Vergleichende Untersuchung von Membrankomponenten der Erythrozyten aus fünf Tilapienarten (Teleostei: Cichlidae).

DISSERTATION zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Biologie der Universität Hamburg

> vorgelegt von

Oliver Hallas aus Pinneberg

> Hamburg 2002

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. VILLWOCK

Weitere Gutachter der Dissertation: Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ

Tag der Disputation: 06. Dezember 2002

Hamburg, den 22. November 2002



ledo lie

Professor Dr. U. Wienand Dekan

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Villwock und Herrn Prof. Dr. Lothar Renwrantz danke ich für die Überlassung des Themas sowie die zahlreichen Anregungen im Rahmen der Gesamtbetreuung meiner Arbeit.

Der experimentelle Teil dieser Dissertation wurde im Labor von Herrn Prof. Dr. Renwrantz durchgeführt, dem ich an dieser Stelle noch einmal für seine fachliche Unterstützung und die vielen anregenden Diskussionen Dank aussprechen möchte.

Allen meinen Mitstreitern in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Villwock und Prof. Dr. Renwrantz insbesondere Sylvia Prelle, Maike Steenbuck, Gina Burmeister, Thomas Falk, Eckart Siegmund und Christian Kähler bin ich für die großartige Kooperation und den Spaß, den wir im Labor hatten, dankbar.

Ebenso danke ich meinen ehemaligen Kollegen Sabine Baumann und Detlef Teege, für die vielfältige Unterstützung. Insbesondere Detlef gebührt mein Dank für seine ständige Hilfsbereitschaft bei plötzlich auftretenden Problemen mit der Aquarientechnik.

Frau Dr. Julia Marxen bin ich besonders dankbar für die Durchsicht der vorliegenden Arbeit auf orthographische Mängel und die kritischen Anmerkungen zum Text. Eventuell übersehene bzw. nachträglich eingebrachte Fehler gehen zu meinen Lasten.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Herrn Dr. Hilge (Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Außenstelle Ahrensburg) für die Hälterung einiger Tilapien sowie bei der Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), die diese Arbeit finanziell unterstützt hat.

Der größte Dank jedoch gebührt meinen Eltern, die mir das Biologiestudium ermöglichten und damit auch Anteil an dieser Arbeit haben.

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

βΝΗΕ	β -adrenerger Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
Abb.	Abbildung
A. demin.	demineralisiertes Wasser
AIA	Artocarpus integrifolia-Agglutinin
AP	Alkalische Phosphatase
APA	Abrus precatorius-Agglutinin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-Biquinoline Dinatriumsalz
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphate-p-toluidine-Salz
BSA	Rinderserumalbumin
С	Bisacrylamidkonzentration der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBB	Coomassie Brilliant Blue G250
CHAPS	3-[3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
EP	Eichprotein
Fuc	L-Fucose
g	Erdbeschleunigung
G3PD	Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Gal	D-Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
Glc	D-Glukose
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GNA	Galanthus nivalis-Agglutinin
GPA	Glykophorin A
GPC	Glykophorin C
³ H ₂ DIDS	4.4 Diiso-thiocyano [3 H ₂]dihydro-stilben-2.2 -disulfonsäure
Hb	Hämoglobin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N´-2-ethansulfonsäure
ННА	Hippeastrum Hybrid-Agglutinin
HMP	Highmolecular Mass Protein/Proteinase
HPA	Helix pomatia-Agglutinin
IgA	Immunglobulin G
IgG	Immunglobulin G
IgG1	Immunglobulin G, Subtyp 1
IgG2a	Immunglobulin G, Subtyp 2a
IgM	Immunglobulin M
kDa	Kilodalton
LC	leichte Kette
LDH	Lactatdehydrogenase
LEA	Lycopersicon esculentum-Agglutinin
М	molekulare Masse: mol·l ⁻¹ (molar)
MAA II	Maackia amurensis II-Agglutinin
Mab	monoklonaler Antikörper
Man	D-Mannose
MCP	Multicatalytic Proteinase
ME	2-Mercaptoethanol
min	Minute
mOsm	milliosmolar

MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
NANA	N-Acetylneuraminsäure
NANAase	N-Acetylneuraminidase
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
Neu5Nac	N-Acetyl-5-neuraminsäure
Oa	Oreochromis aureus
Om	Oreochromis mossambicus
On	Oreochromis niloticus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAS	Periodic Acid Schiffs
PBS	Phosphatpuffer
Per	Ammoniumperoxodisulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PWM	Pokeweed Mitogen (= <i>Phytolacca americana</i> -Agglutinin)
R	Rest
RCA ₆₀	Ricinus communis 60-Agglutinin
rf	relative Wanderungsstrecke (Laufstrecke einer Proteinbande geteilt
	durch die Gesamttrennstrecke des Trenngels)
SBA	Glycine max-Agglutinin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Sg	Sarotherodon galilaeus
Sm	Sarotherodon melanotheron
SNA	Sambucus nigra-Agglutinin
STA	Solanum tuberosum-Agglutinin
Streptavidin-AP	Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat
Sulfobiotin-X-NHS	Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-hexonat
Т	Gesamtmonomerengehalt der Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylendiamin
Thr	Threonin
TM	Tropomyosin
TMB	3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid
TPA	Tetragonolobus purpurea-Agglutinin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TX bzw. TX-100	Triton X-100
UE	Untereinheit
VVA	Vicia villosa-Agglutinin

Inhaltsverzeichnis

I. EINLEIT	TUNG	
1.1.	Taxonomische Gliederung der Tilapien	1
1.2.	Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Tilapienarten	2
1.3.	Die Bedeutung der Tilapien als Aquakulturfische	5
1.4.	Introgression von Tilapien	6
1.5.	Bestimmung von Tilapienarten mittels Komponenten des Blutes	7
1.5.1.	Blutplasma	7
1.5.2.	Hämoglobine und Globinketten	7
1.5.3.	Erythrozytenoberfläche	7
1.6.	Zielsetzung der Arbeit	8

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1.	Fische	10
2.2.	Chemikalien	10
2.3.	Blutabnahme	11
2.4.	Isolierung der Erythrozyten	11
2.5.	Reinheitskontrolle der gewonnenen Erythrozytenfraktion	12
2.6.	Gewinnung von Fischerythrozytenmembranen	12
2.7.	Gewinnung von Humanerythrozytenmembranen	13
2.8.	Reinheitsbestimmung der gewonnenen Fischerythrozytenmembran	13
2.8.1.	Nachweis von Hämolysat in der Membranfraktion	13
2.8.2.	Bestimmung des DNA-Gehaltes der Membranfraktion	14
2.9.	Proteinbestimmung	15
2.10.	Bestimmung des Proteingehaltes im Trockengewicht	16
2.11.	Saure Harnstoffgelelektrophorese	16
2.11.1.	Saure Harnstoffgelelektrophorese im homogenen Gel (8%T, 1%C)	16
2.11.2.	Saure Harnstoffgelelektrophorese im 5-30% Gradientengel	17
2.12.	Diskontinuierliche SDS-Polyarcylamidgradientengelelektrophorese	18
2.12.1.	Probenvorbereitung und Trennbedingungen	19
2.12.2.	Gelfixierung und Proteinfärbung	20
2.12.3.	Molekulargewichtsbestimmung	20
2.13.	Elektrotransfer von Proteinen aus PAGE-Gelen auf PVDF-Membranen	21
2.14.	Coomassiefärbung von PVDF-Membranen	21
2.15.	Solubilisierung von Membranproteinen mit Triton X-100	21
2.16.	Nachweis von Glykoproteinen mit Perjodsäure-Schiffs Reagenz (PAS)	22
2.16.1.	PAS-Färbung von SDS-Gelen	22
2.16.2.	PAS-Färbung von Blots	22
2.17.	Kopplung der Erythrozytenoberfläche mit Sulfobiotin-X-NHS	23
2.18.	Nachweis biotinmarkierter Moleküle	24
2.19.	Nachweis spezifischer Membranproteine mit Antikörpern	25
2.20.	Nachweis von Glykoproteinen mit Lektinen	26
III. ERGE	BNISSE	
3.1.	Blutabnahme und Erythrozytengewinnung	27
3.2	Isolierung der Erythrozytenmembranen	28
3.3.	Proteingehalt der Erythrozytenmembranen	28
3.4.	Bestimmung des Hämolysatanteils in den Erythrozytenmembranen	30
3.5.	Bestimmung des DNA-Gehaltes in den Erythrozytenmembranen	31
3.6.	Elektrophoretische Auftrennung der Erythrozytenmembranproteine	31

