eine Reaktion mit einer Bande (Abb. 10). Diese entsprach ungefähr der Hämoglobin-Bande der Gipfel V. Es könnte sich dabei um eine Kreuzreaktion zwischen dem Antikörper und Hämoglobin handeln. Die Antikörper wurden jedoch gegen rekombinant exprimiertes BgAChBP1 hergestellt und kamen nie mit Hämoglobin in Kontakt. Es könnte sich bei diesen Banden auch um die dichtgepackten Aggregate handeln, die in allen Fraktionen (auch in Gipfel V) zu finden waren. Das würde darauf hindeuten, dass es sich bei diesen Aggregationen um BgAChBP1 handelte. Eine weitere Reaktion mit einer Bande fand sich in Gipfel IV bei 30 kDa, sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen. In Gipfel III Fraktionen 21 und 24 und in Gipfel IV war unter nicht reduzierenden Bedingungen eine schattenartige Bande in Höhe von etwa 100 kDa zu sehen, welche mit den scharf abgegrenzten Banden der SDS-PAGE (Sternchen in Abb. 9) auf dieser Höhe übereinstimmten.

In Gipfel III Fraktion 24 kam es unter reduzierenden Bedingungen mit Anti-BgAChBP2-Antikörper zu einer schwachen Reaktion mit der Bande in Höhe von 30 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen verschwand diese Bande weitestgehend und wurde durch eine kräftigere Bande in Höhe von 60 kDa ersetzt. Das deutlichste Signal fand sich in Gipfel IV. Eine kräftige Doppelbande war bei 25-30 kDa zu sehen. Der obere Teil der Doppelbande entsprach hierbei der Detektion, die auch durch Anti-BgAChBP1-Antikörper erzielt wurde. Zum unteren Teil der Doppelbande gab es kein Pendant. Zwei weitere Banden befanden sich bei 60 kDa und oberhalb von 100 kDa (Abb. 10C). Die Bande bei 60 kDa wurde ausschließlich durch Anti-BgAChBP2-Antikörper detektiert und fehlte im Blot mit Anti-BgAChBP1 (Abb. 10B). Das Bandenmuster in Gipfel IV veränderte sich kaum, die Signale waren jedoch etwas schwächer. Die Doppelbande bei 25 bzw. 30 kDa war nach wie vor vorhanden. Die Banden bei 60 kDa und oberhalb von 100 kDa waren ebenfalls gut zu sehen.

1 Isolierung und Charakterisierung von Proteinen aus der Hämolymphe von *B. glabrata*



(A) Anti-*BgAChBP1*-Antikörper. In allen Fraktionen eine Bande weit oben im Gel. Zusätzlich in Gipfel IV eine Bande in Höhe des AChBP-Monomers.



(B) Anti-*BgAChBP2*-Antikörper. Eine leichte Reaktion in Gipfel III, Fraktion 24 in Höhe von etwa 30 kDa. Zusätzlich Signal in Gipfel IV in Höhe von 25-30 kDa sowie 60 kDa und 100 kDa

Abb. 10: Western-Blots mit Hämolympheproteinen aus *B. glabrata* und Anti-*BgAChBP1*- und Anti-*BgAChBP2*-Antikörper.

Um einen Eindruck der Struktur des unbekannt Proteins (Protein X) aus Gipfel III der Anionenaustausch-Chromatographie zu bekommen (Abb. 8B und 8C), wurden mithilfe des automatisierten Template-Pickers aus Relion 1.3 aus Negativkonst-EM-Aufnahmen verschiedene Proteinansichten selektiert (Tab. 5). Aus diesen Einzelpartikeln wurden

Tab. 5: Datensatz aus negativ kontrastierten Partikeln des unbekannt Proteins (Protein X) aus *B. glabrata*

Anzahl der EM-Aufnahmen	232
Anzahl der Partikel	17721
Boxgröße	96 x 96 px
Elektronenmikroskop	Tecnai G ² 12 BioTWIN
Vergrößerung	71540x
Ångstrom pro Pixel	4,36

Klassensummen gebildet, um den Datensatz nach Einsatz des Selektionsalgorithmus zu sortieren. Nach Aufreinigung des Datensatzes wurden 2D-Klassensummen aus den verbliebenen 17721 Partikeln berechnet (Abb. 11).

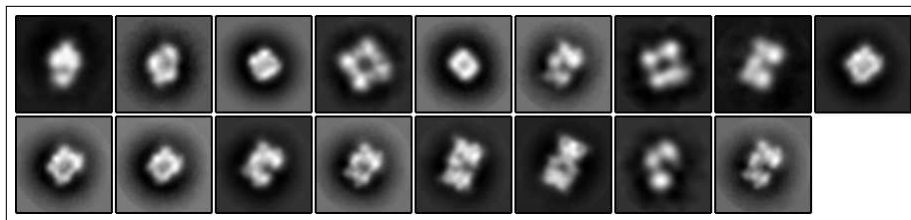


Abb. 11: 2D-Klassensummen des unbekannt Hämolympheproteins. Auswahl der Klassensummen, die mit Relion 1.3 aus dem Datensatz mit 17721 Partikeln berechnet wurden.

Auf Grundlage der Klassensummen (Abb. 11), wurde ein *multirefinement* mit dem Programm EMAN durchgeführt. Als Startmodelle dienten drei unterschiedlich stark verrauschte Kugeln. Nach wenigen Iterationen hatten sich drei sehr unterschiedliche 3D-Rekonstruktionen gebildet (Abb. 12).

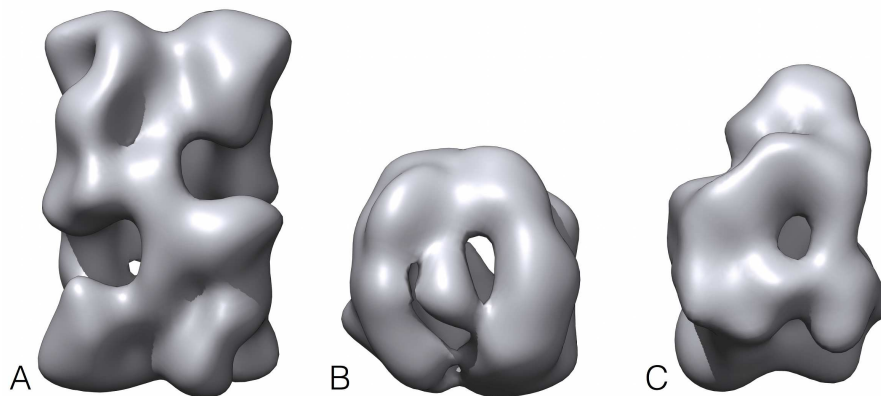


Abb. 12: 3D-Rekonstruktionen des *multirefinements* des unbekanntes Hämolympheproteines. (A) 3D-Dichtekarte in die 8688 Partikel einfließen. Länge der Struktur etwa 50 Å, Breite etwa 30 Å. (B) Zweite 3D-Rekonstruktion mit insgesamt 4819 Partikeln. Kantenlänge des Partikels etwa 30 Å. (C) Dritte 3D-Rekonstruktion aus 4214 Partikeln. Länge etwa 40 Å bei einer Breite von 30 Å.

Die 3D-Rekonstruktion, in die die meisten Partikel einfließen, war gleichzeitig auch die mit der räumlich größten Ausdehnung (Abb. 12A). In dieser 3D-Rekonstruktion befanden sich 8688 Partikel. Die Dichtekarte war länglich und verfügte über eine horizontale Symmetrieachse, möglicherweise sogar über eine D₂-Symmetrie. Eine eher globulär wirkende 3D-Rekonstruktion aus 4819 Partikeln (Abb. 12B) war etwa halb so groß wie die Dichtekarte in Abb. 12A. Die, aus 4214 Partikeln resultierende dritte 3D-Rekonstruktion, wirkte, als handle es sich hierbei um unvollständige Partikel der 3D-Rekonstruktion, die in Abb. 12A gezeigt wurde. Keiner der drei Dichtekarten konnte eine Polypeptidkette zugeordnet werden und es blieb bis zu diesem Zeitpunkt offen, um welches Protein es sich bei der 3D-Rekonstruktion handelte.

2 Rekombinante Expression von *BgAChBP1* mit N-terminalem His-Tag

Die Expression wurde in *E. coli* durchgeführt und durch SDS-PAGE überprüft (siehe Kap. 6.1) (Dissertation Möller, 2012). Eine erfolgreiche Expression des *BgAChBP1* zeigte sich durch die deutliche Bande in Höhe von 25 kDa im Bakterienpellet (P) (Abb. 13). In der nicht-induzierten Kontrolle (P-) fehlte diese Bande und daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um ein bakterientypisches Protein handelte.

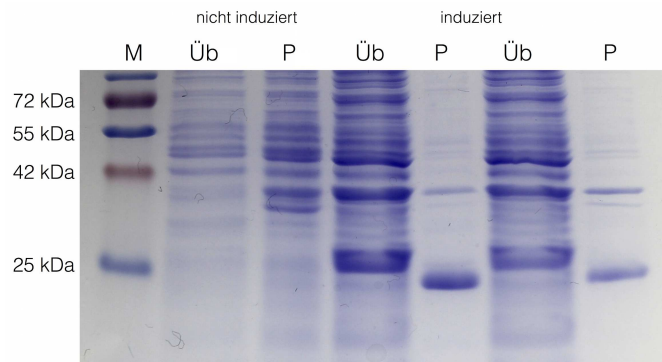


Abb. 13: SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression von *BgAChBP1*. Überstand (Üb) und Bakterienpellet (P). Proteinbande mit der gewünschten Molekülmasse des *BgAChBP1* von 25 kDa im Bakterienpellet; Nichtinduzierte Kontrollproben (Üb- und P-) ohne diese Bande. Marker (M) ProSieve Quad Color Proteinmarker (Lonza, Rockland, USA).

Nachdem sichergestellt wurde, dass *BgAChBP1* exprimiert worden war, wurden die Einschlusskörperchen durch Sonifizieren aufgebrochen. Danach lag *BgAChBP* in Lösung vor und wurde über eine Nickel-Sepharose-Säule gereinigt. Im Gegensatz zum Eluat (E) fehlten in der SDS-PAGE in Durchfluss (DF) und Waschfraktion (WF) die Proteinbande des *BgAChBP1* in Höhe von 25 kDa (Abb. 14). Das Eluat wurde anschließend renaturiert und im letzten Aufreinigungsschritt gegen 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) dialysiert.

Zur leichteren Aufreinigung des Proteins wurde im Vorfeld ein 6x Histidin-*Tag* und eine Erkennungssequenz für die TEV-Protease an das *BgAChBP1*-Gen kloniert (Dissertation Möller, 2012). Mithilfe der Protease wurde der His-*Tag* proteolytisch abgespalten. Der Erfolg der Abspaltung ließ sich in der SDS-PAGE dokumentieren (Abb. 14).

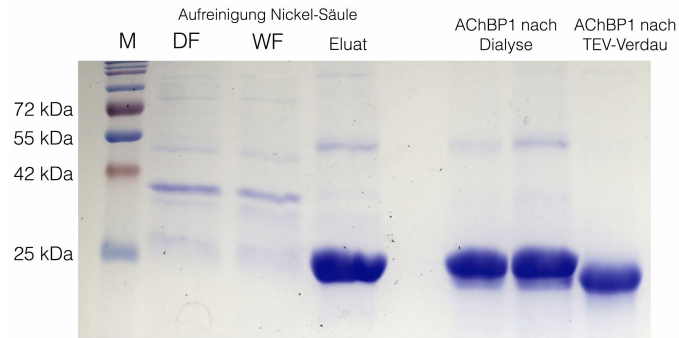


Abb. 14: SDS-Gel zur Überprüfung der Aufreinigung von *BgAChBP1*. Nach Aufreinigung durch Nickel-Affinitäts-Chromatographie nur im Eluat (E) Proteinbande bei 25 kDa; Durchfluss (DF) und Waschfraktion (DF) ohne diese Bande. *BgAChBP1* nach Dialyse in 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) mit kräftiger Bande bei 25 kDa. Nach Abspaltung des His-Tag leicht geringere Molekülmasse des Proteins.

Die Quartärstruktur sowie die Oligomerisation des Proteins wurden mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (EM) untersucht. Nach erfolgter Aufreinigung des *BgAChBP1* lag das Protein als Pentamer vor (Abb. 15A). In den EM-Aufnahmen sind die Aufsichten auf das Pentamer als Vorzugsansicht gut zu erkennen. Erst nachdem der His-Tag abgespalten wurde, konnten sich im Puffer mit 20 mM Tris (pH 7,5) neben den Pentameren auch Dodekaeder bilden (Abb. 15B).

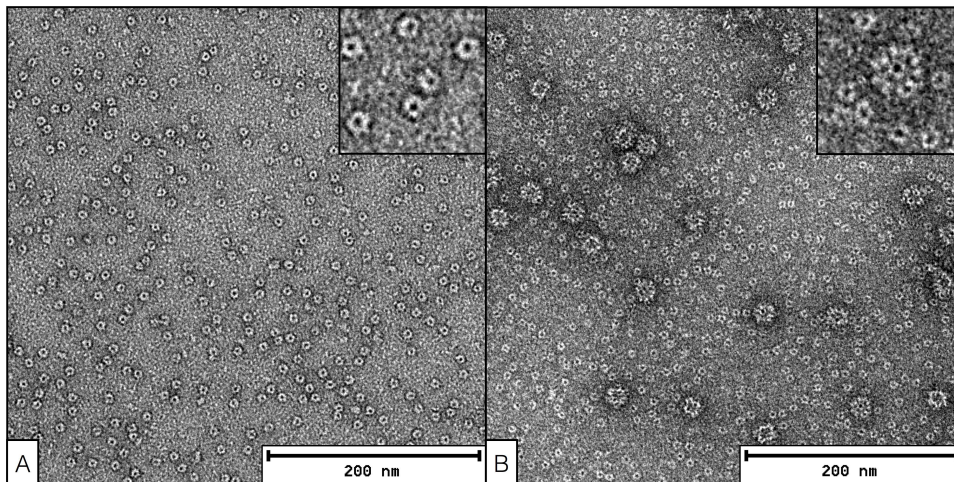


Abb. 15: EM-Aufnahmen des rekombinanten *BgAChBP1* mit und ohne His-Tag. (A) *BgAChBP1* mit His-Tag bildete ausschließlich Pentamere (Ausschnitt). (B) Nach Abspaltung des His-Tags; Pentamere sowie Dodekaeder (Ausschnitt). Beide Proben in 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5).

Um Pentamere und Dodekaeder voneinander zu trennen und eine reine Dodekaederprobe zu erhalten, wurde eine Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt. Im Elutionsprofil waren zwei voneinander getrennte Gipfel zu sehen (Abb. 16A). Gipfel 1 (rechts), war etwas höher als Gipfel 2 (links). Alle Fraktionen der einzelnen Gipfel wurden vereint, aufkonzentriert und danach elektronenmikroskopisch untersucht. In Gipfel 1 fanden sich fast ausschließlich Dodekaeder (Abb. 16B), wohingegen Gipfel 2 fast ausschließlich aus Pentameren bestand (Abb. 16C).

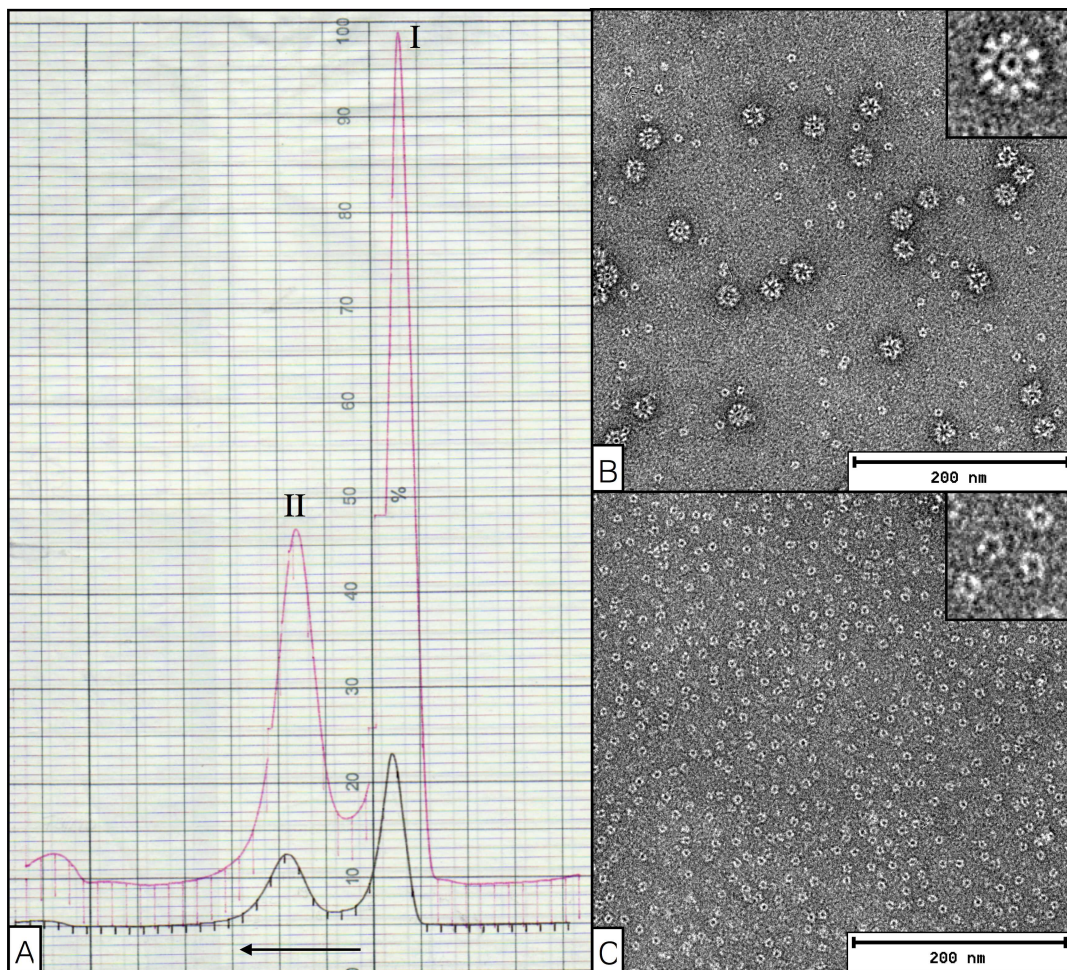


Abb. 16: Trennung von *BgAChBP1*-Pentameren und *BgAChBP1*-Dodekaedern nach erfolgter Abspaltung des His-Tags über eine Größenausschluss-Chromatographie. (A) Elutionsprofil der Größenausschluss-Chromatographie (Pfeilrichtung der Elution). Beide Gipfel des Elutionsprofils wurden aufkonzentriert und elektronenmikroskopisch untersucht. (B) EM-Aufnahme von Gipfel 1. Der Großteil des Proteins lag als Dodekaeder vor, ein kleiner Teil als Pentamere. (C) EM-Aufnahme von Gipfel 2 der ausschließlich Pentamere enthielt.

Um das Medium zu optimieren und so die Stabilität des Dodekaeders zu verbessern, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Holger Stark am Max-Planck-Institut in Göttingen, Thermofluor (siehe 7) verwendet. Als Referenzpuffer diente 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5). Der Puffer, in dem der Dodekaeder des *BgAChBP1* am stabilsten war, enthielt 50 mM Bis-Tris, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ bei einem pH von 6,5. In diesem Puffer waren *BgAChBP1*-Dodekaeder bis 76 °C stabil. In 20 mM Tris-Puffer bei einem pH von 7,5 blieben sie bis ca. 70 °C stabil. Die veränderten Pufferbedingungen wurden mit EM-Aufnahmen hinsichtlich etwaiger Auswirkungen auf die Quartärstruktur überprüft (Abb. 17).

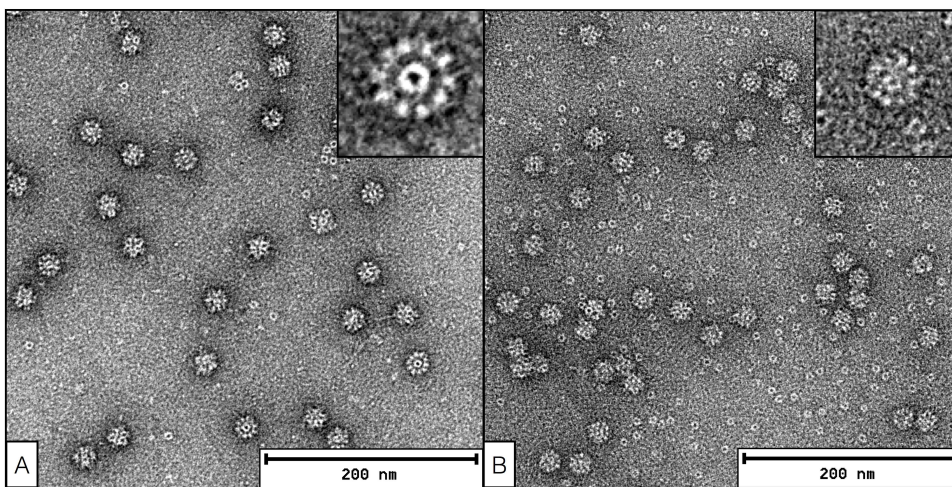


Abb. 17: EM-Aufnahmen des rekombinanten *BgAChBP1* mit und ohne His-Tag in optimiertem Puffer. (A) *BgAChBP1* mit His-Tag zeigt sowohl Pentamere als auch Dodekaeder. Keine Hinderung der Dodekaederbildung durch den His-Tag. (B) *BgAChBP1* ohne His-Tag. Weiterhin Pentamere und Dodekaeder. In diesem Medium keine Kontrollmöglichkeit über den Assemblierungszustand des Proteins mithilfe des His-Tags.

Nach Dialyse gegen 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) zeigte *BgAChBP1* ausschließlich Pentamere (vgl. Abb. 15A). Anschließend wurde das Protein gegen den optimierten Puffer dialysiert und erneut elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 17A). Im Gegensatz zum Tris-Puffer waren hier sowohl Pentamere als auch Dodekaeder zu sehen. Unter diesen Bedingungen war anhand der Bildung von Dodekaedern also nicht zwischen Protein mit und ohne His-Tag (Abb. 17B) zu unterscheiden. Das Vorhandensein von Dodekaedern trotz His-Tag bedeutete, dass nicht sicher war, dass Dodekaeder aus Untereinheiten bestand, bei dem der TEV-Verdau erfolgreich war. Das zusätzliche 13 Aminosäure lange Polypeptid würde bei der geplanten hochaufgelösten

3D-Rekonstruktion stören, da die Auflösung durch die Flexibilität limitiert würde. Studien zur Ligandenbindung könnten durch den *His-Tag* ebenfalls behindert werden, da eine Bindung von bestimmten Liganden an die Histidine nicht ausgeschlossen werden kann.

3 Rekombinante Expression von *BgAChBP2* mit N-terminalem *His-Tag* in *E. coli*

Die Expression des *BgAChBP2* wurde nach dem gleichen Protokoll durchgeführt wie bei *BgAChBP1* (siehe Kap. 2). Sowohl Bakterienpellets als auch deren Überstände wurden mittels SDS-PAGE kontrolliert (Abb. 18).

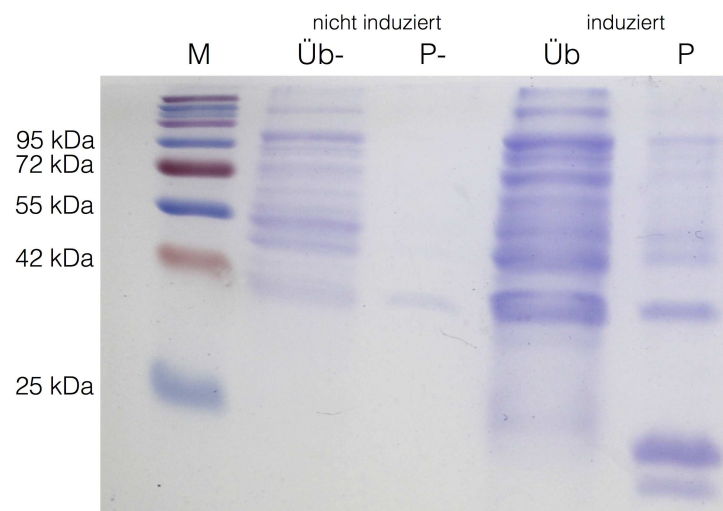


Abb. 18: SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression von *BgAChBP2*. Überstände der Bakterienpellets (Üb) und Bakterienpellet (P). Die erwartete Proteinbande des *BgAChBP2* bei 25 kDa im Bakterienpellet. Keine Proteinbande in erwarteter Höhe in der Kontrolle (P-). Die Proteinexpression war demnach erfolgreich. ProSieve Quad Color Proteinmarker (Lonza, Rockland, USA) als Marker (M).

Das überexprimierte Protein mit einer Molekülmasse von 25 kDa befand sich in den Einschlusskörperchen und damit in den Bakterienpellets. Im Gegensatz zum rekombinanten *BgAChBP1* (siehe Abb. 13) gab es hier eine Doppelbande, die sich als charakteristisch für rekombinantes *BgAChBP2* mit N-terminalem *His-tag* herausstellte (Abb. 18). Die Einschlusskörperchen wurden durch Sonifizieren aufgebrochen und das

BgAChBP2 mithilfe einer Nickel-Affinitäts-Chromatographie aus der Lösung isoliert. Nachdem das resultierende Eluat zur Rückfaltung in den Faltungspuffer eingetroppt worden war, wurde das Protein aufkonzentriert und gegen 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) dialysiert.

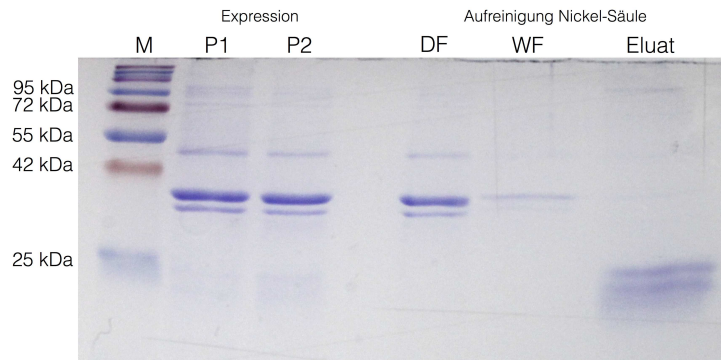


Abb. 19: SDS-PAGE zur Überprüfung der Aufreinigung von *BgAChBP2*. Bakterienpellets der Expression (P1 und P2) mit deutlicher Doppelbande bei etwa 35 kDa. Die schwächere Bande des *BgAChBP2*-Monomers bei 25 kDa. Durchfluss (DF) und Waschfraktion (WF) der Affinitäts-Chromatographie mit Doppelbande bei 35 kDa. Eluat mit kräftiger *BgAChBP2*-Bande bei 25 kDa. ProSieve Quad Color Proteinmarker (Lonza, Rockland, USA) als Marker (M).

Die scharf abgegrenzte Doppelbande bei etwa 35 kDa in den Bakterienpellets (P1 und P2) verfügte offensichtlich nicht über einen His-Tag, denn die Bande fand sich in Durchfluss (DF) und Waschfraktion (WF) der Nickel-Affinitäts-Chromatographie (DF). Im Eluat (E) an sich war nur die typische Doppelbande des *BgAChBP2* bei 25 kDa zu finden. Um den His-Tag zu entfernen, wurde dieser proteolytisch durch die TEV-Protease abgespalten. Zur Überprüfung wurde eine SDS-PAGE mit *BgAChBP2* vor und nach dem TEV-Verdau angefertigt.

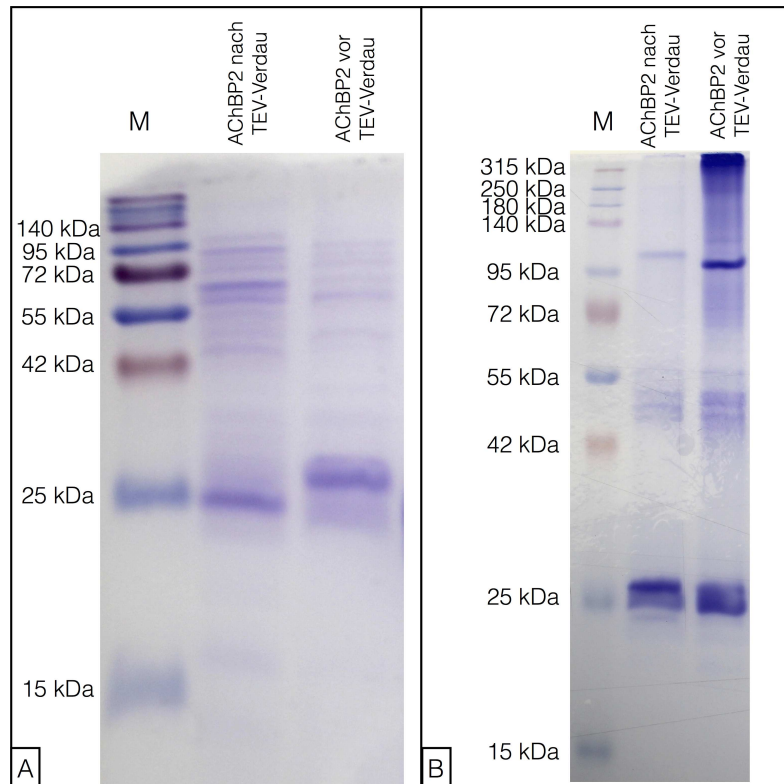


Abb. 20: SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen von *BgAChBP2* nach proteolytischer Abspaltung des *His-Tags*. (A) *BgAChBP2* unter reduzierenden Bedingungen nach Abspalten des *His-Tag* eine etwas geringere Molekülmasse mit der Hauptbande bei 25 kDa. (B) Unter nicht reduzierenden Bedingungen fast identisches Bandenmuster zwischen *BgAChBP2* mit und ohne *His-Tag*. Kein Unterschied in der Molekülmasse sichtbar. Marker (M) ProSieve Quad Color Proteinmarker (Lonza, Rockland, USA).

Nachdem der *His-Tag* abgespalten worden war, war die *BgAChBP2*-Bande bei 25 kDa in der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen etwas weiter gewandert als bei dem Protein mit *His-Tag* (Abb. 20A). Dieses Ergebnis deckte sich mit dem aus *BgAChBP1*, bei dem das erfolgreiche Abspalten des *His-Tags* ebenfalls in der SDS-PAGE gezeigt werden konnte. Unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigte sich aber ein anderes Bild als erwartet. Ein Unterschied in der Molekülmasse war zwischen *BgAChBP2* mit und ohne *His-Tag* nicht zu erkennen (Abb. 20B). Beide Proteine zeigten ein identisches Bandenmuster. Eine deutliche Verstärkung der erwarteten Dimer-Bande bei etwa 50 kDa blieb nach Abspalten des *His-Tags* ebenfalls aus. Eine kräftige Bande bei 100 kDa verschwand durch das Abspalten des *His-Tags* fast vollständig. Es war nicht möglich die sichere Abspaltung des *His-Tags* oder das Vorhandensein von Dipentameren mittels SDS-PAGE nachzuweisen.

Auch über Größenausschluss-Chromatographie war es nicht möglich Pentamere von Dipentameren zu separieren; ebenfalls gelang es nicht die Bande des Dipentamers nach Knispel et al. (2012) auf einen Objektträger für die Elektronenmikroskopie zu übertragen, um so eine Anreicherung des Proteins zu erlangen.

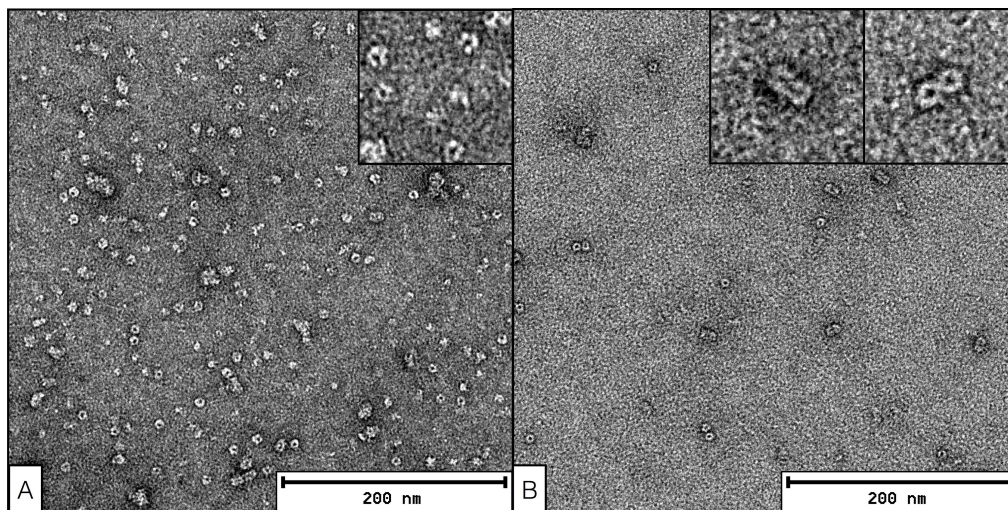


Abb. 21: EM-Aufnahmen des rekombinanten *BgAChBP2* mit und ohne *His-Tag*. (A) *BgAChBP2* mit *His-Tag*: Pentamere und amorphe Aggregate. (B) *BgAChBP2* nach Abspaltung des *His-Tags*: Seitenansichten, die Dipentamere zeigen könnten und Aufsichten auf die pentamere Struktur. Beide Proben in 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) und wurden mit 1% Uranylacetat kontrastiert.

Das gefaltete *BgAChBP2* bildete Pentamere sowie recht viele, allgemein eher kleine amorphe Aggregate (Abb. 21A). Nachdem der *His-Tag* abgespalten worden war, waren Pentamere zu sehen sowie Proteinstrukturen, bei denen es sich um Dipentamere handeln könnte (Abb. 21B). Ob es sich tatsächlich um Dipentamere handelte, oder um Pentamere, die dicht nebeneinander auf dem Objektträger lagen ist aus diesen Aufnahmen nicht mit Sicherheit zu sagen. Zusätzlich waren auch Strukturen zu sehen, bei denen zwei pentamere Aufsichten direkt aneinander lagen. Einzel liegenden Aufsichten ließen keinen Schluss über ihre Länge zu.

Um weitere Erkenntnisse über das *BgAChBP2*-Dipentamer zu erhalten, wurden aus den EM-Aufnahmen Klassensummen und eine 3D-Rekonstruktion berechnet (siehe Kap. 5).

4 3D-Rekonstruktion der Apo-Struktur des *BgAChBP1*-Dodekaeders

Zwei in unserer Arbeitsgruppe von S. Braukmann (unveröffentlicht) angefertigte 3D-Rekonstruktionen des *BgAChBP1*-Dodekaeders mit Nikotin als Ligand und mit Bis-Tris-Puffer zeigten, jeweils eine Masse in der Bindungstasche. Um die Apo-Struktur des Proteinkomplexes zu rekonstruieren, wurde *BgAChBP1* wie in Kap. 2 beschrieben rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Nach Trennung der entstandenen Dodekaeder und Pentamere über eine Größenausschluss-Chromatographie (Abb. 16), wurde die Dodekaeder-Fraktion gegen destilliertes Wasser mit 10 mM $MgCl_2$ und 10 mM $CaCl_2$ dialysiert. In EM-Aufnahmen mit negativ kontrastiertem Protein war kein Unterschied zwischen den Dodekaedern in 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) und denen in destilliertem Wasser zu sehen. Die Partikel wirkten vollständig und zeigten einen durchgängigen Kanal, der sich schwarz vom Pentamer abhob (Abb. 22). Die Dodekaeder waren aber dennoch instabil, weil sie bei cryo-EM-Experimenten in Pentamere dissoziierten. Eine GraFix-Behandlung stabilisierte die Proteinkomplexe jedoch. Anschließend wurden am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Holger Stark am dortigen Titan KriosTM (FEI, Eindhoven) 2049 cryo-EM-Bilder aufgenommen (Tab. 6).

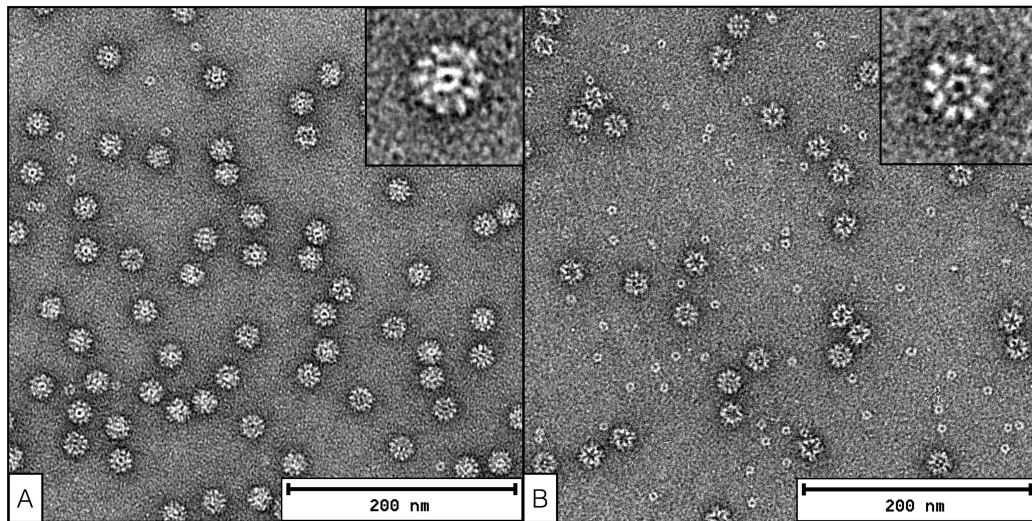


Abb. 22: EM-Aufnahmen der rekombinanten BgAChBP1-Dodekaeder in verschiedenen Puffern. Die Dodekaeder beider Proben wurden zuvor über eine Gelfiltrations-Chromatographie von den Pentameren getrennt. (A) BgAChBP1-Dodekaeder in 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5). (B) Dodekaeder, die vor der Kontrastierung gegen destilliertes Wasser mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM CaCl₂ dialysiert wurden. Beide Proben mit vielen und vollständigen Dodekaedern; in (B) mehr Pentamere als in (A).

Tab. 6: Kryo-Datensatz des BgAChBP1-Dodekaeders

Anzahl der Aufnahmen	2049
Anzahl der Partikel	269866
Boxgröße	256 x 256 px
Elektronenmikroskop	Titan Krios TM
Vergrößerung	112100x
Defokus	3,22 nm-0,48 nm
Ångstrom pro Pixel	1,27

Die 3D-Rekonstruktion des Proteins aus Einzelpartikeln wurde in Relion 1.3 (Scheres, 2012, 2015) sowie in Frealign 9 (Grigorieff, 2007; Lyumkis et al., 2013) durchgeführt. Die Parameter der verwendeten EM-Aufnahmen sind in Tab. 6 zusammengefasst. Nach der CTF-Korrektur wurden von einigen EM-Aufnahmen Aufnahmen von Hand Einzelpartikel ausgewählt aus denen Klassensummen erstellt wurden. Diese wiederum dienten dem *template*-Picker als Vorlage. Alle Einzelpartikel wurden anschließend normalisiert und von den EM-Aufnahmen extrahiert. Die Boxgröße betrug 256 x 256 Pixeln, sodass die Partikel vollständig in der Box lagen. Initial erfolgte

eine Ausrichtung anhand einer Referenz, um fehlgepickte Partikel auszuschließen. Mit diesem vorsortierten Bildstapel aus 261693 Partikeln wurde eine referenzfreie 2D-Klassifizierung durchgeführt, bei der 250 Klassensummen berechnet wurden. In diesen Klassensummen war innerhalb des zentralen Kanals der Pentamere eine hohe Elektronendichte zu sehen, die auf eine zusätzliche Masse hinwies (Abb. 23). Diese hohe Elektronendichte war in bei den negativ kontrastierten Partikeln nicht zu sehen. Auch in allen anderen, bisher in der Arbeitsgruppe angefertigten 3D-Rekonstruktionen des *BgAChBP1*-Dodekaeders befand sich hier ein durchgängiger Kanal, der sich schwarz vom Pentamer abhob.