3.6.1.	Saure Harnstoff-PAGE im homogenen 8%-Gel	31
3.6.2.	Saure Harnstoff-PAGE im 5-30% Gradientengel	32
3.6.3.	5-15%-SDS-Gradienten-PAGE	34
3.6.3.1.	Vergleich der Bandenmuster von Tilapien- und Humanerythrozytenmembranen	37
3.6.3.2.	Artspezifische Unterschiede im Bandenmuster der Erythrozytenmembranen	39
3.6.4.	Vergleich reduzierter und nicht reduzierter Membranen	40
3.7.	Solubilisierung von Membranproteinen mit Triton X-100	41
3.8	PAS-Färbung	43
39	Nachweis biotinilierter Membranproteine	46
3.10	Charakterisierung der Membranproteine mit Antikörpern	49
3 10 1	Anti-Humanerythrozytenspektrin $(\alpha+\beta)$ -Antikörper	<u>4</u> 9
3 10 2	Anti-Ca ²⁺ -ATPase-Antikörper	49
3 10 3	Anti- α -Tubulin-Antikörper	51
3.10.3.	Anti Aktin Antikörper	51
3.10.4.	Anti-Aktin-Altikorper	51
3.10.3. 2.10.6	Anti-Hopomyosin-Antikorper	52
5.10.0. 2.11	Charaktericierung der Membronnroteine mit Lektinen	33 54
3.11. 2.11.1	N A satula surgering der Memoranproteine mit Lektinen	54
3.11.1 .	N-Acetymeuraminsaure (NANA) spezifische Lektine	55
3.11.1.1.	Maackia amurensis Lektin II (MAA II)	55
3.11.1.2.	Sambucus nigra Lektin (SNA)	50
3.11.2.	Mannose spezifische Lektine	57
3.11.2.1.	Hippeastrum Hybrid Lektin (HHA)	5/
3.11.2.2.	Galanthus nivalis Lektin (GNA)	58
3.11.3.	N-Acetylglukosamin spezifische Lektine	59
3.11.3.1.	Lycopersicon esculentum Lektin (LEA)	59
3.11.3.2.	Phytolacca americana ("Pokeweed") Lektin (PWM)	60
3.11.4.	Galaktose spezifische Lektine	61
3.11.4.1.	Artocarpus integrifolia Lektin (AIA)	61
3.11.4.2.	Abrus precatorius Lektin (APA)	62
3.11.4.3.	<i>Ricinus communis</i> $_{60}$ -Lektin (RCA $_{60}$)	62
3.11.5.	Fucose spezifische Lektine	63
3.11.5.1.	Tetragonolobus purpurea Lektin (TPA)	63
IV. DISKU	ISSION	
4.1.	Reinheit der Erythrozytenmembranfraktion	65
4.1.1.	DNA-Kontamination	65
4.1.2.	Hämolysat-Kontamination	66
4.2.	Proteinbestimmung und Proteingehalt der Erythrozytenmembranen	67
4.3.	Auftrennung der Membranproteine in der sauren Harnstoff-PAGE	67
4.4.	Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE	68
4.5.	Aufbau der Humanerythrozytenmembran	69
4.6.	Bisheriger Kenntnisstand über den Membranaufbau von Teleosteererythrozyten	70
4.7.	Vergleich der Membranproteine aus Human- und Tilapienerythrozyten	71
4.7.1	Spektrine	72
4.7.2.	Ankyrine und Schwerkettenmyosin	74
4.7.3.	Spektrinfragmente	75
4.7.4.	Anionenkanal (Bande 3)	76
4.7.5.	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher	79
4.7.6.	Protein 4.1	80
4.7.7.	Protein 4.2	81
4.7.8.	α - und β -Tubulin	81

4.7.9.	Protein 4.9 (Demantin)	83
4.7.10.	Aktin und Tropomodulin	83
4.7.11.	Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase	84
4.7.12.	Tropomyosin	84
4.7.13.	Protein 7.2b (Stomatin)	85
4.7.14.	Membranständige Proteasen	86
4.7.15.	Protein 8	86
4.7.16.	Leichtkettenmyosin	86
4.7.17.	Hämoglobin	87
4.7.18.	Ca ²⁺ -ATPase	88
4.7.19.	Übersicht der analysierten Membranproteine	89
4.8.	Analyse der Membranproteine unter nicht reduzierenden Bedingungen	89
4.9	Membranintegrale Proteine	89
4.10.	Biotinilierte Erythrozytenmembranproteine	90
4.11.	PAS-positive Banden	91
4.12.	Nachweis spezifischer Sacchariddeterminanten einzelner Glykoproteine	94
4.12.1.	N-Acetylneuraminsäure-haltige Kohlenhydratdeterminanten	95
4.12.2.	D-Mannose-haltige Kohlenhydratdeterminanten	97
4.12.3.	N-Acetylglukosamin-haltige Kohlenhydratdeterminanten	97
4.12.4.	D-Galaktose-haltige Kohlenhydratdeterminanten	98
4.12.5.	N-Acetylgalaktosamin-haltige Kohlenhydratdeterminanten	100
4.12.6.	L-Fucose-haltige Kohlenhydratdeterminanten	100
4.13.	Charakterisierung einzelner Glykoproteine	101
4.14.	Unterschiede zwischen Tilapienarten im Lektinbindungsmuster	101
4.15.	Blutgruppen bei Fischen	102
4.16.	Phylogenetische Betrachtung	103
V. ZUSAN	IMENFASSUNG	104

VI. LITERATUR

106

I. EINLEITUNG

1.1. Taxonomische Gliederung der Tilapien

Die Tilapien formen innerhalb der Familie der Buntbarsche (Cichlidae) den aus afrikanischen und levantinischen Arten bestehenden Tribus Tilapiini. Hierzu zählen nach TREWAVAS et al. (1972) und TREWAVAS (1983) die Gattungen: *Tilapia, Sarotherodon, Oreochromis, Danakilia, Iranocichla, Tristramella, Pelmatochromis, Pterochromis, die endemischen Genera Konia, Myaka, Punga und Stomatepia aus Barombi Mbo in Kamerun sowie die Gattung <i>Steatochranus* und *Gobiocichla*. Innerhalb dieser Gruppe stellt *Pelmatochromis* die am wenigsten evoluierte Gattung dar. Sie unterscheidet sich sowohl anatomisch als auch nahrungsökologisch deutlich vom Genus *Tilapia* und repräsentiert wahrscheinlich eine basale Gruppe, von der sich *Tilapia* abgespalten hat (TREWAVAS, 1973a, 1983). Aufgrund neuerer Untersuchungen trennt STIASSNY (1991) *Pelmatochromis, aber auch Pterochromis, Steatochranus* und *Gobiocichla* von den Tilapiini ab. Ihnen fehlen die charakteristischen zwei Foramina auf der Ventralseite des unteren Pharyngealknochens ("lower pharyngeal jaw") sowie der mediane Knochenkamm auf der Dorsalseite dieses Knochenelementes.

Unter der Bezeichnung "Tilapien" versteht man in erster Linie jedoch die Gattungen *Tilapia*, *Oreochromis* und *Sarotherodon* (McANDREW, 2000; TREWAVAS, 1983). Dies hat neben der Tatsache, daß es mit Abstand die artenreichsten und wirtschaftlich bedeutendsten Genera sind, historisch-taxonomische Gründe, denn lange Zeit wurden alle drei Gattungen in dem namengebenden Taxon *Tilapia* zusammengefaßt. Sowohl REAGAN (1920) als auch TREWAVAS (1966) ordneten die Typusarten *Oreochromis hunteri* und *Sarotherodon melanotheron* der von GÜNTHER (1889) respektive RÜPPEL (1852) eingeführten Genera *Oreochromis* und *Sarotherodon* als Vertreter des Subgenus *Sarotherodon* in die Gattung *Tilapia* (SMITH, 1840) ein.