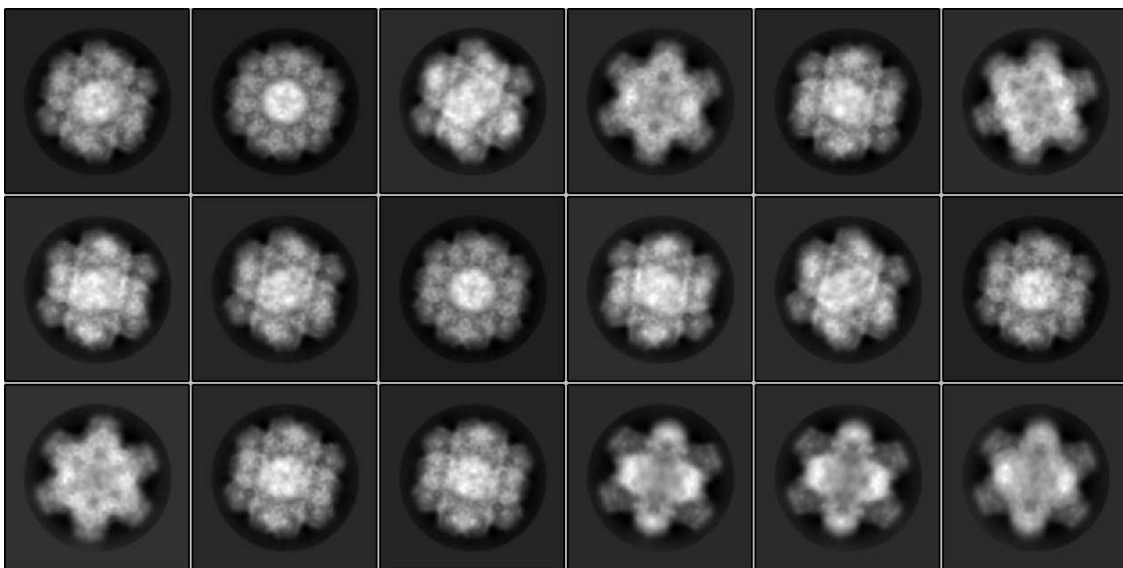


Abb. 23: 2D-Klassensummen des *BgAChBP1*-Dodekaeders. Die Klassensummen zeigen unterschiedlichen Ansichten des Dodekaeders. Klassensummen mit Blick auf die 5-zählige Symmetrieachse eines Pentamers zeigen eine zusätzliche Masse innerhalb des Kanals.

Die Qualität einer Klassensumme wurde anhand ihres Detailreichtums festgemacht. Die Einzelpartikel der besten Klassensummen wurden für den nächsten Berechnungsschritt separiert. Mit den verbliebenen 242928 Partikeln wurde nun eine referenzfreie 3D-Klassifizierung ohne Symmetrievorgabe durchgeführt, bei der insgesamt vier initiale 3D-Rekonstruktionen berechnet wurden. Ein 3D-Modell zeigte eine verrauschte Masse, bei zwei weiteren war die Grundform des Dodekaeders zu erahnen. Das vierte Modell zeigte einen Dodekaeder, bei dem alle Pentamere, die die Kamine des Dodekaeders bildeten, vollständig vorhanden waren. Aus den besten 73802 Einzelpartikeln wurde eine hochauflösende 3D-Rekonstruktion berechnet. Aufgrund der Vorerfahrung sowie

des dodekaederförmigen Aussehens der initialen 3D-Rekonstruktion, wurde eine ikosaedrische Symmetrie vorgegeben. Die resultierende Dichtekarte wurde mittels automatischem *postprocessing* geschärft und ein automatisch berechneter *bfactor* von -225,1 angelegt. In der 3D-Rekonstruktion wurde eine Auflösung von 3,59 Å erzielt (Abb. 24). Auch in der hochaufgelösten Dichtekarte war zentral in jedem Pentamer eine zusätzliche Masse vorhanden (Abb. 24D, E). Zusätzlich befand sich an der Kontaktstelle zwischen zwei Pentameren eine zusätzliche Masse (Abb. 24F).

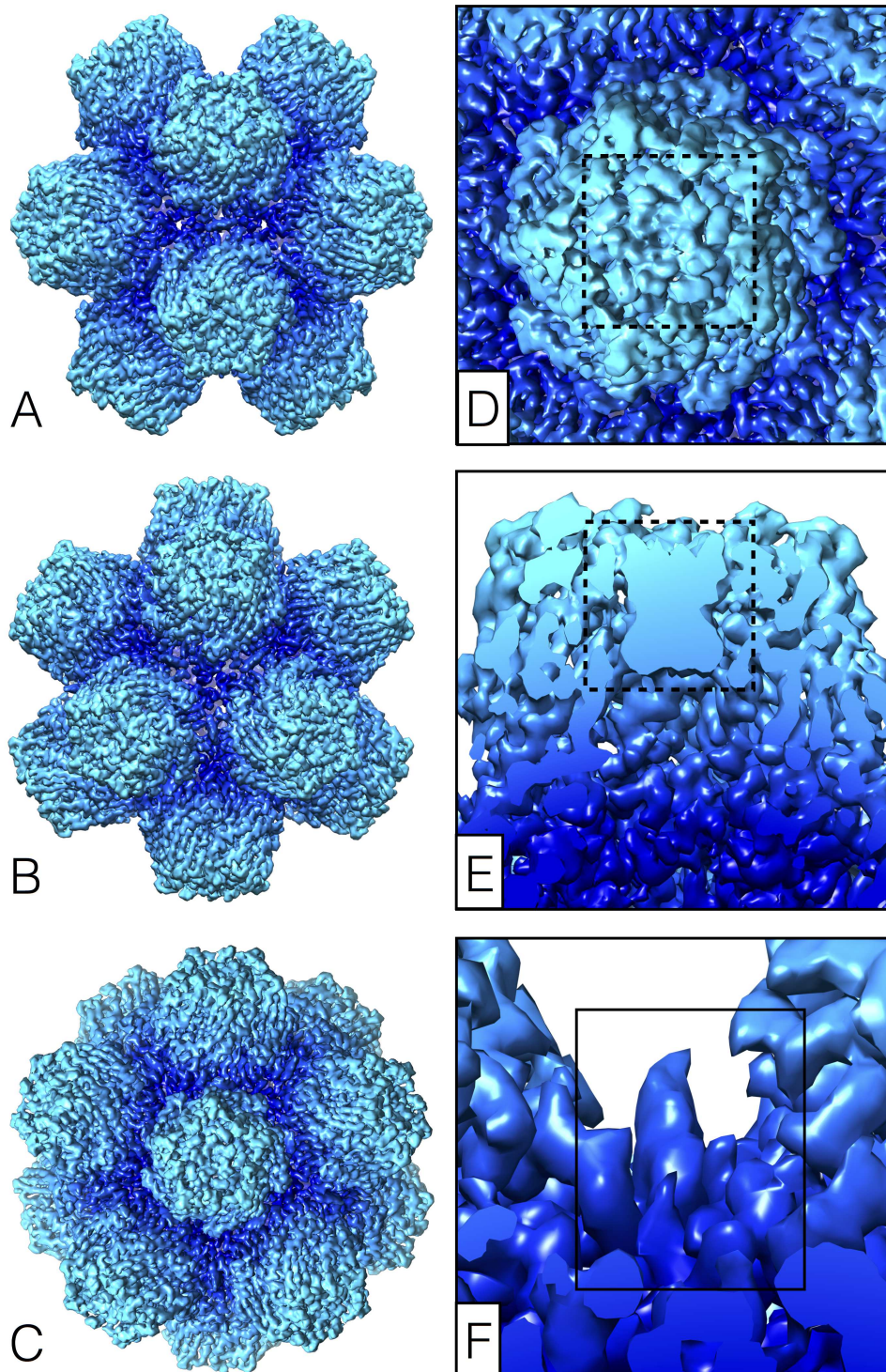


Abb. 24: 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP1*-Dodekaeders mit Relion. (A-C) 3D-Rekonstruktion aus verschiedenen Blickrichtungen mit einer Auflösung von 3,59 Å. (D), (E) Zusätzliche Masse (gestrichelter Kasten) innerhalb eines Pentamers; (D) Aufsicht auf ein Pentamer, (E) Längsschnitt durch ein Pentamer. (F) Zusätzliche Masse (schwarzer Kasten) an der Kontaktstelle zweier Pentamere.

Um auszuschließen, dass es sich bei den zusätzlichen Massen um Symmetrieartefakte handelt, oder die zusätzlichen Massen nur in einzelnen Pentameren vorlagen, wurde mit Frealign eine 3D-Rekonstruktion ohne Symmetrievorgabe berechnet. Verfälschungen der 3D-Rekonstruktion durch Vorgabe einer Symmetrie konnten damit ausgeschlossen werden. Ohne Vorgabe einer Symmetrie wurde eine Auflösung von 6 Å erreicht (Abb. 25) wobei die Kanäle der Pentamere ebenfalls verschlossen waren. Die zusätzlichen Massen den Kontaktstellen zwischen zwei Pentameren traten auch hier auf.

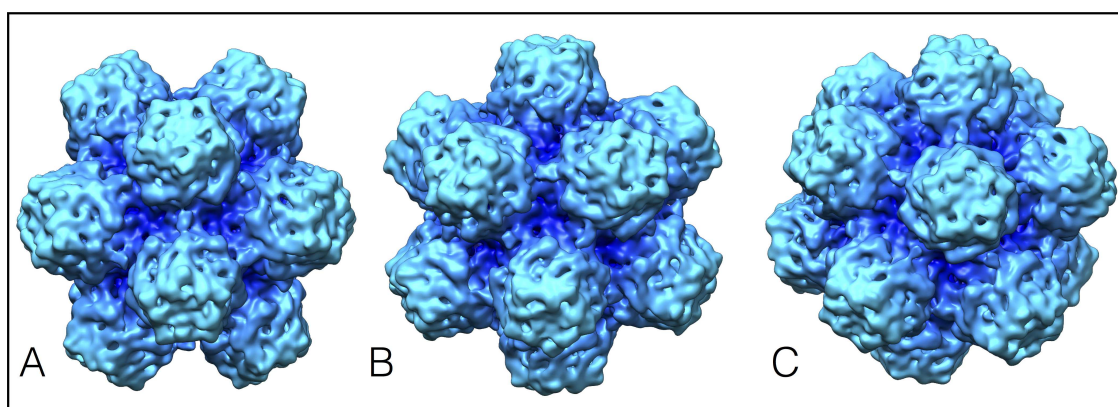


Abb. 25: 3D-Rekonstruktion des BgAChBP1-Dodekaeders mit Frealign ohne Symmetrievorgabe. (A) Blick entlang einer der 10 dreizähligen Symmetrieachsen. (B) Blick entlang einer der sechs fünfzähligen Symmetrieachsen. (C) Ansicht entlang einer der fünfzehn zweizähligen Symmetrieachsen.

Zur Validierung und möglicherweise auch zur Verbesserung der Ergebnisse wurde auch mit Frealign eine hochauflösende 3D-Rekonstruktion berechnet. Angenommen wurde eine ikosaedrische Symmetrie und eine Molekülmasse von 1450 kDa. Der Ausgangsdatensatz entsprach dem der 3D-Rekonstruktion mit Relion. Die resultierende 3D-Dichtekarte hatte nach dem 0,5-Kriterium eine Auflösung von 4,05 Å (Abb. 26A). Nachdem der *bfactor* manuell mit einem Wert von -290 angelegt wurde, waren in allen Pentameren zusätzliche Massen vorhanden (Abb. 26B, C). Ebenso lag eine Masse an der Kontaktstelle zweier Pentamere (Abb. 26D).

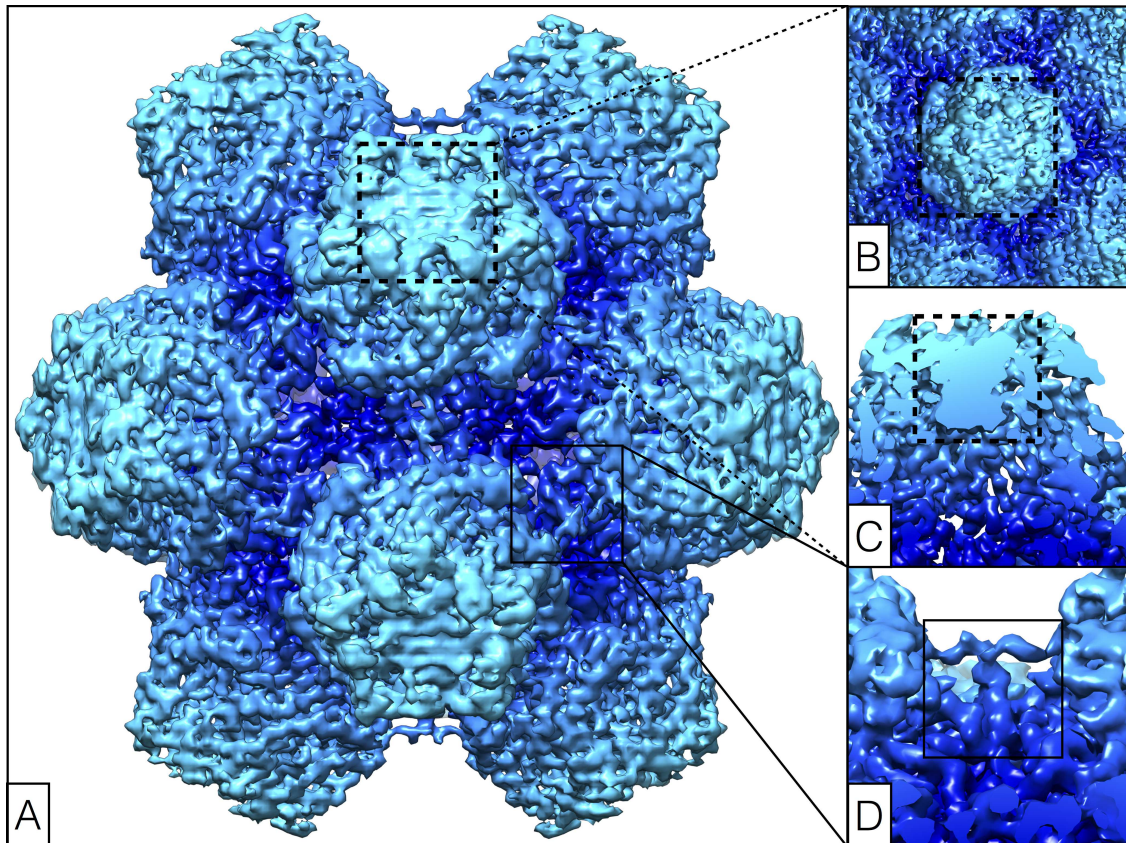


Abb. 26: 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP1*-Dodekaeders mit Frealign. (A) Übersicht über den Dodekaeder, Blick entlang einer der 10 dreizähligen Symmetrieachsen. (B), (C) zusätzliche Masse im Zentrum eines der Pentamere. (B) Aufsicht auf eines der Pentamere mit Zusatzmasse (gestrichelter Kasten), (C) Längsschnitt mit der zentralen Masse (gestrichelter Kasten), (D) Zusatzmasse an Kontaktstelle zweier Pentamere (schwarzer Kasten).

Aus der gleichen Probe wurde zeitlich versetzt EM-Aufnahmen für einen zweiten Datensatz aufgenommen. Aus den 34696 Einzelpartikeln wurde von Dr. David Haselbach (MPI für biophysikalische Chemie, Göttingen) eine neue 3D-Rekonstruktion mit Relion berechnet. Diese erreichte eine Auflösung von 3,5 Å und enthielt keine zusätzlichen Massen innerhalb der Pentamere (Abb. 27A, B). Ebenso war die Masse an der Kontaktstelle zwischen zwei Pentameren deutlich kleiner (Abb. 27C).

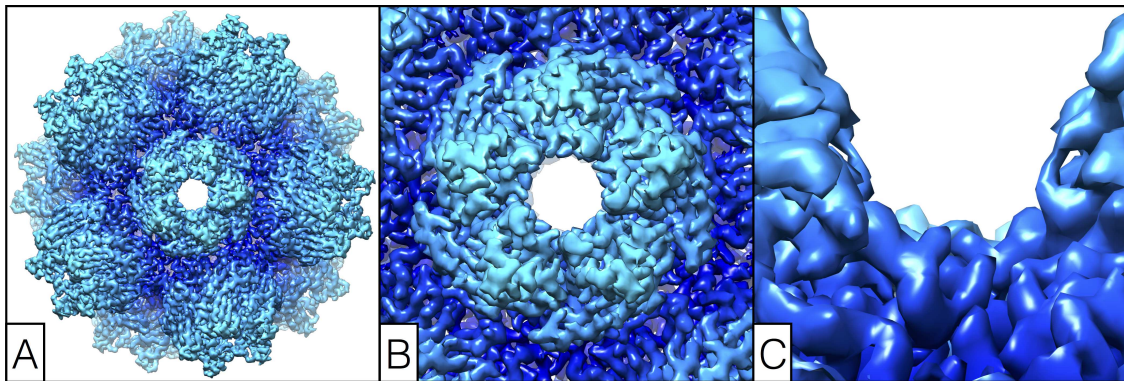


Abb. 27: 3D-Rekonstruktion des BgAChBP1-Dodekaeders aus zweitem Datensatz. (A) Übersicht über den BgAChBP1-Dodekaeder mit einer Auflösung von 3,5 Å. **(B)** Aufsicht auf eines der zwölf Pentamere ohne zusätzliche zentrale Masse. **(C)** Kontaktstelle zwischen zwei Pentameren ohne zusätzliche Masse.

4.1 Einpassen eines pseudoatomaren Homologiemodells

Anhand der 3D-Rekonstruktion mit 3,59 Å wurde das vorhandene Homologiemodell des BgAChBP1 (PDB-ID: 4AOD) eingepasst und von S. Braukmann mithilfe des Programms "coot" flexibel eingepasst (Abb. 28). Sogar die Seitenketten bestimmter Aminosäuren konnten in der 3D-Rekonstruktion identifiziert werden und ermöglichten ein sehr genaues Einpassen des Homologiemodells.

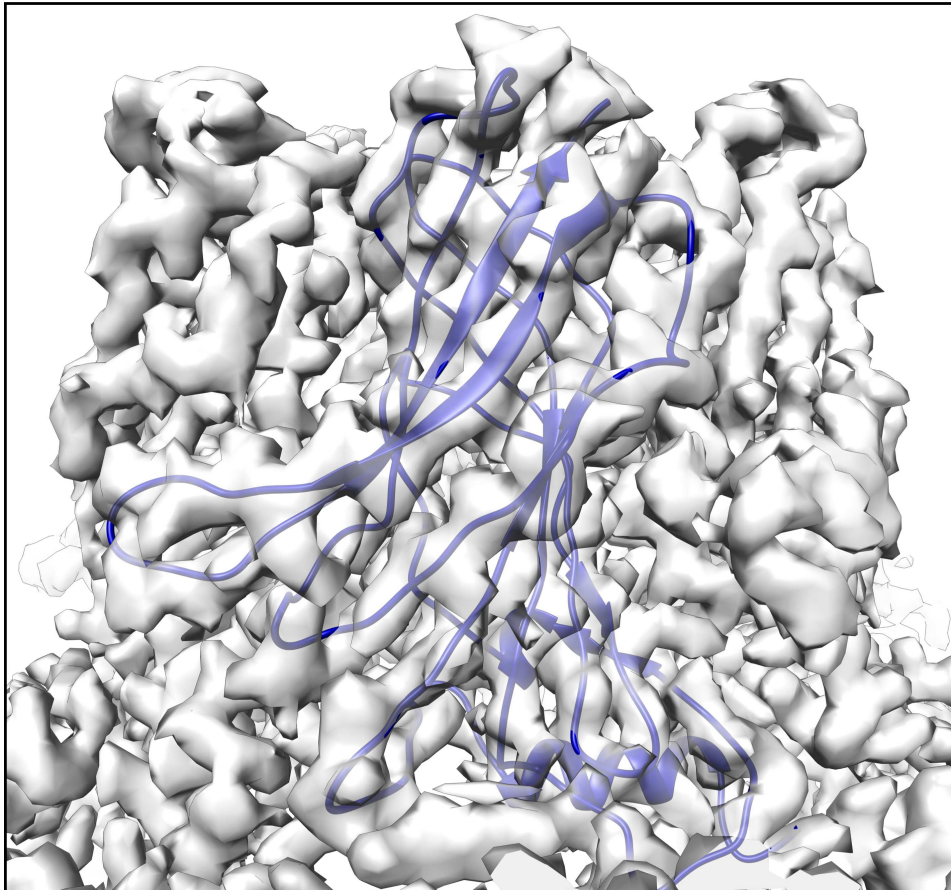


Abb. 28: 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP1*-Dodekaeders mit eingepasster Untereinheit des pseudoatomaren Homologiemodells. Aufgrund der hohen Auflösung kann das Proteinrückgrat entlang der Massen gelegt und die Seitenketten größtenteils den Aminosäuren zugeordnet werden.

In der 3D-Rekonstruktion konnten auch α -Helices (Abb. 29A) und β -Faltblätter (Abb. 29B) aufgelöst werden. In der gesamten Dichtekarte sind die Aminosäure-Seitenketten größtenteils repräsentiert und zeigten die Orientierung der einzelnen Aminosäuren an.

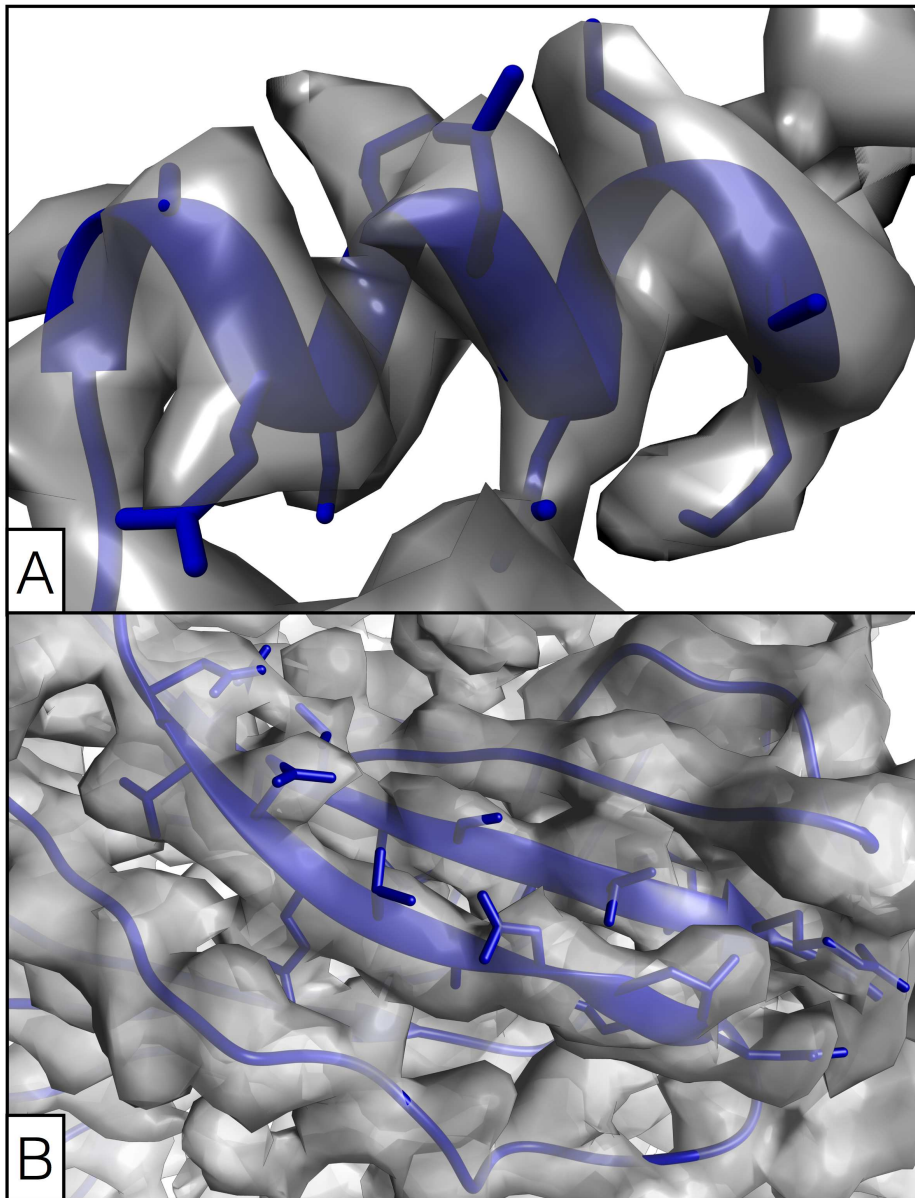


Abb. 29: Detailansicht des eingepassten pseudoatomaren Modells in die 3D-Rekonstruktion des BgAChBP1-Dodekaeders. (A) Dichtekarte der 3D-Rekonstruktion mit eingepasster α -Helix und eingblendeten Seitenketten. Die einzelnen Windungen der Helix sind gut zu erkennen. **(B)** Eingepasste β -Faltblätter mit eingblendeten Seitenketten. Der größte Teil der Seitenketten ist durch Massen in der Dichtekarte repräsentiert.

5 3D-Rekonstruktion des *Bg*AChBP2-Dipentamers

Mit den verwendeten biochemischen Methoden war es nicht möglich *Bg*AChBP2-Dipentamere anzureichern. Um dennoch weitere Informationen über seine Struktur zu erhalten, wurden von Hand Seitenansichten aus EM-Aufnahmen (siehe Abb. 21B) ausgewählt. Hierbei wurden alle Partikel ausgewählt, die ungefähr die doppelte Länge eines Pentamers und eine längliche Form aufwiesen. Tab. 7 fasst die Details des aufgenommenen Datensatzes zusammen. In einem ersten Schritt wurden

Tab. 7: Datensatz aus negativ kontrastierten Partikeln des *Bg*AChBP2-Dipentamers

Anzahl der Partikel	3424
Kontrastmittel	1% Uranylacetat
Boxgröße	64 x 64 px
Elektronenmikroskop	Tecnai G ² 12 BioTWIN
Vergößerung	71540x
Defokus	1,94 nm-1,18 nm
Ångstrom pro Pixel	4,36

Klassensummen aus den Einzelpartikeln erstellt (Abb. 30). Sie zeigten deutlich zwei Massen, die an den beiden äußeren Rändern miteinander verbunden waren. Horizontal zwischen den beiden Massen lag ein deutlicher Spalt.

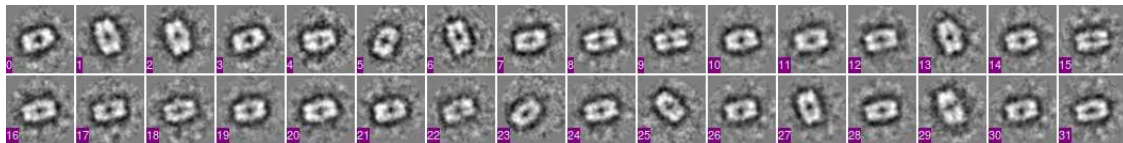


Abb. 30: 2D-Klassensummen des *Bg*AChBP2-Dipentamers. Sie wurden mit IMAGIC-5 aus 3424 Partikeln berechnet. Ein länglicher Partikel, der aus zwei Massen besteht, die an den äußeren Rändern miteinander verbunden sind.

Da eine pentamere Struktur vorausgesetzt wurde und weiterhin angenommen wurde, dass die Verbindung der beiden Pentamere über das freie Cystein C71 erfolgt, wurde für die 3D-Rekonstruktion in EMAN1.9 eine D5-Symmetrie angenommen. Die erstellte 3D-Rekonstruktion zeigte zwei deutlich strukturierte Pentamere, die über Massen miteinander verbunden waren (Abb. 31A-C). Der zentrale Kanal entlang der Längsachse des Pentamers ist gut zu erkennen, wobei der Abstand zwischen den beiden Pentameren recht groß war. Saur, 2013 (Dissertation) zeigte eine 3D-Rekonstruktion des

BgAChBP2-Dipentamers mit C-terminalem His-Tag. In dieser Rekonstruktion, bei der eine D5-Symmetrie vorgegeben war, lagen die beiden Pentamere sehr dicht beisammen, und es war kaum ein Spalt zwischen den beiden Pentameren zu erkennen. In den hier gezeigten Ergebnissen lagen die beiden Pentamere deutlich weiter voneinander entfernt.

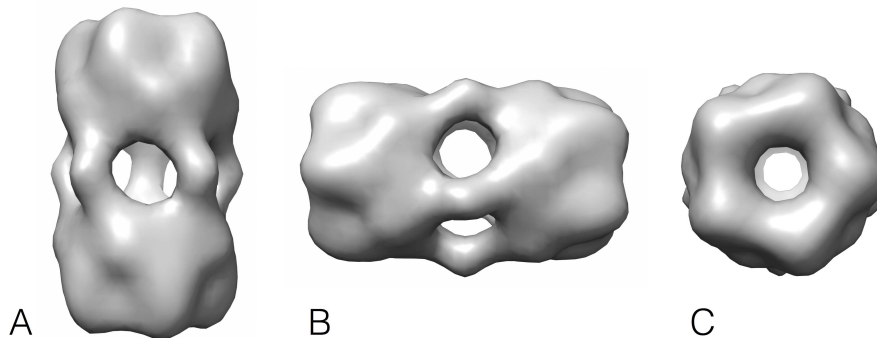


Abb. 31: 3D-Rekonstruktion des BgAChBP2-Dipentamers aus Negativkontrast-EM-Aufnahmen. In Frontansicht, um 90 °C im Uhrzeigersinn gedreht und in Aufsicht. (A-C) 3D-Rekonstruktion mit D5-Symmetrie. Deutlich strukturierte, jedoch relativ weit auseinanderliegende Pentamere.

Ein eingepasstes Homologiemodell des Pentamers (PDB-ID:4AOE) sollte Aussagen über das Vorhandensein von Disulfidbrücken zwischen Pentameren ermöglichen (Abb. 32). Dadurch konnte die Position der Cysteine und damit auch über eine mögliche Disulfidbrücke bestimmt werden. Wenn das Dipentamer durch die Ausbildung von fünf Kopien einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C71 gebildet wird, liegen sich die N-terminalen Seiten der Pentamere gegenüber. Das Homologiemodell konnte vollständig und stabil in die errechnete Masse des Dipentamers eingepasst werden (Abb. 32A-C). Hierbei kamen die Cysteine (C71) jeweils an den Verbindungen zwischen den beiden Pentameren zu liegen. C-terminal ragten die Cys-Schleifen, die vermutlich flexibel sind, aus der Masse heraus.

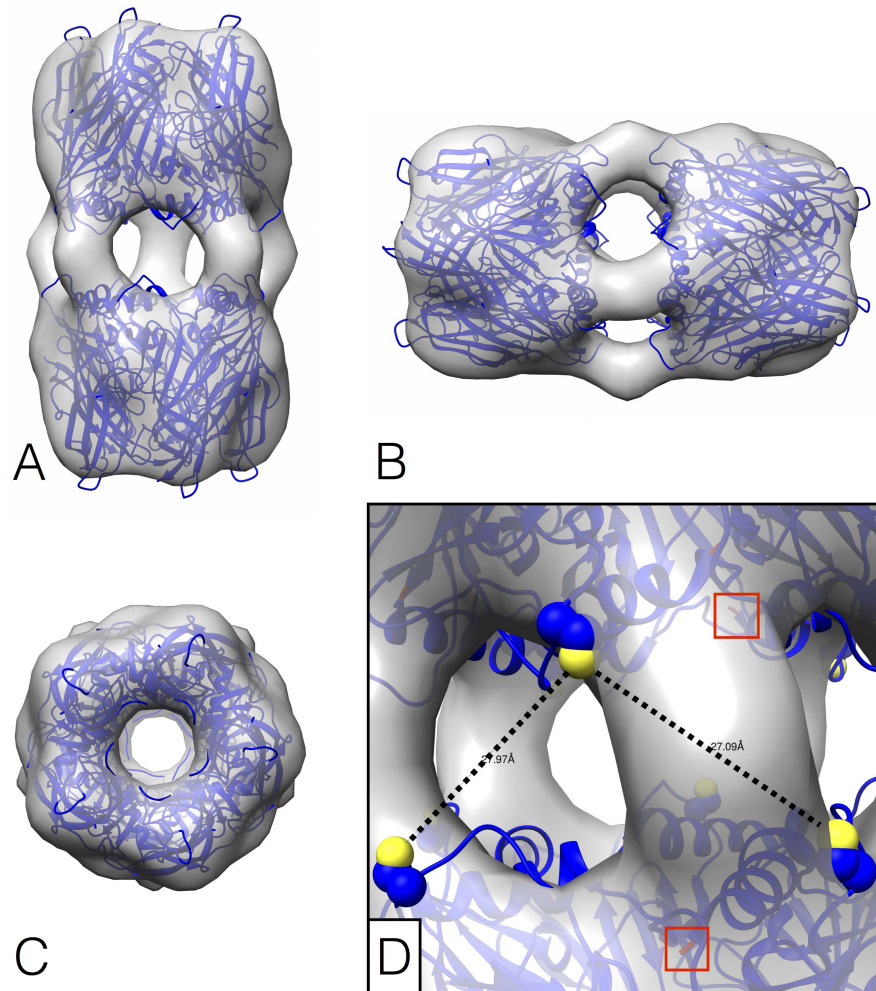


Abb. 32: 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP2*-Dipentamers mit eingepasstem Homologiemodell des Pentamers (PDB-ID: 4AOE). (A-C) In Frontansicht, um 90 °C im Uhrzeigersinn gedreht und in Aufsicht, (D) Distanzen von 27 Å bzw. 28 Å zwischen Cystein C71 (gelb) des oberen Pentamers und der beiden nächstgelegenen Cysteinen des unteren Pentamers. N-Terminus als Anheftstelle des His-Tag rot markiert. Länge der 3D-Rekonstruktion 125 Å, Durchmesser 75 Å.

In die 3D-Rekonstruktion wurden hypothetische Disulfidbrücken eingezeichnet (Abb. 32D). Bei der erreichten Auflösung war es nicht möglich die Händigkeit der Struktur zu bestimmen, daher wurde die Distanz zwischen einem Cystein des oberen Pentamers zu den beiden nächstgelegenen Cysteinen des unteren Pentamers gemessen. Der Abstand zwischen zwei Cysteinen betrug 27 Å bzw. 28 Å. Bei einer solchen Distanz ist dem Vorhandensein einer Disulfidbrücke zu widersprechen.

Da unter bestimmten Vorraussetzungen auch *BgAChBP1*, in dessen Aminosäuresequenz sich ein Phenylalanin anstelle des Cysteins an Position 71 befindet, Dipentamere bildete, könnte es sich bei dem rekonstruierten Dipentamer um ein Artefakt handeln.

5.1 3D-Rekonstruktion eines Dipentamers aus *BgAChBP1* mit His-Tag

Durch Zugabe von 10 mM MgCl₂ und 10 mM CaCl₂ zu rekombinantem *BgAChBP1* mit His-Tag kam es ebenfalls zur Ausbildung von Strukturen, die Dipentameren ähnelten. Da diese verschwanden, sobald der His-Tag abgespalten wurde, ist davon auszugehen, dass es sich um Aggregate handelte, das durch Interaktionen der Histidine mit zweiwertigen Kationen hervorgerufen wurden. Wie auch bei den *BgAChBP2*-Dipentameren wurden Klassensummen sowie 3D-Rekonstruktionen unter Vorgabe einer D5-Symmetrie erstellt.

Um einen ersten Eindruck von den Partikeln im Datensatz (Tab. 8) zu bekommen

Tab. 8: Datensatz aus negativ kontrastierten Partikeln des His-Tag-induzierten *BgAChBP1*-Dipentamers

Anzahl der Partikel	9033
Kontrastmittel	1% Uranylacetat
Boxgröße	64 x 64 px
Elektronenmikroskop	Tecnai G ² 12 BioTWIN
Vergrößerung	71540x
Defokus	3,19 nm-1,52 nm
Ångstrom pro Pixel	4,36

und eine Einschätzung über die Struktur geben zu können, wurden mit IMAGIC-5 Klassensummen aus 9033 Einzelpartikeln berechnet (Abb. 33).

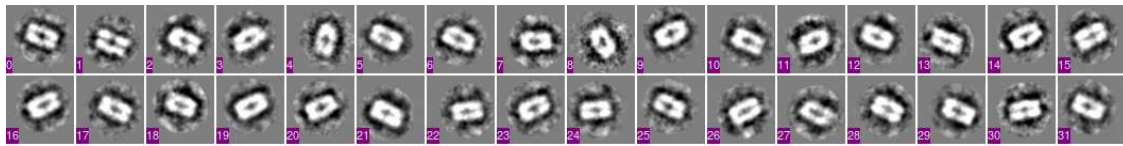


Abb. 33: 2D-Klassensummen des *BgAChBP1*-Dipentamers mit *His-Tag*. Sie wurden mit IMAGIC-5 aus dem Datensatz mit 9033 Partikeln berechnet. Im länglichen Partikel ist kein deutlicher vertikaler Spalt zu sehen, horizontal ist weniger Masse vorhanden.

Die längliche Struktur war mit 10 nm doppelt so lang, wie ein Pentamer. In vielen Klassensummen war zentral durch die Längsachse der Struktur weniger Masse zu erkennen. Hierbei handelte es sich um den Kanal, der inmitten des Pentamers liegt. Zwischen den beiden Pentameren war in einigen Klassensummen ein Spalt zu erkennen, in anderen lagen beide Pentamere so eng beisammen, dass die Masse durchgängig erschien. Insgesamt war der Abstand zwischen den beiden Pentameren geringer als bei den Klassensummen aus *BgAChBP2* (Abb. 30).

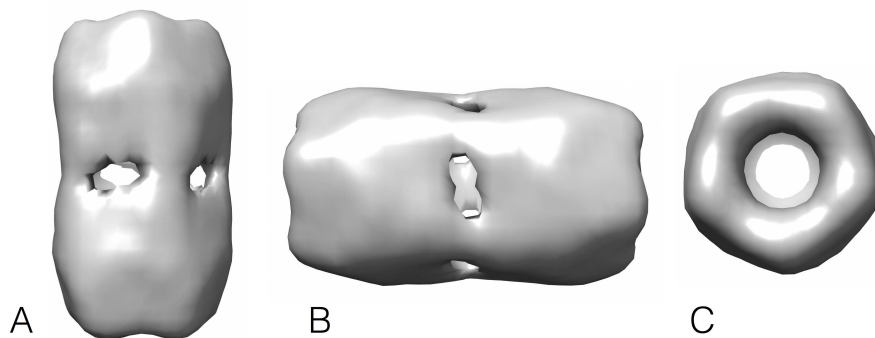


Abb. 34: 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP1*-Dipentamers mit *His-Tag* aus Negativkontrast-EM-Aufnahmen. (A-C) In Frontansicht, um 90 °C im Uhrzeigersinn gedreht und in Aufsicht. Die Länge der 3D-Rekonstruktion beträgt 120 Å, der Durchmesser 70 Å.

Es waren zwei Massen zu erkennen, die einen Hohlzylinder bilden und die an insgesamt fünf Stellen mit der gegenüberliegenden Masse verbunden waren (Abb. 34). Im Vergleich zur 3D-Rekonstruktion des Dipentamers aus *BgAChBP2* wirkte die 3D-Rekonstruktion weniger detailliert, obwohl ihr mehr Einzelpartikel zugrunde lagen. Der Spalt zwischen den beiden Pentameren war deutlich schmaler als bei *BgAChBP2* (Abb. 31).

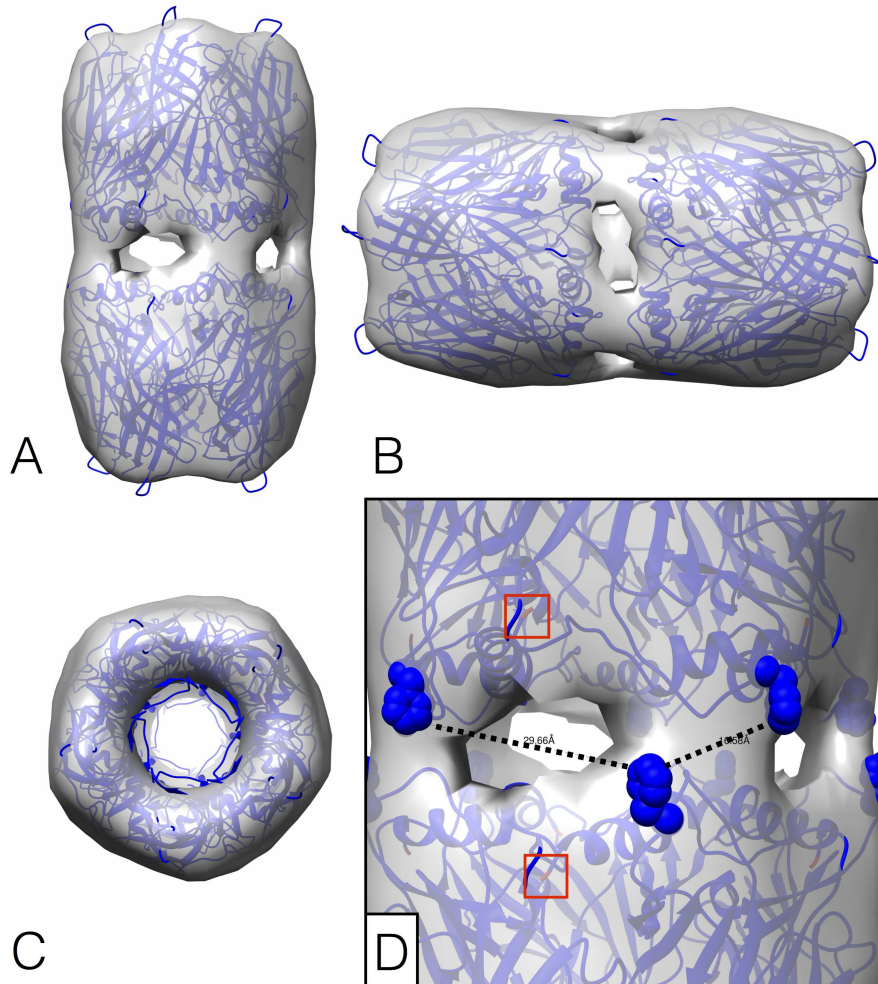


Abb. 35: 3D-Rekonstruktion des BgAChBP1-Dipentamers mit His-Tag mit eingepasstem Homologiemodell (PDB-ID: 4AOD). (A-C) In Frontansicht, um 90 °C im Uhrzeigersinn gedreht und in Aufsicht, (D) Distanzen von 16,6 Å bzw. 29,7 Å zwischen Phenylalanin F71 (gelb) des oberen Pentamers und der beiden nächstgelegenen Phenylalanine des unteren Pentamers. N-Terminus als Anheftstelle des His-Tag rot markiert.