Innerhalb dieses Taxons *Tilapia* bildete THYS VAN DEN AUDENAERDE (1968, 1971) acht maulbrütende Untergattungen (*Sarotherodon, Oreochromis, Alcolapia, Neotilapia, Nyasalapia, Loruwiala, Danakilia, Nilotilapia*), die dann von TREWAVAS (1973a, b) in der nun wieder eigenständigen Gattung *Sarotherodon* zusammengefaßt wurden. Später löste TREWAVAS (1983) dieses Genus *Sarotherodon* in die Gattungen *Danakilia, Oreochromis,* und *Sarotherodon* auf. *Danakilia* bildet mit der Art *Danakilia franchetti* ein monotypisches Genus, das sich durch die besonderen tricuspiden Zähne von den übrigen Tilapien unterscheidet (TREWAVAS, 1983).

Oreochromis umfaßt mit den Untergattungen *Oreochromis*, *Alcolapia*, *Neotilapia*, *Nyasalapia*, *Loruwiala* und *Valliocola* nov. gen. maternale Maulbrüter, während die Gattung *Sarotherodon* biparenterale und paternale Maulbrüter beinhaltet. Nach TREWAVAS (1983) haben sich beide Genera aus der substratlaichenden Gattung *Tilapia* entwickelt. Diese Tialpien zeichnen sich durch folgende gemeinsame morphologische Merkmale aus (THYS VAN DEN AUDENAERDE, 1968; TREWAVAS, 1983):

- 1. gedrungener, seitlich abgeflachter Körper mit langen Brustflossen und großem Kopf
- 2. Juvenile besitzen einen schwarzen Pigmentfleck oder "Tilapien-Marker" am Übergang vom hart- zum weichstrahligen Dorsalisabschnitt, der innerhalb der Gattung *Tilapia* oft bei den Adulttieren persistiert, in den Genera *Oreochromis* und *Sarotherodon* hingegen meist verblaßt.
- 3. Cycloidschuppen, nur selten sehr schwach ausgeprägte Kammschuppen
- 4. 7-28 Siebfortsätze am unteren Teil des vorderen Kiemenbogens.

Das Genus *Tilapia* (SMITH, 1840) enthält im Gegensatz zu den maulbrütenden Spezies der Gattungen *Oreochromis* und *Sarotherodon* nur substratlaichende Arten. Es unterscheidet sich nicht nur ethologisch, sondern auch anatomisch von diesen Maulbrütern zum Beispiel in der Form des unteren Pharynxknochens, in der geringen Anzahl von maximal 17 Siebfortsätzen im unteren Bereich des ersten Kiemenbogens oder durch gröbere Schlundzähne (GOURÈNE & TEUGELS, 1998; LOWE-McCONNEL, 1991). Diese anatomischen Unterschiede gehen auf die überwiegend makrophage und herbivore Ernährungsweise der Gattung *Tilapia* zurück. Mit 38 Spezies ist es die artenreichste Gruppe innerhalb der Tilapien (GOURÈNE & TEUGELS, 1998).

1.2. Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Tilapienarten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Erythrozytenmembranen von drei Arten der Gattung *Oreochromis* und zwei Spezies des Genus *Sarotherodon* untersucht, weshalb beide Gattungen mit den jeweiligen Arten im folgenden näher beschrieben werden (Angaben aus TREWAVAS, 1983). Abbildungen der Tiere finden sich auf der Bildtafel 1. Arten aus dem Genus *Tilapia* standen zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeit nicht zu Verfügung.

Die Gattung *Oreochromis* umfaßt maternale Maulbrüter, die zur Paarungszeit einen ausgesprochenen Sexualdimorphismus und Sexualdichromatismus zeigen. Die Männchen bauen eine Laicharena, die sie gegenüber Konkurrenten verteidigen. In beiden Geschlechtern sind die Genitalpapillen sehr gut entwickelt und die Bauchschuppen kleiner bis wesentlich kleiner als die Schuppen an den Flanken. Die Gattung *Oreochromis* umfaßt nach der Einteilung von TREWAVAS (1983) fünf Subgenera mit insgesamt 33 Arten und 18 Unterarten.

Das Verbreitungsgebiet von Oreochromis aureus erstreckt sich vom Nildelta in östlicher Richtung über die Küstenflüsse Israels bis zum Jordantal. Im Westen reicht es über das Tschadbecken, den mittleren Niger bis zum Senegal. In diesen Gebieten kommt O. aureus sympatrisch mit O. niloticus vor. Im Gegensatz zu dieser Art besiedelt O. aureus jedoch weder den Nil stromaufwärts, noch die großen ostafrikanischen Seen.

Adulte O. aureus (S.3, Abb. a) sind im allgemeinen graublau gefärbt mit hellem Bauch und dunklerem Rücken, abhängig vom Erregungszustand können dunkle Vertikalstreifen auftreten. Die Dorsalis ist hell-dunkel gepunktet. In der Balzzeit sind bei den Männchen die Säume der Rücken- und Schwanzflosse intensiv rot- orangerot gefärbt. Äußerlich unterscheidet sich O. aureus von O. niloticus vor allem in der Färbung der Schwanzflosse. Sie besitzt nicht die niloticus-typischen regelmäßigen dunklen Vertikalstreifen, sondern weist einen charakteristischen rötlichen Rand auf. Juvenile Tiere besitzen graue Vertikalstreifen auf den Körperseiten sowie der Caudalis und sind deshalb nur sehr schwer von O. niloticus zu unterscheiden. Die Anzahl der Wirbel, Schuppen und dorsalen Flossenstrahlen ist zwar im Mittel niedriger als bei O. niloticus, dennoch können die absoluten Werte beider Arten überlappen. O. aureus ernährt sich überwiegend von Phytoplankton (Jungtiere auch Zooplankton), frißt aber in Gefangen-schaft auch pelletiertes Futter wie die übrigen in die Untersuchngen einbezogenen Arten.

Oreochromis niloticus kommt außer in den bei *O. aureus* beschriebenen Gebieten Nil aufwärts über den Albert-, Edward- und Kivusee bis zum Tangajikasee vor sowie in den weiter östlich gelegenen Tana- und Turkanasee. *O. niloticus* fehlte natürlicherweise im Victoriasee und allen ostwärts strömenden Flüssen. Im Westen reicht das Verbreitungsgebiet vom Tschadbecken über Nigeria bis zum Senegal, wobei die Art jedoch in Sierra Leone, Liberia sowie den größten Teilen der Elfenbeinküste fehlt. In Kamerun kommt *O. niloticus* im südlichen Bereich des Tschadbeckens und im Benue-Flußsystem vor (TREWAVAS, 1983).

Bildtafel 1: Habitusskizzen der untersuchten Tilapienarten



a) *Oreochromis aureus* aus FALK et al. (1996)



b) Oreochromis n. niloticus aus TREWAVAS (1983)



c) Oreochromis mossambicus -E aus TREWAVAS (1983)



d) Oreochromis mossambicus -Γ aus TREWAVAS (1983)



e) Sarotherodon g. galilaeus aus TREWAVAS (1983)



f) Sarotherodon m. melanotheron aus TREWAVAS (1983) Auch wenn *O. niloticus* von Detritus, (Phyto-)Plankton, Insektenlarven bis zu Aufwuchs und Makrophyten ein großes Nahrungsspektrum nutzt, kann die Art jedoch überwiegend als herbivor angesehen werden.

Die Nominatform *O. n. niloticus* (S.3, Abb. b) ist silbergrau gefärbt mit einer weißsilbernen Bauchseite. Ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal zu *O. aureus* ist die Färbung der Schwanzflosse, die bei *O. n. niloticus* ein distinktes Vertikalstreifenmuster aufweist. Das Operculum besitzt einen deutlichen Fleck und ist bei den Männchen pinkfarben, während es bei den Weibchen grün schimmernd. Zur Balzzeit sind der untere Abschnitt von Kopf und Körper sowie die Rücken- und Schwanzflosse der $\Gamma\Gamma$ oft rötlich gefärbt..

Im Unterschied zur Nominatform besitzen die Männchen der Unterart *O. n. eduardianus* der in der Balzphase eine schwarze Unterseite sowie dunkle Flossen, während Kopf und Flanken rot gefärbt sind. Diese Subspezies kommt in folgenden Seen vor: Lake Albert (Uganda), Lake Edward, Lake George (Uganda, Zaire), Kivusee (Ruanda, Zaire), Tangayika-See und dem Ruzizi-Fluß (Burundi, Tansania, Zaire).