Das Homologiemodell (PDB-ID: 4AOD) konnte stabil in die 3D-Rekonstruktionen eingepasst werden (Abb. 35). An den C-terminalen Enden der Pentamere ragte die Cys-Schleife deutlich aus der berechneten Masse heraus. Der zentrale Kanal hatte in beiden Rekonstruktionen einen größeren Durchmesser als das Homologiemodell. Die Verbindungen zwischen dem oberen und unteren Pentamer waren deutlich kürzer als bei den Rekonstruktionen des *BgAChBP2*-Dipentamers.

Im eingepassten Homologiemodell des Pentamers aus *BgAChBP1* befand sich an Position 71 der Aminosäurekette Phenylalanin. Da eine Messung der Distanz zwischen den beiden Pentameren durchgeführt wurde, waren die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren unerheblich. Der Abstand zwischen einem Phenylalanin des oberen Pentamers zu den beiden nächstgelegenen Phenylalaninen des unteren Pentamers betrug 16,6 Å bzw. 29,7 Å (Abb. 35D). Damit sind die Distanzen zwischen den potentiellen Bindungspartnern zwar deutlich geringer als in der 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP2*-Dipentamers, aber dennoch deutlich zu groß für die direkte Verbindung zwischen den beiden Pentameren über eine Disulfidbrücke. Die Verbindung könnte bei dieser 3D-Rekonstruktion über die 6 Aminosäuren des *His-Tags* und die 7 Aminosäuren der Erkennungssequenz für die TEV-Protease zustande gekommen sein. Diese Aminosäuresequenz ist vermutlich flexibel und wurde dadurch in den 3D-Rekonstruktionen aus negativ kontrastierten Aufnahmen nicht sichtbar. Die zehn Kopien der Peptidsequenz sind hier wahrscheinlich durch die sichtbaren fünf Brücken repräsentiert.

6 Bindung von amorphem Calciumcarbonat an rekombinantes BgAChBP

Einige Acetylcholin-Bindeproteine binden ACC und sind an der Bildung der Molluskenschale beteiligt (Ma et al., 2007; Huang et al., 2009).

Rekombinant hergestelltes BgAChBP1 und BgAChBP2 wurde darauf untersucht ob es durch die Zugabe von ACC aus der Lösung gefällt werden konnte. Dies würde Hinweise darüber liefern, ob die Glykosilierung des Proteins für eine solche Bindung verantwortlich ist, oder ob die Bindung direkt über die Polypeptidkette erfolgt, wie in Su et al. (2013) für *Pinctada fucata* postuliert.

BgAChBP1 Nach dreistündiger Inkubation mit rekombinant hergestelltem BgAChBP1 (in Form von Pentameren oder Dodekaedern) wurde das Calciumcarbonat durch Zentrifugation pelletiert. Die Zugabe von EDTA-Lösung und eine anschließende einstündige Inkubation lösten das CaCO₃-Pellet vollständig.

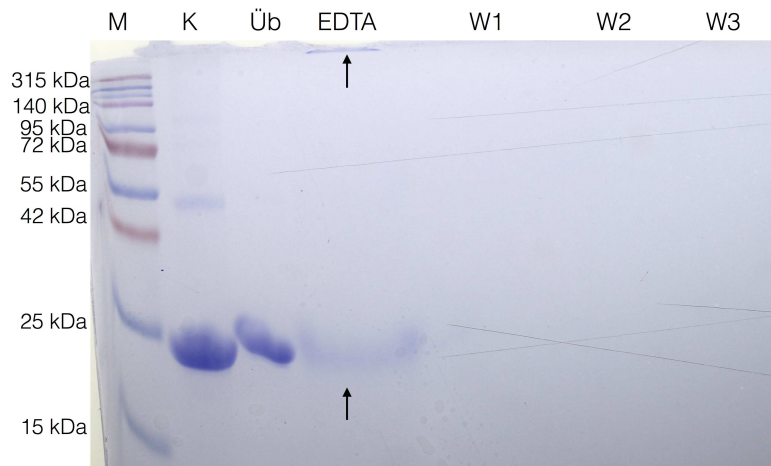


Abb. 36: Bindungstest von amorphem Calciumcarbonat (ACC) mit BgAChBP1-Pentamere. Ausgangsmaterial des rekombinanten BgAChBP1 (K); Überstand nach Inkubation mit ACC (Üb). BgAChBP1 durch ACC aus der Lösung gefällt (Pfeil). In allen drei Spuren des BgAChBP1 eine Bande bei 25 kDa. Zusätzlich in der Kontrolle (K) eine Bande bei 50 kDa. Waschfraktionen vor EDTA-Extraktion (W1-3) ohne Proteinbanden. Auftragsmengen jeweils 10 µL, (M) ProSieve Quad Color Proteinmarker (Lonza, Rockland, USA).

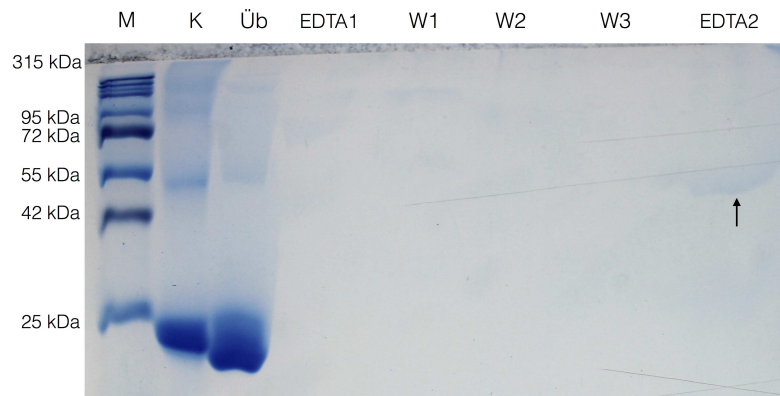


Abb. 37: Bindungstest von amorphem Calciumcarbonat (ACC) mit *BgAChBP1*-Pentamere. Ausgangsmaterial des rekombinanten *BgAChBP1* (K); Überstand nach Inkubation mit ACC (Üb). *BgAChBP1* durch ACC aus der Lösung gefällt (Pfeil). In allen drei Spuren des *BgAChBP1* eine Bande bei 25 kDa. Zusätzlich in der Kontrolle (K) eine Bande bei 50 kDa. Waschfraktionen vor EDTA-Extraktion (W1-3) ohne Proteinbanden. Auftragsmengen jeweils 10 μ L, (M) ProSieve Quad Color Proteinmarker (Lonza, Rockland, USA).

BgAChBP1-Pentamere ließen sich zum Teil aus der Lösung fällen (Pfeil, Abb. 36). Dieser kleine Teil des Proteins war fest an das ACC gebunden (EDTA), wohingegen der größte Anteil nicht durch ACC aus der Lösung gefällt wurde (Üb). Zusätzlich zur 25 kDa-Bande war in der EDTA-Fraktion eine Bande am oberen Rand des Gels zu finden, das dort enthaltene Protein war offensichtlich zu groß um einzuwandern. Hierbei muss es sich um Aggregate des *BgAChBP1* handeln. Im Gegensatz zum Ausgangsmaterial (K) war in keiner der anderen Spuren eine Bande bei 50 kDa zu sehen, sondern nur die 25 kDa-Bande. Da in keiner der Waschfraktionen (W1-3) eine Proteinbande vorlag, kann davon ausgegangen werden, dass das Material fest an ACC gebunden war. Grundsätzlich scheint eine Bindung von *BgAChBP1*-Pentameren an ACC auch ohne Glykosilierung möglich zu sein.

Eine Probe, die ausschließlich *BgAChBP1*-Dodekaeder enthielt sollte Aufschluss darüber liefern, ob diese ein anderes Bindungsverhalten zu ACC zeigten (Abb. 37). Im Ausgangsmaterial war erwartungsgemäß eine kräftige Bande bei 25 kDa zu sehen. Außerdem war in dieser Probe eine deutlich schwächere Bande bei 50 kDa sowie ein leichter Schmier im oberen Teil des Gels vorhanden. Auch im Überstand (Üb), der Protein enthielt, dass nicht an ACC gebunden hatte traten eine Bande bei 25 kDa und 50 kDa auf. Die Konzentration des gebundenen Proteins war offensichtlich sehr gering, sodass bei einem Auftragsvolumen von 15 μ L keine Proteinbande in

der EDTA-Fraktion (EDTA1) zu sehen war; erst bei einem Auftragsvolumen von 25 μ L zeigte sich eine schwache Bande. Sie lag bei 50 kDa (Pfeil, Abb. 36). In den Waschfraktionen (W1-3) war keine Proteinbande zu sehen. Es lässt sich also festhalten, dass auch BgAChBP1-Dodekaeder Calciumcarbonat binden können, dies jedoch in geringerem Umfang als BgAChBP1-Pentamere.

BgAChBP2 Nach der Inkubation mit ACC war eine deutliche Trübung der Lösung zu erkennen. Durch die Zentrifugation bildete sich ein stabiles Pellet, welches durch EDTA-Lösung gelöst werden konnte.

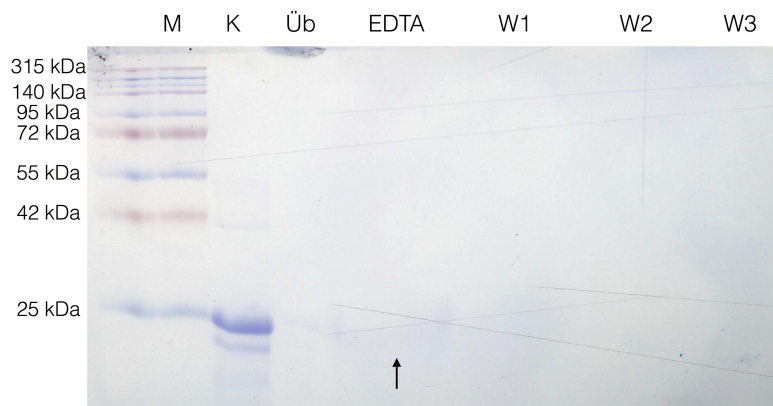


Abb. 38: Bindungstest von amorphem Calciumcarbonat (ACC) an BgAChBP2. Ausgangsmaterial des rekombinanten BgAChBP2 (K); Überstand nach Inkubation mit ACC (Üb); AChBP, dass durch EDTA gefällt wurde (EDTA). Typische Doppelbande des rekombinanten BgAChBP2 bei 25 kDa, im Überstand (Üb) Bande am oberen Rand des Gels, sehr schwache Bande in der EDTA-Lösung (EDTA) bei 25 kDa (Pfeil). Dieser kleine Teil des BgAChBP2 wurde durch ACC aus der Lösung gefällt. Waschfraktion (W) ohne Proteinbande. (M) ProSieve Quad Color Proteinmarker (Lonza, Rockland, USA).

Das Ausgangsmaterial (K) bildete die typische Doppelbande des rekombinanten BgAChBP2 bei 25 kDa. Überraschenderweise war im Überstand keine Bande in dieser Höhe zu finden, sondern eine Bande am oberen Ende des Gels, deutlich über der 315 kDa-Bande des Markers (Abb. 38). Das Protein war demnach nicht in das Gel eingewandert. Ein kleiner Teil des Proteins band an ACC und war bei 25 kDa in der EDTA-Lösung (Pfeil, Abb. 38) zu finden. Die Waschfraktionen (W1-3) zeigten keine Proteinbande. Daraus folgt, dass Pentamere des rekombinanten BgAChBP2 zwar prinzipiell in der Lage sind durch ACC aus der Lösung gefällt zu werden, dieser Effekt jedoch deutlich schwächer als bei BgAChBP1-Pentameren war.

7 Gerichtete Mutagenese von *BgAChBP1*

Um die Bedeutung bestimmter Aminosäuren für die Inter-Pentamer-Kontakte des *BgAChBP1* zu untersuchen, wurden einzelne Positionen in der Sequenz des *BgAChBP1* gegen Glycin und Alanin ausgetauscht. Durch das Fehlen der Seitenkette bei Glycin ermöglicht diese Aminosäure dem Protein eine hohe Flexibilität im Proteinerückgrat. Alanin hingegen greift weniger in die Biegung des Rückgrats ein. Bei der Auswahl der Mutationsstellen wurden von Saur et al. (2012) postulierte Salz- und Disulfidbrücken herangezogen (Abb. 39).

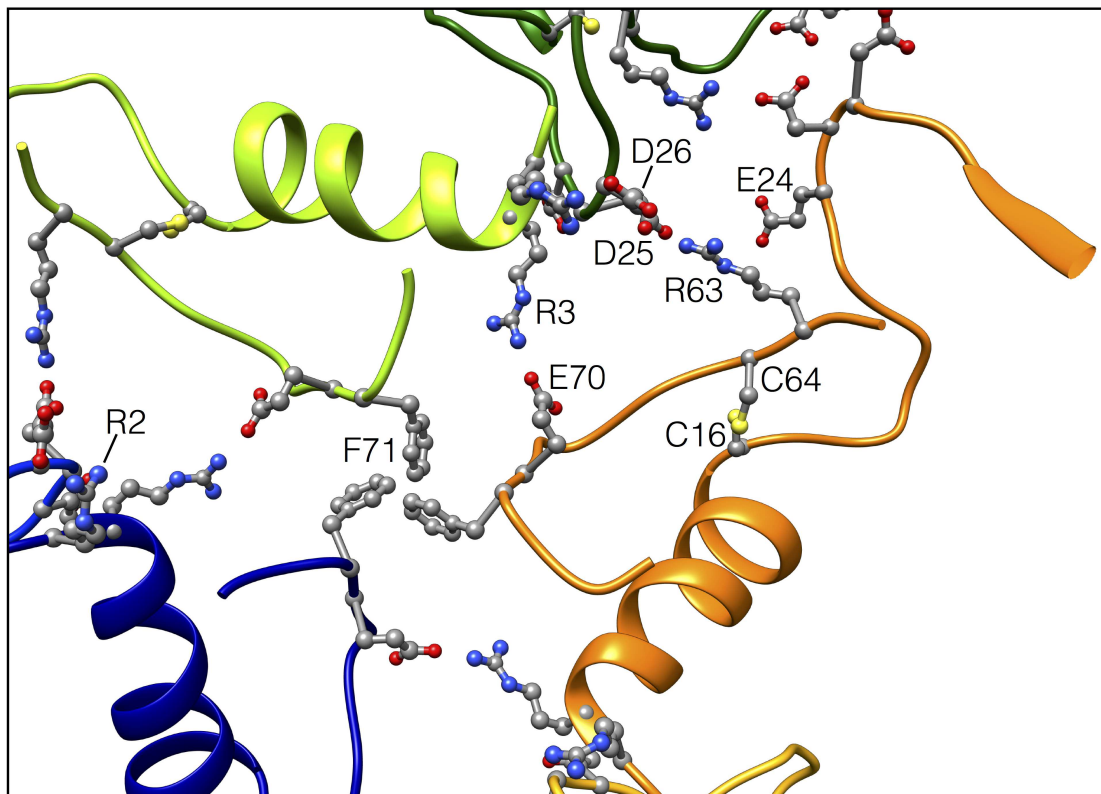


Abb. 39: Übersicht über relevante Aminosäuren für die Mutagenese. Anhand des Homologiemodells (PDB-ID: 4AOD) erstellte Übersicht der Kontaktstellen zwischen den Pentameren innerhalb des *BgAChBP1*-Dodekaeders. Überprüft werden sollte die Bedeutung postulierter Salzbrücken ($R2 \leftrightarrow D26$, $R3 \leftrightarrow E70$ und $D25 \leftrightarrow R63$), der Disulfidbrücke ($C16 \leftrightarrow C64$) und des hydrophoben Trimers aus F71 für den Zusammenhalt der Dodekaeder.

Die Amplifikate der Mutagenese-PCR wurden über ein Agarosegel überprüft (exemplarisch im Anhang 4). Um die Mutation sicherzustellen, wurden alle Plasmide

sequenziert. Die Expression der Proteine verlief nach dem gleichen Protokoll wie bei *BgAChBP1* und wurde ebenfalls durch SDS-PAGE kontrolliert. In allen durchgeführten Expressionen zeigte eine Bande in Höhe von 25 kDa im Eluat der Affinitäts-Chromatographie das *BgAChBP1*-Monomer an (exemplarisch im Anhang 4). In einigen Gelen trat zusätzlich eine Bande der gleichen Größe im Durchfluss und der Waschfraktion auf. Diese kann von einem weiteren Protein mit ähnlicher Größe herrühren, das in den Bakterien produziert wurde, oder die Säulenkapazität war zu gering für die Menge an exprimiertem Protein. Nach erfolgter Rückfaltung und Dialyse gegen 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) wurde das Protein im Elektronenmikroskop untersucht. Analysiert wurde hierbei Protein mit *His-Tag*, welches im Wildtyp Pentamere, aber keine Dodekaeder bildet. Desweiteren wurden die Mutanten untersucht, nachdem der *His-Tag* proteolytisch abgespalten wurde und zwar in 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) sowie mit demselben Tris-Puffer mit zusätzlich 10 mM $MgCl_2$ und 10 mM $CaCl_2$. Wildtypisches *BgAChBP1* bildet unter beiden Bedingungen sowohl Pentamere als auch Dodekaeder (siehe Abb. 15). Im Folgenden sind die Ergebnisse der Mutationen anhand der EM-Aufnahmen zusammengestellt.

7.1 *BgAChBP1*-R2G und *BgAChBP1*-R2A

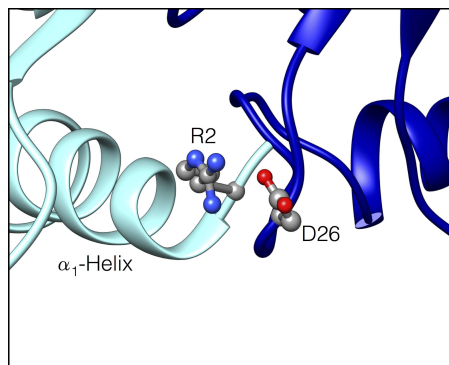


Abb. 40: Postulierte Salzbrücke $R2 \leftrightarrow D26$. Verbindung der α_1 -Helix mit Schleife L1 einer benachbarten Untereinheit desselben Pentamers.

Die vermutete Beteiligung von Arginin R2 an der Bindungsstelle der Pentamere sollte durch den Austausch von R2 gegen Glycin und gegen Alanin überprüft werden. Diese Salzbrücke verbindet möglicherweise die α_1 -Helix mit der Schleife L1 der Nachbaruntereinheit desselben Pentamers (Abb. 40).

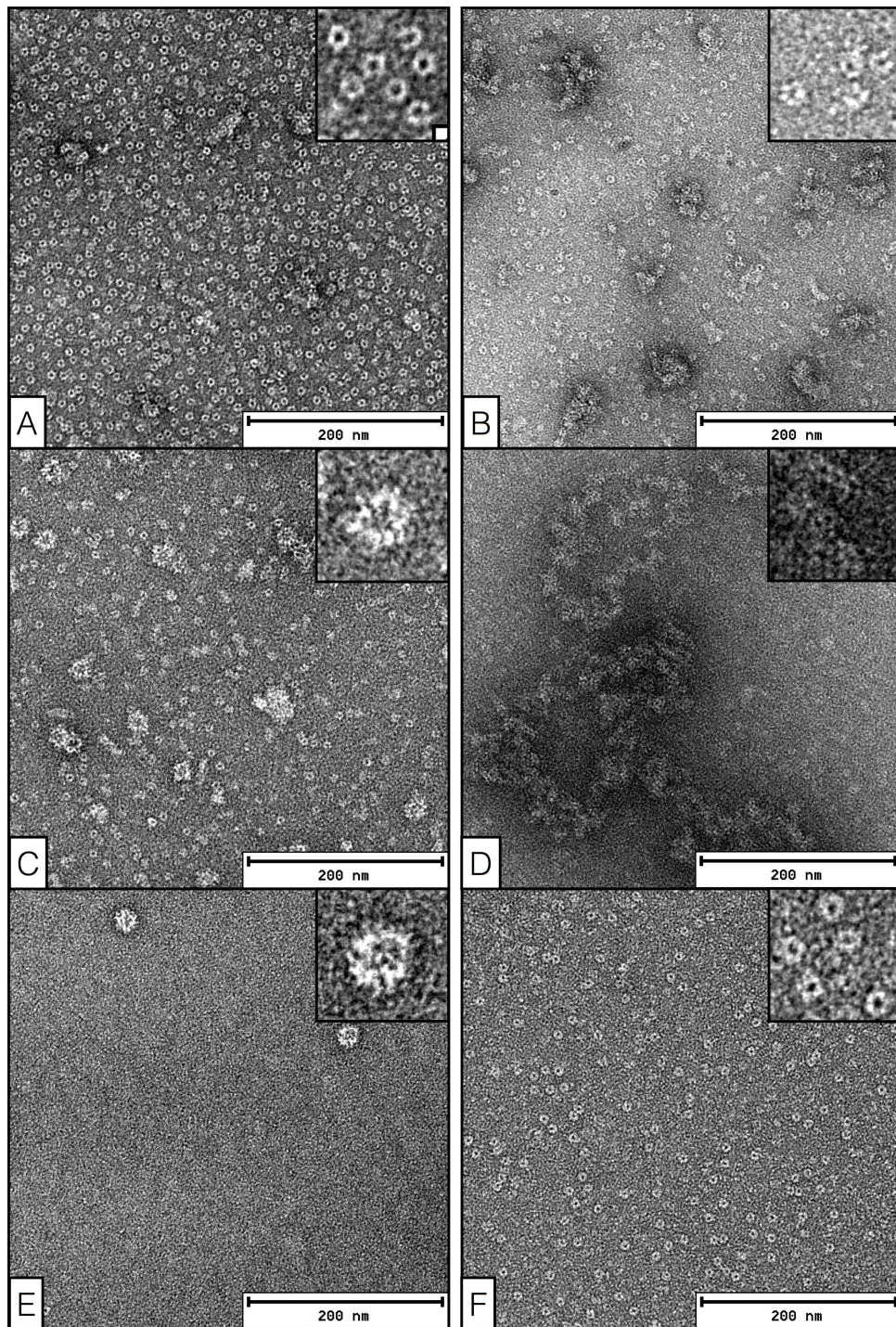


Abb. 41: EM-Aufnahmen der Mutanten R2G und R2A. (A) R2G mit *His-Tag*, bildet Pentamere. (B) R2A mit *His-Tag* bildet ebenfalls Pentamere. (C) R2G ohne *His-Tag* bildet Pentamere und dodekaederartige Strukturen (Kasten). (D) R2A ohne *His-Tag* lagert sich zu Aggregaten zusammen. (E) R2G nach Zugabe von 10 mM $MgCl_2$ / 10 mM $CaCl_2$, regulärere Dodekaeder (Kasten) dafür fehlende Pentamere. (F) R2A mit 10 mM $MgCl_2$ / 10 mM $CaCl_2$; ausschließlich Bildung von Pentameren. R2 beeinflusst die Bildung von Dodekaedern. Fehlt es, werden unvollständige Quartärstrukturen gebildet.

Die R2G-Mutante des *BgAChBP1* mit *His-Tag* bildete Pentamere (Abb. 41A), ebenso die *BgAChBP1-R2A*-Mutante (Abb. 41B). Die Faltung des Proteins im Faltungspuffer war also erfolgreich. Abb. 41C,D zeigt die beiden Mutanten nachdem der *His-Tag* abgespalten wurde. Hier waren bei *BgAChBP1-R2G* sowohl Pentamere als auch Dodekaeder zu sehen, wobei die Dodekaeder nicht vollständig zu sein schienen (Abb. 41C). Die meisten Dodekaeder wirkten, als seien nicht alle Pentamere fest miteinander verbunden. Oft waren Pentamere gegeneinander verschoben oder fehlten. Bei *BgAChBP1-R2A* kam es durch das Abspalten des *His-Tag* zu großen Aggregationen (Abb. 41D). Durch die Zugabe von Salz (10 mM $MgCl_2$ und 10 mM $CaCl_2$) verschwanden die Pentamere bei *BgAChBP1-R2G* fast vollständig und die Dodekaeder waren regulärer ausgebildet (Abb. 41E). Die Aggregate in *BgAChBP1-R2A* zerfielen durch die Zugabe der Salze zu Pentameren (Abb. 41F).

7.2 *BgAChBP1-R3G* und *BgAChBP1-R3A*

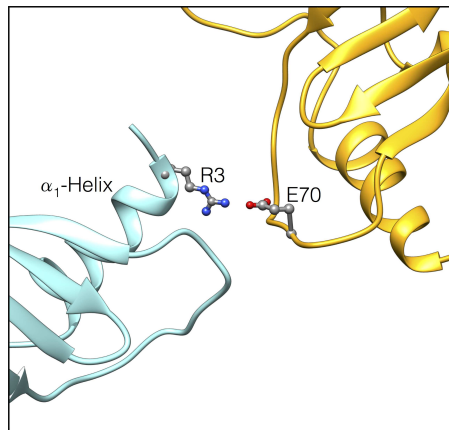


Abb. 42: Postulierte Salzbrücke R3↔E70. Salzbrücke zwischen dem Ende der α_1 -Helix und der L3-Schleife benachbarter Pentamere.

Zwischen Arginin R3 und Glutaminsäure E70 wurde eine Salzbrücke zwischen benachbarten Pentameren postuliert (Saur et al., 2012), die durch die Mutation an R3 entfernt werden sollte. Sie sollte das N-terminale Ende der α_1 -Helix mit der L3-Schleife einer Untereinheit im benachbarten Pentamer verbinden (Abb. 42).

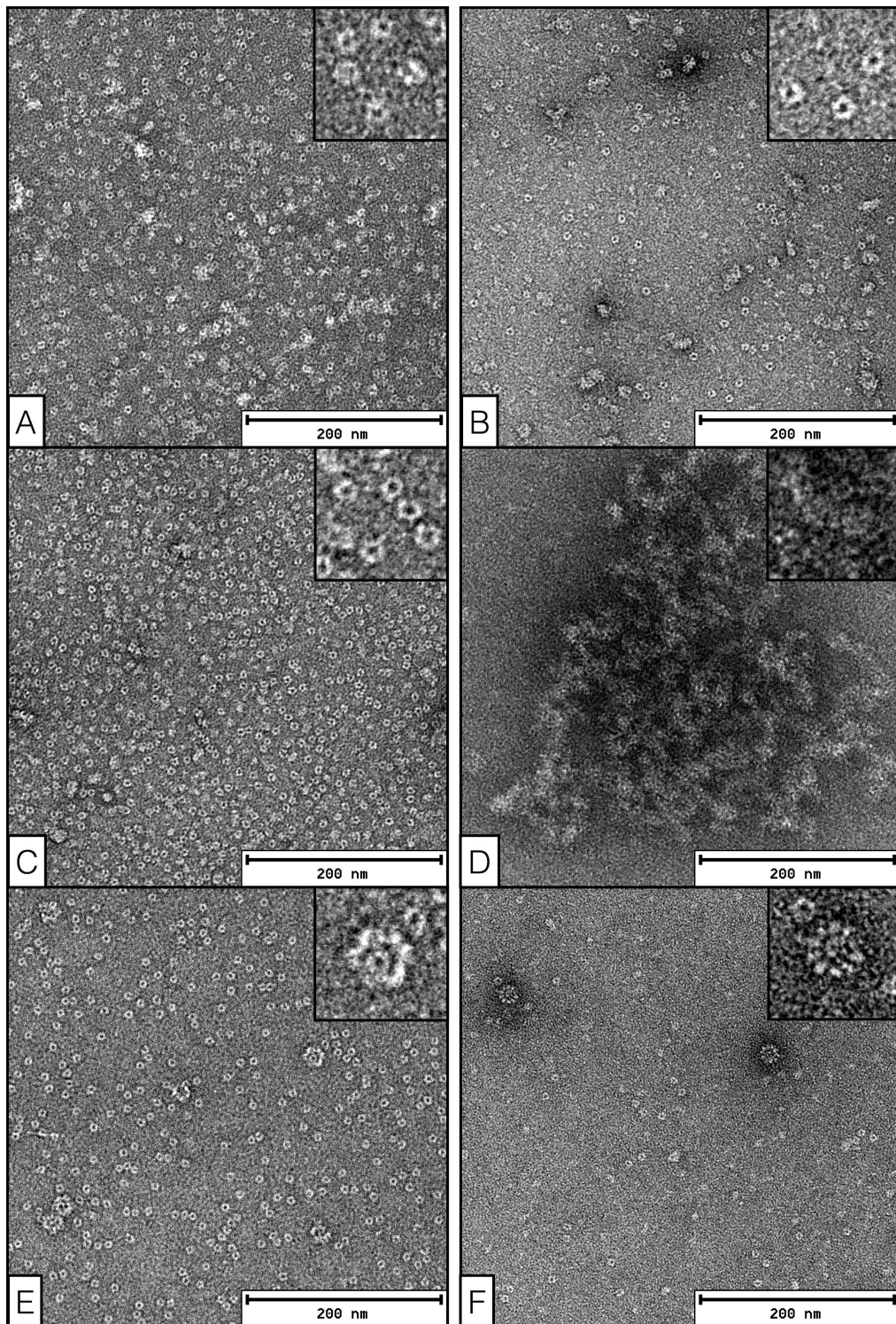


Abb. 43: EM-Aufnahmen der Mutanten R3G und R3A. (A), (B) R3G bzw. R3A mit His-*Tag* bildet Pentamere. (C) Ohne His-*Tag* bildet R3G weiterhin Pentamere; (D) R3A Aggregate. (E), (F) 10 mM MgCl₂ und 10 mM CaCl₂ induzierte in beiden Mutanten Dodekaederbildung, die jedoch häufig unvollständig waren (Kasten). R3 spielt eine Rolle bei der Dodekaederbildung; durch Salze kann die Funktion jedoch teilweise gerettet werden.

BgAChBP1-R3G mit *His-Tag* bildet Pentamere (Abb. 43A), ebenso verhielt sich *BgAChBP1*-R3A mit *His-Tag* (Abb. 43B). Nachdem der *His-Tag* von der R3G-Mutante abgespalten wurde, waren ausschließlich Pentamere zu sehen (Abb. 43C). Bei *BgAChBP1*-R3A bildeten sich unter diesen Bedingungen große Aggregate (Abb. 43D). Die Zugabe von 10 mM $MgCl_2$ und 10 mM $CaCl_2$ sorgte bei *BgAChBP1*-R3G für vereinzelte Dodekaederbildung (Abb. 43E). An den gebildeten Dodekaedern fehlten jedoch einzelne Pentamere oder waren gegeneinander verschoben. Durch die Salze ließen sich die Aggregate der R3A-Mutante auflösen und die Bildung von Dodekaedern wurde induziert (Abb. 43F). Auch bei diesen Dodekaedern waren die meisten unvollständig, wirkten jedoch regelmäßiger als die der R2-Mutanten.

7.3 *BgAChBP1*-C16/C64G und *BgAChBP1*-C16/C64A

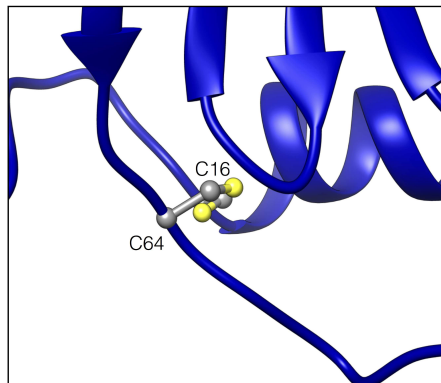


Abb. 44: Disulfidbrücke C16↔C64. Disulfidbrücke, die exklusiv in *BgAChBP1* bekannt ist.

BgAChBP1 verfügt als Besonderheit über die Möglichkeit einer zusätzlichen Disulfidbrücke, die das C-terminale Ende der $\alpha 7$ -Helix mit der L3-Schleife derselben Untereinheit verbindet (C16↔C64). Bei der folgenden Mutante sollte der Einfluss dieser potentiellen Disulfidbrücke auf die Dodekaederbildung untersucht werden.

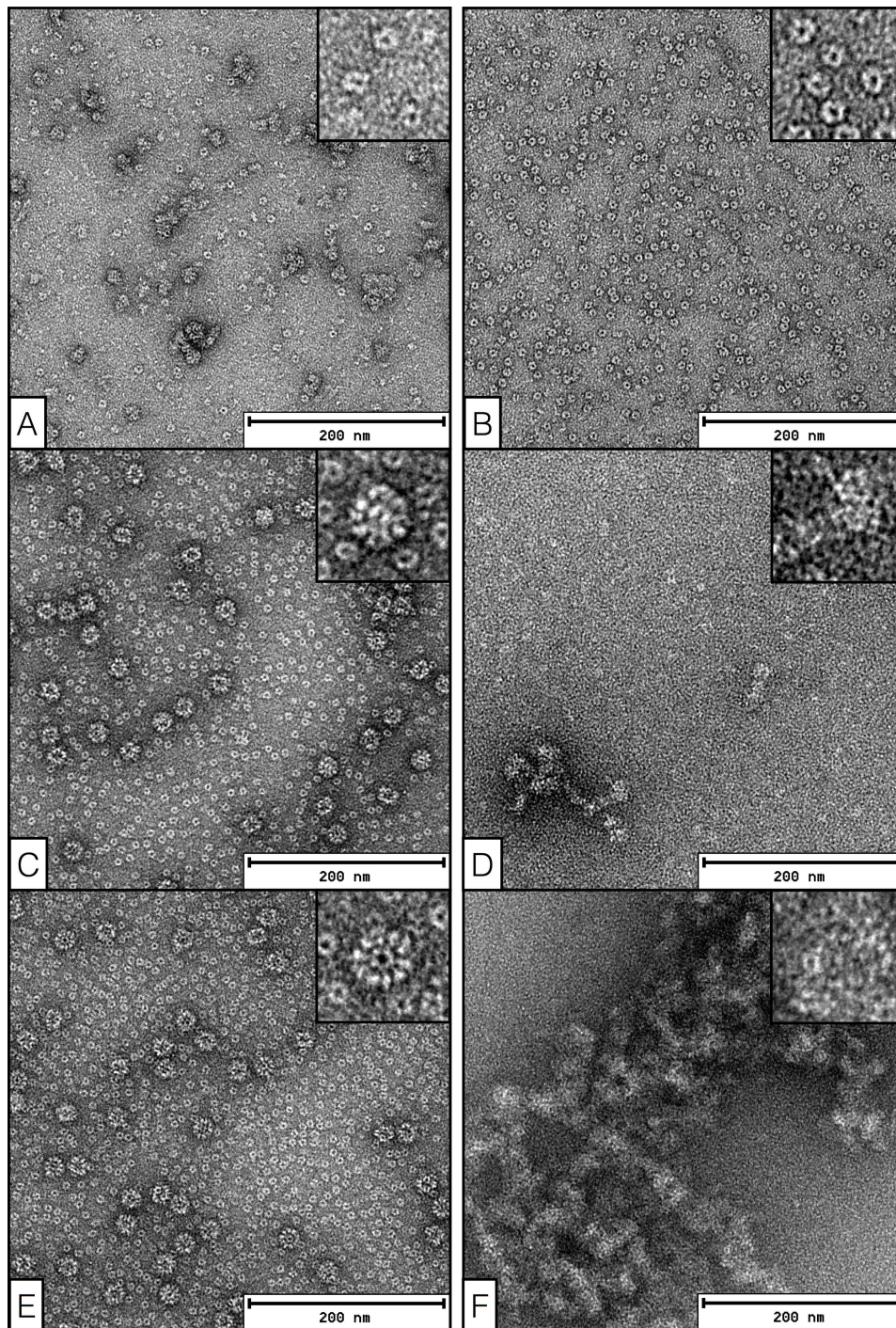


Abb. 45: EM-Aufnahmen der Mutanten C16/C64G und C16/C64A. (A), (B) C16/C64G bzw. C16/C64A mit His-Tag bilden Pentamere. **(C)** C16/C64G ohne His-Tag bildet Pentamere und Dodekaeder. **(D)** Bei C16/C64A kam es ohne His-Tag zur unstrukturierten Aggregation. **(E)** Durch 10 mM MgCl₂ und CaCl₂ änderte sich nichts an den Pentameren und Dodekaedern in C16/C64G. **(F)** Unter gleichen Bedingungen bildet C16/C64A weiterhin amorphe Aggregate. Fazit: Während C16/C64G im Assemblierungsverhalten nicht vom wildtypischen BgAChBP1 zu unterscheiden war, bildeten sich bei C16/C64A weder Pentamere noch Dodekaeder, nachdem der His-Tag abgespalten wurde.

Solange sich der *His-Tag* am Protein befand, bildeten beide Mutanten Pentamere (Abb. 45A,B). Nachdem der *His-Tag* abgespalten wurde, waren in *BgAChBP1*-C16/C64G Dodekaeder zu sehen (Abb. 45C). Das Assemblierungsverhalten war wie beim Wildtyp (Abb. 15). Wurde bei *BgAChBP1*-C16/C64A der *His-Tag* abgespalten, waren keine Pentamere zu sehen, sondern es bildeten sich amorphe Aggregate (Abb. 45D). Im Gegensatz zur Mutante mit Glycin bildeten sich keinerlei Dodekaeder. Die Zugabe von 10 mM $MgCl_2$ und $CaCl_2$ in den 20 mM Tris-Puffer änderte nichts an der Assemblierung des *BgAChBP1*-C16/C64G (Abb. 45E). Bei *BgAChBP1*-C16/C64A hingegen sorgte diese Änderung dafür, dass sich große, zusammenhängende Aggregate bildeten und kaum noch kleinere Strukturen oder einzelne Pentamere zu finden waren (Abb. 45F).

7.4 *BgAChBP1*-E24A

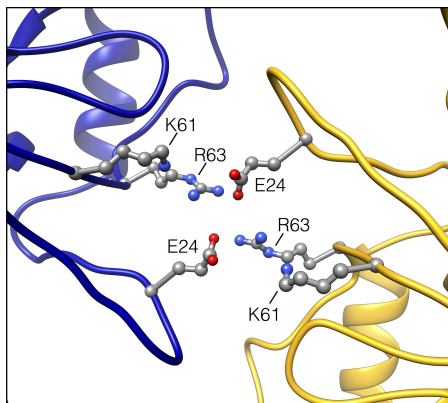


Abb. 46: Mögliche Kontaktstellen der Aminosäure E24. Im neuen Homologiemodell ist eine Salzbrücke zu R63 denkbar.

Zwischen der Aminosäure R63 und E24 könnte eine Salzbrücke bestehen (Abb. 46). Im neuen Homologiemodell lagen diese Aminosäuren eng zusammen. Die Glutaminsäure E24 wurde durch Alanin ersetzt um die Ausbildung einer Salzbrücke zu verhindern.

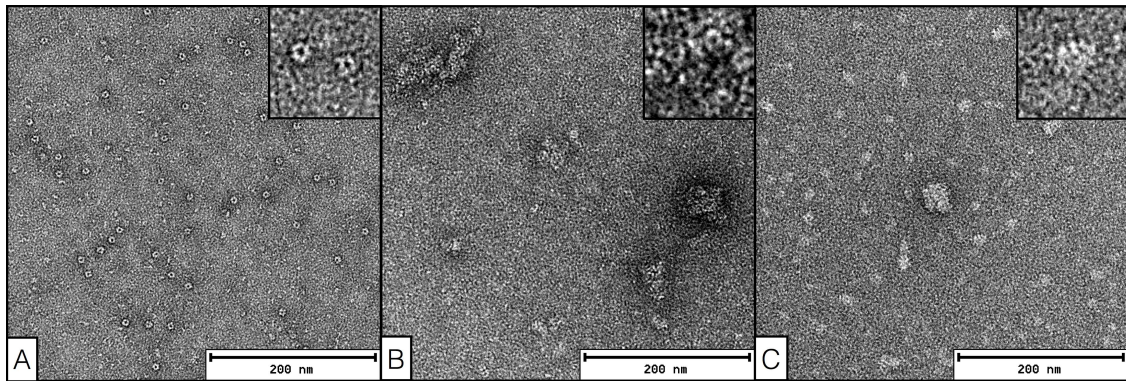


Abb. 47: EM-Aufnahmen der Mutanten E24A. (A) E24A mit His-Tag bildet Pentamere. (B) Ohne His-Tag sind unterschiedlich große Aggregate vorhanden. (C) Durch $MgCl_2$ und $CaCl_2$ kommt es zur Bildung kleinerer Aggregate. Sie sind etwa doppelt so groß wie Pentamere und zeigen eine unbekannte Form. E24A zeigt ohne His-Tag keine Bildung mehr von Pentameren oder gar Dodekaedern.

BgAChBP1-E24A bildete Pentamere, solange sich der His-Tag am Protein befand (Abb. 47A). Nach dessen proteolytischer Abspaltung kam es zur Ausbildung amorpher Aggregate (Abb. 47B), ohne dass Pentamere zu sehen waren. Nach Zugabe von $MgCl_2$ und $CaCl_2$ waren Aggregate zu sehen, die etwa doppelt so groß wie Pentamere waren, jedoch nicht deren typische Form zeigten (Abb. 47C). Auch in diesem Puffer kam es weder zur Bildung von Pentameren noch Dodekaedern.

7.5 *BgAChBP1*-R63A

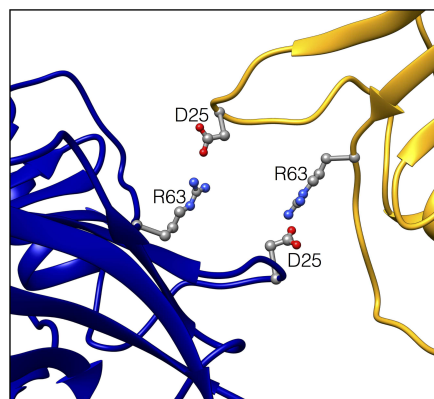


Abb. 48: Postulierte Salzbrücke D25↔R63. Postulierte Salzbrücke zwischen der L1- und L3-Schleife zweier Pentamere.

Eine Salzbrücke als Inter-Pentamerverbindung könnte bei D25 ↔ R63 vorliegen (Abb. 48).

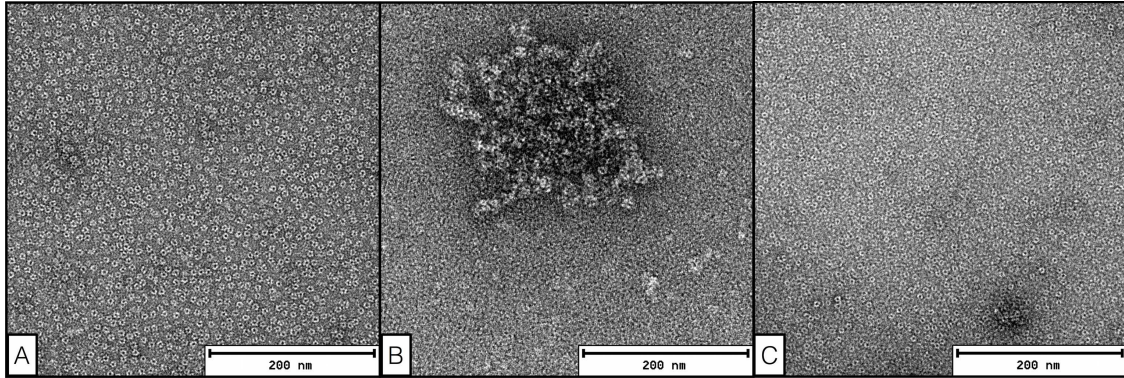


Abb. 49: EM-Aufnahmen der Mutanten R63A. (A) R63A mit His-Tag bildet Pentamere; (B) ohne His-Tag große Aggregate vermutlich aus Pentameren zusammengesetzt. (C) Nach Zugabe von $MgCl_2$ und $CaCl_2$ sind fast ausschließlich Pentamere vorhanden. Bei der Mutante bildeten sich Pentamere, jedoch keine Dodekaeder.

Solange sich bei der Mutante R63A der His-Tag am Protein befand, bildeten sich Pentamere. Nachdem der His-Tag abgespalten wurde, bildeten sich große amorphe Aggregate, die aus vielen Pentameren zusammengesetzt zu sein schienen. Außerdem waren auch einige einzelne Pentamere zu sehen (Abb. 49B). Durch die Zugabe von $MgCl_2$ und $CaCl_2$ lösten sich diese Aggregate auf die durch das Abspalten des His-Tag entstanden waren und es lagen fast ausschließlich einzelne Pentamere vor (Abb. 49C). Unter den getesteten Bedingungen war diese Mutante nicht in der Lage, Dodekaeder zu bilden.

7.6 *BgAChBP1*-E70G und *BgAChBP1*-E70A

Um die postulierte Salzbrücke zwischen Arginin R3 (siehe 7.2) und Glutaminsäure E70 zu charakterisieren, wurde die Glutaminsäure mutiert. Die Salzbrücke sollte das N-terminale Ende der α 1-Helix mit der L3-Schleife von Untereinheiten zweier benachbarter Pentamere verbinden (Abb. 42).

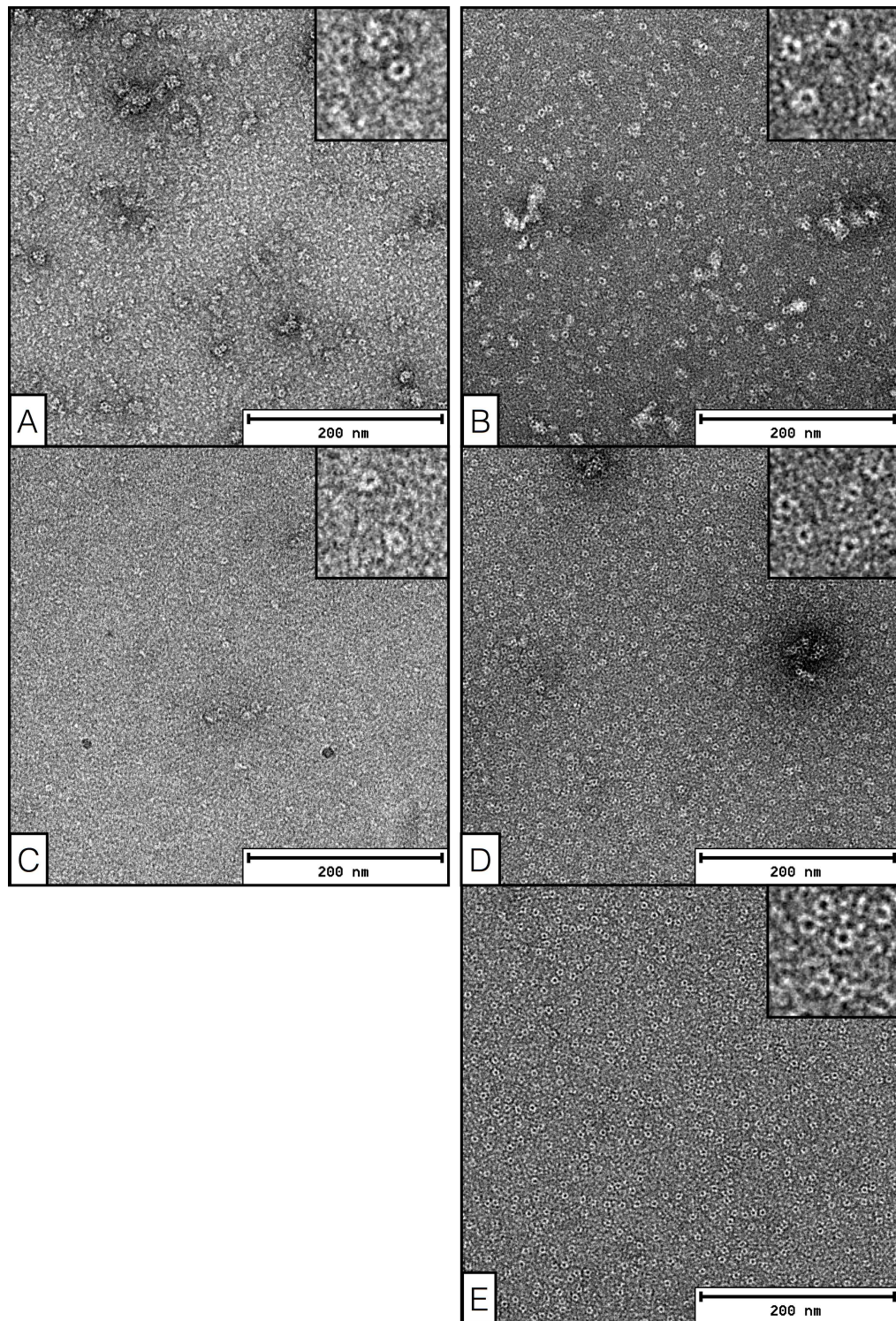


Abb. 50: EM-Aufnahmen von *Bg*AChBP1-E70G und E70A. (A), (B) Mit *His-Tag* bilden E70G bzw. E70A Pentamere. (C) E70G bildete ohne *His-Tag* Pentamere; große Teile des Proteins fielen aus. (D) E70A bildete ohne *His-Tag* Pentamere. (E) Auch mit $MgCl_2$ und $CaCl_2$ sind bei E70A nur Pentamere vorhanden. Die Auswirkungen auf E70G scheinen so gravierend zu sein, dass ein Großteil des Proteins ausfiel. Bei E70A bildeten sich Pentamere, jedoch keine Dodekaeder.

Beide Mutanten bildeten mit *His-Tag* Pentamere (Abb. 50A,B). Bei *BgAChBP1-E70G* waren nach Abspaltung des *His-Tags* nur noch wenig Protein vorhanden, welches aber größtenteils als Pentamere vorlag (Abb. 50C). Ein großer Teil des Proteins war durch die Abspaltung des *His-Tag* als weißer Niederschlag ausgefallen. Bei *BgAChBP1-E70A* konnte kein derart deutliches Ausfallen des Proteins beobachtet werden. Hier waren in den EM-Aufnahmen ebenfalls Pentamere zu sehen, es kam jedoch zu keiner Dodekaederbildung (Abb. 50D). Die Zugabe von $MgCl_2$ und $CaCl_2$ sorgte bei *BgAChBP1-E70G* für vollständiges Ausfallen des Proteins aus der Lösung, sodass es nicht möglich war, EM-Aufnahmen zu machen. Bei *BgAChBP1-E70A* änderte die Zugabe der Salze nichts an den gebildeten Strukturen. Es waren nach wie vor ausschließlich Pentamere zu finden (Abb. 50E).

Fazit: Im Gegensatz zu den beiden Mutanten an R3 kam es bei der Mutation an E70 unter keinen der getesteten Bedingungen zur Bildung von Dodekaedern oder dodekaederähnlichen Strukturen. Die Struktur von *BgAChBP1-E70G* war offensichtlich in den verwendeten Puffern nicht stabil, denn das Protein fiel nach Abspalten des *His-Tag* aus. Bei *BgAChBP1-E70A* kam es zwar nicht zu diesem Effekt, es bildeten sich jedoch ausschließlich Pentamere.

7.7 *BgAChBP1-F71G* und *BgAChBP1-F71A*

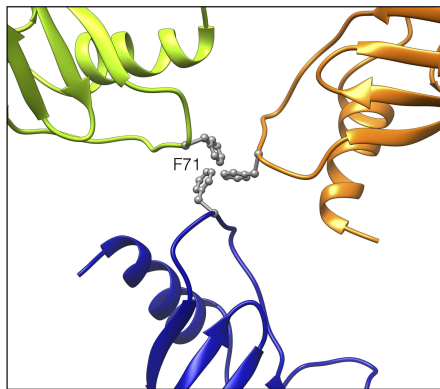


Abb. 51: Aromatisches Trimer aus F71. Diesem hydrophoben Cluster wird eine wichtige Funktion bei der Bildung des Dodekaeders zugeschrieben.

Phenylalanin F71 könnte eine wichtige Rolle bei der Bildung der Dodekaeder spielen,

da es an der Kontaktstelle dreier Pentamere einen hydrophoben *Cluster* bilden könnte (Abb. 51)(Saur et al., 2012). Beide *BgAChBP1-F71*-Mutanten bildeten Pentamere, solange der *His-Tag* nicht abgespalten war. *BgAChBP1-F71G* bildete zusätzlich kleine Partikel, die nicht die typischen Ansichten eines Pentamers zeigten (Abb. 52A). Ohne *His-Tag* bildeten sich bei dieser Mutante unterschiedlich große Proteinaggregate und es waren so gut wie keine einzeln liegenden Pentamere zu sehen (Abb. 52C). Bei *BgAChBP1-F71A* hingegen aggregierten nach Abspalten des *His-Tags* die Pentamere weiter zu Dodekaedern (Abb. 52D). Bei fast allen Dodekaedern schienen die Pentamere gegeneinander verschoben zu sein. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von $MgCl_2$ und $CaCl_2$ noch deutlich verstärkt. Nach der Zugabe der Salze waren keine vollständigen Dodekaeder mehr zu sehen. Es waren jedoch immer wieder Pentameransammlungen zu finden, die wie unvollständige Dodekaeder aussahen (Abb. 52F). Bei *BgAChBP1-F71G* zerfielen die amorphen Aggregate, die nach Abspalten des *His-Tags* entstanden waren durch $MgCl_2$ und $CaCl_2$. Es waren aber nur vereinzelt Pentamere und keine Dodekaeder zu finden (Abb. 52E).

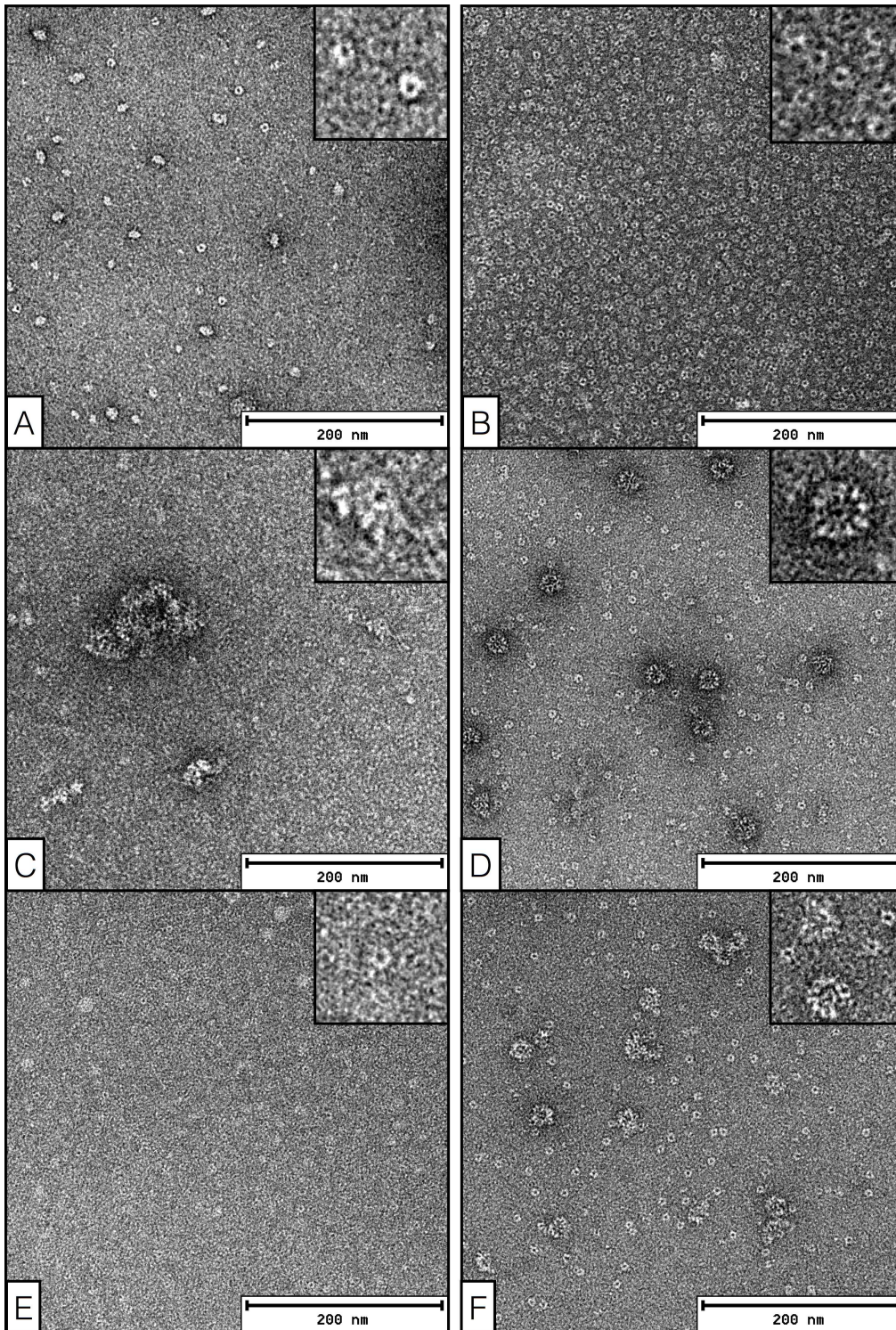


Abb. 52: EM-Aufnahmen der Mutanten F71G und F71A. (A), (B) F71G bzw. F71A bilden mit *His-Tag* Pentamere. (C) Ohne *His-Tag* bildet F71G unterschiedlich große amorphe Aggregate. (D) F71A war in der Lage Pentamere und unvollständige Dodekaeder zu bilden (Kasten). (E) Durch $MgCl_2$ und $CaCl_2$ bildeten sich bei F71G vereinzelt Pentamere. (F) F71A bildete auch mit Salzen Dodekaeder, diese waren jedoch unvollständig (Kasten).

8 Gerichtete Mutagenese an *BgAChBP2*

8.1 *BgAChBP2*-C71F

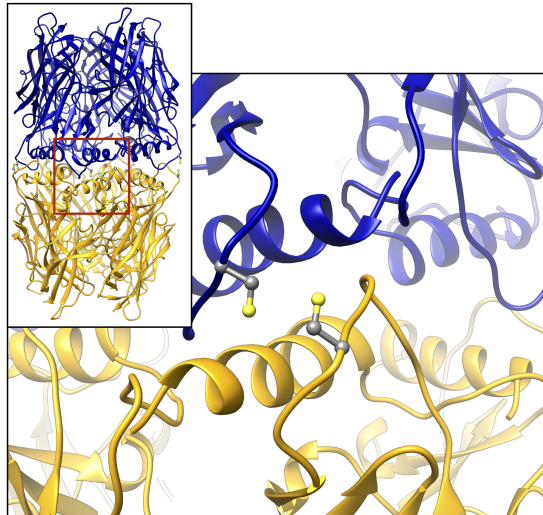


Abb. 53: Position der Aminosäure C71 in *BgAChBP2*. Hypothetisches Dipentamer (Kasten) und Detailansicht des dafür verantwortlichen C71 (groß).

Die Untereinheit von *BgAChBP2* verfügt über insgesamt fünf Cysteine. Vier davon bilden zwei bei allen AChBPs vorhandene intramolekulare Disulfidbrücken. Das Cystein C71 hat somit nur die Möglichkeit, mit dem Cystein eines benachbarten Pentamers zu interagieren, wodurch ein Dipentamer entsteht. Die exponierte Lage von C71 macht es wahrscheinlich, dass diese Aminosäure eine solche Disulfidbrücke ausbildet. Zudem wurden bei *BgAChBP2* in der nichtreduzierenden SDS-PAGE Untereinheiten-Dimere nachgewiesen (Saur et al., 2012; Abb. 20B). Um zu sehen, ob ein Austausch des C71 in ein Phenylalanin, wie es bei *BgAChBP1* an dieser Stelle vorhanden ist, *BgAChBP2* dazu befähigt, ebenfalls Dodekaeder zu bilden, wurde diese Mutation durchgeführt. Die Proteinaufreinigung und Faltung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bei *BgAChBP1* und *BgAChBP2*.

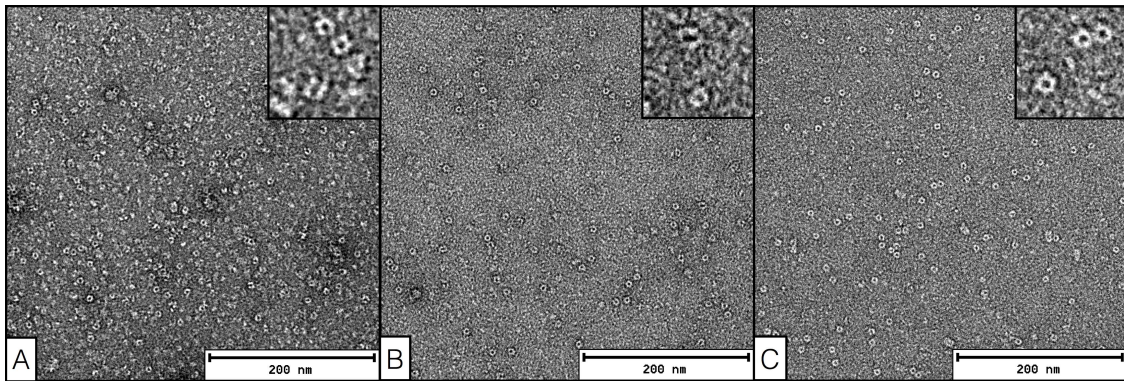


Abb. 54: EM-Aufnahmen von *BgAChBP2-C71F*. (A) *BgAChBP2-C71F* mit His-Tag bildete Pentamere und nur vereinzelte größere Aggregate. (B) Ohne His-Tag waren weiterhin Pentamere vorhanden. (C) Auch $MgCl_2$ und $CaCl_2$ konnte keine Dodekaederbildung induzieren.

Die Bildung der Pentamere zeigte, dass die Faltung zu Pentameren erfolgreich war (Abb. 54A). Es waren deutlich weniger amorphe Aggregate als beim *BgAChBP2* Wildtyp zu sehen (vgl. Abb. 21) und der Großteil des Proteins lag als Pentamer vor. Nach Abspaltung des His-Tag und auch nach Zugabe von $MgCl_2$ und $CaCl_2$ blieben die Pentamere weiterhin vorhanden. Es konnte keine Dodekaederbildung induziert werden (Abb. 54B,C).

9 Zweidimensionale Immunelektrophorese mit *BgAChBP*

Durch zweidimensionale Immunelektrophorese sollte geklärt werden, ob es sich beim *BgAChBP*-Dodekaeder um ein Homooligomer handelt. In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass die Antikörper spezifisch mit der jeweiligen *BgAChBP*-Isoform reagierten (Abb. 55). Kreuzreaktionen zwischen den beiden Isoformen und den Antikörpern konnten ausgeschlossen werden (siehe Abb. 56).

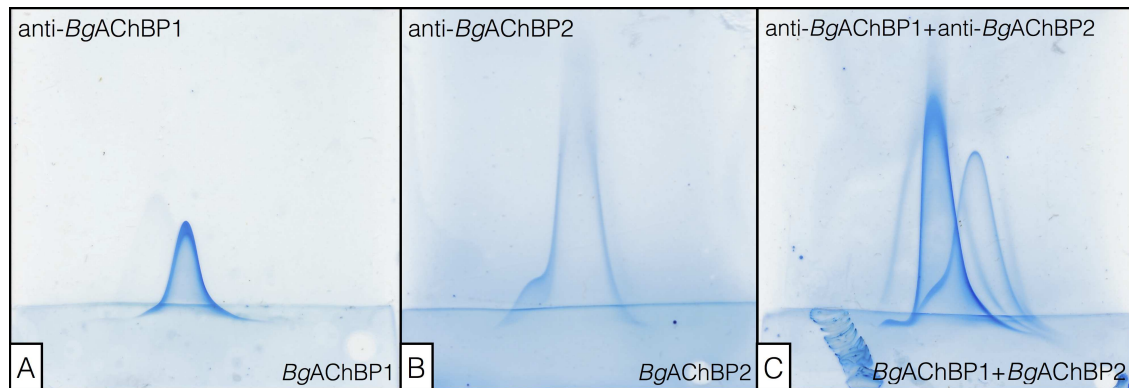


Abb. 55: Zweidimensionale Immunelektrophoresen mit rekombinantem *BgAChBP*. (A) Rekombinantes *BgAChBP1* (2,5 μ L) mit anti-*BgAChBP1*-Antikörper (20 μ L). Das Protein wird deutlich erkannt. (B) Rekombinantes *BgAChBP2* (3 μ L) mit anti-*BgAChBP2*-Antikörper (15 μ L). Es bildet ebenfalls ein deutliches Präzipitat. (C) Beide Isoformen (je 2,5 μ L) im gleichen Punkt aufgetragen, gegen ein Gemisch beider Antikörper (20 μ L anti-*BgAChBP1*-Antikörper, 15 μ L anti-*BgAChBP2*-Antikörper). Es sind insgesamt vier Präzipitate zu erkennen.

Rekombinantes *BgAChBP1* bildete mit dem dazugehörigen Antikörper ein kräftiges Präzipitat. Leicht dazu versetzt, als Schatten, war ein zweites Präzipitat zu erkennen (Abb. 55A). Dieses schwache Präzipitat war nur bei Versuchen mit rekombinantem Protein vorhanden, nicht aber bei Hämolympheproteinen. Demnach handelt es sich um eine unspezifische Reaktion mit Bakterienproteinen, welche spezifisch für die rekombinante Expression sind, oder um *BgAChBP*-Monomere, die in der Hämolymphe nicht in dieser Form auftreten. Bei rekombinantem *BgAChBP2* bildeten sich ebenfalls ein kräftiges und ein schwaches Präzipitat (Abb. 55B). Die linke Seite des Präzipitats wies eine Schulter auf, welche charakteristisch für die Detektion von rekombinantem *BgAChBP2* zu sein schien. Wurden beide Isoformen gemeinsam in einem Punkt aufgetragen und liefen gegen ein Gemisch beider Antikörper, bildeten sich vier Präzipitate (Abb. 55C). Die beiden Isoformen wanderten in der ersten Dimension unterschiedlich weit durch das Gel. Die Präzipitate beider Proteine waren durchgängig und verschmolzen an keiner Stelle miteinander, was darauf schließen lässt, dass sie als nicht verwandt zu betrachten sind. Das rechte Präzipitat ragte mit einer Schulter durch das gesamte linke Präzipitat. Die Schulter wurde nur bei rekombinantem *BgAChBP2* beobachtet, sodass es sich bei diesem Gipfel um *BgAChBP2* handeln muss. Das etwas dunklere Präzipitat wanderte in der ersten Dimension weiter und stammte von *BgAChBP1*. Rechts und links waren zwei weitere schwache Gipfel zu erkennen.

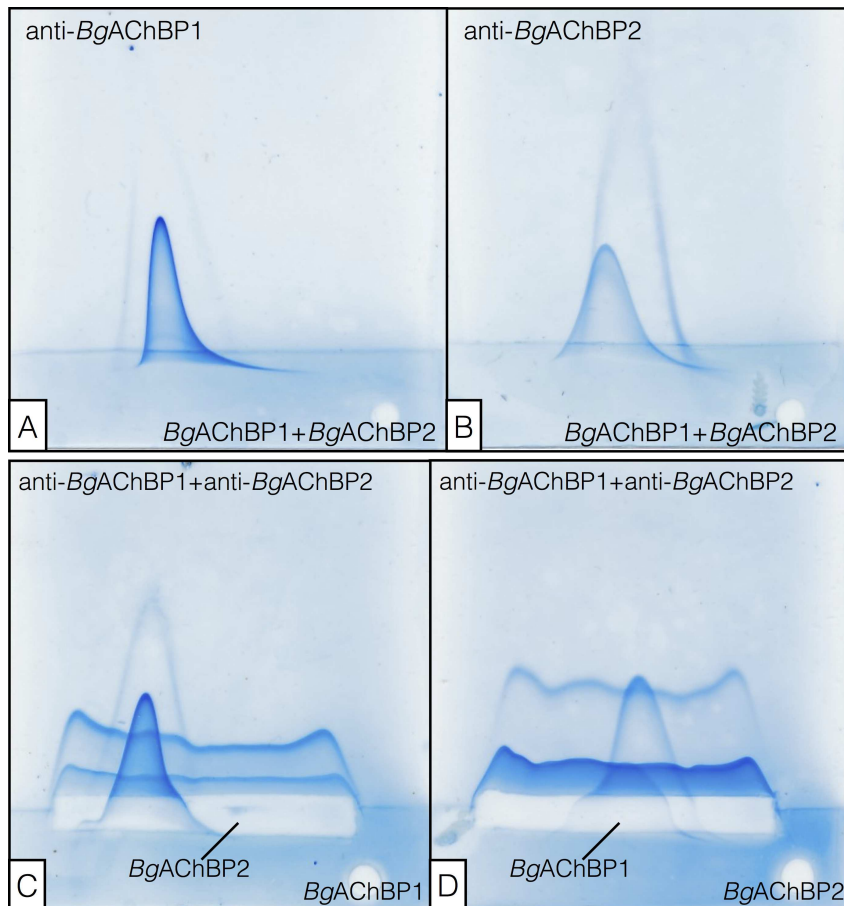


Abb. 56: Zweidimensionale Immunelektrophoresen mit rekombinantem *BgAChBP*. (A) Rekombinantes *BgAChBP1* und *BgAChBP2* (2,5 μL und 4 μL) mit anti-*BgAChBP1*-Antikörper (20 μL). Ein kräftiger Gipfel sowie ein schwächeres und höheres Präzipitat im Hintergrund wurden erkannt. (B) Rekombinantes *BgAChBP1* und *BgAChBP2* (2,5 μL und 4 μL) mit anti-*BgAChBP2*-Antikörper (15 μL). Zwei unterschiedlich hohe übereinander liegende Präzipitate sind zu sehen. (C) Die beiden Präzipitate des *BgAChBP1* (2,5 μL) verschmelzen nicht mit dem *BgAChBP2* 4 μL im Trog. Es lag ein Gemisch beider Antikörper vor (20 μL anti-*BgAChBP1*-Antikörper, 15 μL anti-*BgAChBP2*-Antikörper). (D) Auch die beiden Präzipitate des *BgAChBP2* (4 μL) verschmelzen nicht mit dem *BgAChBP1* (2,5 μL) im Trog. Es wurden die gleichen Antikörpervolumina verwendet wie in C).

Sowohl die Reaktion zwischen beiden rekombinanten *BgAChBP*-Isoformen mit anti-*BgAChBP1*-Antikörper (Abb. 55A) als auch die Reaktion zwischen beiden rekombinanten *BgAChBP*-Isoformen mit anti-*BgAChBP2*-Antikörper (Abb. 55B) führte jeweils nur zu einem Präzipitat, wodurch gezeigt wurde, dass es zu keinen Kreuzreaktionen kam. Wurde eine Isoform aufgetragen und die andere im Trog, so bildete sich ein Präzipitat, welches nicht mit dem Trogprotein verschmolz (Abb. 55C,D). Demnach war das aufgetragene Protein nicht mit dem Trogprotein verwandt. Insbesondere in Abb. 55D ist gut zu erkennen, dass keines der beiden Präzipitate mit dem Trogprotein verschmolz, woraus sich weiter schließen lässt, dass es sich bei dem zweiten Präzipitat nicht um eine expressionsbedingte Komponente handelt, da diese bei beiden Isoformen auftreten müsste. Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei dem zweiten Präzipitat jeweils um Monomere der *BgAChBP*-Isoform handelt.

Nachdem sichergestellt wurde, dass die einzelnen Antikörper spezifisch eine Isoform des Proteins erkannten, wurde *BgAChBP* über eine Anionenaustauscher-Chromatographie aus der Hämolymphe von *B. glabrata* gewonnen. Die Fraktionen wurden vor Durchführung der Versuche mittels EM auf das Vorhandensein von *BgAChBP* kontrolliert (siehe Abb. 8D).

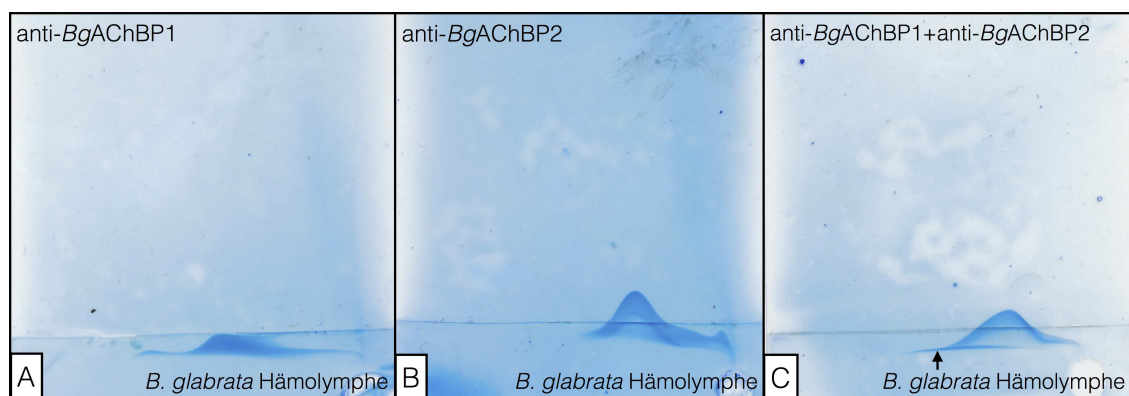


Abb. 57: Zweidimensionale Immunelektrophoresen mit *BgAChBP*. (A) *BgAChBP* mit anti-*BgAChBP1*-Antikörper (15 μ L). AChBP bildete ein kräftiges und niedriges Präzipitat. (B) *BgAChBP* mit anti-*BgAChBP2*-Antikörper (15 μ L). Es kam zu einem höheren Präzipitatsgipfel als in A). (C) *BgAChBP* mit einem Gemisch beider Antikörper (je 15 μ L). Es ist ein kleiner Gipfel und links davon ein strichartiges Präzipitat zu sehen (Pfeil).

Wie die Immunelektrophorese zeigte, erkannten beide Antikörper Protein in der Probe des nativen *BgAChBP* (Abb. 57).

Mit anti-*BgAChBP1*-Antikörper bildete sich ein recht flaches und längliches Präzipitat, welches zu beiden Seiten in einem strichartigen Verlauf endete (Abb. 57A). Durch geringere Mengen an zugegebenem Antikörper oder geringerer Proteinmenge wurde dieses Präzipitat nur in seiner Intensität schwächer, nicht jedoch höher. Anti-*BgAChBP2*-Antikörper bildete mit dem Protein ebenfalls ein Präzipitat. Dieses war etwas höher als das des *BgAChBP1* (Abb. 57B). *BgAChBP1* wanderte in der ersten Dimension etwas weiter als *BgAChBP2*. Um herauszufinden, ob in der Hämolymphe beide AChBP-Isoformen getrennt voneinander erkannt werden, wurde ein Gemisch beider Antikörper verwendet. Es kam zur Bildung eines niedrigen Präzipitats an dessen linkem Fuß ein zweites strichartiges Präzipitat lag (Abb. 57C). Dieses zweite Präzipitat hatte seinen Mittelpunkt am linken Fuß und reichte bis ungefähr zur Mitte des ersten Gipfels. Vergleicht man die beiden Präzipitate mit den ersten beiden Versuchen, handelte es sich bei dem höheren Gipfel vermutlich um *BgAChBP2* und bei dem strichartigen Präzipitat um *BgAChBP1*. Es scheint, als würden beide Protein vollständig getrennt voneinander detektiert.

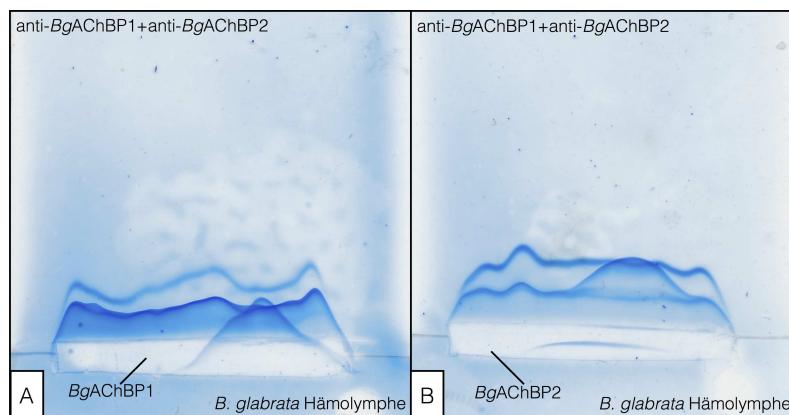


Abb. 58: Crossed-line-Immunelektrophoresen des *BgAChBP*. (A) Natives *BgAChBP* als Hauptprotein und rekombinantes *BgAChBP1* im Trog. Das Präzipitat verschmolz nicht mit dem Trogprotein, die Füße waren deutlich zu sehen. (B) Natives *BgAChBP* als Hauptprotein und rekombinantes *BgAChBP2* im Trog. Ein flaches Präzipitat im Trog sowie ein weiteres, welches auf dem Trogprotein aufsaß. Keine Verschmelzung zwischen Trogprotein und Hauptprotein.

Wurde natives *BgAChBP* als Hauptprotein aufgetragen und rekombinantes *BgAChBP1* im Trog, so bildeten sich zwei deutliche Präzipitate über die gesamte Länge des Trogs (Abb. 58A). Die Linien verschmolzen an keiner Stelle mit dem Hauptgipfel

(BgAChBP2). Das strichförmige Präzipitat wie in Abb. 57A war nicht zu sehen. Es war offensichtlich mit einer der beiden Linien (BgAChBP1) komplett verschmolzen.

Bei rekombinantem BgAChBP2 als Trogprotein bildeten sich ebenfalls zwei klar erkennbare Linien (Abb. 58B). Das strichförmige Präzipitat (BgAChBP1) blieb hier erhalten. Der Hauptgipfel saß auf dem Gipfel des Trogproteins auf, ohne dass Füße in den Trog hineinreichten. Zwischen dem Präzipitat des Trogproteins und dem des Hauptproteins war zwar eine klare Abgrenzung vorhanden, diese war aber weniger stark als in den anderen Bereichen des Trog-Präzipitats. Es kam also zu einer teilweisen Verschmelzung des nativen BgAChBP2 mit dem rekombinanten BgAChBP2 im Trog.

10 Untersuchung der Hämolympheproteine von *Planorbarius corneus*

Um einen Überblick über die enthaltenen Proteine zu bekommen, wurde die frisch entnommene Hämolymphe elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 59). Sie war durch das enthaltene Hämoglobin kräftig rot gefärbt.

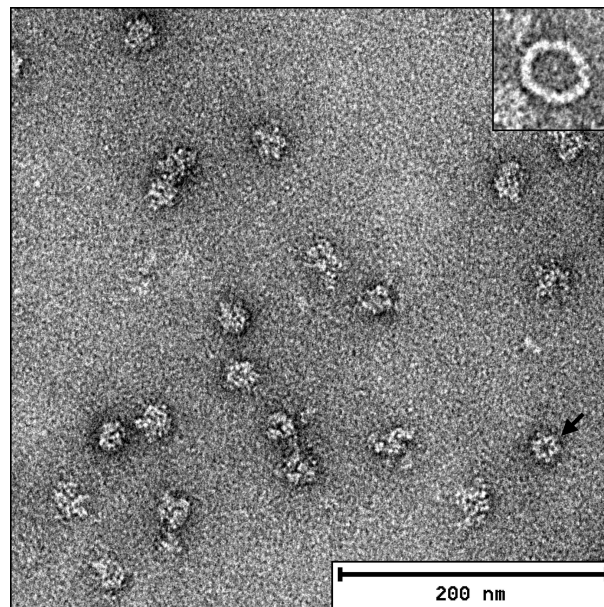


Abb. 59: EM-Aufnahme der Hämolympheproteine von *P. corneus*. Zu sehen sind Hämoglobin als Hauptprotein der Hämolymphe, vereinzelte Dodekaeder des AChBP (Pfeil) und Hämocyanin (Ausschnitt). Mit 1% Uranylacetat negativ kontrastiert.

Hämoglobin (Hb) bildete kompakte, etwas amorph wirkende Strukturen und war erwartungsgemäß das häufigste Protein in der Hämolymphe (siehe Abb. 59). Daneben waren auch Hämocyaninringe zu sehen (Abb. 59, Ausschnitt). Die vereinzelt Dodekaeder des PcAChBP stimmten in Größe und Aussehen mit denen von *B. glabrata* überein. Ähnlich wie bei *B. glabrata* nahm dieses Protein bei *P. corneus* in den EM-Aufnahmen nur einen geringen Anteil der Hämolympheproteine ein.