O. n. sugutae lebt im Suguta-River und seinen Zuflüssen sowie im Kapedo (Kenia). Neben den heißen, alkalischen Sodaquellen des Kapedo wird der Suguta unterirdisch durch den Baringosee mit Wasser versorgt. Die geschlechtsreifen Tiere fallen durch ihr extrem großes Maul auf, das sie von allen anderen *niloticus*- Subspezies unterscheidet. Die Grundfärbung der Kopfoberseite und der Flanken bei erwachsenen Tieren ist grünlich, der Rücken hingegen erscheint braun, die Unterseite weiß.

Oreochromis mossambicus besiedelt natürlicherweise die Seen und Flüsse der ostafrikanischen Küstenregion, insbesondere von Mosambik (Sambesi, Limpopo) bis zur Kapregion. Bedingt durch Introgression und Aquakultur ist die Art heute weltweit verbreitet. Die Grundfärbung reicht von schwach oliv bis silbergrau. *O. mossambicus* besitzt einen ausgeprägten Sexualdimorphismus, denn im Gegensatz zu den Weibchen (S.3, Abb. c) ist bei den adulten Männchen das Maul auffällig verlängert und ähnelt einem Entenschnabel (S. 3: Abb. d). In der Brutzeit sind die Männchen bis auf den weißen Operculumrand und die hellen Wangen blauschwarz gefärbt. Die Art ist ausgesprochen omnivor.

Das Genus Sarotherodon umfaßt nach TREWAVAS (1983) 10 Arten mit 10 Unterarten. Im Gegensatz zu Oreochromis enthält die Gattung Sarotherodon biparentale oder paternale Maulbrüter. Sexualdimorphismus ist nicht bzw. nur gering ausgebildet. Die Genitalpapillen der $\Gamma\Gamma$ sind klein und die Schuppen der Bauchseite sind nicht kleiner als jene auf den Flanken.

Sarotherodon galilaeus (S.3, Abb. e) ist eine sehr hochrückige Art mit grauer bis grüngrauer Grundfärbung. Der Kopf bei adulten Tieren ist gelblich abgesetzt und an den Flanken können schwarze Vertikalstreifen von der Dorsalis bis zur Körpermitte ausgebildet sein. Die Flossen sind nicht gemustert, nur die Caudalis hat einen rötlichen Rand. *S. galilaeus* wird nach TREWAVAS (1983) in fünf Subspezies unterteilt, von denen die Nominatform *S. g. galilaeus* die weiteste Verbreitung hat. Das Vorkommen reicht von Jordanien und Israel im Osten über Ägypten den Nil aufwärts bis zum Turkanasee (Kenia) im Süden. In Zentralafrika findet sich die Art in den oberen Zuflüssen des Kongos und reicht vom Tschadbecken über das Nigerund Volta-Flußsystem nach Westafrika bis zum Senegal. Einzelne Nachweise existieren auch für Mauretanien und Marokko. *S. galilaeus* ernährt sich überwiegend mikrophag von Phytoplankton. Im Unterschied zu *S. galilaeus* hat *Sarotherodon m. melanotheron* (S.3, Abb. f) eine schlanke Körperform mit opalblauer Grundfärbung. Die Schuppenbasen sind goldgelb abgesetzt und zwei bis drei dorsale Schuppenreihen zeigen eine irisierende Orangefärbung. *S. melanotheron* weist einen Sexualdichromatismus auf. Während das Operculum der Weibchen transparent ist und deshalb durch die roten Kiemen rosa erscheint, glänzt der Kiemendeckel der Männchen metallisch golden. In beiden Geschlechtern finden sich im unteren Kopfbereich schwarze Fleckenmuster. Das Verbreitungsgebiet von *Sarotherodon m. melanotheron* beschränkt sich auf die westafrikanischen Brackwasserlagunen und Flußsysteme von der Elfenbeinküste bis zum südlichen Kamerun. Im allgemeinen betreiben die Männchen die Brutpflege.

1.3. Die Bedeutung der Tilapien als Aquakulturfische

Ihr großes Adaptationsvermögen an unterschiedliche Nahrung und verschiedene Umweltbedingungen, die Fähigkeit, hohe und schwankende Salzgehalte zu tolerieren (TREWAVAS, 1983), sowie ihre Überlebensfähigkeit selbst bei hohen Temperaturen und geringsten Sauerstoffgehalten (BALARIN & HATTON, 1979, zit. n. FALK et al., 1998) machen Tilapien zu geeigneten Aquakulturfischen. Die Zucht von herbi- oder omnivoren Tilapien, die am unteren Ende der Nahrungskette fressen, ermöglicht eine einfache und kostengünstige Produktion hochwertigen Eiweißes und kann somit helfen, die Lebensmittel- und Proteinversorgung insbesondere der rasch wachsenden Bevölkerung in Entwicklungsländern zu gewährleisten sichern. Tilapien werden deshalb auch als "aquatic chicken" bezeichnet (MACLEAN, 1994).

Zwischen 1986 und 1995 verdreifachte sich die aquakulturelle Tilapienproduktion von 225693 auf 658178 Tonnen Fisch pro Jahr (FAO, 1997). 84% aller Tilapien werden dabei in der asiatisch-pazifischen Region gezüchtet, während aus Afrika, dem Ursprungskontinent der Tilapien, mit rund 31000t nur 5,4% stammen. Zweidrittel der afrikanischen Produktion entfallen dabei auf Ägypten (EDWARDS et al., 2000). In mehr als 75 Ländern werden Tilapien kommerziell oder versuchsweise gezüchtet (PULLIN et al., 1994). Die Produktion beschränkt sich dabei überwiegend auf den Bereich der Tropen und Subtropen, weil das Temperaturoptimum der Fische je nach Art oder Zuchtform zwischen 24 und 32°C liegt (MUIR et al., 2000). Neben der intensiven Zucht in speziellen Tilapienfarmen hat die integrierte Haltung von Tilapien mit Enten in Hausteichen ("polyculture" auf dem Lande für Entwicklungsländer eine hohe Bedeutung. Diese Minimalproduktion erlaubt nicht nur eine wirtschaftliche direkte Versorgung der Menschen mit Fisch, sondern sie kann gleichzeitig auch den Lebensstandard erhöhen. In Guatemala erwies sich dieses "integrated lifestock fish production"-Konzept für die Bauern günstiger als die reine Geflügelhaltung. Ihr Einkommen stieg um 17%, wenn sie 40% der jährlichen Fischproduktion verkauften (ENGLE, 1997). Damit gewinnen Tilapien auch ökonomisch für die Landbevölkerung an Bedeutung.

Die am häufigsten in der Aquakultur eingesetzten Arten sind *O. niloticus, O. aureus* und männliche Monosexhybriden aus *O. niloticus* x O. *aureus* (PULLIN, 1991). Sie zeichnen sich durch ihr schnelles Wachstum aus und können wegen ihrer omnivoren Ernährungsweise unterschiedlichste Nahrungsquellen nutzen. *O. aureus* besitzt im Vergleich zu den übrigen Tilapien eine größere Kältetoleranz und ist besonders für die Haltung in Netzkäfigen geeignet. Die Kreuzung von *O. niloticus* x *O. aureus* liefert in der F1-Generation rein männliche Nachkommen (TREWAVAS, 1983). Dies ist für die Fischproduktion von besonderem Vorteil, da Männchen fast das gesamte Futter in Muskelmasse umsetzen. Bei Weibchen hingegen reduziert sich mit Eintritt in die Geschlechtsreife das Muskelwachstum, da ein Großteil der Energie in die Produktion von Eiern geht. Die Hälterung rein männlicher Linien ist daher wirtschaftlicher, nicht zuletzt auch für die anschließende maschinelle Weiterverarbeitung der Fische (einheitliche Körpergröße).

1.4. Introgression von Tilapien

Die Tatsache, daß Tilapien sowohl schmackhafte, als auch euryöke Fische sind, die sich unter den verschiedensten Umweltbedingungen fortpflanzen, hat dazu geführt, daß diese Buntbarsche schon frühzeitig aus ihren ursprünglichen Verbreitungsgebieten verschleppt und in neue, zuvor von diesen Arten oder Populationen nicht besiedelte Gewässer, eingesetzt wurden. Nach TREWAVAS (1983) wurde schon 1924 *O. niloticus* aus dem Edward-See in den Bunyoni-See eingeführt. Weitere Beispiele für die Introgression von Tilapien in Afrika durch den Menschen finden sich bei AGNESE (1998) und TREWAVAS (1983).

HUET (1972, zit. n. OBERST, 1990) führt an, daß die ostafrikanische Art *Oreochromis mossambicus* seit 1939 in Indonesien kultiviert wird und sich von dort über den gesamten indopazifischen Raum ausgebreitet hat. Wann und wie diese Fische nach Asien gelangt sind, ist unbekannt. Von dort oder von Afrika erreichten die Tilapien dann auch Zentral- und Südamerika (THYS, 1989 pers. com. zit. n. OBERST, 1990).

Heutzutage sind die Tilapien weltweit in den Tropen verbreitet mit der Konsequenz der irreversiblen Verfälschung der ursprünglichen Ichthyofauna. Sofern noch keine genetischen oder ethologischen Reproduktionsbarrieren ausgebildet sind, bilden normalerweise geographisch getrennte Tilapienarten fertile Nachkommen (TREWAVAS, 1983). Es kommt zur Vermischung des natürlichen Genpools zweier oder mehrerer Arten. Neben dem Verlust der genetischen Vielfalt und den ökologischen Folgeschäden tritt ein weiteres Problem auf. Die Hybriden nehmen hinsichtlich ihrer Merkmalsausprägung eine intermediäre Stellung zwischen den beiden Elternarten ein (AVTALION & WOJDANI, 1971). Solche Hybridisierungsphänomene erschweren zusätzlich die Artbestimmung von Tilapien. Dies gilt insbesondere für juvenile Individuen, denn Tilapien besitzen, wie alle afrikanischen Cichliden, eine enorme morphologische Veränderungen ermöglichen es ihnen, neue ökologische Nischen zu erschließen. Deshalb ist es sehr schwierig, anhand morphologischer Charakteristika die verwandtschaftlichen Beziehungen eindeutig zu klären bzw. einzelne Spezies sicher zu identifizieren.

Mit 33 Arten und 18 Unterarten zeigen die Vertreter der Gattung *Oreochromis* schon natürlicherweise eine sehr große morphologische Variabilität und eine entsprechende intragenerische Ähnlichkeit. So lassen sich die Männchen von *O. mossambicus* und *O. spilurus* außer in ihrer geographischen Verbreitung einzig an der Balzfärbung unterscheiden (TREWAVAS, 1983). Werden beide Spezies durch den Menschen zusammengebracht, können die Männchen anhand äußerer Merkmale nicht mehr unterschieden werden.

Generell zeichnen sich die wirtschaftlich genutzten Tilapienarten durch eine hohe morphologische Übereinstimmung aus und überlappen teilweise in ihren differenzierenden Kriterien (OBERST et al., 1992; THYS VAN DEN AUDENAERDE, 1971; TREWAVAS, 1983). Durch Introgression fremder Arten und Populationen und den damit verbundenen Hybridisierungsphänomenen wird eine sichere Artbestimmung einzelner Arten anhand meristischer und morphologischer Merkmale nahezu unmöglich und bleibt im wesentlichen ausgewiesenen Taxonomen vorbehalten.

Für die gezielte Züchtung ertragreicher Aquakulturformen, die Überprüfung der genetischen Identität und Reinheit der Zuchtarten sowie zur nachhaltigen Nutzung der natürlichen genetischen Fischressourcen ist jedoch eine zweifelsfreie Artidentifizierung unerläßlich.

1.5. Bestimmung von Tilapienarten mittels Komponenten des Blutes

Seit Mitte der 80er Jahre beschäftigt sich die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Villwock zusammen mit Prof. Dr. Renwrantz am Zoologischen Institut und Zoologischen Museum der Universität Hamburg mit der Artbestimmung bei Tilapien. Im Zentrum der Untersuchungen stehen die verschiedenen Komponenten des Blutes. Die Nutzung von Tilapienblut als Ausgangsmaterial für die Artcharakterisierung hat den Vorteil, daß die Fische für die Untersuchung nicht getötet werden müssen, sondern anschließend für die Zucht weiter verwendet werden können. Dabei zeigen Blutplasma, Erythrozyteninhaltsstoffe und die Erythrozytenoberfläche artspezifische Merkmale.

1.5.1. Blutplasma

Die Auftrennung der Blutplasmaproteine von *Oreochromis aureus, O. niloticus und S. galilaeus* zeigt sowohl in der Nativ-, als auch in der SDS-Gelelektrophorese eine große Bandenzahl an. Einige der aufgetrennten Polypeptide sind dabei charakteristisch für die jeweilige Art (OBERST et al., 1992). Die hohe Anzahl der Proteinbanden erschwert jedoch den Artenvergleich. Mit Lektinen und Anti-Tilapienplasma-Antiseren können die drei Spezies im Western-Blot zwar eindeutig unterschieden werden (OBERST, 1990; OBERST et al., 1992), doch ist diese Methode sehr zeitaufwendig.

Anhand hitze- und ethanolresistenter Plasmaproteine lassen sich *O. niloticus*, *S. galilaeus*, *S. melanotheron* und *T. guineensis* dagegen leicht elektrophoretisch von einander abgrenzen (OBERST et al., 1992/93). Der Vorteil der Hitze- und Ethanolbehandlung liegt in der Bandenreduktion. Die verbleibenden Proteine erlauben ohne zusätzliche methodische Verfahren eine Differenzierung. Dadurch wird die Artidentifizierung wesentlich vereinfacht.

1.5.2. Hämoglobine und Globinketten

Neben dem Blutplasma bieten die roten Blutkörperchen eine weitere Möglichkeit, Tilapien zu bestimmen. Hierfür eignen sich sowohl die Erythrozytenoberfläche, als auch die Erythrozyteninhaltsstoffe. Hauptbestandteil der roten Blutkörperchen ist das Hämoglobin. Erste Untersuchungen von OBERST et al. (1989) und OBERST (1990) zeigten, daß sich Oreochromis aureus, O. niloticus und S. galilaeus in ihren Hämoglobinen unterscheiden. Weitergehende Analysen des roten Blutfarbstoffes durch FALK (1994) und FALK et al. (1998) zeigten, daß Tilapienerythrozyten zwischen 22 und 26 verschiedene tetramere Hämoglobine besitzen, die in der isoelektrischen Fokussierung ein artspezifisches Bandenmuster für O. aureus, O. niloticus, O. andersonii, O. mossambicus, S. galilaeus, S. melanotheron, T. busumana, T. discolor und T. zillii ergeben. Diese Tetramere setzen sich aus heterogenen α - und β -Globinketten zusammen, anhand derer sich in der sauren Harnstoffgelelektrophorese mit und ohne Triton X-100 wiederum eine eindeutige Artbestimmung durchführen läßt (FALK, 1994; FALK et al. 1994, 1996, 1998). Lediglich Tilapia dageti und Tilapia guineensis können über ihre Hämoglobine und Globinketten nicht voneinander unterschieden werden (FALK et al., 1996, 1998). Die Analyse von Tilapienhämoglobinen und Globinketten ist ebenfalls geeignet sowohl Hybriden, als auch Unterarten zu identifizieren und erlaubt populationsgenetische Untersuchungen (FALK et al., 1998, 1999).

1.5.3. Erythrozytenoberfläche

Gegenüber der Analyse der Erythrozyteninhaltsstoffe ist der Nachweis artspezifischer Oberflächenmoleküle auf den roten Blutkörperchen im Agglutinationstest ein einfaches Verfahren. OBERST et al. (1988) haben das Bindungsvermögen von 26 Lektinen (Kohlenhydrat bindende Proteine) an unbehandelten sowie enzymbehandelten Erythrozyten von *O. aureus*, *O. niloticus* und *S. galilaeus* untersucht. Lediglich die roten Blutkörperchen von *O. aureus* werden nach Neuraminsäureabspaltung durch das Weinbergschneckenlektin HPA agglutiniert. Dadurch läßt sich diese Art eindeutig von *O. niloticus* und *S. galilaeus* abgrenzen. *S. galilaeus* kann durch die Kombination verschiedener Lektine identifiziert werden.