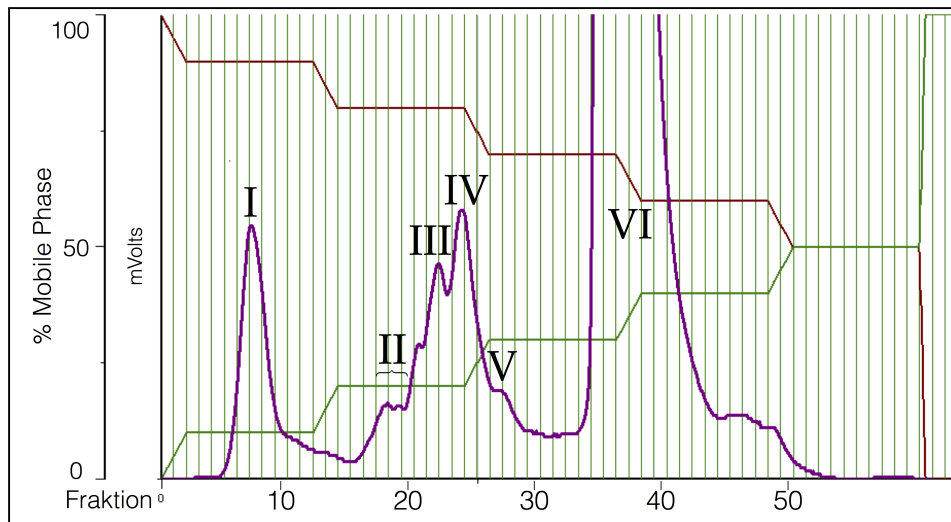


Abb. 60: Elutionsprofil der Anionenaustausch-Chromatographie der Hämolymphe aus *P. corneus* Ein Milliliter Hämolymphe mit 0,5 mL/min wurde über Q-Sepharose aufgetrennt (Stufengradient). Aus allen bezeichneten Gipfeln wurden Proben entnommen. AChBP wurde in den Gipfeln II-V erwartet. Die Fraktionen des Gipfels VI zeigten eine deutlich rote Farbe, welches auf Hämoglobin hinwies. In Magenta ist die Intensität gegen die Zeit aufgetragen. In Grün sind die Stufen des Gradienten (Anteil an Puffer B) eingezeichnet, gegenläufig hierzu verläuft in Rot der Gradient des Auftragspuffers (Puffer A).

Die Hämolympheproteine wurden mittels Anionenaustausch-Chromatographie aufgetrennt (Abb. 60). Aus allen Gipfeln wurden Proben entnommen und elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 61). Die Gipfel II-V lagen eng beisammen und gingen teilweise ineinander über. Die Fraktionen aus Gipfel VI waren rötlich gefärbt, was auf Hämoglobin hinwies. Gipfel I zeigte keine Proteinstrukturen und wurde daher nicht weiter untersucht. In Gipfel II waren große, globuläre Partikel und AChBP-Pentamere zu sehen (Abb. 61A). Die globulären Partikel waren auch in den Gipfeln III, IV und V zu sehen. In Gipfel III waren in großen Mengen AChBP-Pentamere und vereinzelt AChBP-Dodekaeder zu finden (Abb. 61B). Der Hauptteil der Dodekaeder sowie Hämocyanin war in Gipfel IV zu finden (Abb. 61C).

In *P. corneus* war AChBP also vorhanden und ließ sich mit den gleichen Methoden und Bedingungen anreichern, wie bei *B. glabrata*. Gipfel V zeigte AChBP-Dodekaeder und andere, kleinere Partikel, die keinem bekannten Protein zugeordnet werden konnten (Abb. 61D). In Gipfel VI waren ausschließlich Hämoglobinpartikel vorhanden, die sich jedoch bereits in einer aufgelockerten Form befanden, was auf seine destabilisierte Quartärstruktur hinwies (Abb. 61E). Unter den verwendeten Pufferbedingungen kam es zu einer rasche Dissoziation des Hämoglobins.

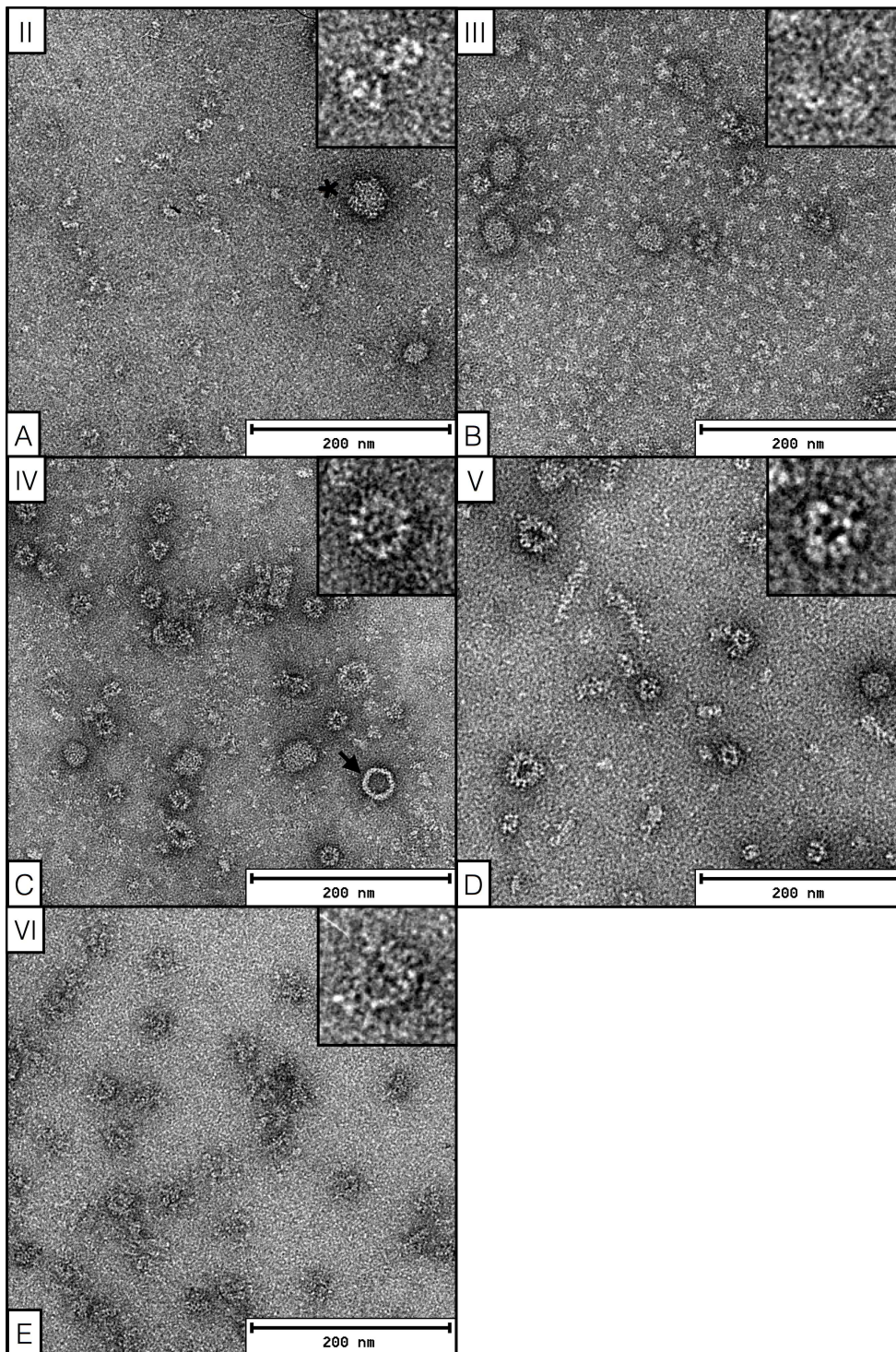


Abb. 61: EM-Aufnahmen verschiedener Gipfel der Anionenaustausch-Chromatographie. (A) Gipfel II mit Pentameren (Ausschnitt) und globulären Proteinaggregaten (Stern). (B) Gipfel III mit deutlich mehr Pentameren. Zusätzlich globuläre Proteinaggregate sowie Dodekaeder. (C) Gipfel IV zeigte Dodekaeder (Ausschnitt), Hämocyanin (Pfeil) und globuläre Proteinaggregate. (D) Gipfel V enthielt Dodekaeder und verschiedene andere Partikel. (E) Gipfel VI zeigte Hämoglobin. Alle Proben mit 1% Uranylacetat negativ kontrastiert; außer Gipfel VI alle Gipfel auf eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/mL aufkonzentriert.

Von den Gipfeln aus der Anionenaustausch-Chromatographie (siehe Abb. 60) wurde eine SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen angefertigt (Abb. 62).

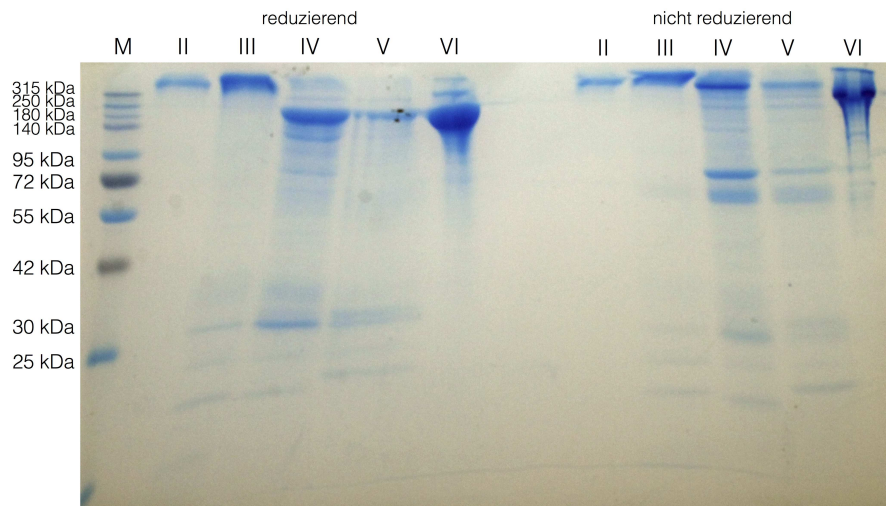


Abb. 62: SDS-PAGE der einzelnen Gipfel aus der Anionenaustausch-Chromatographie. In den Gipfeln II und III sind unter reduzierenden Bedingungen starke Banden oberhalb der 315 kDa-Bande des Markers zu sehen. Zusätzlich befindet sich in Gipfel III eine schwache Bande bei 30 kDa. Gipfel IV zeigt unter reduzierenden Bedingungen eine deutliche Bande in Höhe von 25 und 30 kDa sowie eine sehr starke Bande bei 180 kDa und eine sehr schwache Bande bei etwa 300 kDa. Die schwache Bande bei 300 kDa trat auch in den Gipfeln V und VI auf. In Gipfel V waren ebenfalls Banden bei 30 kDa und 180 kDa. In den Gipfeln II und III änderte sich das Bandenmuster unter nicht reduzierenden Bedingungen nicht. In Gipfel IV und V war die Bande bei 30 kDa schwächer, dafür gab es eine neue Doppelbande bei 60 kDa und 70 kDa. 15%ige SDS-PAGE, je 25 μ L Probenvolumen, Marker (M) ProSieve Quad Color Proteinmarker (Lonza, Rockland, USA) verwendet.

Bei der Bande in Höhe von 180 kDa unter reduzierenden Bedingungen in den Gipfeln IV, V und VI dürfte es sich um Hämoglobin handeln, welches in der SDS-PAGE trotz seiner Molekülmasse von 240 kDa irregulär wie ein 180 kDa-Protein wandert (Lieb et al., 2006). Insbesondere in Gipfel VI war in den EM-Aufnahmen Hämoglobin zu sehen (siehe Abb. 61E). In den Gipfeln IV und V lag eine schwache Bande in Höhe von 300 kDa. Dies entspricht der Molekülmasse von Planorbiden-Hämocyanin (Lieb et al., 2006; Markl, 2013), welches auch in den EM-Aufnahmen zu finden war (siehe Abb. 61C). Insbesondere in Gipfel IV waren in den EM-Aufnahmen immer wieder Aufsichten und Seitenansichten des Hämocyanin-Zylinders zu sehen. Es handelt sich dabei um ein "Dekamer ohne Kragen" (Markl, 2013). In den Gipfeln IV und

V war unter reduzierenden Bedingungen zudem eine Bande in Höhe von 30 kDa vorhanden. Dies entspricht dem glykosilierten Monomer des AChBPs, was durch die Dodekaeder in den EM-Aufnahmen erhärtet wurde. In Gipfel IV und V blieben diese beiden Banden unter nicht reduzierenden Bedingungen etwas abgeschwächt bestehen. Zusätzlich war eine neue Doppelbande in Höhe von 60 kDa und 70 kDa zu sehen. Diese Situation entspricht der bei *B. glabrata*. Die Ausbildung einer Bande in Höhe eines Untereinheiten-Dimers deutet darauf hin, dass zwei AChBP-Untereinheiten über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Allerdings erklärt dies nur die neue Bande bei 60 kDa. Woher die Bande bei 70 kDa stammt bleibt unklar.

Um herauszufinden, welche der Banden in der Hämolymphe von *P. corneus* AChBP sind, wurden Western-Blots durchgeführt. Hierbei wurden polyklonale Antikörper verwendet, die gegen die beiden rekombinanten Isoformen des *BgAChBP* hergestellt worden waren. Zusätzlich wurde ein polyklonaler Antikörper gegen Hämoglobin aus *B. glabrata* herangezogen.

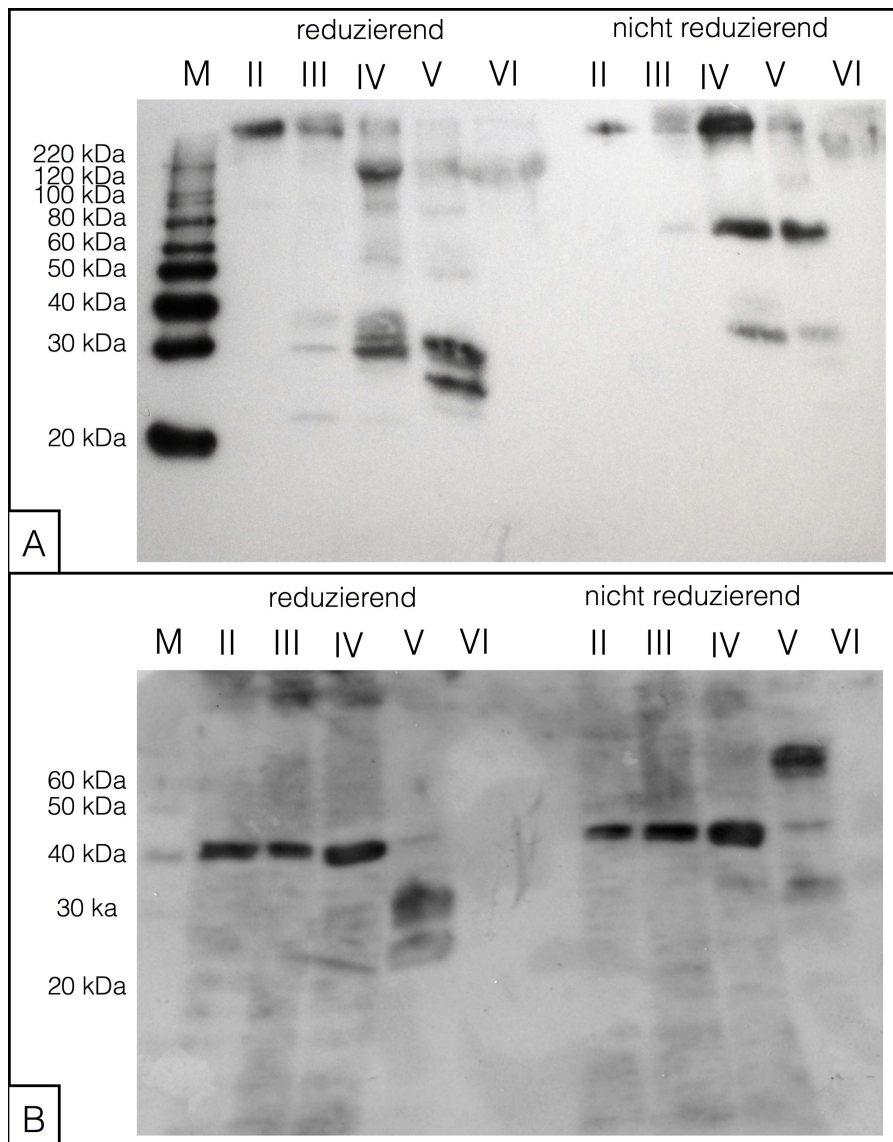


Abb. 63: Western-Blots mit Hämolympheproteinen aus *P. corneus*. (A) *BgAChBP1*-Antikörper (2 μ L). In allen Spuren eine Bande weit oben im Gel, die sich jedoch nach rechts ausdünn. In den Gipfeln IV und V eine Bande bei 30 kDa und etwa 250 kDa. In Gipfel V zusätzlich eine Bande bei 25 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen in beiden Gipfeln eine Bande bei leicht über 30 kDa, eine bei etwa 70 kDa sowie am oberen Rand des Blots. (B) *BgAChBP2*-Antikörper (4 μ L). Banden in den Gipfeln II, III und IV bei 40 kDa. Keine Veränderung des Bandenmusters unter nicht reduzierenden Bedingungen. Eine weitere Bande in Gipfel V bei 25 kDa und leicht über 30 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde diese schwächer, dafür eine kräftige Bande in Höhe von etwa 70 kDa.

Das Auftragungsschema der Western-Blots entsprach dem der SDS-PAGE in Abb. 62. In allen Spuren war unter Verwendung des anti-*BgAChBP1*-Antikörpers eine unterschiedlich starke Reaktion im oberen Bereich des Blots zu sehen (Abb. 63A). Mit diesem Antikörper war eine schwache Reaktion bei 30 kDa in Gipfel III zu sehen. Dies würde zu den vereinzelt AChBP-Dodekaedern in den EM-Aufnahmen passen (Abb. 61B). Unter nicht reduzierenden Bedingungen verschwanden diese Banden und wurden durch eine neue Bande in Höhe von 70 kDa ersetzt. In Gipfel III kam es unter reduzierenden Bedingungen ebenfalls zur Detektion eines 30 kDa Proteins, unter nicht reduzierenden Bedingungen wurde diese Bande schwächer und eine Bande bei etwa 70 kDa reagierte. Zusätzlich wurde in den Gipfeln III, IV und V eine Bande bei etwa 180 kDa, die unter nicht reduzierenden Bedingungen verschwand, erkannt. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um eine Kreuzreaktion zu Hämoglobin. Obwohl die Gipfel IV und V in der SDS-PAGE keine deutlichen Unterschiede zeigten (Abb. 62), ist hier unter reduzierenden Bedingungen ein leichter Unterschied auszumachen: Im Gegensatz zu Gipfel IV wurden in Gipfel V Banden bei 25 und 30 kDa detektiert. Unter nicht reduzierenden Bedingungen war der Unterschied zwischen den beiden Fraktionen weit geringer. Lediglich die Bande in Gipfel V, die zu groß war um einzuwandern, war etwas schwächer.

In den Gipfeln III, IV und V war sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht reduzierenden Bedingungen eine deutliche Bande in Höhe von 40 kDa zu sehen, die mit dem anti-*BgAChBP2*-Antikörper reagierte (Abb. 63B). In diesem Bereich war in der SDS-PAGE keine deutliche Bande zu sehen (Abb. 62). In allen drei Spuren war im oberen Teil des Gels nur ein schwacher Schatten, nicht aber eine sauber abgegrenzte Bande zu erkennen, wie es beim *BgAChBP1*-Antikörper der Fall war. Gipfel V unterschied sich im Bandenmuster deutlich von den vorherigen Gipfeln: Die Bande bei 40 kDa war nur schwach zu sehen, dafür war unter reduzierenden Bedingungen eine Bande bei 25 kDa und 30 kDa zu sehen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen war die Bande bei 30 kDa und eine bei etwa 60 kDa zu sehen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Antikörper in der Lage waren, AChBP aus *P. corneus* zu detektieren, wurden zweidimensionale Immunelektrophoresen angefertigt.

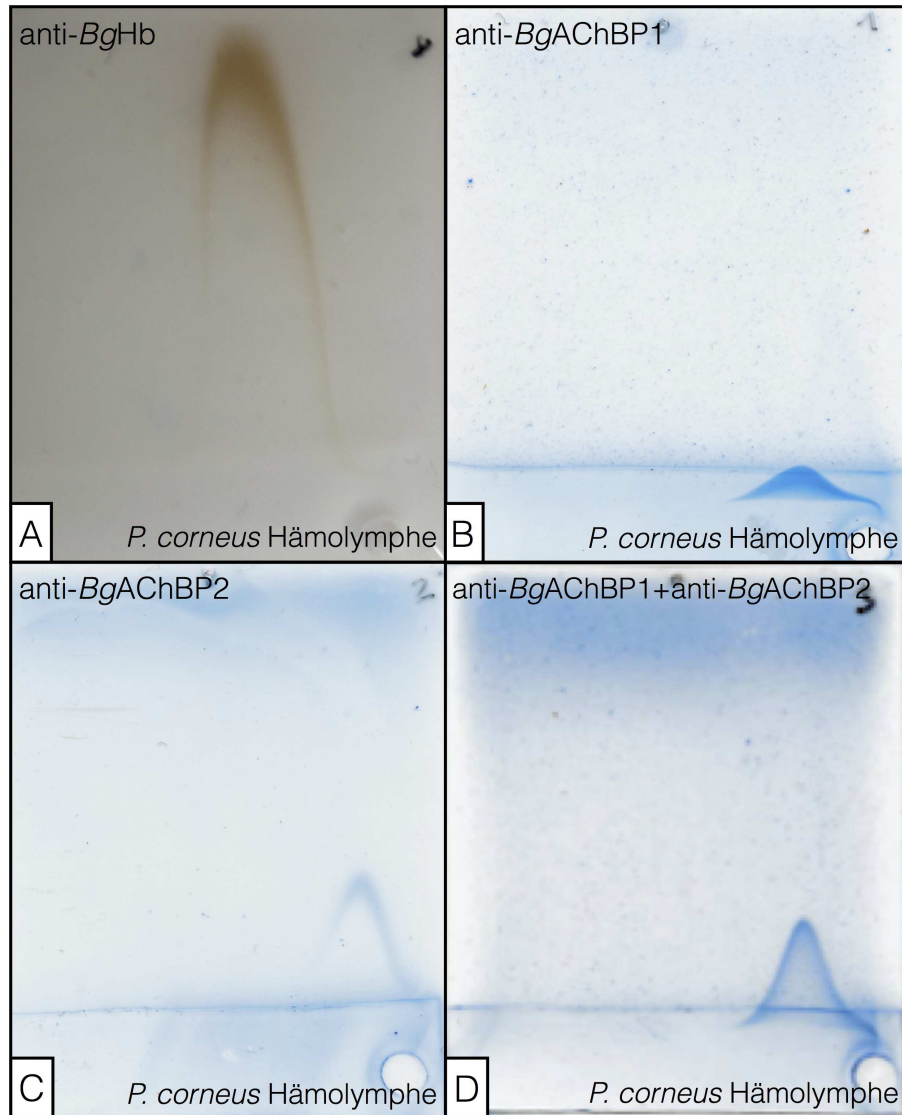


Abb. 64: Zweidimensionale Immunelektrophorese der Hämolympheproteine aus *P. corneus*. (A) Hämolympheproteine mit anti-BgHb-Antikörper. Hämoglobin (rot), bildet ein Präzipitat. (B) Hämolympheproteine (10 μ L) mit anti-BgAChBP1-Antikörper (30 μ L) bilden ein kräftiges Präzipitat. (C) Hämolympheproteine (10 μ L) mit anti-BgAChBP2-Antikörper (100 μ L) bilden ein schwaches Präzipitat. (D) Hämolympheproteine mit beiden Antikörpern gegen BgAChBP, nur ein Präzipitat.

Mit anti-*BgHb*-Antikörper bildete sich ein Präzipitat, dass durch die kräftig-rote Farbe des Hämoglobins auch ohne zusätzliche Färbung sichtbar war (Abb. 64A). Gipfel VI zeigte keine Reaktion mit anti-*BgAChBP1*- oder anti-*BgAChBP2*-Antikörper (nicht gezeigt). So konnte ausgeschlossen werden, dass die Antikörper gegen AChBP zu einer Kreuzreaktion führten. Alle weiteren Immunelektrophoresen wurden mit Hämolymphe durchgeführt und somit ausgeschlossen, dass die Proteinmengen der einzelnen Gipfel der Anionenaustausch-Chromatographie für eine Reaktion zu gering sein könnten. Hämolympheproteine mit anti-*BgAChBP1*-Antikörper bildete ein relativ flaches, kräftiges Präzipitat aus (Abb. 64B). Ein so kräftiges Präzipitat zeigte sich auch unter Verwendung des *BgAChBP*-Dodekaeders (siehe Abb. 57A). Aus Hämolympheproteinen und anti-*BgAChBP2*-Antikörper resultierte ein einzelnes schwaches Präzipitat (64C). Wurden beide Antikörper in den angegebenen Mengen eingesetzt, konnte nur ein Präzipitat sichtbar gemacht werden (Abb. 64D). Daher ist, obwohl der Antikörper gegen *BgAChBP2* eine Reaktion zeigte, nicht sicher belegt, dass die Abb. 64B und 64C zwei verschiedene Isoformen des AChBP zeigen.

10.1 Transkriptomanalyse von *PcAChBP*

Gesamt-RNA aus *P. corneus* wurde isoliert nach ihrer Sequenzierung bioinformatisch ausgewertet (siehe 5.1). Insgesamt wurden 70.457.092 RNA-Sequenzen mit einer Länge von 151 Basen und einer durchschnittlichen Qualität der Sequenzierung von 78% Q30-Basen geliefert. Die Sequenzen von *BgAChBP1* (GenBank: JQ814367.1) und *BgAChBP2* (GenBank: JQ814368.1) dienten als Ausgangspunkt für die Suche nach verwandten Sequenzen bei *P. corneus*. Aus 1305 RNA-Sequenzen wurde die Sequenz von *PcAChBP1* zusammengesetzt. Sie umfasst einen offenen Leserahmen von 690 Basen (229 Aminosäuren). Mit SignalP 4.1 Server wurde ein 17 Aminosäuren langes Signalpeptid vorhergesagt (grau hinterlegt in Abb. 65). In der Sequenz liegen vier Cysteine (gelb in Abb. 65). *PcAChBP1* besitzt drei potentielle N-Glykosilierungsstellen (türkis in Abb. 65). *PcAChBP1* hat ohne das Signalpeptid einen theoretischen Isoelektrischen Punkt von 4,90 und eine berechnete Molekülmasse von 24,34 kDa.

Aus nur 133 RNA-Sequenzen wurde die Sequenz eines weiteren AChBP-Proteins (*PcAChBP2*) zusammengesetzt. Der offene Leserahmen ist 654 Basen lang (217 Aminosäuren). Das identifizierte Signalpeptid ist 13 Aminosäuren lang. *PcAChBP2* hat ohne Signalpeptid eine berechnete Molekülmasse von 23,50 kDa und einen

theoretischen isoelektrischen Punkt von 5,36. Das Protein besitzt insgesamt 6 Cysteine, wobei eines innerhalb des Signalpeptids liegt (Abb. 65B) und eine potentielle N-Glykosilierungsstelle.

Aus 259 RNA-Sequenzen wurde ein großer Teil eines weiteren AChBP zusammengesetzt. Diese Sequenz umfasst 712 Basen (214 Aminosäuren). Der C-terminale Bereich fehlt und konnte im Transkriptom auch mit unterschiedlichsten Parametern nicht gefunden werden. Dieser AChBP-Sequenz fehlt das strikt konservierte C-terminale Motiv des Tyr-X-Cys-Cys-X-Tyr und das Stop-Codon. Der identifizierte Teil des Proteins verfügt über ein 19 Aminosäuren langes Signalpeptid. Desweiteren liegen innerhalb des Signalpeptids 4 Cysteine und im restlichen Fragment weitere drei (Abb. 65C).

Die Sequenzidentitäten auf Aminosäureebene der drei *PcAChBPs* sind in Tab. 9 aufgeführt.

```

1      10      20      30      40
MFRQVLILFLIFQGSVGDDRSEVYSRIIRRSDLDSIPTVGDKPLQISIG
50  QLVNIQWANTKQNELEVIIWVTQSWKDKSLSWELNPSWNPHPPSFNQV
100  SV PAKEIWTPDITIFKSIGAPEIYSSNAVVYIDGNVTTYIPQIRARVMC
150  NLK NLYQSNNVTCSLKSGSRTRPSTEMSLSVQGDKNILSEYIESSMYEEV
200  LDVT QKVNQKKYDCCPETYDEAELTFSFRQAHF
210  220  229

```

(A) *PcAChBP1*

```

1      10      20      30      40
MLLCFLLQGSLGHTKDRSEILNDIIQRSKVPSIPMVDDQPVNVSLLHYTL
50  M NIQRADVEYNEVDVLIWLTYEWKDPSLSWAKECTSFNEVIVPVSKIWI
100  PD ISVFNSIGTPEMYADQVTHVYKDGSVMYVPQLRYKVVCDLSKLTTEV
150  GAT CSLKAGSWTRSSKELFLSENKEDHLSEYFAHSKFQLLKASQTINKK
200  VYPCCPDTYEDAELIFTFKK
210  217

```

(B) *PcAChBP2*

```

1      10      20      30      40
MEIPQICILLCMLRGCLCLNNRADVLSRIIKNSNPDVIPIEGDNPVEVS
50  V AYTLINVQRADMEHNEVDVLWLTQSWKDKSLAWDSNYTKFNSLSVPT
100  KY IWTPDITVYNSVGAPEIYASNMAVVGSDGNVLYVPQIRVRCTCDIKN
150  LKS IWGFETPFKKKDSVTCSVRSESWTHPGEELTLKSQGEVILSQYLEE
200  SKFE LLAATQIVNKKLFPT
210  215

```

(C) *PcAChBP3*

Abb. 65: Aminosäuresequenz von *PcAChBP1*, *PcAChBP2* und *PcAChBP3*. Signalpeptide (grau), Cysteine (gelb) und potentielle N-Glykosilierungsstellen (türkis) hinterlegt. In (C) ist der unklare Bereich dunkelgrau unterstrichen.

Tab. 9: Sequenzidentität auf Aminosäureebene der *PcAChBP*

	<i>PcAChBP1</i>	<i>PcAChBP2</i>	<i>PcAChBP3</i>
<i>PcAChBP1</i>		46,45%	48,28%
<i>PcAChBP2</i>	46,45%		45,41%
<i>PcAChBP3</i>	48,28%	45,41%	

10.2 3D-Rekonstruktion des *PcAChBP*

In Tab. 10 sind die Eckdaten des Datensatzes für eine grobe 3D-Rekonstruktion des *PcAChBP*-Dodekaeders mit negativ kontrastierten Partikeln zusammengefasst. Die *PcAChBP*-Dodekaeder wurden von Hand mithilfe des Appion-Moduls Manual-Picker selektiert. Die CTF-Korrektur erfolgte ebenfalls in Appion durch das Modul CTFfind3. Die Berechnung der 2D-Klassensummen wurde in IMAGIC-5 durchgeführt, die anschließende 3D-Rekonstruktion in EMAN 1.9.

Nach dem referenzfreien Alignment in IMAGIC-5 wurden aus den resultieren

Tab. 10: Datensatz aus negativ kontrastierten Partikeln des *PcAChBP*-Dodekaeders

Anzahl der EM-Aufnahmen	335
Kontrastmittel	1% Uranylacetat
Anzahl der Partikel	5757
Boxgröße	96 x 96 px
Elektronenmikroskop	Tecnai G ² 12 BioTWIN
Vergrößerung	71540x
Defokus	3,2 nm-1,07 nm
Ångstrom pro Pixel	4,36

Klassensummen Referenzen für die Multivariate statistische Analyse gewählt. Bereits nach der zweiten Iteration waren deutlich verschiedene Ansichten eines Dodekaeders in den Klassensummen zu sehen (Abb. 66).

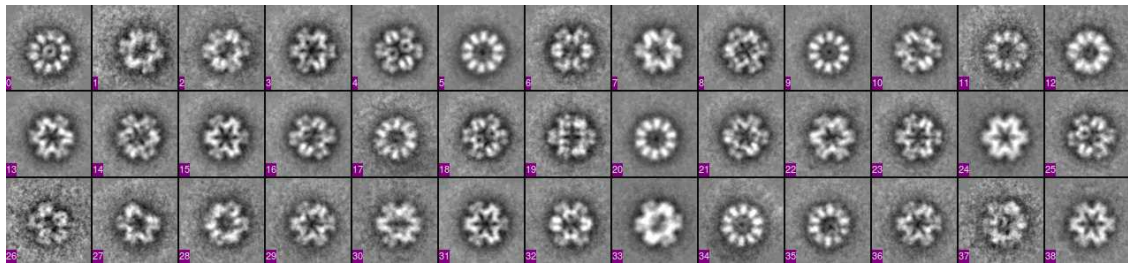


Abb. 66: 2D-Klassensummen des PcAChBP-Dodekaeders. Auswahl der Klassensummen, die mit IMAGIC-5 aus dem Datensatz mit 5757 Partikeln berechnet wurden.

Um den Datensatz aufzureinigen, wurde mit EMAN ein *multi-refinement* durchgeführt, bei dem aus drei unterschiedlich stark verrauschten Kugeln jeweils eine 3D-Rekonstruktion berechnet wurde. Nach 50 Iterationen ohne Symmetrievorgabe hatte sich aus einem der Modelle ein Dodekaeder gebildet. Die Rückprojektionen der anderen beiden Modelle zeigten kaum Ähnlichkeit mit den Einzelpartikeln oder den Klassensummen und wurden verworfen. Auf dieser Grundlage wurde mit EMAN eine 3D-Rekonstruktion ohne Symmetrie berechnet (Abb. 67A-C).

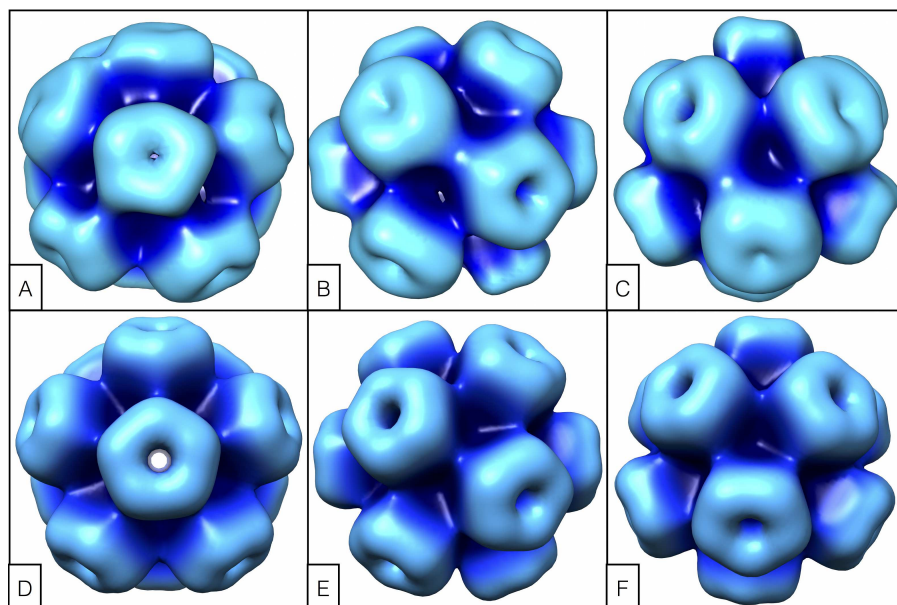


Abb. 67: 3D-Rekonstruktion des PcAChBP-Dodekaeders. (A-C) 3D-Rekonstruktion ohne Annahme einer Symmetrie. (D-F) 3D-Rekonstruktion mit ikosaedrischer Symmetrie. (A/D) Blick entlang einer der sechs fünfzähligen Symmetrieachsen. (B/E) Blick entlang einer der fünfzehn zweizähligen Symmetrieachsen. (C/F) Ansicht entlang einer der 10 dreizähligen Symmetrieachsen.

In die finale 3D-Rekonstruktion des Dodekaeders ohne Symmetrievorgabe gingen 3881 Einzelpartikel ein (Abb. 67A-C). Da ohne Symmetrievorgabe mit einer recht geringen Anzahl an Partikeln ein so deutlicher Dodekaeder berechnet werden konnte, wurde nun eine ikosaedrische Symmetrie, vorgegeben (67D-F). Laut dem 0,5 Kriterium hat diese Rekonstruktion eine Auflösung von ca. 18 Å. Das pseudoatomare Homologiemodell des *BgAChBP1* (PDB-ID: 4AOD) (Saur et al., 2012) wurde in die 18 Å-Rekonstruktion eingepasst. Das Homologiemodell passte gut in die einzelnen Pentamere des Dodekaeders (Abb. 68). In Abb. 68B ist ein einzelnes Pentamer mit eingepasstem pseudoatomarem Modell gezeigt. Nur die C-terminale L7-Schleife ragt leicht aus der Dichtekarte heraus. In Abb. 68C ist eine Aufsicht des eingepassten Modells in die Dichtekarte gezeigt. Abgesehen von der L7-Schleife ragen keine Strukturen des Homologiemodells deutlich aus der Masse heraus.

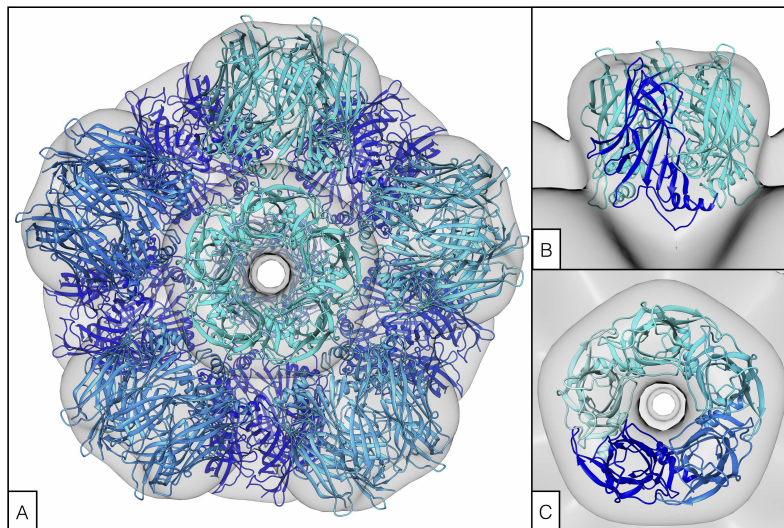


Abb. 68: Einpassen eines pseudoatomaren Homologiemodells in die 18 Å-Rekonstruktion des *PcAChBP*-Dodekaeders. (A) 3D-Rekonstruktion mit 12 eingepassten Homologiemodellen (PDB-ID: 4AOD). (B) Seitenansicht eines einzelnen, eingepassten Pentamers. Untereinheiten in verschiedenen Blautönen dargestellt; (C) Aufsicht auf ein eingepasstes Pentamer.

D Diskussion

1 Natives *BgAChBP1* und *BgAChBP2*

Die Kristallstruktur von Homopentameren ist von verschiedenen anderen Mollusken bekannt (*Lymnaea stagnalis* (Brejc et al., 2001; Smit et al., 2001), *Haliothis discus hannai* (Huang et al., 2009), *Bulinus truncatus* (Celie et al., 2005), *Aplysia californica* (Hansen et al., 2004)). Das AChBP von *Biomphalaria glabrata* bildet hier eine Ausnahme, denn in der Hämolymphe der Schnecke existiert es als regelmäßiger Pentagonododekaeder und ähnelt damit in seiner Struktur dem Kapsid mancher Viruspartikel (Fuschiotti et al., 2006). Im Elektronenmikroskop genauso aussehende Proteine wurden auch bei anderen Planorbiden gefunden (Wood and Mosby, 1975; Terwilliger et al., 1976; Illan et al., 1986; Herskovits and Hamilton, 1990, 1994). Es liegt nahe, dass es sich hierbei ebenfalls um AChBP-Dodekaeder handelt.

Die Western-Blot-Analysen von Hämolympheproteinen von *B. glabrata* hatten gezeigt, dass eine Bande bei 30 kDa sowohl *BgAChBP1* als auch *BgAChBP2* enthielt. Antikörper die gegen *BgAChBP2* gerichtet waren, zeigten zusätzlich eine Reaktion mit einer Bande, die unter nicht reduzierenden Bedingungen bei 60 kDa zu finden war. Bei dieser Bande war demnach davon auszugehen, dass sie *BgAChBP2*-Dimere enthielt. Dies unterstützte die Hypothese, dass *BgAChBP2* aufgrund seines ungepaarten Cysteins C71 in der Lage ist Dipentamere auszubilden (Saur et al., 2012). Ob eine weitere Oligomerisation zu Dodekaedern in der Hämolymphe möglich ist, blieb offen.