Mittels des Sojabohnenlektins ist eine einfache Unterscheidung von *Tilapia zillii* von den morphologisch sehr ähnlichen Arten *T. dageti* und *T. guineensis* möglich. Denn nur die roten Blutkörperchen von *T. zillii* werden mit SBA agglutiniert (OBERST et al., 1996). Auch *S. melanotheron* kann durch die Agglutination seiner Erythrozyten mit LPA und RCA₁₂₀ von sieben anderen Tilapienarten unterschieden werden (RENWRANTZ et al., 1997).

Außer Lektinen sind auch in Tilapien gegen xenogene Tilapienerythrozyten gezogene Antiseren zur Artdifferenzierung geeignet (OBERST et al. 1989; OBERST 1990, PRELLE, 1999). OBERST (1990) verwendet sowohl unbehandelte, als auch enzymbehandelte, rote Blutkörperchen als Immunogen und stellt fest, daß die nativen Erythrozyten artspezifische Oberflächenmoleküle von hoher Antigenität besitzen. Die Agglutinationsversuche mit den verschiedenen Antiseren lassen weiterhin den Schluß zu, daß *O. aureus* und *O. niloticus* untereinander eine größere immunologische Übereinstimmung zeigen als gegenüber *S. galilaeus* (OBERST et al. 1989; OBERST 1990).

Hinweise auf die nähere immunologische Verwandtschaft zwischen den beiden *Oreochromis*-Arten belegen auch die Ergebnisse von OBERST & VILLWOCK (1993). Hier reagieren drei von sechs in *O. aureus* gegen allogene Erythrozyten, also rote Blutkörperchen der gleichen Art, gezogene Antiseren ebenfalls mit Erythrozyten aus *O. niloticus*. Die allogenen Immunisierungen von *O. aureus* und *O. niloticus* zeigen außerdem die Existenz von fünf bzw. sieben Isoantigenen auf den roten Blutkörperchen dieser Tilapien an. Die Erythrozyten tragen also unterschiedliche Blutgruppenmerkmale (OBERST & VILLWOCK, 1993).

PRELLE (1999) hat ebenfalls durch Kreuzimmunisierung und anschließender Absorption mit xenogenen Tilapienerythrozyten artspezifische Antiseren gegen rote Blutkörperchen aus *O. aureus, O. niloticus, O. mossambicus, S, galilaeus* und *S. melanotheron* erhalten. Neben den artspezifischen Antigenen besitzen alle untersuchten Arten auch zwischen zwei und fünf gemeinsame Determinanten.

Eine wesentliche Eigenschaft der von PRELLE (1999) gezogenen Antiseren ist, daß auch mit ungewaschenen Vollblutproben eine Artbestimmung im Agglutinationstest durchgeführt werden kann. Die Antiseren verlieren darüber hinaus selbst nach einer viermonatigen Lagerung bei 35°C kaum an Aktivität. Beides sind Voraussetzungen für die Entwicklung eines immunologischen Schnelltests, der auch unter tropischen Feldbedingungen funktionieren soll.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Den vorstehenden Ausführungen zufolge sind Erythrozyten sehr gut zur Differenzierung von Inhalt, Tilapienarten geeignet. Sowohl ihr das Hämoglobin, als auch die Erythrozytenmembran enthalten artspezifische Merkmale. Bei den Hämoglobinen lassen sich diese auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Tetramere aus verschiedenen α - und β -Globinketten zurückführen (FALK, 1994). Bis auf den Nachweis von N-Acetylneuraminsäure und N-Acetylglukosamin als frei zugängliche, terminale Sacchariddeterminanten sowie Galaktose und N-Acetylgalaktosamin als subterminale Kohlenhydratreste (OBERST et al., 1988) ist die Erythrozytenmembranen der Tilapien jedoch bisher nicht näher charakterisiert worden.

Eine Literaturrecherche in verschiedenen Datenbanken (ASFA, Biosis, Current Contents, Medline) hat ergeben, daß generell kaum Informationen über die Zusammensetzung und den Aufbau der Erythrozytenmembranen von Knochenfischen vorliegen. Zwar gibt es einige wenige elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Ultrastruktur der roten Blutkörperchen aus Austernfischen (FAWCETT, 1959; FAWCETT & WITEBSKY, 1964), Goldfischen (WEINREB & WEINREB, 1965; COHEN, 1978) und Aalen (KREUTZMANN & JONAS, 1978). Angaben über die Zusammensetzung der Plasmamembran von Teleosteererythrozyten sind allerdings nicht bekannt.

WARREN et al. (1979) haben die Zusammensetzung der roten Blutkörperchen des Glatthaies *Mustelus canis* analysiert. Die Zellmembran besteht zu 53,5 % aus Proteinen, zu 40,5 % aus Lipiden und zu 6,0% aus Kohlenhydraten. Sie weicht damit nicht wesentlich von Humanerythrozytenmembranen ab. Den Hauptanteil der Kohlenhydrate bilden D-Galaktose und D-Mannose. Dann folgen N-Acetylneuraminsäure, N-Acetylglukosamin, L-Fucose und N-Acetylgalaktosamin. Im Vergleich zu den Membranen der roten Blutkörperchen aus Säugetieren fällt der hohe Mannosegehalt sowie der geringe Anteil an N-Acetylgalaktosamin auf. (WARREN et al., 1979). $31,1 \pm 4,0\%$ der Sialinsäure ist an Glykolipide gebunden, wovon etwa Zweidrittel durch *Vibrio cholerae*-Neuraminidase abgespalten werden können. In ihrer Aminosäure- und Lipidzusammensetzung (31,56 % Neutrallipide, 66,14 % Phospholipide sowie 2,3 % andere Lipide) ähnelt die Plasmamembran der roten Blutkörperchen aus *Mustelus canis* der von Säugererythrozyten (WARREN et al., 1979).

Über den Membranaufbau der Teleosteererythrozyten ist -wie zuvor erwähnt- bisher nur sehr wenig bekannt. In den Arbeiten von ROWLEY et al. (1988) und GLOMSKI et al. (1992) über Fischerythrozyten gibt es keinerlei Informationen über die Erythrozytenmembran der Knochenfische. Auch COHEN (1991) geht in seiner Übersicht über das Zytoskelett der kernhaltigen, roten Blutkörperchen nicht näher auf die Membran der Teleosteererythrozyten ein. Bisher sind nur zwei Erythrozytenmembranproteine bei Knochenfischen, nämlich der Anionenkanal (HÜBNER et al., 1992; MICHEL & RUDLOFF, 1989; MOTAIS et al., 1992; ROMANO & PASSOW, 1984) und der Na⁺/H⁺-Austauscher aus Forellen (MALAPERT et al., 1998; VAN NORREN et al., 1997) charakterisiert worden. CASSOLY et al. (1989) und MICHEL & RUDLOFF (1989) haben die Polypeptide der Erythrozytenmembran von *Salmo gairdneri* aufgetrennt, ohne jedoch einzelne Banden genauer zu charakterisieren

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß es bisher keine weitergehende Übersicht und Analyse der Erythrozytenmembranproteine von Knochenfischen gibt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Membranen der roten Blutkörperchen aus *O. aureus, O. niloticus, O. mossambicus, S. galilaeus und S. melanotheron* zu isolieren, näher zu identifizieren bzw. zu charakterisieren und soweit möglich, mit den bisherigen Untersuchungen zur Erythrozytenoberfläche der Tilapien zu vergleichen. Darüber hinaus soll überprüft werden, ob die Erythrozytenmembran noch weitere artspezifische Merkmale enthält, die einen zusätzlichen intra- respektive intergenerischen Vergleich zu lassen.

Desweiteren werden die Ergebnisse über die Erythrozytenmembranen der Tilapien soweit möglich mit entsprechenden Untersuchungen bei anderen Wirbeltieren verglichen. Aufgrund der Vielzahl der Arbeiten bilden hierbei die Mammalia, allen voran der Mensch, den Schwerpunkt. Damit bietet sich aber auch die Gelegenheit, den Aufbau der roten Blutkörperchen unter stammesgeschichtlichen Aspekten zu erörtern. Stellen doch die Osteichthyes neben den Chondrichthyes die untersten Vertreter der Euvertebraten, während die Mammalia am Ende der Wirbeltierevolution stehen.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Fische

Über die Arten und Unterarten von Tilapien, die im Rahmen der Untersuchungen verwendet werden, gibt Tabelle 1 Auskunft.

Tabelle 1: Herkunft und Anzahl der in den Versuchen eingesetzten Tilapien.

Art (mit Abkürzung)	Anzahl	Herkunft
Oreochromis aureus (Oa)	12	Universität Sterling, Schottland
Oreochromis mossambicus (Om)	4	Institut für Angewandte Botanik, Hamburg
Oreochromis n. niloticus (On)	10	Bundesforschungsanstalt für Fischerei
Oreochromis n. niloticus (On)	9	Universität Sterling, Schottland
O. n. eduardianus (On)	3	River Ruzizi, Burundi (Wildfänge)
O. n. sugutae (On)	3	River Suguta, Kenia (Wildfänge)
Sarotherodon galilaeus (Sg)	5	Bundesforschungsanstalt für Fischerei
Sarotherodon melanotheron (Sm)	8	River Densu (Mündung), Ghana (Wildfänge)

Neben Wildfängen mit bekannter Herkunft (s. Tab. 1) wurden auch Fische aus Nachzuchten oder Importen verwendet. Die von der Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Außenstelle Ahrensburg, stammenden *Oreochromis niloticus* sind Nachzuchten von Tieren, die aus Zaire importiert wurden. *Oreochromis aureus* hingegen ist eine F1-Generation, deren Elterntiere aus Israel kommen. Von dort stammen auch die *Sarotherodon galilaeus*. Über die ursprüngliche Herkunft der anderen Tilapien, die von der Universität Sterling und dem Institut für Angewandte Botanik der Universität Hamburg zur Verfügung gestellt wurden, liegen keine Informationen vor.

Für die Untersuchungen werden jeweils Proben verschiedener Fische einer Art, bei *O. niloticus* Proben der drei Unterarten vereint, um individuelle bzw. populationsspezifische Variationen möglichst auszuschließen. Die Abkürzung der Sammelprobe aus den drei verschiedenen *niloticus*-Subspezies lautet deshalb "On". Ein Vergleich der Membranen auf Unterartniveau findet nicht statt.

Gehalten werden die Fische im Zoologischen Institut und Zoologischen Museum der Universität Hamburg. Die Unterbringung erfolgt in Durchflußaquarienanlagen mit konstantem Wasserdurchsatz und externer Filteranlage als auch in herkömmlichen Einzel- oder Sammelbecken mit internen Kiesfiltern und Belüftung. Bei den Durchflußanlagen werden täglich 10% der Wasserenge automatisch ausgetauscht, während in den konventionellen Aquarien jede Woche 2/3 des Wasser gewechselt wird. Die Wassertemperatur in den Becken beträgt im Winter durchschnittlich 24°C und im Sommer 26°C.

Gefüttert werden die Tilapien mit einem schwimmfähigen Alleinfutter für Forellen und Karpfen: Kronen Fish FS 40 E (Kraftfutterwerke Wesel). Die Pellets bestehen nach Herstellerangaben aus: 40% Rohprotein, 8% Rohfett, 3% Rohfaser, 9,5% Rohasche und 2% Lysin.

2.2. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle eingesetzten Chemikalien von Merck und haben Analysenqualität. Das verwendete demineralisierte Wasser (A. demin.) wird von einer Millipore-Anlage produziert.

2.3. Blutabnahme

Zur schmerzfreien Blutabnahme werden die Fische mit Ethyl-4-aminobenzoat ("Benzocain") betäubt: auf 10 l Wasser kommen 10 ml einer 20% igen Ethyl-4-aminobenzoat-Lösung in Dimethylsulfoxid. Anschließend werden sie in nasse Papiertücher gewickelt, um ein Austrocknen der Kiemen zu verhindern und die Schleimschicht der Epidermis nicht stärker zu beschädigen. Das Blut wird über eine Luer-Lock-Spritze mit 0,9 mm Kanüle aus der Schwanzvene entnommen. Damit das Fischblut nicht gerinnt, werden in der Spritze ca. 50 μ l Heparin-Natrium-250.000 (ratiopharm) vorgelegt. Der Abstand zwischen den Blutentnahmen bei einem Einzeltier beträgt mindestens 1 Monat.

Für alle Blutentnahmen liegen Genehmigungen des Gesundheitsamtes, Fachdienst Gesundheitlicher Verbraucherschutz und Veterinärwesen, der Freien und Hansestadt Hamburg vor.

2.4. Isolierung der Erythrozyten

Erythrozytenwaschpuffer, 20 mM HEPES-Puffer, 310 ± 10 mOsm (GROTH et al., 1984): 4,766 g HEPES (SERVA)

- + 8,516 g NaCl
- + 900 ml A. demin.
- + 4 N NaOH ad pH 7,4

ad 11 A. demin.

55% ige isoosmotische Percoll-Lösung:

- 15,00 ml Percoll
- + 1,50 ml 1,5 M NaCl-Lösung
- + 10,77 ml Erythrozytenwaschpuffer
- = 27,27 ml 55% Percoll-Lösung

30% ige isoosmotische Percoll-Lösung:

- 3,0 ml 55% Percoll-Lösung
- + 2,5 ml Erythrozytenwaschpuffer
- = 5,5 ml 30% Percoll-Lösung

Durch Zentrifugation des heparinisierten Vollblutes für 10 Minuten bei 400g/4°C trennt man das Blutplasma von den Blutzellen ab. Um an den Zellen haftende Plasmareste zu entfernen, wird das Zellsediment noch dreimal in einem 4°C kalten Erythrozytenwaschpuffer pH 7,4 resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen.

Die störenden Leuko- und Thrombozyten werden durch eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll (Sigma, Deisenhofen) von den roten Blutkörperchen abgetrennt. Der Gradient besteht aus zwei übereinandergeschichteten, isoosmotischen Percoll-Lösungen unterschiedlicher Dichte: dem unteren 6 ml starken Trennkissen (55% Percoll) und dem darüberliegenden 1 ml starken Auftragskissen (30% Percoll).

500 μ l gewaschene Blutzellen werden in 500 μ l Erythrozytenwaschpuffer aufgenommen und vorsichtig auf das 30 % Percollkissen geschichtet. Der Dichtegradient wird dann für 20 Min bei 500g/4°C zentrifugiert und danach der Überstand abpipettiert. Die sedimentierten Erythrozyten werden zweimal in 50 ml Erythrozytenwaschpuffer resuspendiert und bei 300g/4°C abzentrifugiert, um das Percoll zu entfernen.

2.5. Reinheitskontrolle der gewonnenen Erythrozytenfraktion

Zur Überprüfung, ob sich Thrombo- und Leukozyten als Verunreinigung zwischen den isolierten, roten Blutkörperchen befinden, werden diese in Erythrozytenwaschpuffer mit 3% BSA (SERVA) aufgenommen, auf Objektträgern ausgestrichen und über Nacht luftgetrocknet. Die Blutzellen werden mit der panoptischen Färbung nach PAPPENHEIM (ROMEIS, 1968) identifiziert.

Hierzu werden die Ausstriche für 3 min mit May-Grünwald-Lösung (25 g May-Grünwald/100 ml Methanol) überschichtet. Danach gibt man das gleiche Volumen an abgekochtem A. demin. hinzu und gießt nach 1 min ab. Die Objektträger werden jetzt für 15-20 min mit verdünnter Giemsa-Lösung (1:38,5 in A. demin.) überschichtet und abschließend kurz mit abgekochtem A. demin. gespült. Die Zellen werden bei 100facher Vergrößerung betrachtet. Hierzu wird der Ausstrich an drei verschiedenen Stellen auf seiner gesamten Länge mikroskopiert.

2.6. Gewinnung von Fischerythrozytenmembranen

Lysepuffer, 10 mM HEPES, 5 mM MgCl₂·6 H₂O, pH 7,4:

2,383 g HEPES (SERVA)

- + 1,016 g $MgCl_2 \cdot H_2O$
- + 950 ml A. demin.
- + 4 N NaOH ad pH 7,4

ad 1000 ml A. demin.

Homogenisationspuffer pH 7,4:

- 50,0 ml Lysepuffer pH 7,4
- + 50,0 μ l 10 mM Pepstatin (SERVA, 7 mg / 1 ml Methanol)
- + 50,0 μ l 10 mM Leupeptin (SERVA, 5 mg / 1 ml A. demin.)
- + 500 μ l 100 mM Pefabloc SC (Merck, 100 mg / 4,172 ml A. demin.)