Im Rahmen meiner Arbeit sollte die zweidimensionale Immunelektrophorese Aufschluss über die Zusammensetzung des Dodekaeders geben. Rekombinantes *BgAChBP2* allein kann offenbar keine Dodekaeder bilden, aber Saur et al. (2012) ließen offen, ob Hetero-Oligomere Dodekaeder existieren. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Antikörper die gegen die rekombinanten *BgAChBP*-Isoformen hergestellt worden waren sowohl *BgAChBP* aus der Schnecke erkannten, als auch selektiv für die Isoformen

waren. Durch die *Crossed-line*-Immunelektrophorese und das komplette Verschmelzen des Präzipitats von *BgAChBP*-Dodekaedern aus der Schneckenhämolymph mit dem Präzipitat des rekombinanten *BgAChBP1* ließ sich ableiten, dass die Dodekaeder aus der Hämolymph ausschließlich aus *BgAChBP1* bestehen (siehe Abb.58). Es kam außerdem zu keiner Kreuzreaktion zwischen den beiden Isoformen. Das Präzipitat des nativen *BgAChBP2* lag dem des rekombinanten *BgAChBP2* auf und war nicht vollständig verschmolzen (siehe Abb.58). Dies könnte durch die Glykosilierungen zustande kommen, welche am rekombinanten Protein fehlen.

2 Unidentifiziertes Protein X aus *B. glabrata*

Auffällig waren Proteine, die in Gipfel III gefunden wurden (siehe Abb. 7). Hier zeigten die EM-Aufnahmen längliche Partikel, welche etwas größer als Pentamere des AChBP waren. Zudem waren Ansichten zu finden, bei denen anscheinend zwei dieser Partikel aneinander gelagert waren (siehe Abb. 8B, C). In der SDS-PAGE bildete sich bei dieser Fraktion unter reduzierenden Bedingungen eine Proteinbande von etwas über 200 kDa. Überraschenderweise zeigte sich unter nicht reduzierenden Bedingungen eine Bande, die weiter ins Gel einwanderte und bei 100 kDa zu liegen kam. Eine Bande dieser Größe war unter reduzierenden Bedingungen nicht zu finden. Im Western-Blot konnte in Gipfel III mit anti-*BgAChBP*-Antikörper nichts detektiert werden. Es ist also davon auszugehen, dass es sich bei dem gefundenen Protein weder um *BgAChBP1* noch *BgAChBP2* handelt. Aus EM-Aufnahmen wurden verschiedene Ansichten selektiert, die diesem Protein zugeordnet wurden. Daraus wurden Klassensummen gebildet (siehe Abb. 11). In der 3D-Rekonstruktion mit mehreren Startmodellen entstand aus ca. 8688 Partikel eine Dichtekarte, die eine längliche Form aufweist (siehe Abb. 12A). Das Protein scheint über eine D2-Symmetrie zu verfügen.

Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei diesem Protein nicht um eine Variante von AChBP handelt. Was es darstellt, blieb offen.

3 Rekombinantes *BgAChBP1*

In der Schnecke macht das AChBP nur einen sehr geringen Prozentsatz der Hämolymphproteinee aus (Lieb et al., 2006). Die gewonnenen Probenmengen waren

daher sehr gering und hierdurch war es bisher nicht möglich, natives *BgAChBP1* und *BgAChBP2* voneinander zu trennen. Auch konnte bisher in EM-Aufnahmen von Hämolyseproteinen das *BgAChBP2* nicht eindeutig identifiziert werden.

Im Gegensatz zum C-terminalen *His-Tag* (Dissertation Möller 2012) konnte der in meiner Arbeit verwendete N-terminale *His-Tag* mittels TEV-Protease abgespalten werden. So wurden strukturelle Analysen ermöglicht ohne etwaige Beeinflussung durch eine solche, zusätzliche Sequenz. Das ursprüngliche mit einem C-terminalen *His-Tag* ausgestattete rekombinante Protein wurde nicht weiter hergestellt, da es zur Aggregatbildung neigte und der flexible *His-Tag* die Auflösung bei der 3D-Rekonstruktion begrenzte (Dissertation Saur 2013).

Das Protokoll zur Expression und Aufreinigung des *BgAChBP1* mit C-terminalem *His-Tag* wurde bereits von Dr. V. Möller etabliert (Dissertation Möller 2012). Es wurde für die vorliegende Expression mit N-terminalem *His-Tag* übernommen. Dr. V. Möller hatte bereits erste Versuche unternommen und gezeigt, dass es möglich war, den N-terminalen *His-Tag* von den assemblierten Pentameren abzuspalten (Dissertation Möller 2012). Erst durch Abspaltung des *His-Tags* kam es bei *BgAChBP1* zur Ausbildung von Dodekaedern. Die Assemblierung wurde in 20 mM Tris-Puffer (pH 7,5) unterstützt. Es konnte also durch das Vorhandensein von Dodekaedern Rückschlüsse darüber gewonnen werden, ob die Abspaltung des *His-Tags* erfolgreich war. Außerdem konnte unter diesen Bedingungen, je nach Versuch, mit einer reinen Pentamerprobe oder mit Dodekaedern gearbeitet werden. Die Abspaltung des *His-Tags* zeigte sich in der SDS-PAGE durch eine etwas weitere Wanderung der Monomerbande (siehe Abb. 14). Die Assemblierung der Pentamere zu Dodekaedern umfasste nie die gesamte Proteinmenge. Ein Teil der Probe verblieb stets als Pentamer. Dabei blieb offen, ob bei dieser Fraktion der *His-Tag* nicht abgespalten wurde.

Mit dem durch die Thermofluor-Methode optimierten Puffer gelang eine gezielte Induktion der Dodekaederbildung nicht (siehe Abb. 17). Der *BgAChBP1*-Dodekaeder denaturierte in diesem Puffer erst bei 76 °C. Im Puffer mit 20 mM Tris (pH 7,5) denaturierte das Protein bei etwa 70 °C. Jedoch bildeten sich im optimierten Puffer trotz des *His-Tags* Dodekaeder aus. Da das Protein auch im Tris-Puffer bis in hohe Temperaturbereiche stabil blieb und gleichzeitig eine gezielte Induktion der Dodekaederbildung möglich war, wurde dieser Puffer beibehalten.

4 3D-Rekonstruktion des BgAChBP1-Dodekaeders

Es war möglich, eine hoch aufgelöste 3D-Rekonstruktion des AChBP1-Dodekaeders zu berechnen. Da das Protein in destilliertem Wasser mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM CaCl₂ vorlag, sollte nichts vorhanden sein, was als Ligand dienen könnte. Aufgrund der Instabilität des Proteins beim Vitrifizieren, vermutlich verursacht durch die fehlenden Puffermoleküle, war es notwendig, die GraFix-Methode (Kastner et al., 2008; Stark, 2010) anzuwenden um dem Protein zusätzliche Stabilität zu verleihen. In den Klassensummen der Kryo-Proben war innerhalb des zentralen Kanals der Pentamere eine zusätzliche, sehr schlecht aufgelöste Masse zu erkennen (siehe Abb. 23). Durch eine 3D-Rekonstruktion ohne Angabe einer Symmetrie, konnte zum einen der Aufbau des Dodekaeders bestätigt werden, zum anderen war auch hier durchgehend in allen Pentameren eine zusätzliche Masse vorhanden. Diese 3D-Rekonstruktion erreichte eine Auflösung von 6 Å. Die 3D-Rekonstruktion in Relion erreichte eine nominelle Auflösung von 3,59 Å. Aufgrund der sichtbaren Details, wie Seitenketten von Aminosäuren, der β -Faltblätter und α -Helices, ist die tatsächliche Auflösung wohl noch etwas höher. In der 3D-Rekonstruktion befanden sich zusätzliche schlechter aufgelöste Massen innerhalb der Pentamere sowie an den Kontaktstellen zwischen zwei Pentameren (siehe Abb. 24). Möglicherweise wurde die Auflösungsbestimmung hierdurch insgesamt beeinträchtigt. Mehrere voneinander unabhängige Rekonstruktionsversuche aus diesem Datensatz mit Relion und FREALIGN, auch durch Dr. David Haselbach vom MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen, führten zum gleichen Ergebnis. Da die zusätzlichen Massen bereits in den Klassensummen sowie der symmetriefreien 3D-Rekonstruktion vorhanden waren, handelte es sich hierbei offensichtlich weder um einen Fehler bei der 3D-Rekonstruktion noch um einen Symmetriesierungsfehler. Die Ursache der Artefakte musste demnach im Datensatz zu finden sein. Andererseits ist in Negativkontrast-EM-Aufnahmen der Probe nach GraFix eindeutig zu sehen, dass der zentrale Kanal der Pentamere frei ist. Somit blieb als mögliche Ursache der Artefakte die Vitrifizierung in Kombination mit GraFix; dies wurde jedoch als äußerst unwahrscheinlich angesehen, zumal ein solcher Effekt bei den bisherigen 3D-Rekonstruktionen des Dodekaeders nie beobachtet wurde. Durch neue EM-Aufnahmen aus den gleichen Proben konnte das Rätsel gelöst werden. Dr. David Haselbach berechnete aus dem neuen Datensatz eine artefaktfreie 3D-Rekonstruktion und erzielte eine Auflösung von 3,5 Å (siehe Abb. 27). Die beiden 3D-Rekonstruktionen wiesen, abgesehen von den Artefakten, so gut wie keine

Unterschiede auf. Ursächlich für die Artefakte war vermutlich ein instabiles *flatfield* bei der Aufnahme der Bilder im Elektronenmikroskop. Im *power spectrum* der Aufnahmen lässt sich dies durch vertikal verteilte Punkte erkennen. In der Regel verursachen sie jedoch keine Probleme, da sie sich durch die statistischen Methoden bei der 3D-Rekonstruktion herausrechnen. In diesem Datensatz war dies durch die hohe Symmetrie des *AChBP*-Dodekaeders offensichtlich nicht der Fall.

Aufgrund der höheren Auflösung konnte mithilfe dieser 3D-Rekonstruktion das bestehende Homologiemodell (PDB-ID: 4AOD) durch S. Braukmann verbessert werden. Große Bereiche der 3D-Dichtekarte deckten sich mit den 3D-Rekonstruktionen von *BgAChBP* in Komplex mit Nikotin oder Bis-Tris, wiesen teilweise jedoch eine deutlich bessere Auflösung auf. An der Kontaktstelle zwischen zwei Pentameren ragten die Seitenketten der Aminosäuren E24, D25 und R63 in die Masse (Abb. 69). Durch ihre räumliche Nähe ist es schwierig eine Aussage über die genauen Bindungspartner der Aminosäuren zu treffen. Da gerade dieser Bereich für die Bindung zwischen den Pentameren eine wichtige Rolle spielt (Saur et al., 2012), wäre eine Aufklärung anzustreben.

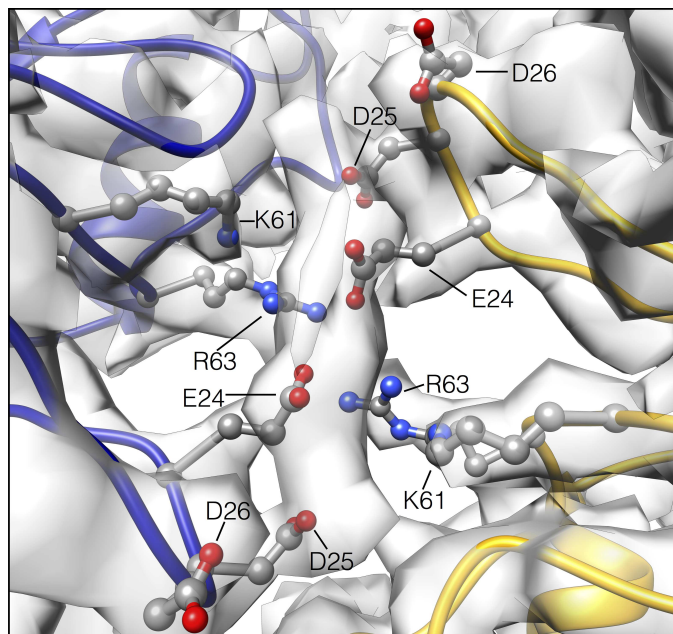


Abb. 69: Masse in der 3D-Rekonstruktion an der Kontaktstelle zweier Pentamere. 3,6 Å-Rekonstruktion mit eingepasstem Homologiemodell. Die Aminosäuren, die in den Mutationsstudien eine Rolle spielten, sind benannt.

5 Mutagenese-Experimente

Das Homologiemodell des Dodekaeders, welches auf Grundlage der 3,6 Å-Rekonstruktion erstellt wurde (Abb. 70), zeigte gegenüber dem publizierten Modell (PDB-ID: 4AOD, Saur et al. 2012) Abweichungen zu den bisher angenommenen Verbindungen zwischen den Pentameren.

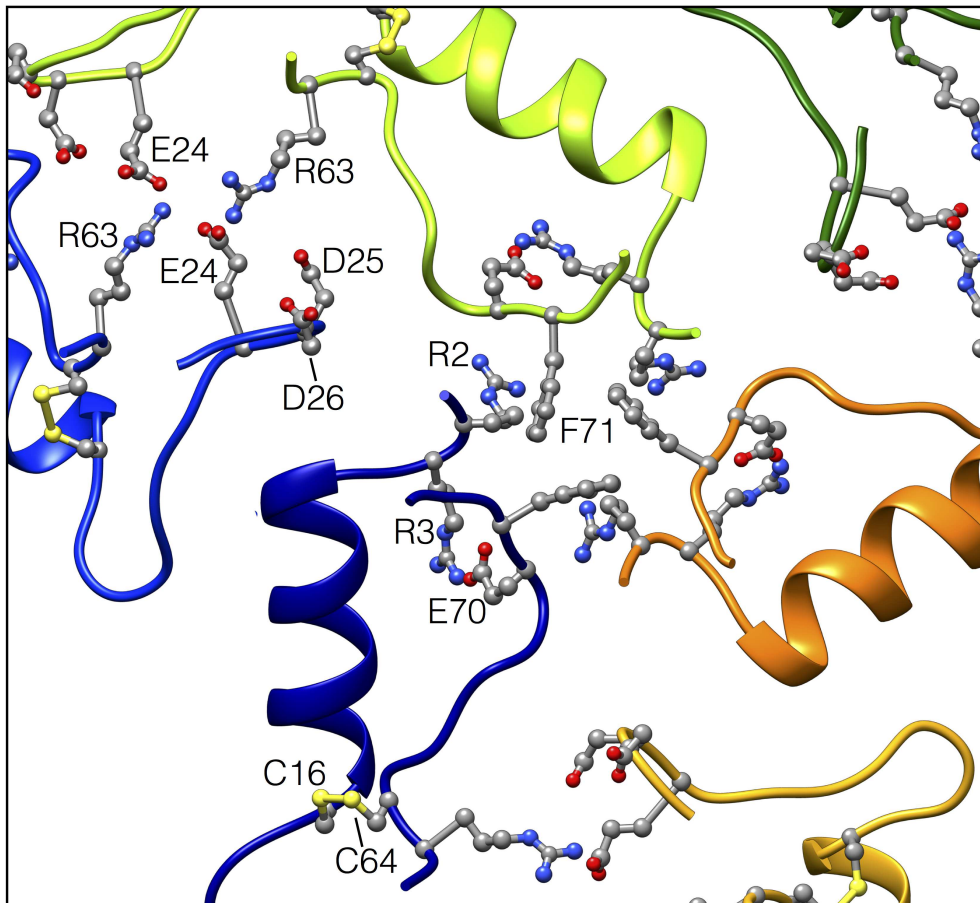


Abb. 70: Vermutete Kontaktstellen zwischen den Pentameren im neuen Homologiemodell des *BgAChBP1*-Dodekaeders. Die postulierten Salzbrücken $R2 \leftrightarrow D26$, $R3 \leftrightarrow E70$ und $D25 \leftrightarrow R63$, die Disulfidbrücke $C16 \leftrightarrow C64$ und das aromatische Trimer aus F71 wurden mutiert.

Die Aminosäuren R2 und D26 lagen nun so weit auseinander, dass eine Salzbrücke zwischen ihnen nicht mehr möglich war. Ebenso lagen die Aminosäuren R3 und E70 nun an Positionen, die eine Salzbrücke innerhalb einer Untereinheit, anstelle einer Verknüpfung zweier Pentamere, wahrscheinlicher machte. Die Ergebnisse der Mutationsversuche sind in Tab. 11 zusammengefasst. Solange sich der His-Tag am

Tab. 11: Übersicht über die Ergebnisse aller Mutationen bei *BgAChBP1*. Bildung von Pentameren (1x5), Dodekaedern (12x5), Aggregaten aus Pentameren (nx5) und undefinierten Aggregaten (n). E70G fiel bei Zugabe von 10 MgCl₂ und 10 CaCl₂ aus (X).

Mutante	mit His-Tag				ohne His-Tag				ohne His-Tag + Salz			
	1x5	12x5	nx5	n	1x5	12x5	nx5	n	1x5	12x5	nx5	n
Wildtyp	✓	-	-	-	✓	✓	-	-	✓	✓	-	-
R2G	✓	-	-	-	✓	(✓)	-	✓	✓	(✓)	-	-
R2A	✓	-	✓	-	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-
R3G	✓	-	-	-	✓	-	-	-	✓	(✓)	-	-
R3A	✓	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	-	-
C16/64G	✓	-	✓	-	✓	✓	-	-	✓	✓	-	-
C16/64A	✓	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	-	✓
E24A	✓	-	-	-	-	-	✓	-	-	-	✓	✓
R63A	✓	-	-	-	-	-	✓	-	✓	-	-	-
E70G	✓	-	-	-	✓	-	-	-	X	X	X	X
E70A	✓	-	-	✓	✓	-	✓	-	✓	-	-	-
F71G	✓	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	-	-	-
F71A	✓	-	-	-	✓	✓	-	-	✓	(✓)	(✓)	-

Protein befand, bildeten alle Mutanten Pentamere und zeigten keine Dodekaeder. Dies entsprach den Ergebnissen des Wildtyps und wurde als Beleg gesehen, dass die Proteinexpression und Faltung erfolgreich war.

Die Salzbrücke R2↔D26 sollte das N-terminale Ende der α -Helix mit der L1-Schleife der Nachbaruntereinheit des selben Pentamers verknüpfen (siehe Abb. 40; Saur et al. 2012). *BgAChBP1*-R2G und *BgAChBP1*-R2A zeigten unterschiedliche Ergebnisse (Tab. 11). Das Fehlen von Dodekaedern bei *BgAChBP1*-R2A legt nahe, dass R2 an der Bildung von Dodekaedern beteiligt ist. Durch das fehlende β -Kohlenstoffatom im Glycin verfügt das Rückgrat der Aminosäurekette bei *BgAChBP1*-R2G über eine ungewöhnlich hohe Flexibilität im N-terminalen Bereich der Sequenz, sodass es möglich sein könnte, dass Dodekaeder-artige Strukturen durch andere Aminosäuren, wie beispielsweise die Salzbrücke R3↔E70, stabilisiert werden. Im neuen Homologiemodell ragte D26 in die Bindungsstelle zwischen zwei Pentameren hinein und könnte hier ebenso wie E24 und D25 mit R63 interagieren (siehe Abb. 69). Für R2 konnte jedoch kein alternativer Bindungspartner ausgemacht werden.

Bei der postulierten Salzbrücke $R3 \leftrightarrow E70$ handelt es sich um die Verbindung der α -Helix und der L3-Schleife zweier Untereinheiten (siehe Abb. 42; Saur et al. 2012). Bei den Mutanten (R3G, R3A, E70G und E70A) bildeten sich keine Dodekaeder nach Abspalten des His-Tags. Durch 10 mM $MgCl_2$ und 10 mM $CaCl_2$ bildeten sie sich bei R3G und R3A, nicht aber bei E70A (Tab. 11) Dodekaeder. Eine Verbindung zwischen R3 und E70 ist anzunehmen und wird durch die 3D-Rekonstruktion untermauert. Im Gegensatz zur publizierten Struktur liegt $R3 \leftrightarrow E70$ innerhalb der Untereinheit und nicht wie bisher angenommen zwischen zwei benachbarten Pentameren (Abb. 71). Die Salzbrücke stabilisiert den N-terminalen Bereich des Proteins innerhalb der Untereinheit und ist als strukturgebend für den Dodekaeder zu betrachten. Die Zugabe von zweiwertigen Kationen kann die Funktion von R3 zumindest teilweise ausgleichen. Die Strukturveränderungen an E70 waren so groß, dass es unter keinen der getesteten Bedingungen zur Bildung von Dodekaedern kam.

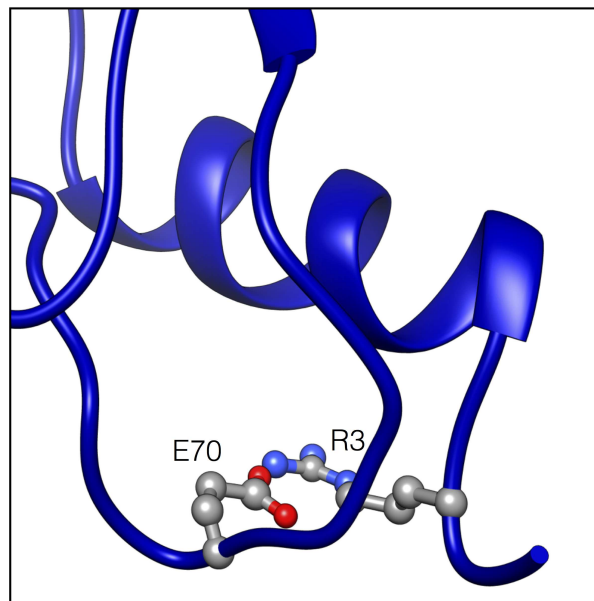


Abb. 71: Mögliche Salzbrücke $R3 \leftrightarrow E70$ innerhalb einer Untereinheit. Homologiemodell anhand der 3,6 Å-Rekonstruktion.

Die mögliche intramolekulare Disulfidbrücke $C16 \leftrightarrow C64$ ist einzigartig innerhalb der bisher bekannten AChBPs und AChRs. Daher wurde angenommen, dass sie den N-terminalen Bereich der Untereinheit stabilisiert und so zum Aufbau des BgAChBP1-Dodekaeders beiträgt (Saur et al., 2012). Im publizierten Homologiemodell

(PDB-ID:4AOD; Saur et al. 2012) betrug die Distanz zwischen den beiden Cysteinen 3,1 Å, im vorliegenden Homologiemodell 2,6 Å. Überraschenderweise war C16/64G nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, wohingegen sich bei C16/64A nach Abspalten des His-Tags unstrukturierte Aggregate bildeten und weder Pentamere noch Dodekaeder vorhanden waren (Tab. 11). Es war unerwartet, dass die Diskrepanz zwischen den beiden Mutanten so groß ist und auch, dass diese exklusive Disulfidbrücke Einfluss auf die Pentamerbildung hat.

Die gesamte Region der Aminosäure E24 hat sich im Vergleich zum publizierten Homologie-Modell 4AOD (siehe Abb. 39) aus der direkten Nachbarschaft des N-Terminus herausbewegt und liegt nun an der Kontaktstelle zwischen zwei Pentameren (Abb. 70). In der 3D-Rekonstruktion des *Bg*AChBP1-Dodekaeders liegen E24 und R63 zweier benachbarter Pentamere in einer Distanz von 3,1 Å zueinander. Innerhalb einer Untereinheit liegt der Abstand zwischen E24 und R63 bei 3,5 Å. Somit ist die Ausbildung einer Salzbrücke an beiden Stellen denkbar (Abb. 72).

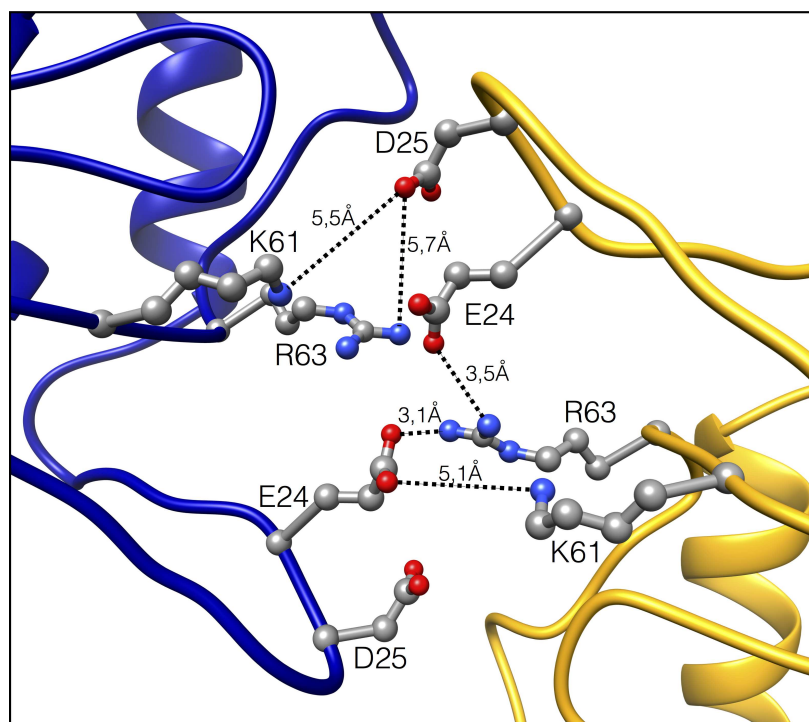


Abb. 72: Distanzen zwischen Aminosäuren an der Kontaktstelle zwischen zwei Pentameren. Homologiemodell anhand der 3,6 Å-Rekonstruktion.

Die Aminosäuren E24 und R63 scheinen eine Rolle in der Dodekaederbildung zu spielen, ohne sie wurde kein Dodekaeder gebildet. Bei der Mutation an R63 zerfielen die großen Aggregate nach der Zugabe von 10 MgCl₂/10 CaCl₂ zu Pentameren.

Im publizierten Homologiemodell stellte die Salzbrücke D25↔R63 eine Verbindung zweier benachbarter Pentamere dar und sollte durch die Mutation an R63 überprüft werden. Im neuen Homologiemodell beträgt die Distanz zwischen D25 und R63 5,7 Å (Abb. 72). Zwar ist diese Aminosäure sowohl bei *BgAChBP1* als auch *BgAChBP2* vorhanden, doch bildet nur *BgAChBP1*-Dodekaeder. Hieraus lässt sich ableiten, dass diese Salzbrücke nicht die einzige Voraussetzung für die Dodekaederbildung darstellt. Zudem liegen die beiden Aminosäuren im neuen Homologiemodell deutlich weiter auseinander. Durch die Substitution von R63 kam es zu keiner Dodekaederbildung mehr (siehe Tab. 11). Im Homologiemodell ragen die Seitenketten von E24, D25 und R63 in die Masse an der Kontaktstelle zwischen zwei Pentameren (Abb. 69). R63 spielt, ebenso wie E24, vermutlich eine Rolle bei der Bildung der Quartärstruktur, wobei offen bleiben muss, ob das Fehlen der Salzbrücke oder Änderung der Konformation das Ausbleiben der Dodekaeder bewirkt.

Phenylalanin F71 lag im publizierten Homologiemodell (PDB-ID:4AOD, Saur et al. 2012) an der Kontaktstelle zwischen drei Pentameren und könnte dort einen hydrophoben Cluster bilden. Von anderen Proteinen ist eine maßgebliche Stabilisierung der Quartärstruktur durch ein solches Trimer bekannt (z.B. Burley and Petsko 1985; Lanzarotti et al. 2011). Diese Aminosäure könnte also eine Schlüsselrolle bei der Stabilisierung der Dodekaeder spielen, da kein anderes bekanntes AChBP an dieser Stelle ein Phenylalanin trägt. Bildete F71G in erster Linie irreguläre Aggregate, traten bei F71A Dodekaeder-artige Strukturen auf (siehe Tab. 11). Es ist also wahrscheinlich, dass das aromatische Trimer stabilisierend auf die Dodekaeder wirkt (Abb. 73). Durch Glycin wird dem Rückgrat der Aminosäuresequenz vermutlich eine zu hohe Flexibilität ermöglicht, sodass sich die Konformation im N-terminalen Bereich zu sehr ändert.

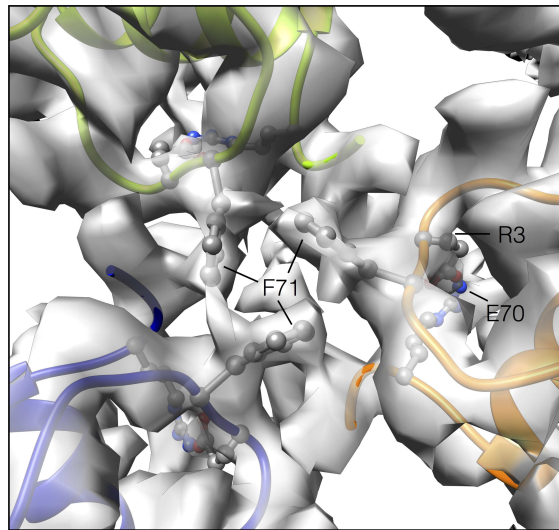


Abb. 73: Kontaktstelle dreier Pentamere im *BgAChBP1*-Dodekaeder. Im an die 3,6 Å-Rekonstruktion angepassten Homologiemodell liegt die Salzbrücke R3↔E70 innerhalb eines Pentamers (siehe Abb. 72). In direkter Nachbarschaft hierzu der hydrophobe Cluster F71.

6 Rekombinantes *BgAChBP2*

Bei *Bulinus truncatus*, die zur gleichen Familie wie *B. glabrata* gehört, können zwei Pentamere über eine Salzbrücke zwischen Arginin (R9) und Glutamat (E19) zu einem Dipentamer verknüpft werden (Celie et al., 2005). Durch das ungepaarte Cystein (C71) in *BgAChBP2* könnte sich auch hier ein Dipentamer bilden (Saur et al., 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde rekombinantes *BgAChBP2* mit einem N-terminalen His-Tag verwendet. Die Expression des *BgAChBP2* wurde nach dem gleichen Protokoll durchgeführt wie bei *BgAChBP1*. In der SDS-PAGE bildete das Protein eine Doppelbande bei 25 kDa. Die Ausbeute der Expression bei *BgAChBP1* und *BgAChBP2* war ähnlich, jedoch bildete *BgAChBP2* neben den Pentameren deutlich mehr unstrukturierte Aggregate. Da ein zu großer Teil des Ausgangsmaterials denaturiert vorlag und nicht in Lösung zu bringen war, war es nicht möglich eine Pufferoptimierung durch die Thermofluor-Methode durchzuführen. Eine schlechtere Löslichkeit des *BgAChBP2* wurde bereits bei *BgAChBP2* mit C-terminalem His-Tag beschrieben (Dissertation Möller 2012). Auch bei der rekombinanten Expression der beiden Isoformen des AChBP von *B. truncatus* kam es zu deutlichen Unterschieden in der Löslichkeit (Celie et al., 2005). Beim exprimierten *BtAChBP* handelte es sich um ein Dekamer, wie es auch hier bei *BgAChBP2* vorliegen könnte.

Bei rekombinantem BgAChBP2 mit C-terminalem His-Tag war eine Dimerbande in der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen nachweisbar, die auf eine Dimerisierung durch das freie C71 zurückgeführt wurde (Dissertation Möller 2012). Die EM-Aufnahmen zeigten Partikel, die Dipentameren entsprechen könnten (Dissertation Möller 2012; Dissertation Saur 2013). Auch bei BgAChBP2 mit N-terminalem His-Tag waren in den EM-Aufnahmen Dipentamere zu sehen (Abb. 21). In der SDS-PAGE wanderte BgAChBP2 nach Abspalten des His-Tags weiter als mit His-Tag (siehe Abb. 20A). Unter nicht reduzierenden Bedingungen war keine Differenz in der Molekülmasse zu sehen (siehe Abb. 20B). Eine Dimerbande bei 50 kDa war nur schwach zu sehen, trat aber auch vor der Abspaltung des His-Tags auf. Dies deutet darauf hin, dass sich die Disulfidbrücke nicht ausbildete. Dazu passend war es nicht möglich, Dimere bzw. Dipentamere anzureichern. Die dazu durchgeführten Versuche scheiterten: Die Anreicherung von Dipentameren durch Gelfiltrations-Chromatographie gelang nicht, da entweder weiterhin ein Gemisch aus Pentameren, Dipentameren und Aggregaten vorhanden war, oder aber nur eine einzige Fraktion, die Pentamere enthielt. Auch die Überführung einer Proteinbande auf ein EM-grid nach Auftrennung des Proteins in einem Acrylamidgel unter nativen Bedingungen gelang nicht (Methode nach Knispel et al. 2012). Auf den EM-Aufnahmen waren Pentamere, Dipentamere und amorphe Aggregate zu sehen.

Ich selektierte die in den EM-Aufnahmen vorhandenen Seitenansichten von Dipentameren und berechnete aus ihnen Klassensummen sowie eine 3D-Rekonstruktion. Das vorhandene Homologiemodell (PDB-ID: 4AOE) ließ sich stabil in die Rekonstruktion einpassen, wobei C71 an einer Massebrücke zwischen den beiden Pentameren zu liegen kam. Die Distanz zwischen den beiden Pentameren war viel zu groß für eine Disulfidverbrückung (Abb. 32D). In Hinblick auf die Beobachtung, dass in der SDS-PAGE kaum eine Dimerbande zu beobachten war, drängte sich folgende Hypothese auf: Die von mir selektierten Dipentamere waren nicht über Disulfidbrücken, sondern über N-terminale His-Tags verbunden; sie bildeten sich also aus einer Untereinheitenfraktion, bei der der His-Tag nicht abgespalten war. Im Gegensatz dazu hat bei Saur (Dissertation, 2013) der C-terminale His-Tag eine "normale" Dimerbildung nicht verhindert. Die Zugabe von zweiwertigen Kationen zu BgAChBP1 mit N-terminalem His-Tag führte ebenfalls zu vermeintlichen Dipentameren. Diese verschwanden durch Abspalten des His-Tags und es kam, wie erwartet zur Ausbildung

von Dodekaedern. Polyhistidin-Anhänge sind prinzipiell in der Lage zu einer Oligomerisierung von Proteinen zu führen, die nicht der wildtypischen Situation entspricht (Wu and Filutowicz, 1999). Seitenansichten dieser über His-Tag verknüpften Pentamere aus *BgAChBP1* wurden selektiert und eine 3D-Rekonstruktion nach den gleichen Parametern wie bei *BgAChBP2* berechnet. In der 3D-Rekonstruktion lag F71 so, dass sie an einer Masse zu liegen kam, welche die beiden Pentamere verband (Abb. 35D). Die minimale Distanz zwischen zwei Phenylalaninen bei *BgAChBP1* bzw. zwei Cysteinen bei *BgAChBP2* betrug etwa 17 Å (Abb. 35D bzw. Abb. 32D).

Um die Situation an einem Dipentamer darzustellen, wurde der Abstand zwischen zwei Pentameren mithilfe des Homologiemodells des *BgAChBP2* Pentamers (PDB-ID: 4AOE) auf Grundlage von *Aplysia californica* (PDB-ID: 2C9T) simuliert (Abb. 74A,D). In der 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP2*-Dipentamers mit eingepasstem Homologiemodell (Abb. 74B,E) ist deutlich zu erkennen, wie groß der Abstand zwischen den beiden Pentameren in Relation zum simulierten Dipentamer ist (Abb. 74A,D). Zwar liegen im Vergleich dazu die beiden Pentamere bei *BgAChBP1* dichter zusammen, spiegeln jedoch nur die Situation des Proteins mit His-Tag wieder (Abb. 74C,F).

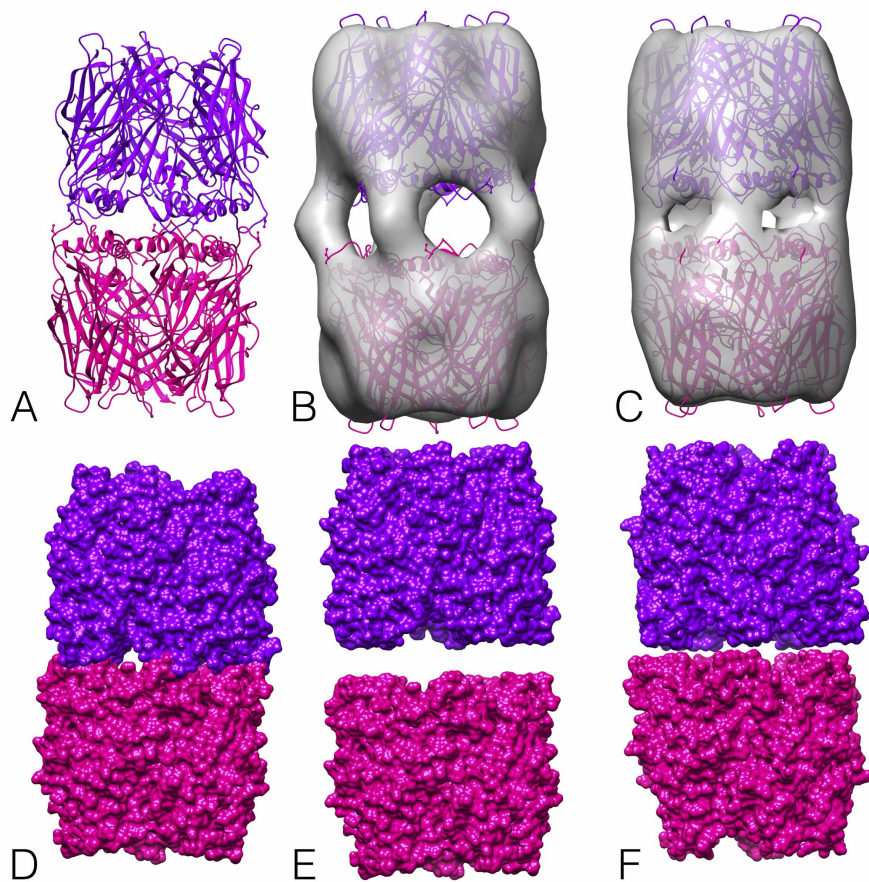


Abb. 74: Vergleich eines simulierten Dipentamers mit den 3D-Rekonstruktionen von *BgAChBP2* und *BgAChBP1* mit His-Tag. **A)** Zwei Pentamere (PBD-ID: 4AOE) anhand des Dipentamer aus *Aplysia californica* (PDB-ID: 2C9T) zu einem Dipentamer zusammengefügt. **B)** Eingepasstes Homologiemodell in die 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP2*-Dipentamers. **C)** 3D-Rekonstruktion des *BgAChBP1*-Dipentamers mit His-Tag. **D)** Oberfläche des simulierten Dipentamers aus A. **E)** Oberfläche des eingepassten Modells in die 3D-Rekonstruktion von *BgAChBP2*. **F)** Oberfläche des eingepassten Modells in die Dichtekarte des *BgAChBP1*.

In allen 3D-Rekonstruktionen kamen die Aminosäuren an Position 71 (Cystein in *BgAChBP2* und Phenylalanin in *BgAChBP1*) so zu liegen, dass sie sich an einer Massebrücke zwischen den beiden Pentameren befanden. In direkter räumlicher Nähe liegt jedoch auch der N-Terminus des Proteins an dem der *His-Tag* ansetzt.

Indem das ungepaart vorliegende Cystein (C71) gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde und somit ein Zustand ähnlich wie in *BgAChBP1* hergestellt wurde, kam es zu einer weit höheren Ausbeute an Pentameren und nur noch zu minimalen irregulären Aggregationen (Abb. 54). Durch den Austausch der Aminosäure wurde erhofft, eine Dodekaederbildung induzieren zu können. Dies war jedoch nicht der Fall.

7 Versuche zur Bindung von ACC an rekombinantes *BgAChBP1* und *BgAChBP2*

In der Meeresschnecke *Haliotis discus hannai* wurden zwei AChBP-ähnliche Proteine gefunden, die zuerst beide als Amorphe-Calciumcarbonat-bindende Proteine (ACCBP) eingestuft wurden. Bei Funktionsstudien stellte sich heraus, dass es sich bei einer der beiden Isoformen um ein "echtes" Acetylcholin-Bindeprotein handelte, während das andere als ACCBP an der Schalenbildung beteiligt ist (Huang et al., 2009). Da die Funktion des *BgAChBP* in *B. glabrata* bisher nicht geklärt ist und die beiden bisher bekannten ACCBPs aus *Haliotis discus hannai* und *Pinctada fucata* als Pentamere oder Dipentamere vorliegen (Ma et al., 2007; Huang et al., 2009), stellte sich die Frage, ob zumindest eine der Isoformen des *BgAChBP* ebenfalls an der Schalenbildung beteiligt sein könnte. Ein Anteil des nativen *BgAChBP* wurde bei Zugabe von amorphem Calciumcarbonat aus der Lösung gefällt (Saur et al., 2012). Es blieb jedoch offen, ob es sich dabei um *BgAChBP1* oder *BgAChBP2* handelte.

Die Bindung von amorphem Calciumcarbonat an ACCBP könnte durch die Glykosilierung der Proteine bedingt sein (Ma et al., 2007; Huang et al., 2009) oder direkt über die Polypeptidkette stattfinden (Su et al., 2013). Daher wurden Bindungsversuche mit dem rekombinant hergestellten *BgAChBP1* und *BgAChBP2* durchgeführt.

Im Versuch wurden Pentamere mit *His-Tag* der beiden Isoformen und *BgAChBP1*-Dodekaeder getrennt voneinander untersucht, um mögliche durch die Quartärstruktur bedingte Unterschiede zu sehen. *BgAChBP1*-Pentamere und

Dodekaeder waren durch amorphes Calciumcarbonat aus der Lösung zu fällen, wenn auch nur zu einem geringen Anteil. Die *BgAChBP1*-Pentamere fanden sich in der SDS-PAGE in der erwarteten Höhe von 25 kDa. Rekombinante *BgAChBP1*-Dodekaeder führten ebenfalls zu einer leichten Monomerbande und einer leichten Dimerbande, die jedoch auch in der Kontrolle vorhanden war. Die Dimerbande ist also nicht als Resultat der Bindung an ACC zu sehen.

Bei *BgAChBP2* war ebenfalls durch ACC ein Ausfällen aus der Lösung möglich, dieser Effekt war jedoch deutlich geringer als bei *BgAChBP1*. Es konnte nicht beantwortet werden, ob es sich dabei um unterschiedliche Affinitäten der beiden Isoformen zu ACC handelt oder ob womöglich das rekombinante *BgAChBP2* weniger funktional als *BgAChBP1* war (vgl. Kap. 6). Wie auch bei *BgAChBP1* waren die Proteinbanden bei *BgAChBP2* schwach, was bedeutet, dass keine großen Mengen an Protein isoliert wurden. Da die rekombinanten Proteine nicht über Glykosilierungen verfügten, scheint eine Bindung von ACC direkt an die Polypeptidkette möglich zu sein; ob die Glykosilierungen zu einer zusätzlichen Bindung führen, konnte hier nicht geklärt werden.

8 Untersuchung der Hämolympheproteine aus *Planorbarius corneus*

Planorbarius corneus gehört wie *B. glabrata* zu den Planorbidae und verfügt ebenfalls über das rosettenförmige Hämolympheprotein (Wood and Mosby, 1975). Die Ähnlichkeit in Größe und Form zu den *BgAChBP*-Dodekaedern lässt erkennen, dass es sich hier ebenfalls um ein dodekaedrisches AChBP handelt (Saur et al., 2012).

AChBP-Dodekaeder, Hämocyanin und Hämoglobin wurden mithilfe der Anionenaustausch-Chromatographie getrennt (siehe Abb. 60). Ebenso wie bei *B. glabrata* (Lieb et al., 2006) bildet *P. corneus*-Hämocyanin Dekamere ohne Kragen. Hämocyanin und AChBP-Dodekaeder befinden sich nach der Abtrennung des Hämoglobins in den gleichen Fraktionen. Beide Proteine stellten, ähnlich wie bei *B. glabrata*, nur einen geringen Teil der Hämolympheproteine dar. Erwartungsgemäß bildete Hämocyanin in der SDS-PAGE eine schwache Bande bei 300 kDa.

Durch die Transkriptomanalyse ergaben sich drei verschiedene *PcAChBP*-Sequenzen, die untereinander eine Aminosäureidentität zwischen 45% und 48% aufweisen (siehe

D Diskussion

Tab. 9). Die Sequenzidentität zu den beiden *Bg*AChBPs lag zwischen 33% und 51% (Abb. 75). Auch zu den anderen aufgeführten AChBPs bestand eine Aminosäureidentität von mindestens 33%. Im berechneten Stammbaum verschiedener nah verwandter AChBPs aus Gastropoden bilden die AChBPs aus *P. corneus* und *B. glabrata* einen gut unterstützten gemeinsamen Ast. Innerhalb dieses Astes sind die Unterstützungswerte jedoch deutlich geringer. Im gezeigten Stammbaum sind die *Pc*AChBPs nicht paarweise mit *Bg*AChBP1 und *Bg*AChBP2 verwandt (Abb. 76).

	PcAChBP1	PcAChBP2	PcAChBP3 ...	BgAChBP1	BgAChBP2	BtAChBP	LsAChBP1	AcAChBP
PcAChBP1		46%	48%	41%	33%	34%	34%	33%
PcAChBP2	46%		45%	51%	48%	42%	40%	34%
PcAChBP3 (unvoll)	48%	45%		44%	35%	35%	36%	33%
BgAChBP1	41%	51%	44%		51%	35%	34%	31%
BgAChBP2	33%	48%	35%	51%		35%	32%	29%
BtAChBP	34%	42%	35%	35%	35%		43%	33%
LsAChBP1	34%	40%	36%	34%	32%	43%		33%
AcAChBP	33%	34%	33%	31%	29%	33%	33%	

Abb. 75: Distanzmatrix zwischen verschiedenen AChBPs. *textitAc*, *Aplysia californica* (Genebank: AAL37251) wurde als Außengruppe gesetzt; *Bg*, *Biomphalaria glabrata* (Genebank: JQ814368, JQ814367); *Bt*, *Bulinus truncatus* (PDB-ID: 2BJ0); *Ls*, *Lymnaea stagnalis* (Genebank: AAK64377); *Pc*, *Planorbarius corneus*.

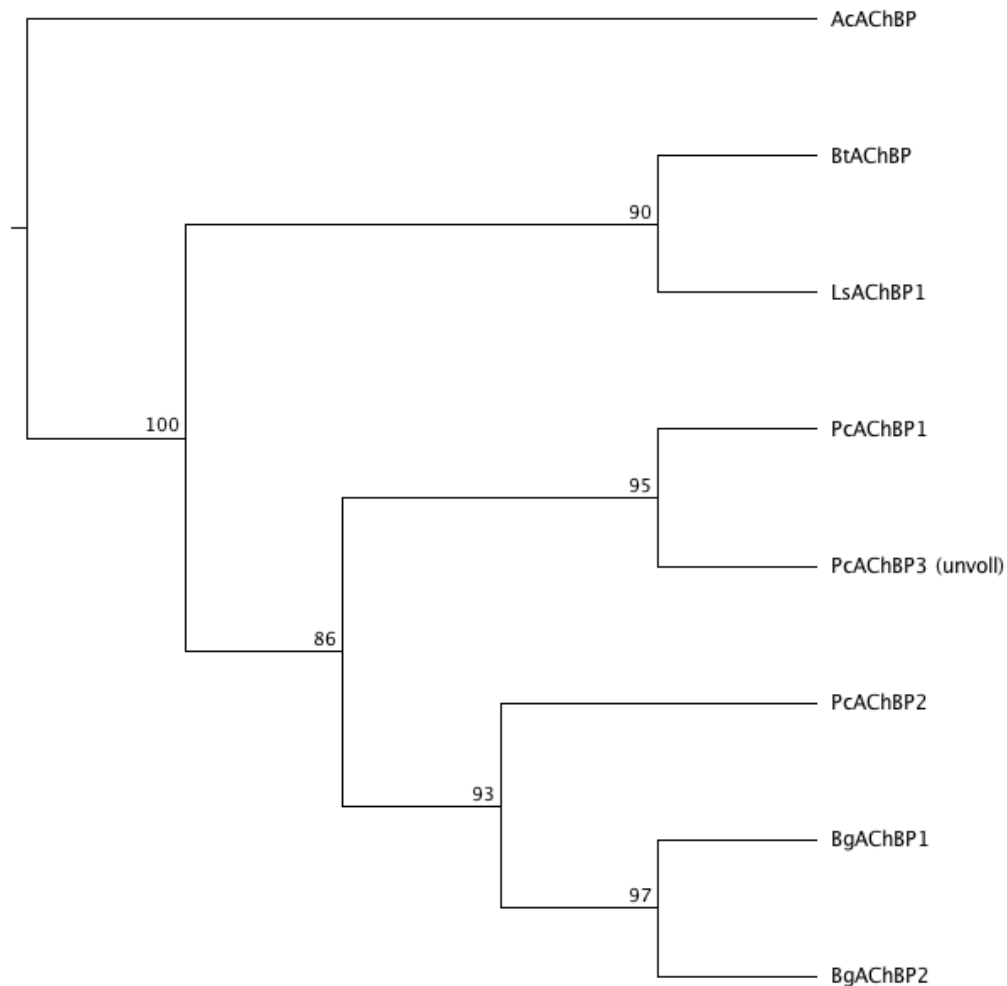


Abb. 76: Stammbaum auf Grundlage der Distanzmatrix verschiedener AChBPs. Verglichen wurden die AChBPs verschiedener Gastropoden. Der *consensus*-Stammbaum basiert auf 100000 Stammbäumen und wurde mit der *neighbor-joining*-Methode und Geneious 9 erstellt. Angegeben sind die *bootstrap*-Werte der einzelnen Verzweigungen. *textitAc*, *Aplysia californica* (Genebank: AAL37251) wurde als Außengruppe gesetzt; *Bg*, *Biomphalaria glabrata* (Genebank: JQ814368, JQ814367); *Bt*, *Bulinus truncatus* (PDB-ID: 2BJ0); *Ls*, *Lymnaea stagnalis* (Genebank: AAK64377); *Pc*, *Planorbarius corneus*.

Bei *PcAChBP1* handelt es sich um ein 212 Aminosäuren langes Protein mit vier Cysteinen, die im Alignment an den konservierten Positionen zu liegen kamen. *PcAChBP2* ist 204 Aminosäuren lang und verfügt, genau wie *BgAChBP2*, über insgesamt fünf Cysteine. Damit wäre *PcAChBP2* potentiell in der Lage Dimere zu bilden. Das zusätzliche freie Cystein liegt im Alignment an der gleichen Stelle wie bei *BgAChBP2* (Abb. 77, schwarz umrandet). *PcAChBP3* ist mindestens 195 Aminosäuren lang. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um das vollständige Protein, da innerhalb des vorliegenden Datensatzes weder das typische Motiv des Y-X-C-C-X-Y noch ein Stopcodon gefunden wurden. Das *PcAChBP3*-Fragment besitzt drei Cysteine, von denen zwei an konservierten Positionen liegen (Abb. 77, blau umrandet). Die Validierung aller drei Sequenzen durch Sequenzierung steht noch aus.

8 Untersuchung der Hämolympheproteine aus *Planorbarius corneus*

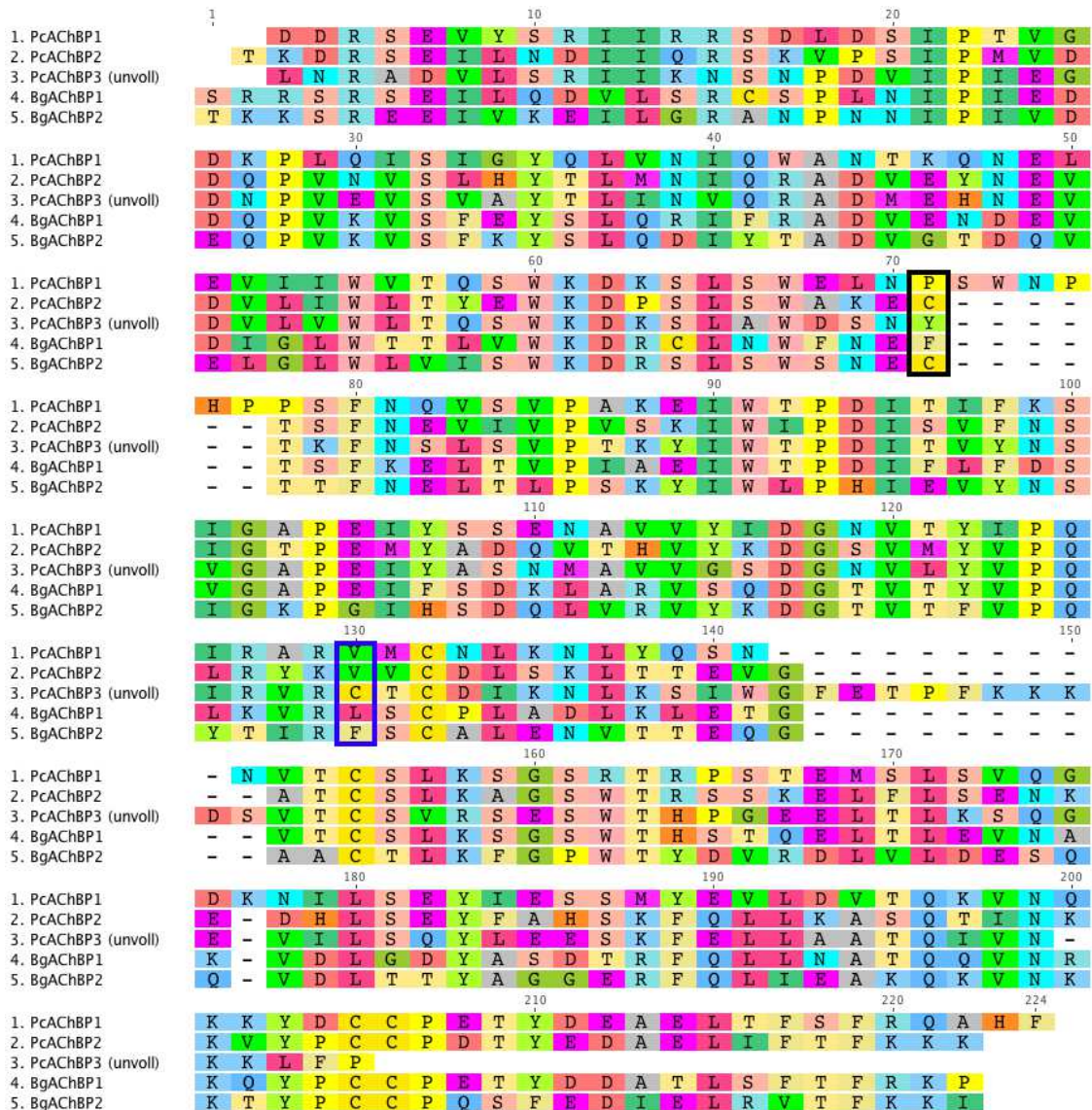


Abb. 77: Sequenzalignement der drei PcAChBP mit verwandten AChBPs. *Ac*, *Aplysia californica* (Genebank: AAL37251); *Bg*, *Biomphalaria glabrata* (Genebank: JQ814368, JQ814367); *Bt*, *Bulinus truncatus* (PDB-ID: 2BJ0); *Ls*, *Lymnaea stagnalis* (Genebank: AAK64377); *Pc*, *Planorbarius corneus*. Das freie Cystein in PcAChBP2 und BgAChBP2 ist schwarz umrandet, das freie Cystein in PcAChBP3 blau.

Für alle drei *PcAChBPs* wurden Homologiemodelle berechnet. Dabei lag die Aminosäure-Insertion in *PcAChBP1* (in Abb. 77 von Position 72-77) an der Stelle, die im *BgAChBP1*-Dodekaeder die Kontaktstelle zwischen drei Pentameren bildet (Abb. 78A). Die Cysteine lagen im Homologiemodell so, dass sie an den konservierten Positionen Disulfidbrücken bilden könnten. In *PcAChBP2* kam keine längere Insertion oder Deletion vor. Das freie Cystein findet sich im Homologiemodell an der potentiellen Kontaktstelle zwischen drei Pentameren und entsprach damit größtenteils dem Homologiemodell von *BgAChBP2* (Abb. 78B). Das Fragment *PcAChBP3* besitzt ebenfalls eine lange Aminosäureinsertion (im Alignment Abb. 77 von Position 143-151). Diese bildete im Homologiemodell eine lange Schleife (Abb. 78C). Das unpaare Cystein lag im Homologiemodell innerhalb des Proteins in β -Faltblatt 6, in der Nähe der Disulfidbrücke C124 \leftrightarrow C147.

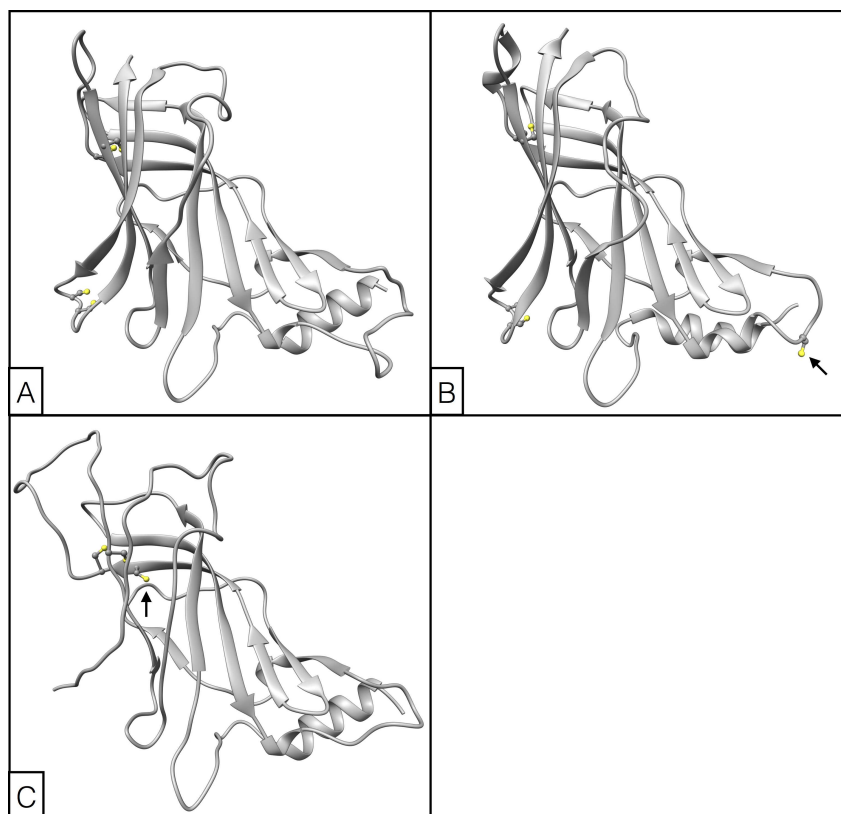


Abb. 78: Homologiemodelle der drei *PcAChBP*. Als Vorlage für die Homologiemodelle wurde die Kristallstruktur mit der jeweils höchsten Übereinstimmung gewählt. Bei *PcAChBP1* und *PcAChBP3* handelte es sich hierbei um *LsAChBP* (PDB-ID: 3WTJ), bei *PcAChBP2* um *BrAChBP* (PDB-ID: 2BJ0). Cysteine in gelb dargestellt.

Die Pentamere, die in den EM-Aufnahmen in den Fraktionen II, III und IV zu sehen sind (siehe Abb. 61), reagieren mit anti-*BgAChBP2*-Antikörper, wobei dieses Protein über keine Disulfidbrücke verfügt (siehe Abb. 63B). Ein Protein dieser Größe ist untypisch für AChBP, welches in der Regel als Monomer eine Molekülmasse zwischen etwa 23 und 30 kDa hat (z.B. Smit et al. 2001; Hansen et al. 2004; Celie et al. 2005; Saur et al. 2012). Die Molekülmasse kann durch Glykosilierungen jedoch variieren. In den Fraktionen III, IV und V reagierte anti-*BgAChBP1*-Antikörper mit einer Proteinbande bei 30 kDa (siehe Abb. 63A). Der größte Teil dieses Materials bildete unter nicht reduzierenden Bedingungen Dimere. In den EM-Aufnahmen waren in diesen Fraktionen AChBP-Dodekaeder und Hämocyanin zu sehen (siehe Abb. 61). Demnach werden die *PcAChBP*-Dodekaeder von *PcAChBP2* mit seinem unpaaren Cystein gebildet. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen bei *B. glabrata*, bei denen die Dodekaeder von *BgAChBP1* gebildet werden (siehe Diskussion 1). Auch anti-*BgAChBP2*-Antikörper reagierte mit Protein der 30 kDa-Bande, jedoch nur in Gipfel V (siehe Abb. 63B). Dieses Protein bildete unter nicht reduzierenden Bedingungen ebenfalls Dimere. Überraschend war, dass die SDS-PAGE nicht auf einen derartigen Unterschied zwischen Gipfel IV und V hindeute, da sich beide Gipfel im Bandenmuster kaum unterschieden (siehe Abb. 62). Aus EM-Aufnahmen des negativ-kontrastierten AChBP-Dodekaeders wurden etwa 3800 Partikeln selektiert, aus denen eine 3D-Rekonstruktion berechnet wurde. Diese Dichtekarte zeigte bei einer Auflösung von etwa 18 Å und ohne Vorgabe einer Symmetrie einen deutlichen Dodekaeder. Die Vorgabe einer ikosaedrischen Symmetrie brachte keine Verbesserung der Auflösung. Dennoch war es selbst bei dieser Auflösung problemlos möglich, das Homologiemodell des *BgAChBP1* in die erstellte Dichtekarte einzupassen. Um eine höhere Auflösung zu erzielen und mehr Details in der Struktur erkennen zu können, ist Kryo-Elektronenmikroskopie erforderlich.

Zwischen *PcAChBP1* und dem dodekaeder-bildenden *BgAChBP1* waren einige Aminosäurepositionen identisch oder isofunktionell, die mit der Stabilität und der Bildung dieser Quartärstruktur in Verbindung gebracht wurden (Saur et al., 2012). An den Positionen 3, 25, 26 und 70 tragen *BgAChBP1* und *PcAChBP2* identische oder isofunktionale Aminosäuren (Tab. 12).

Tab. 12: Vergleich der Aminosäuren die bei *BgAChBP1* möglicherweise an der Bildung der Dodekaeder beteiligt sind. Identische (dunkelgrau) und isofunktionelle (dunkelgrau) Aminosäuren mit *BgAChBP1*.

Position in <i>BgAChBP1</i>	<i>BgAChBP1</i>	<i>BgAChBP2</i>	<i>PcAChBP1</i>	<i>PcAChBP2</i>	<i>PcAChBP3</i>
2	R	K	-	T	-
3	R	K	D	K	L
16	C	A	S	S	S
24	E	V	V	V	E
25	D	D	G	D	G
26	D	E	D	D	D
63	R	R	K	P	K
64	C	S	S	S	S
70	E	E	N	E	N
71	F	C	P	C	-

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich *BgAChBP2* und *PcAChBP2* entsprechen und auch beide in der Lage sind Dodekaeder zu bilden. Das Fehlen von Dodekaedern bei rekombinant hergestelltem *BgAChBP2* könnte auf nicht ausgebildete Disulfidbrücken zurückzuführen sein (vgl. Diskussion 6). Evolutionär gesehen könnte es erst später zur Entwicklung von *BgAChBP1* gekommen sein. Erst in diesem Verlauf ging die Disulfidbrücke verloren und an dessen Stelle trat der hydrophobe Cluster von Phenylalanin. Zusätzlich bildete sich die exklusive Disulfidbrücke C16↔C64. *PcAChBP1* hingegen scheint nur Pentamere zu bilden. Von *PcAChBP3* konnte weder die gesamte Sequenz noch die Struktur gefunden werden.

E Zusammenfassung

Acetylcholin-Bindeprotein (AChBP) kommt in der Hämolymphe von Mollusken und Anneliden vor. Es ist ein ringförmiges Pentamer aus fünf Untereinheiten mit je 25 kDa. AChBP ist strukturell und funktionell homolog zur extrazellulären ligandenbindenden Domäne des nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR). Dieser wird aufgrund seiner physiologischen und medizinisch-pharmakologischen Bedeutung intensiv untersucht. Im Gegensatz zum Membranprotein AChR ist das Hämolympheprotein AChBP wasserlöslich. Aufgrund dieser Eigenschaft dient AChBP als äußerst hilfreiches Modell bei der Erforschung der Struktur und Funktion des AChR. Die tropische Süßwasserschnecke *Biomphalaria glabrata* (Familie Planorbidae) besitzt als Besonderheit ein AChBP, das 25 nm große reguläre Dodekaeder aus zwölf Pentameren bildet. Damit ist es der 3D-Elektronenmikroskopie sehr gut zugänglich. 2012 publizierte unsere Arbeitsgruppe die Aminosäuresequenz, Quartärstruktur und rekombinante Expression von zwei Isoformen des *B. glabrata* AChBP, genannt *BgAChBP1* und *BgAChBP2*. Rekombinantes *BgAChBP1* bildete Dodekaeder, rekombinantes *BgAChBP2* dagegen lediglich die üblichen Pentamere und eventuell Dipentamere.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten in erster Linie genauere Strukturdaten ermittelt werden. Von rekombinanten, in reinem Wasser gelösten *BgAChBP1*-Dodekaedern wurde mittels 3D-Elektronenmikroskopie eine 3D-Rekonstruktion mit einer Auflösung von 3,5 Å erstellt. Diese sehr hoch aufgelöste 3D-Rekonstruktion wurde einer genauen topologischen Analyse unterzogen. Die Bedeutung bestimmter Aminosäuren für die Kontakte zwischen den Pentameren wurde mittels gerichteter Mutagenese und anschließender Elektronenmikroskopie untersucht. Zur Existenz eines Dipentamers beim *BgAChBP2* wurden weitere Hinweise gesammelt; dieser Aspekt konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden. Darüber hinaus wurden Hinweise gesammelt, dass rekombinantes *BgAChBP1* amorphes Calciumcarbonat bindet und somit wahrscheinlich an der Bildung des Schneckenhauses beteiligt ist. Rekombinantes *BgAChBP2* scheint amorphes Calciumcarbonat in weit geringerem Umfang zu binden. Doch auch zu diesem Aspekt sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Bei der einheimischen planorbiden Schnecke *Planorbarius corneus* wurden AChBP-Dodekaeder in der Hämolymphe nachgewiesen und biochemisch angereichert. Eine Transkriptomanalyse lieferte drei AChBP-Sequenzen, von denen zwei vollständig und die dritte fast vollständig waren. Wie der molekulare Stammbaum und biochemische Analysen zeigten, wurde in *P. corneus* kein zum *BgAChBP1* orthologes Protein gefunden. Die Dodekaeder gehen hier ganz offensichtlich auf ein AChBP zurück, das dem *BgAChBP2* ähnlich ist. Das legt den Verdacht nahe, dass in der Hämolymphe von *B. glabrata* das *BgAChBP2* ebenfalls Dodekaeder bildet und dass lediglich das rekombinant exprimierte *BgAChBP2* dazu (bisher) nicht in der Lage ist. Dies könnte an einer bestimmten Disulfidbrücke liegen, die sich beim *BgAChBP2* zwischen zwei Pentameren ausbilden müsste.

Literaturverzeichnis

- Aebi, U. and Pollard, T. D. (1987). A glow discharge unit to render electron microscope grids and other surfaces hydrophilic. *Microsc. Res. Tech.*, 7(1):29–33.
- Albrecht, C., Kuhn, K., and Streit, B. (2007). A molecular phylogeny of Planorboidea (Gastropoda, Pulmonata): insights from enhanced taxon sampling. *Zool. Sci.*, 36:27–39.
- Arneric, S. P., Holladay, M., and Williams, M. (2007). Neuronal nicotinic receptors: a perspective on two decades of drug discovery research. *Biochem. Pharmacol.*, 74(8):1092–1101.
- Baker, M. L., Hryc, C. F., Zhang, Q., Wu, W., Jakana, J., Haase-Pettingell, C., Afonine, P. V., Adams, P. D., King, J. A., Jiang, W., and Chiu, W. (2013). Validated near-atomic resolution structure of bacteriophage epsilon15 derived from cryo-EM and modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(30):12301–12306.
- Banks, G., Kemenes, I., Schofield, M., O’Shea, M., and Korneev, S. a. (2009). Acetylcholine binding protein of mollusks is unlikely to act as a regulator of cholinergic neurotransmission at neurite-neurite synaptic sites in vivo. *FASEB J.*, 23(9):3030–3036.
- Bartesaghi, A., Merk, A., Banerjee, S., Matthies, D., Wu, X., Milne, J. L. S., and Subramaniam, S. (2015). 2.2 Å resolution cryo-EM structure of beta-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor. *Science*, 348(6239):1147–1151.
- Bourne, Y., Radic, Z., Araoz, R., Talley, T. T., Benoit, E., Servent, D., Taylor, P., Molgo, J., and Marchot, P. (2010). Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(13):6076–6081.
- Brejč, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A. B., and Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, 411(6835):269–276.
- Brenner, S. and Horne, R. W. (1959). A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 34:103–110.
- Burley, S. K. and Petsko, G. A. (1985). Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science*, 229(4708):23–28.
- Celie, P. H. N., Klaassen, R. V., van Rossum-Fikkert, S. E., van Elk, R., van Nierop, P., Smit, A. B., and Sixma, T. K. (2005). Crystal structure of acetylcholine-binding protein from *Bulinus truncatus* reveals the conserved structural scaffold and sites of variation in nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.*, 280(28):26457–26466.

- Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(7):2172–2175.
- Crowther, R. A., Amos, L. A., Finch, J. T., De Rosier, D. J., and Klug, A. (1970). Three dimensional reconstructions of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs. *Nature*, 226(5244):421–425.
- Downing, K. H. and Glaeser, R. M. (2008). Restoration of weak phase-contrast images recorded with a high degree of defocus: the "twin image" problem associated with CTF correction. *Ultramicroscopy*, 108(9):921–928.
- Drummond, A., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., and Duran, C. (2011). Geneiousv5.4.
- Dubochet, J. (2012). Cryo-EM – the first thirty years. *J. Microsc.*, 245(3):221–224.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J. J., Homo, J. C., Lepault, J., McDowell, A. W., and Schultz, P. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.*, 21(2):129–228.
- Dubochet, J. and McDowell, A. (1981). Vitrification of pure water for electron microscopy. *J. Microsc.*, 124(3):3–4.
- Fuschiotti, P., Schoehn, G., Fender, P., Fabry, C. M. S., Hewat, E. A., Chroboczek, J., Ruigrok, R. W. H., and Conway, J. F. (2006). Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. *J. Mol. Biol.*, 356(2):510–520.
- Glaeser, R. M. and Downing, K. H. (1992). Assessment of resolution in biological electron crystallography. *Ultramicroscopy*, 47(1-3):256–265.
- Goddard, T. D., Huang, C. C., and Ferrin, T. E. (2007). Visualizing density maps with UCSF Chimera. *J. Struct. Biol.*, 157(1):281–287.
- Grigorieff, N. (2007). FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures. *J. Struct. Biol.*, 157(1):117–125.
- Grimsley, G. R. and Pace, C. N. (2004). Spectrophotometric determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Protein. Sci.*, Chapter 3:3.1:3.1.1–3.1.9.
- Hansen, S. B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P., and Bourne, Y. (2005). Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J.*, 24(20):3635–3646.

- Hansen, S. B., Talley, T. T., Radic, Z., and Taylor, P. (2004). Structural and ligand recognition characteristics of an acetylcholine-binding protein from *Aplysia californica*. *J. Biol. Chem.*, 279(23):24197–24202.
- Harauz, G. and M, v. H. (1986). Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction. *Optik*, 78(4).
- Harris, J. R. (1991). Negative staining-carbon film technique: new cellular and molecular applications. *Microsc. Res. Tech.*, 18(3):269–276.
- Hartley, J. L., Temple, G. F., and Brasch, M. A. (2000). DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Res.*, 10(11):1788–1795.
- Henderson, R., Sali, A., Baker, M. L., Carragher, B., Devkota, B., Downing, K. H., Egelman, E. H., Feng, Z., Frank, J., Grigorieff, N., Jiang, W., Ludtke, S. J., Medalia, O., Penczek, P. A., Rosenthal, P. B., Rossmann, M. G., Schmid, M. F., Schroder, G. F., Steven, A. C., Stokes, D. L., Westbrook, J. D., Wriggers, W., Yang, H., Young, J., Berman, H. M., Chiu, W., Kleywegt, G. J., and Lawson, C. L. (2012). Outcome of the first electron microscopy validation task force meeting. *Structure*, 20(2):205–214.
- Herskovits, T. T. and Hamilton, M. G. (1990). The hemoglobin of the aquatic snail, *Planorbella duryi* (Wetherby). *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, 95(2):321–326.
- Herskovits, T. T. and Hamilton, M. G. (1994). The molecular weight and subunit organization of *Helisoma trivolvis* (Say) hemoglobin: light-scattering and scanning transmission electron microscopic studies. *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, 107(3):433–441.
- Huang, J., Wang, H., Cui, Y., Zhang, G., Zheng, G., Liu, S., Xie, L., and Zhang, R. (2009). Identification and comparison of amorphous calcium carbonate-binding protein and acetylcholine-binding protein in the abalone, *Haliotis discus hannai*. *J. Mar. Biotechnol.*, 11(5):596–607.
- Hucho, F. and Weise, C. (2001). Ligand-Gated Ion Channels. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40(17):3100–3116.
- Illan, E., Hammel, I., MM, D., and Daniel, E. (1986). Erythrocrucorin from the aquatic snail *Helisoma trivolvis*. Quaternary structure and arrangement of subunits.
- Jiang, W. and Ludtke, S. J. (2005). Electron cryomicroscopy of single particles at subnanometer resolution. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15(5):571–577.
- Jorgensen, A., Kristensen, T. K., and Stothard, J. R. (2004). An investigation of the "Ancyloplanorbidae" (Gastropoda, Pulmonata, Hygrophila): preliminary evidence from DNA sequence data. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 32(3):778–787.

- Kang, D., YS, G., Suh, M., and Kang, C. (2002). Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23(11).
- Karlin, A. (1993). Structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 3(3):299–309.
- Karlin, A. (2002). Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3(2):102–114.
- Kash, T. L., Jenkins, A., Kelley, J. C., Trudell, J. R., and Harrison, N. L. (2003). Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature*, 421(6920):272–275.
- Kastner, B., Fischer, N., Golas, M. M., Sander, B., Dube, P., Boehringer, D., Hartmuth, K., Deckert, J., Hauer, F., Wolf, E., Uchtenhagen, H., Urlaub, H., Herzog, F., Peters, J. M., Poerschke, D., Luhrmann, R., and Stark, H. (2008). GraFix: sample preparation for single-particle electron cryomicroscopy. *Nat. Methods*, 5(1):53–55.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., and Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatic*, 28(12):1647–1649.
- Knispel, R. W., Kofler, C., Boicu, M., Baumeister, W., and Nickell, S. (2012). Blotting protein complexes from native gels to electron microscopy grids. *Nat. Methods*, 9(2):182–184.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Bioph. Methods*, 10(3-4):203–209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lander, G. C., Stagg, S. M., Voss, N. R., Cheng, A., Fellmann, D., Pulokas, J., Yoshioka, C., Irving, C., Mulder, A., Lau, P.-W., Lyumkis, D., Potter, C. S., and Carragher, B. (2009). Appion: an integrated, database-driven pipeline to facilitate EM image processing. *J. Struct. Biol.*, 166(1):95–102.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.*, 58:913–949.

- Lanzarotti, E., Biekofsky, R. R., Estrin, D. A., Marti, M. A., and Turjanski, A. G. (2011). Aromatic-aromatic interactions in proteins: beyond the dimer. *J. Chem. Inf. Model.*, 51(7):1623–1633.
- Laurell, C. B. (1965). Antigen-Antibody crossed electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 10:358–361.
- Laurell, C. B. (1966). Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Anal. Biochem.*, 15(1):45–52.
- Lee, N., Francklyn, C., and Hamilton, E. P. (1987). Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(24):8814–8818.
- Lemos, Q. T. (1999). Contribution to the histology of *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 32(4):343–347.
- Leonard, S. and Bertrand, D. (2001). Neuronal nicotinic receptors: from structure to function. *Nicotine Tob. Res.*, 3(3):203–223.
- Lester, H. A., Dibas, M. I., Dahan, D. S., Leite, J. F., and Dougherty, D. A. (2004). Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends in neurosciences*, 27(6):329–336.
- Lieb, B., Dimitrova, K., Kang, H.-S., Braun, S., Gebauer, W., Martin, A., Hanelt, B., Saenz, S. A., Adema, C. M., and Markl, J. (2006). Red blood with blue-blood ancestry: intriguing structure of a snail hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(32):12011–12016.
- Ludtke, S. J., Baldwin, P. R., and Chiu, W. (1999). EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J. Struct. Biol.*, 128(1):82–97.
- Lyumkis, D., Brilot, A. F., Theobald, D. L., and Grigorieff, N. (2013). Likelihood-based classification of cryo-EM images using FREALIGN. *J. Struct. Biol.*, 183(3):377–388.
- Ma, Z., Huang, J., Sun, J., Wang, G., Li, C., Xie, L., and Zhang, R. (2007). A novel extrapallial fluid protein controls the morphology of nacre lamellae in the pearl oyster, *Pinctada fucata*. *J. Biol. Chem.*, 282(32):23253–23263.
- Markl, J. (2013). Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochim. Biophys. Acta*, 1834(9):1840–1852.
- McCormack, T., Petrovich, R. M., Mercier, K. a., DeRose, E. F., Cuneo, M. J., Williams, J., Johnson, K. L., Lamb, P. W., London, R. E., and Yakel, J. L. (2010). Identification and functional characterization of a novel acetylcholine-binding protein from the marine annelid *Capitella teleta*. *Biochemistry*, 49(10):2279–2287.

- Miller, P. S. and Smart, T. G. (2010). Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 31(4):161–174.
- Mindell, J. A. and Grigorieff, N. (2003). Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, 142(3):334–347.
- Möller, V. (2012). Charakterisierung und Expression zweier multimerer Hämolympheproteine der Schnecke *Biomphalaria glabrata*. Dissertation, JGU Mainz, Germany.
- Niesen, F. H., Berglund, H., and Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.*, 2(9):2212–2221.
- Ohi, M., Li, Y., Cheng, Y., and Walz, T. (2004). Negative staining and image classification - powerful tools in modern electron microscopy. *Biol. Proced. Online*, 6:23–34.
- Orlova, E. V., Dube, P., Harris, J. R., Beckman, E., Zemlin, F., Markl, J., and van Heel, M. (1997). Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *J. Mol. Biol.*, 271(3):417–437.
- Penczek, P., Radermacher, M., and Frank, J. (1992). Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice. *Ultramicroscopy*, 40(1):33–53.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13):1605–1612.
- Rosenthal, P. B. and Henderson, R. (2003). Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.*, 333(4):721–745.
- Salgueiro, S., Potts, S., McIlgorm, E. A., Ansell, K. H., Hemberger, J., and Gussow, D. (1999). A protein from the salivary glands of the giant Amazon leech with high sequence homology to a nicotinic acetylcholine receptor subunit. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.*, 54(11):963–971.
- Saur, M. (2013). Three-dimensional electron microscopy of five extracellular protein complexes. Dissertation, JGU Mainz, Germany.
- Saur, M., Moeller, V., Kapetanopoulos, K., Braukmann, S., Gebauer, W., Tenzer, S., and Markl, J. (2012). Acetylcholine-binding protein in the hemolymph of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata* is a pentagonal dodecahedron (60 subunits). *PLOS ONE*, 7(8):e43685.

- Schatz, M. (1992). Invariante Klassifizierung elektronenmikroskopischer Aufnahmen von eiseingebetteten biologischen Makromolekülen. Dissertation, Freie Universität, Berlin.
- Scheres, S. H. W. (2012). RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J. Struct. Biol.*, 180(3):519–530.
- Scheres, S. H. W. (2015). Semi-automated selection of cryo-EM particles in RELION-1.3. *J. Struct. Biol.*, 189(2):114–122.
- Shahsavari, A., Gajhedre, M., Kastrop, J. S., and Balle, T. (2016). Structural Studies of Nicotinic Acetylcholine Receptors: Using Acetylcholine-Binding Protein as a Structural Surrogate. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*
- Sine, S. M. and Engel, A. G. (2006). Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*, 440(7083):448–455.
- Sixma, T. K. and Smit, A. 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. *Annu. Rev. Biophys.*, 32(4):311–334.
- Smit, A. B., Syed, N. I., Schaap, D., Van Minnen, J., Klumperman, J., Kits, K. S., Lodder, H., Van Der Schors, R. C., Van Elk, R., Sorgedrager, B., Brejc, K., Sixma, T. K., and Geraerts, W. P. (2001). A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature*, 411(6835):261–268.
- Smithers, S. R. and Terry, R. J. (1965). The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*, 55(4):695–700.
- Stark, H. (2010). GraFix: stabilization of fragile macromolecular complexes for single particle cryo-EM. *Methods Enzymol.*, 481:109–126.
- Su, J., Liang, X., Zhou, Q., Zhang, G., Wang, H., Xie, L., and Zhang, R. (2013). Structural characterization of amorphous calcium carbonate-binding protein: an insight into the mechanism of amorphous calcium carbonate formation. *Biochem. J.*, 453(2):179–186.
- Terwilliger, N. B., Terwilliger, R. C., and Schabtach, E. (1976). The quaternary structure of a molluscan (*Helisoma trivolvis*) extracellular hemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, 453(1):101–110.
- Thon, F. (1966). Zur Defokussierungsabhängigkeit des Phasenkontrastes bei der elektronenmikroskopischen Abbildung. *Z. Naturforschg.*, 4(21):476–478.

- Torkkeli, P. H., Liu, H., and French, A. S. (2015). Transcriptome analysis of the central and peripheral nervous systems of the spider *Cupiennius salei* reveals multiple putative cys-loop ligand gated ion channel subunits and an acetylcholine binding protein. *PLOS ONE*, 10(9).
- Tzartos, S. J., Barkas, T., Cung, M. T., Kordossi, A., Loutrari, H., Marraud, M., Papadouli, I., Sakarellos, C., Sophianos, D., and Tsikaris, V. (1991). The main immunogenic region of the acetylcholine receptor. Structure and role in myasthenia gravis. *Autoimmunity*, 8(4):259–270.
- Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 346(4):967–989.
- Unwin, N., Miyazawa, A., Li, J., and Fujiyoshi, Y. (2002). Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits. *J. Mol. Biol.*, 319(5):1165–1176.
- van Heel, M. (1984). Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy*, 13(1-2):165–183.
- van Heel, M. (1987). Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction. *Ultramicroscopy*, 21(2):111–123.
- van Heel, M., Harauz, G., Orlova, E. V., Schmidt, R., and Schatz, M. (1996). A new generation of the IMAGIC image processing system. *J. Struct. Biol.*, 116(1):17–24.
- van Heel, M. and Keegstra, W. (1981). IMAGIC: A fast, flexible and friendly image analysis software system. *Ultramicroscopy*, 7(2):113–129.
- Weeke, B., Kroll, J., and Axelsen, N. H. (1973). A Manual of quantitative immunoelectrophoresis. Methods and applications. *Scand. J. Immunol. Suppl.*, 1:37–46.
- Wilbur, K. and Yonge, C. (1966). Physiology of Mollusca. Volume II. *Academic Press*.
- Wood, E. J. and Mosby, L. J. (1975). Physicochemical properties of *Planorbis corneus* erythrocrucorin. *Biochem. J.*, 149(2):437–445.
- Wu, J. and Filutowicz, M. (1999). Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. *Acta Biochim. Pol.*, 46(3):591–599.
- Zhou, Z. H. (2008). Towards atomic resolution structural determination by single-particle cryo-electron microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18(2):218–228.

Zhu, J., Penczek, P. A., Schroder, R., and Frank, J. (1997). Three-dimensional reconstruction with contrast transfer function correction from energy-filtered cryoelectron micrographs: procedure and application to the 70S *Escherichia coli* ribosome. *J. Struct. Biol.*, 118(3):197–219.

Danksagung

Ich danke...

... Herrn Prof. Dr. Jürgen Markl für die Bereitstellung des Themas sowie des Laborplatzes, die bereichernden Diskussionen, die kritische Durchsicht und Kommentierung meines Manuskripts

... Herrn Prof. Dr. Walter Stöcker für die Übernahme der zweiten Berichterstattung meiner Arbeit

... Herrn Prof. Dr. Bernhard Lieb für die Hilfe bei der Präparation der Gesamt-RNA und die Einführung in die Transkriptomanalyse

... [REDACTED] für die Einarbeitung in das Thema und die vielen kleinen Tipps, die die Laborarbeit einfacher gestalteten

... Dr. Aaron Gehl aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Tremel für die Synthese von amorphem Calciumcarbont

... Dr. Ashwin Chari, Dr. David Haselbach und Prof. Dr. Holger Stark vom Institut für Biochemie des Max-Planck Institutes Göttingen für Optimierung der Puffer bei *BgAChBP1* und die Aufnahme der Kryo-EM-Aufnahmen

... Dr. Frank Depoix für die Einweisung am EM und die vielen wertvollen Tipps

... Dr. Wolfgang Gebauer für die geduldigen Antworten bei allen Fragen rund um Zweidimensionale Immunelektrophorese und Gelfiltration

... Sandra Braukmann für die Erstellung des Homologiemodells von *BgAChBP1*

... Dr. Mario Dejung für die Hilfe bei allen Computerfragen

... Marlen Hutter für die Expression der *BgAChBP1*-Alanin-Mutanten

... Dr. Maria Kokkinopoulou, Martin Haugwitz, Dr. Michael Saur, Dr. Philipp Arnold und der gesamten AG Markl für die vielen interessanten Gespräche und Diskussionen und das allgemein gute Arbeitsklima

... Alex für die Durchsicht des Manuskripts

... und Vanessa für ihre stetige Unterstützung und Geduld.

Erklärung und Copyright

Erklärung

Ich versichere hiermit die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt zu haben.

Mainz, den 21. November 2016

Kristiane Ann Kathrin Rusitzka

Copyright

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

Abbildungsverzeichnis

1	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor (nAChR) und Acetylcholin-Bindeprotein (AChBP)	3
2	Homologiemodell des <i>BgAChBP1</i>	4
3	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders	7
4	<i>Biomphalaria glabrata</i>	8
5	<i>Planorbarius corneus</i>	9
6	Schematische Zeichnung des Agarosegels nach Dpn1-Verdau	17
7	Elutionsprofil der Anionenaustausch-Chromatographie der Hämolympheproteine aus <i>B. glabrata</i>	50
8	EM-Aufnahmen einzelner Gipfel der Anionenaustausch-Chromatographie <i>B. glabrata</i>	52
9	SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen einzelner Fraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie	53
10	Western-Blots mit Hämolympheproteinen aus <i>B. glabrata</i> und Anti- <i>BgAChBP1</i> - und Anti- <i>BgAChBP2</i> -Antikörper	55
11	2D-Klassensummen des unbekanntes Hämolympheproteins	56
12	3D-Rekonstruktionen des <i>multirefinements</i> des unbekanntes Hämolympheproteins	57
13	SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression von <i>BgAChBP1</i>	58
14	SDS-PAGE zur Überprüfung der Aufreinigung von <i>BgAChBP1</i>	59
15	EM-Aufnahmen des rekombinanten <i>BgAChBP1</i> mit und ohne His-Tag	59
16	Trennung von <i>BgAChBP1</i> -Pentameren und Dodekaedern über Größenausschluss-Chromatographie	60
17	EM-Aufnahmen des rekombinanten <i>BgAChBP1</i> mit und ohne His-Tag in optimiertem Puffer	61
18	SDS-PAGE zur Überprüfung der Expression von <i>BgAChBP2</i>	62
19	SDS-PAGE zur Überprüfung der Aufreinigung von <i>BgAChBP2</i>	63
20	SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen von <i>BgAChBP2</i> nach Abspaltung des His-Tags	64
21	EM-Aufnahmen des rekombinanten <i>BgAChBP2</i> mit und ohne His-Tag	65
22	EM-Aufnahmen der rekombinanten <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeder in verschiedenen Puffern	67
23	2D-Klassensummen des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders	68
24	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders mit Relion	70
25	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders ohne Symmetrievorgabe	71
26	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders mit Frealign	72
27	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders aus zweitem Datensatz	73
28	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders mit eingepasster Untereinheit des pseudoatomaren Homologiemodells	74

29	Detailansicht des eingepassten pseudoatomaren Modells in die 3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders	75
30	2D-Klassensummen des <i>BgAChBP2</i> -Dipentamers	76
31	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP2</i> -Dipentamers	77
32	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP2</i> -Dipentamers mit eingepasstem Homologiemodell	78
33	2D-Klassensummen des <i>BgAChBP1</i> -Dipentamers mit <i>His-Tag</i>	80
34	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP1</i> -Dipentamers mit <i>His-Tag</i>	80
35	3D-Rekonstruktion des <i>BgAChBP1</i> -Dipentamers mit <i>His-Tag</i> mit eingepasstem Homologiemodell	81
36	Bindungstest von amorphem Calciumcarbonat mit <i>BgAChBP1</i>	83
37	Bindungstest von amorphem Calciumcarbonat mit <i>BgAChBP1</i>	84
38	Bindungstest von amorphem Calciumcarbonat an <i>BgAChBP2</i>	85
39	Übersicht über relevante Aminosäuren für die Mutagenese	86
40	Postulierte Salzbrücke R2↔D26	87
41	EM-Aufnahmen von <i>BgAChBP1</i> -R2G und R2A	88
42	Postulierte Salzbrücke R3↔E70	89
43	EM-Aufnahmen von <i>BgAChBP1</i> -R3G und R3A	90
44	Disulfidbrücke C16↔C64	91
45	EM-Aufnahmen von <i>BgAChBP1</i> -C16/C64G und C16/C64A	92
46	Mögliche Kontaktstellen der Aminosäure E24	93
47	EM-Aufnahmen von <i>BgAChBP1</i> -E24A	94
48	Postulierte Salzbrücke D25↔R63	94
49	EM-Aufnahmen von <i>BgAChBP1</i> -R63A	95
50	EM-Aufnahmen der Mutanten E70G und E70A	96
51	Aromatisches Trimer aus F71	97
52	EM-Aufnahmen von <i>BgAChBP1</i> -F71G und F71A	99
53	Position der Aminosäure C71 in <i>BgAChBP2</i>	100
54	EM-Aufnahmen von <i>BgAChBP2</i> -C71F	101
55	Zweidimensionale Immunelektrophoresen mit rekombinantem <i>BgAChBP</i>	102
56	Zweidimensionale Immunelektrophoresen mit rekombinantem <i>BgAChBP</i>	103
57	Zweidimensionale Immunelektrophoresen mit <i>BgAChBP</i>	104
58	<i>Crossed-line</i> -Immunoelktrophoresen des <i>BgAChBP</i>	105
59	EM-Aufnahme der Hämolympheproteine von <i>P. corneus</i>	106
60	Elutionsprofil der Anionenaustausch-Chromatographie der Hämolymphe aus <i>P. corneus</i>	107
61	EM-Aufnahmen verschiedener Gipfel der Anionenaustausch-Chromatographie	109
62	SDS-PAGE der einzelnen Gipfel aus der Anionenaustausch-Chromatographie	110
63	Western-Blots mit Hämolympheproteinen aus <i>P. corneus</i>	112

64	Zweidimensionale Immunelektrophorese der Hämolympheproteine aus <i>P. corneus</i>	114
65	Aminosäuresequenz von <i>PcAChBP1</i> , <i>PcAChBP2</i> und <i>PcAChBP3</i>	116
66	2D-Klassensummen des <i>PcAChBP</i> -Dodekaeders	118
67	3D-Rekonstruktion des <i>PcAChBP</i> -Dodekaeders	118
68	Einpassen eines pseudoatomaren Homologiemodells in die 18 Å-Rekonstruktion des <i>PcAChBP</i> -Dodekaeders	119
69	Masse in der 3D-Rekonstruktion an der Kontaktstelle zweier Pentamere	124
70	Vermutete Kontaktstellen zwischen den Pentameren im neuen Homologiemodell des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders	125
71	Mögliche Salzbrücke R3↔E70 innerhalb einer Untereinheit	127
72	Distanzen zwischen Aminosäuren an der Kontaktstelle zwischen zwei Pentameren	128
73	Kontaktstelle dreier Pentamere im <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeder	130
74	Vergleich eines simulierten Dipentamers mit den 3D-Rekonstruktionen von <i>BgAChBP2</i> und <i>BgAChBP1</i> mit <i>His-Tag</i>	133
75	Distanzmatrix zwischen verschiedenen AChBPs.	136
76	Stammbaum auf Grundlage der Distanzmatrix verschiedener AChBPs.	137
77	Sequenzalignment der drei <i>PcAChBP</i> mit verwandten AChBPs	139
78	Homologiemodelle der drei <i>PcAChBP</i>	140
79	Agarosegel zur PCR Überprüfung der <i>BgAChBP1</i> -R2G Mutante	171
80	SDS-PAGE von <i>BgAChBP1</i> -E70G	172
81	SDS-PAGE von <i>BgAChBP2</i> -C71F	173

Tabellenverzeichnis

4	Übersicht über Transformation verschiedener Bakterienstämme.	20
5	Datensatz aus negativ kontrastierten Partikeln des unbekanntes Proteins (Protein X) aus <i>B. glabrata</i>	56
6	Kryo-Datensatz des <i>BgAChBP1</i> -Dodekaeders	67
7	Datensatz aus negativ kontrastierten Partikeln des <i>BgAChBP2</i> -Dipentamers	76
8	Datensatz aus negativ kontrastierten Partikeln des <i>His-Tag</i> -induzierten <i>BgAChBP1</i> -Dipentamers	79
9	Sequenzidentität auf Aminosäureebene der <i>PcAChBP</i>	117
10	Datensatz aus negativ kontrastierten Partikeln des <i>PcAChBP</i> -Dodekaeders	117
11	Übersicht über die Ergebnisse aller Mutationen bei <i>BgAChBP1</i>	126
12	Vergleich der Aminosäuren die bei <i>BgAChBP1</i> möglicherweise an der Bildung der Dodekaeder beteiligt sind	142

Anhang

1 Verwendete Puffer und Lösungen

1.1 Mikrobiologische Methoden

Nährmedien und Agarplatten

LB-Medium (pro Liter)	10 g NaCl 10 g Trypton 5 g Hefeextrakt pH 7,0
LB-Agar (pro Liter)	20 g Agar-Agar pro Liter LB-Medium
SOC-Medium (pro Liter)	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 2,5 mL 1 M KCl 10 mL 1 M MgCl ₂ 20 mL 1 M Glukose pH 7,0
Ampicillin Lösung	100 µg/mL Ampicillin
Kanamycin Lösung	50 µg/mL Kanamycin
TSS-Medium	85 % LB-Medium 10 % PEG (wt/vol, MW 6000) 5 % DMSO (vol/vol) 50 mM MgCl ₂ pH 6,5

1.2 Molekularbiologische Methoden

DNA-Gelelektrophorese

1 x TBE Puffer	0,9 M Tris/Cl 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA
10 x Probenpuffer	10 % Glycerin 0,4 % Bromphenolblau

Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/mL Ethidiumbromid
Marker	GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, St. Leon-Roth)

1.3 Proteinbiochemische Methoden

Anionenaustausch-Chromatographie

Puffer A 50 mM Tris
5 mM CaCl₂
5 mM MgCl₂
pH 7,4

Puffer B 50 mM Tris
5 mM CaCl₂
5 mM MgCl₂
1 M NaCl
pH 7,4

Rekombinante Expression von AChBP

L-Arabinose Lösung 20% L-Arabinose

Lysis Puffer 3 mM KH₂PO₄
47 mM K₂HPO₄
0,4 M NaCl
0,1 M KCl
1,4 M Glycerin
0,2 M Triton X 100
10 mM Imidazol
pH 7,8

Lysozym Lösung 1 g Lysozym (5%)
19 mL 10 mM Tris
pH 7,5

Bindepuffer/ Waschpuffer für Ni-NTA Säule 20 mM Na₂HPO₄
0,5 M NaCl
20 mM Imidazol

	8 M Harnstoff 1 mM β -Mercaptoethanol pH 7,4
Elutionspuffer für Ni-NTA Säule	20 mM Na_2HPO_4 0,5 M NaCl 0,5 M Imidazol 8 M Harnstoff 1 mM β -Mercaptoethanol pH 7,4
Faltungspuffer	0,1 M Tris 0,5 M L-Arginin 0,9 mM ox. Glutathion 2 mM EDTA pH 8,0
Dialyse Puffer (Tris-Puffer)	20 mM Tris/HCl pH 7,5

Bindungstest mit Amorphem Calciumcarbonat

Tris/HCl-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5
EDTA-Lösung	0,5 M EDTA

Zweidimensionale Immunelektrophorese

Immunoelktroden-Puffer (5 x)	19 mM Na-Diethylbarbiturat 0,1 M Diethylbarbitursäure pH 8,6
1 % Agarosegel	1 % (w/v) Agarose M (Amersham Pharmacia, Freiburg) in 1 x Elektrodenpuffer
Waschlösung	0,6 % NaCl
Immunelektrophorese Färbelösung	0,5 % Coomassie G250 40 % Ethanol 99 % 10 % Essigsäure

Immunelektrophorese Entfärbelösung 40 % Isopropanol
10 % Essigsäure

Western-Blot

Marker	MagicMark XP (Invitrogen, Karlsruhe)
Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM Glycin pH 8,0
Anodenpuffer	300 mM Tris pH 10,4
1x TBS-Puffer	10 mM Tris 150 mM NaCl pH 7,5
1x TBS-Tween-Triton-Puffer (TBS-T-Puffer)	20 mM Tris/ HCl (2,42 g/l) 500 mM NaCl (29,22 g/l) 0,05 % Tween (v/v 0,5 ml/l) 0,2 % Triton x-100 (v/v) 2 ml/l) pH 7,5
Blockierungspuffer für <i>BgAChBP1</i> - \ <i>BgAChBP2</i> -Antikörperpuffer	20 mL 1x TBS-Puffer, pH 7,5 10 % Magermilchpulver (MMP)
Blockierungspuffer für His-Antikörper	20 mL 1x TBS-Puffer, pH 7,5 3 % BSA
Anti- <i>BgAChBP1</i> - \ anti- <i>BgAChBP2</i> -Antikörper mit Magermilchpulver (MMP)	20 mL 1x TBS-T Puffer, pH 7,5 7,5 % MMP X μ L 1. Antikörper
Anti-His-Antikörperpuffer mit Rinderserumalbumin (BSA)	20 mL 1x TBS-T Puffer, pH 7,5 1 % BSA X μ L 1. Antikörper
Antikörperpuffer 2	20 mL 1x TBS-Puffer, pH 7,5

für <i>BgAChBP1</i> -\ <i>BgAChBP2</i> Antikörper	5 % MMP Y µL 2. Antikörper
Antikörperpuffer 2 für His-Antikörper	20 mL 1x TBS-Puffer, pH 7,5 7,5 % MMP Y µL 2. Antikörper

1.4 Polyacrylamidelektrophorese

Polyacrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe))	30 % Polyacrylamid 0,8 % Bisacrylamid
Polymerisationsstarter	10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Coomassie Färbelösung	0,1 % Coomassie R250 40 % Ethanol 99 % 7,5 % Essigsäure
Kolloidale Coomassie Färbelösung nach Kang et. al. (2 L)	0,4 g Coomassie G250 100 g Aluminiumsulfat-Hydrat 200 mL Ethanol 99 % 47 mL o-Phosphorsäure 1660 mL H ₂ O Milli-Q
Coomassie Entfärbelösung	20 % Isopropanol 7 % Essigsäure
Gelaufbewahrungslösung	7,5 % Essigsäure
Marker	ProSieve Quad Color Proteinmarker (Lonza, Rockland, USA)

SDS-PAGE

Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris 0,4 % SDS pH 6,8
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris

	0,4 % SDS pH 8,8
Elektrophorese-Laufpuffer	23 mM Tris 190 mM Glycin 0,2 % SDS pH 8,3
Tris/Stab Puffer (CaCl ₂ / MgCl ₂ erst nach pH Einstellung zugeben)	0,05 M Tris 5 mM CaCl ₂ 5 mM MgCl ₂ 0,15 M NaCl pH 7,4
1 x SDS-Probenpuffer (100 mL)	12,5 mL Tris (0,5 M Tris; pH 6,8) 10 ml Glycerin 2 mL β-Mercaptoethanol 0,1 g Bromphenolblau 2 g SDS pH 6,8 nicht reduzierend: ohne β-Mercaptoethanol
5 x SDS-Probenpuffer (12 mL)	4,6 mL Tris/Stab Puffer 2 mL Glycerin 400 μL β-Mercaptoethanol 0,1 g Bromphenolblau 4 mL 20% SDS nicht reduzierend: ohne β-Mercaptoethanol

Native PAGE

Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris pH 6,8
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris pH 8,8
Elektrophorese-Laufpuffer	23 mM Tris 190 mM Glycin pH 8,3
Tris/Stab Puffer	0,05 M Tris

(CaCl ₂ / MgCl ₂ erst nach pH Einstellung zugeben)	5 mM CaCl ₂ 5 mM MgCl ₂ 0,15 M NaCl pH 7,4
5 x Probenpuffer (12 mL)	4,6 mL Tris/Stab Puffer 2 mL Glycerin 0,1 g Bromphenolblau

	Trenngel 7,5%	Trenngel 10%	Trenngel 15%
Acrylamid 30% [mL]	2,5	3,3	5
Trenngel-Puffer [mL]	2,5	2,5	2,5
dH ₂ O [mL]	5	4,1	2,4
TEMED [μL]	3	3	3
APS [μL]	100	100	100
Radikalstarter TEMED und APS erst kurz vor Gebrauch zugeben			

Sammelgel	
Acrylamid 30% [mL]	0,4
Trenngel-Puffer [mL]	0,8
dH ₂ O [mL]	2
TEMED [μL]	3
APS [μL]	100
Radikalstarter TEMED und APS erst kurz vor Gebrauch zugeben	

1.5 Lösungen für die Elektronenmikroskopie

1% Uranylacetat 0,01 g Uranylacetat pro mL destilliertes Wasser
5 Minuten schütteln

2 Verwendete Primer

M13 for	GTAAAACGACGGCCAG
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC
T7 for	TAATACGACTCACTATAGGG

<i>BgAChBP1-R2A</i> for	GTATTTTCAGGGCTCCGCAAGAAGCAGAAGTGAG
<i>BgAChBP1-R2A</i> rev	CTCACTTCTGCTTCTTGCGGAGCCCTGAAAATAC
<i>BgAChBP1-R2G</i> for	CTGTATTTTCAGGGCTCCGGTAGAAGCAGAAGTGAGATTC
<i>BgAChBP1-R2G</i> rev	GAATCTCACTTCTGCTTCTACCGGAGCCCTGAAAATACAG
<i>BgAChBP1-R3A</i> for	GTATTTTCAGGGCTCCAGAGCAAGCAGAAGTGAGATTCTTC
<i>BgAChBP1-R3A</i> rev	GAAGAATCTCACTTCTGCTTGTCTGGAGCCCTGAAAATAC
<i>BgAChBP1-R3G</i> for	CAGGGCTCCAGAGGAAGCAGAAGTG
<i>BgAChBP1-R3G</i> rev	CACTTCTGCTTCTCTGGAGCCCTG
<i>BgAChBP1-C16A</i> for	CTTCAAGATGTCCTCAGCAGGGCTAGCCCTTTAAACATCCCC
<i>BgAChBP1-C16A</i> rev	GGGGATGTTTAAAGGGCTAGCCCTGCTGAGGACATCTTGAAG
<i>BgAChBP1-C16G</i> for	GATGTCCTCAGCAGGGGTAGCCCTTTAAAC
<i>BgAChBP1-C16G</i> rev	GTTTAAAGGGCTACCCCTGCTGAGGACATC
<i>BgAChBP1-E24A</i> for	GCCCTTTAAACATCCCCATTGCAGATGACCAGCCAGTCAAAG
<i>BgAChBP1-E24A</i> rev	CTTTGACTGGCTGGTCATCTGCAATGGGGATGTTTAAAGGGC
<i>BgAChBP1-R63A</i> for	CGACCTTGGTCTGGAAGGACGCATGTCTCAACTGGTTTAATG
<i>BgAChBP1-R63A</i> rev	CATTAAACCAGTTGAGACATGCGTCCTTCCAGACCAAGGTCG
<i>BgAChBP1-C64A</i> for	GGTCTGGAAGGACAGAGCTCTCAACTGGTTTAATG
<i>BgAChBP1-C64A</i> rev	CATTAAACCAGTTGAGAGCTCTGTCCTTCCAGACC
<i>BgAChBP1-C64G</i> for	CTTGGTCTGGAAGGACAGAGGTCTCAACTGGTTTAATG
<i>BgAChBP1-C64G</i> rev	CATTAAACCAGTTGAGACCTCTGTCCTTCCAGACCAAG
<i>BgAChBP1-E70A</i> for	GATGTCTCAACTGGTTTAATGCATTCACTTCTTTCAAAG
<i>BgAChBP1-E70A</i> rev	CTTTGAAAGAAGTGAATGCATTAAACCAGTTGAGACATC
<i>BgAChBP1-E70G</i> for	CTCAACTGGTTTAATGGATTCACTTCTTTCAAAG
<i>BgAChBP1-E70A</i> rev	CTTTGAAAGAAGTGAATCCATTAAACCAGTTGAG
<i>BgAChBP1-F71A</i> for	GTCTCAACTGGTTTAATGAAGCCACTTCTTTCAAAGAGTTG
<i>BgAChBP1-F71A</i> rev	CAACTCTTTGAAAGAAGTGGCTTCATTAAACCAGTTGAGAC
<i>BgAChBP1-F71G</i> for	CTCAACTGGTTTAATGAAGGCACTTCTTTCAAAGAGTTG
<i>BgAChBP1-F71G</i> rev	CAACTCTTTGAAAGGAAGTGCCTTCATTAAACCAGTTGAG

BgAChBP2-C71F for GCTGGTCCAACGAGTTCACCACCTTCAATG
BgAChBP2-C71F rev CATTGAAGGTGGTGAACCTCGTTGGACCAGC

3 Aminosäuresequenzen der *BgAChBP1* und *BgAChBP2* Mutanten

BgAChBP1-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRRSRSEILQDVLSRCSPLNIP
IEDDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEVDIGLWTTL
VWKDRCLNWFNEFTSFKELTVPIAEIWTPDIFLFDSV
GAPEIFSDKLARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKVLDLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-R2G-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSGRSRSEILQDVLSRCSPLNIP
IEDDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEVDIGLWTTL
VWKDRCLNWFNEFTSFKELTVPIAEIWTPDIFLFDSV
GAPEIFSDKLARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKVLDLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-R2A-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSARRSRSEILQDVLSRCSPLNIP
IEDDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEVDIGLWTTL
VWKDRCLNWFNEFTSFKELTVPIAEIWTPDIFLFDSV
GAPEIFSDKLARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKVLDLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-R3G-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRRSRSEILQDVLSRCSPLNIPIED
DQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEVDIGLWTTLVWKDRCLNWFNEFTSFKELTVPIAEIWTPDIFLFDSVGAPEIFSDKLARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADLKLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKVLDLGDYASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-R3A-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRA SRSEILQDVLSRCSPLNIP
IEDDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEV DIGLWTTL
VWKDRCLNWFNEFTSFKELTVPIAEIWTPDIFLFD SV
GAPEIFSDK LARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKV DLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-C16/64G-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRRSRSEILQDVLSRGSPLNIP
IEDDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEV DIGLWTTLV
WKDRGLNWFNEFTSFKELTVPIAEIWTPDIFLFD SV
GAPEIFSDK LARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKV DLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-C16/64A-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRRSRSEILQDVLSRASPLNIP
IEDDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEV DIGLWTTL
VWKDRALNWFNEFTSFKELTVPIAEIWTPDIFLFD SV
GAPEIFSDK LARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKV DLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-E24A-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRRSRSEILQDVLSRCSPLNIP
IADDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEV DIGLWTTL
VWKDRCLNWFNEFTSFKELTVPIAEIWTPDIFLFD SV
GAPEIFSDK LARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKV DLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-R63A-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRRSRSEILQDVLSRCSPLNIPIED
DQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEV DIGLWTTLVWKDAC
LNWFNGFTSFKELTVPIVEIWTPDIFLFD SVGAPEIFSDK L
ARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADLKLETGVTCSLKSG
SWTHSTQELTLEVNAKV DLGDYASDTRFQLLNATQQVN
RKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-E70G-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRRSRSEILQDVLSRCSPLNIP
IEDDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEVDIGLWTTLV
WKDRCLNWFNGFTSFKELTVPIVEIWTPDIFLFDV
GAPEIFSDKRLARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKVDLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-E70A-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRRSRSEILQDVLSRCSPLNIP
IEDDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEVDIGLWTTLV
WKDRCLNWFNAFTSFKELTVPIVEIWTPDIFLFDV
GAPEIFSDKRLARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKVDLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-F71G-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRRSRSEILQDVLSRCSPLNIP
IEDDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEVDIGLWTTLV
WKDRCLNWFNEGTSFKELTVPIVEIWTPDIFLFDV
GAPEIFSDKRLARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKVDLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP1-F71A-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGSRRSRSEILQDVLSRCSPLNIP
IEDDQPVKVSFEYSLQRIFRADVENDEVDIGLWTTLV
WKDRCLNWFNEATSFKELTVPIVEIWTPDIFLFDV
GAPEIFSDKRLARVSQDGTVTYVPQLKVRLSCPLADL
KLETGVTCSLKSGSWTHSTQELTLEVNAKVDLGDY
ASDTRFQLLNATQQVNRKQYPCCPETYDDATLSFTFRKP Stop

BgAChBP2-His-TEV

Met HHHHHHENLYFQGTKKSREEIVKEILGRANPNNIPIVD
EQPVKVSFKYSLQDIYTADVGTQVELGLWLVISWKDRS
LSWSNECTTFNELTLP SKYIWLPHIEVYNSIGKPGIHS DQ
LVRVYKDGTVTFVPQYTIRFSCALENVTTTEQGA ACTLKF
GPWTYDVRDLVLDESQQVDLTTYAGGERFQLIEAKQKV
NKKTYPCCPQSFEDIELRVTFKKI Stop

BgAChBP2-C71F-His-TEV

Met H H H H H H E N L Y F Q G T K K S R E E I V K E I L G R A N P N N I P
I V D E Q P V K V S F K Y S L Q D I Y T A D V G T D Q V E L G L W L V I
S W K D R S L S W S N E F T T F N E L T L P S K Y I W L P H I E V Y N S I
G K P G I H S D Q L V R V Y K D G T V T F V P Q Y T I R F S C A L E N V
T T E Q G A A C T L K F G P W T Y D V R D L V L D E S Q Q V D L T T Y
A G G E R F Q L I E A K Q K V N K K T Y P C C P Q S F E D I E L R V T F K K I Stop

4 Überprüfung der Expression der *BgAChBP*-Mutanten

4.1 Agarosegel der Mutagenese-PCR des *BgAChBP1-R2G*

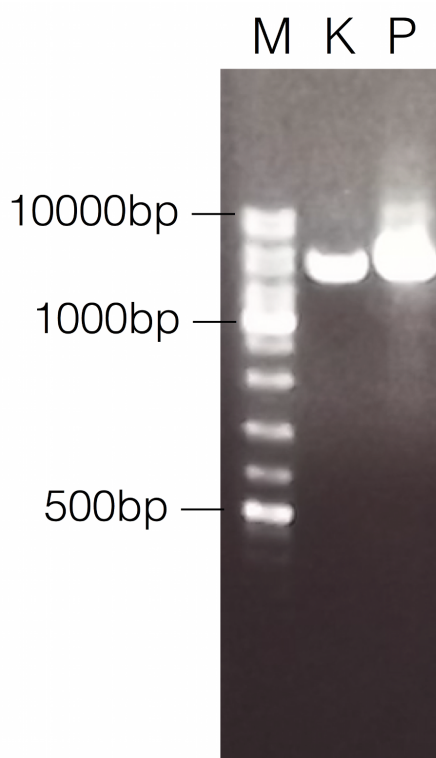


Abb. 79: Überprüfung der PCR bei *BgAChBP1-R2G*. 1%iges Agarosegel mit PCR-Produkt als Kontrolle (K) und PCR-Produkt nach Dpn1-Verdau (P). Kontrolle und Dpn1-Verdau zeigten eine Bande bei ca. 6000bp, der erwarteten Größe des Amplifikats. Die Mutations-PCR war erfolgreich. Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas) als Größenstandard.

4.2 SDS-PAGE von *BgAChBP1-E70G*

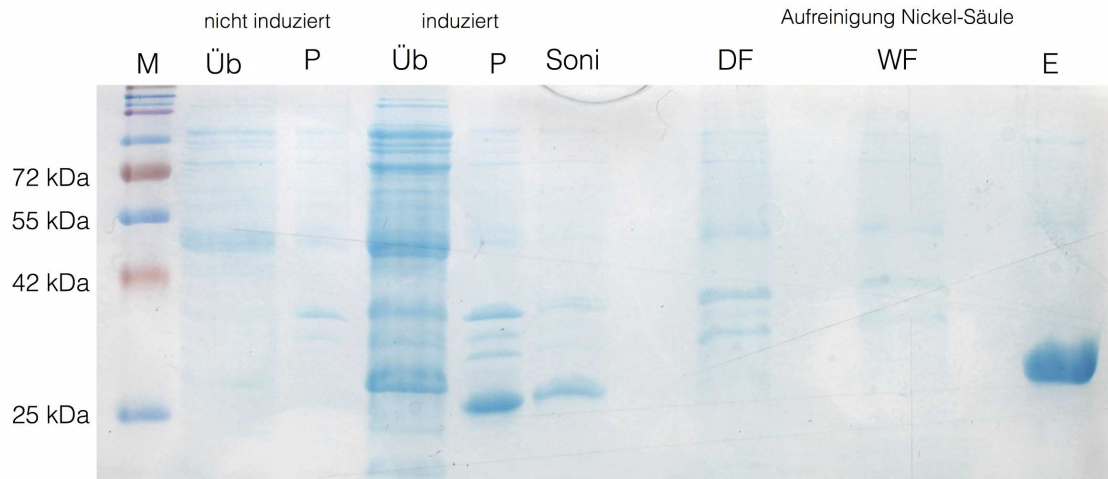


Abb. 80: SDS-PAGE von *BgAChBP1-E70G*. Bakterienpellet (P) zeigte die erwartete Bande bei 25 kDa. Im Pellet nach der Sonifikation (Soni) war ebenfalls Protein vorhanden. Durchfluss (DF) und Waschfraktionen (WF) zeigten keine Bande bei 25 kDa; dafür deutliche Bande in dieser Höhe im Eluat (E). ProSieve Quad Color Proteinmarker (Lonza, Rockland, USA) als Größenstandard.

4.3 SDS-PAGE von *BgAChBP2-C71F*

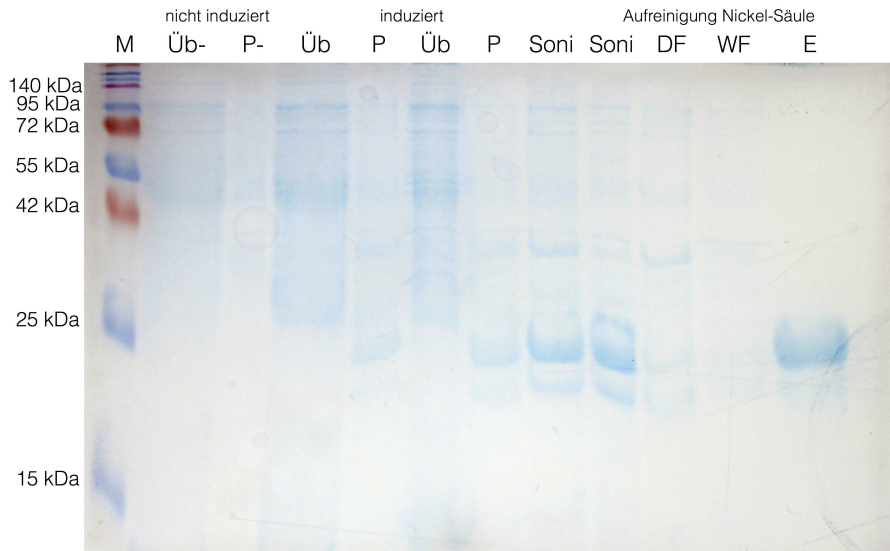


Abb. 81: SDS-PAGE von *BgAChBP2-C71F*. Im Bakterienpellet (P) und nach dem Sonifizieren (Soni) Doppelbande des exprimierten Proteins. In Durchfluss (DF) und Waschfraktion (WF) keine Bande bei 25 kDa. Anreicherung des Proteins im Eluat (E). Größenstandard ProSieve Quad Color (Lonza, Rockland, USA).

5 Sequenzen von *PcAChBP1*, *PcAChBP2* und *PcAChBP3* aus der Transkriptomanalyse

PcAChBP1

```

ATGTTTCGACAAGTTCTCATCCTGTTCTTGATTTTTTCAA
GGTAGTGTTGGTGATGACAGGTCGGAGGTGTACAGTCG
AATCATTTCGCAGATCTGATCTCGATAGCATTCCAACGG
TAGGAGACAAGCCACTGCAGATTTCTATTGGTTATCAG
TTAGTCAACATACAGTGGGCGAATACAAAGCAGAACGA
GTTGGAGGTCATTATCTGGGTGACGCAGTCGTGGAAGG
ATAAATCTCTTAGTTGGGA ACTGAATCCTTCATGGAAC
CCGCATCCTCCTTCGTTTAATCAGGTGAGTGTACCCGCT
AAGGAAATTTGGACTCCGGACATCACAATCTTCAAATC
CATTGGAGCCCCAGAGATATATTCATCGGAGAATGCAG
TTGTCTATATAGATGGTAATGTGACGTACATCCCTCAGA
TACGCGCTCGTGTCATGTGTAATTTGAAAAATCTATACC
AGTCTAACAACGTCACATGCAGTCTCAAGTCGGGGTCT
CGAACTCGTCCGTCAACAGAGATGTCTTTGTCCGTTCA
    
```

AGGGGATAAGAATATTCTTTCTGAGTACATAGAAAGTT
CAATGTATGAAGTCTTAGATGTCACCCAAAAGGTCAAC
CAAAGAAATACGATTGTTGCCCGGAGACATACGACGA
AGCTGAGCTGACATTTAGTTTTAGACAAGCACATTTTTGA

Aminosäuresequenz

Met FRQVLILFLIFQGSVGD DRSEVYSRIIRRS DLDSIPTV
GDKPLQISIGYQLVNIQWANTKQNELEVIIWVTQSWKD
KSLSWELNPSWNP HPPSFNQVSVPAKEIWTPDITIFKS
IGAPEIYSSENA VVYIDGNVTYIPQIRARVMCNLKNLY
QSNNVTC SLKSGSRTRPSTEMSLSVQGDKNILSEYIES
SMYEVL DVTQKVNQKKYDCCPETYDEAELTFSFRQAHF Stop

PcAChBP2

ATGCTTTTGTGTTTTCTGCTGCAAGGTTCTTTGGGCCAT
ACAAAAGACAGATCCGAGATTTTAAATGACATAATTCA
AAGATCTAAAGTACCAAGCATCCCCATGGTCGATGACC
AGCCAGTGAACGTCTCATTGCATTACACATTAATGAAC
ATACAGAGAGCTGATGTGGAATACAACGAAGTGGACGT
CCTTATCTGGTTGACTTACGAATGGAAAGATCCATCTCT
CAGTTGGGCCAAAGAATGTACTTCTTTTAAATGAAGTCAT
AGTGCCAGTCTCAAAAATCTGGATACCAGATATCTCCGT
CTTCAACTCAATTGGCACCCCGGAAATGTACGCAGACC
AGGTGACACATGTGTACAAGGACGGTAGTGTAATGTAC
GTACCACA ACTTCGATACA AAGTCGTCTGTGACCTGTCA
AAACTGACAACGGAAGTGGGCGCCACCTGCAGCCTGAA
GGCAGGATCTTGGACACGYTCRTCAAAAGAACTGTTTT
TGTCTGAAAACAAGGAAGATCATCTTTCTGAATACTTTG
CACACTCCAAGTTTCAGTTACTGAAGGCTAGTCAAACA
ATCAACAAGAAGGTGTACCCATGTTGTCCAGATACGTA
CGAGGACGCAGAGCTGATTTTTACTTTTAAAAGAAATAA

Aminosäuresequenz

Met LLLCFL LQGSLGHTKDRSEILNDIIQRSKVPSIPMVDDQ
PVNVSLHYTLMNIQRADVEYNEVDVLIWLT YEWKDPSLS
WAKECTSFNEVIVPVSKIWI PDISVFNSIGTPEMYADQVT
HVYKDG SVMYVPQLRYKVVCDLSKLTTEVGATCSLKAG
SWTXXSKELFLSENKEDHLSEYFAHSKFQLLKASQTINK
KVYPCCPD TYEDAELIFTFKKKK Stop

5 Sequenzen von PcAChBP1, PcAChBP2 und PcAChBP3 aus der Transkriptomanalyse

PcAChBP3

ATGGAGATACCTCAGATTTGTATACTGTTGTGTTTAAT
GTTACGAGGTTGTCTATGTTTAAATCGAGCAGACGTCC
TATCTCGAATCATCAAAAACCTCTAATCCTGACGTCATC
CCAATAGAGGGAGATAACCCAGTGGAGGTATCTGTGGC
ATACACACTGATCAATGTGCAGAGGGCGGATATGGAGC
ACAACGAGGTGGACGTCCTCGTCTGGCTGACTCAATCC
TGGAAAGACAAATCTCTCGCCTGGGACTCCA ACTACAC
TAAATTTAACTCGTTGAGTGTGCCACAAAATATATAT
GGACGCCAGATATTACAGTCTACAATTCAGTGGGGGCC
CCAGAAATATACGCTTCAAACATGGCGGTTGTTGGCAG
TGATGGGAACGTGCTCTATGTGCCACAAATACGCGTTC
GTTGCACATGCGACATCAAAAATTTGAAATCAATTTGG
GGATTTGAGACACCATTCAAGAAGAAAGATAGTGTCAC
ATGCAGTGTTAGATCTGAGTCTTGGACACACCCAGGA
GAAGA ACTGACACTGAAATCACAAGGGGAAGTAATTC
TGTCACAATACCTTGAAGAATCCAAGTTTGAGTTGCT
GGCCGCTACTCAAATAGTTAACAAGAAATTGTTTCCCACC

Aminosäuresequenz

Met EIPQICILLCLMLRGCLCLNRADVLSRIIKNSNPDVPI
EGDNPVEVSVAYTLINVQRADMEHNEVDVLVWLTQSWK
DKSLAWDSNYTKFNLSVPTKYIWTPDITVYNSVGAPEI
YASNMAVVGSDGNVLYVPQIRVRCTCDIKNLKSIWGFET
PFKKKDSVTCSVRSESWTHPGEELTLKSQGEVILSQYLEE
SKFELLAATQIVNKKLFPT