20%, 30% und 60% Saccharoselösung für die Dichtegradientenzentrifugation:

10/15/30 g Saccharose für die Dichtegradientenzentrifugation

ad 50 ml 0,9% NaCl

1 ml gewaschene Tilapienerythrozyten werden in 50 ml eiskaltem Lysepuffer (GROTH et al., 1984) resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Hierbei platzen die roten Blutkörperchen auf, wodurch ein Großteil des Hämoglobins freigesetzt wird. Die Zellen werden für 20 min bei 1400g/4°C sedimentiert und der hämoglobinhaltige Überstand abgesaugt. Das Erythrozytensediment wird in 10 ml eiskaltem Homogenisationspuffer aufgenommen. Durch die niedrige Temperatur und die im Puffer vorhandenen Proteaseinhibitoren soll ein proteolytischer Abbau der Membranproteine durch eventuell freigesetzte Proteasen während der Aufarbeitungsschritte unterbunden bzw. minimiert werden.

Die resuspendierten Erythrozyten werden dann in einem Homogenisator Typ Dounce (Kontes Scientific Glasware) auf Eis mit 2 x 50 Stößen homogenisiert. Die dabei auftretenden Scherkräfte zerreißen die Zellen, wodurch die Kerne und die zytoplasmatischen Bestandteile freigelegt werden. Der Zusatz von Kationen im Lysepuffer verhindert ein Anschwellen der Zellkerne und damit den Austritt von DNA (GRAHAM, 1992). Das Homogenat wird dann für 75 min bei 49.000g/4°C in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Kerne und das Zytoplasma werden dabei über einen Saccharose-Dichtegradienten von den Erythrozytenmembranen abgetrennt. Dieser Gradient besteht aus drei Schichten:

obere Schicht:	1 ml 15 % Saccharoselösung, Auftragskissen
mittlere Schicht:	8 ml 30 % Saccharoselösung, hält das Zytoplasma zurück
untere Schicht:	7 ml 60 % Saccharoselösung, trennt Kerne von Membranen
	(GRAHAM, 1992).

Zur Zentrifugation werden ultraclear-Gefäße (Beckman) verwendet, die aufgrund ihrer hohen Transparenz ein fast vollständiges Abpipettieren der angereicherten Plasmamembranen erlauben. Hierzu entfernt man zunächst mit einer langen Pasteurpipette das Hämolysat und saugt dann die Membranbande auf dem 60 %-Saccharosekissen ab.

Die gesammelten Membranfraktionen werden zweimal in 20 ml eiskalter 0,9 % NaCl-Lösung resuspendiert und für 30 min bei 49.000g/4°C abzentrifugiert, um die Saccharose und Hämoglobinreste weitestgehend herauszuwaschen. Nach Aliquotierung werden die Erythrozytenmembranen bei -70°C gelagert.

2.7. Gewinnung von Humanerythrozytenmembranen

Die Präparation von Humanerythrozyten erfolgt nach der Methode von DODGE et al. (1963). Hierzu werden A-Erythrozyten wie unter 2.3 beschrieben aus Eigenblut isoliert, mit eiskaltem Phosphatpuffer pH 7,4 auf Eis hämolysiert und dann für 30 min bei 49.000g/4°C abzentrifugiert. Nach Absaugen des hämoglobinhaltigen Überstandes werden die sedimentierten Zellmembranen noch 3-5x mit dem Phosphatpuffer gewaschen, um das Zytoplasma mit dem Hämoglobin weitestgehend zu entfernen. Die Erythrozytenmembranen werden bei -70° C gelagert.

2.8. Reinheitsbestimmung der gewonnenen Fischerythrozytenmembran

Um eine relative Aussage zu bekommen, wie rein die gewonnene Membranfraktion ist, muß der Anteil von Komponenten des Erythrozyteninhaltes bestimmt werden. Als Leitsubstanz für zytoplasmatische Verunreinigungen dient Hämoglobin, der Hauptbestandteil des Erythrozyten. Die Kontamination mit Zellkernen, den absolut und massenmäßig größten Organellen der roten Blutkörperchen von Fischen, wird durch eine DNA-Bestimmung nachgewiesen.

2.8.1. Nachweis von Hämolysat in der Membranfraktion

0,42 mM TMB in 0,1 M Acetat/Zitronensäure-Puffer pH 4,9:

- 1,261 g Na-Azetat $^{3}H_{2}O$
- + 90 ml A. demin.

+ Zitronensäure ad pH 4,9

ad 100 ml A. demin.

+ 13,16 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid (SIGMA) in DMSO

Reaktionslösung: 0,42 mM TMB-Lösung mit 0,004% H₂O₂

25 ml 0,42 mM TMB-Lösung

+ $100 \,\mu l$ 1 % H₂O₂-Lösung

Das Verfahren basiert auf der Peroxidase-Bestimmung mit Tetramethylbenzidin (TMB) von BOS et al. (1981). Wie Peroxidase ist auch Hämoglobin in der Lage, bei Anwesenheit von H_2O_2 TMB in ein farbiges Reaktionsprodukt umzuwandeln (Pseudoperoxidase-Aktivität). Die Farbintensität der umgesetzten TMB-Lösung ist dabei proportional zur Hämoglobinkonzentration (LIEM et al. 1979). Als Referenzsubstanz wird ein Hämolysatstandard herangezogen, der nach einer modifizierten Methode von FALK (1994) erstellt wird. Hierzu resuspendiert man1 ml Erythrozyten (s. 2.3) in 4 ml eiskaltem A. demin und zentrifugiert den Überstand für 1h bei 120.000g/4°C ab, um Organellen und Membranreste niederzuschlagen. Das so gewonnene Hämolysat wird 1+1 in 80% Glyzerin-PBS pH 7,4-Lösung aufgenommen und bei -20°C gelagert. Für den Hämoglobinnachweis wird dieser Standard 1:1000 mit A. demin verdünnt.

Pipettierschema

a)	Hämolysatstandard 1:1000	[µ1]:	5/ 10/ 15/ 20/ 25/ (jeweils im Doppelansatz)
+	A. demin.	[µ1]:	45/ 40/ 35/ 30/ 25/
+	Reaktionslösung	[µ1]:	jeweils 900 µl (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)
b)	Membranprobe	[µl]:	2
+	A. demin.	[µl]:	48
+	Reaktionslösung	[µl]:	900 (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen)

Die Ansätze werden für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 50 μ l 2 M Schwefelsäure gestoppt. Hierbei kommt es zu einem Farbumschlag der umgesetzten TMB-Substratlösung von blau nach gelb. Die Absorption wird bei 450 nm gegen den Blindwert (50 μ l A. demin. + 900 μ l Reaktionslösung + 50 μ l 2 M H₂SO₄) gemessen. Der Hämolysatgehalt in der Membranfraktion wird über die Gleichung der Regressionsgeraden des Standards berechnet.

2.8.2. Bestimmung des DNA-Gehaltes der Membranfraktion

Acetaldehyd-Lösung.:

- 1 ml Acetaldehyd (4°C)
- + 50 ml A. demin.

Diphenylamin-Reagenz:

- 1,5 g Diphenylamin
- + 100 ml Eisessig
- + 1,5 ml konzentrierte Schwefelsäure

Reaktionslösung (unmittelbar vor Gebrauch ansetzen):

- 20 ml Diphenylamin-Reagenz
- + 0,1 ml Acetaldehyd-Lösung

DNA-Standard (0,125 mg/ml DNA):

- 1 mg Calf Thymus DNA (SIGMA)
- + 4 ml 5 mM NaOH (zum Lösen der DNA)
- + 4 ml 1 N HClO₄

ad 70°C für 15 min

Der DNA-Gehalt der isolierten Erythrozytenmembranen wird nach der Diphenylamin-Methode (BURTON, 1968) bestimmt. 10 µl Fischerythrozytenmembranen werden mit A. demin. auf ein Endvolumen von 25 µl gebracht, dann 1+1 mit 1 N Perchlorsäure gemischt und für 15 min auf 70°C erhitzt, um die DNA zu extrahieren. Pipettierschema:

+

- a) DNA-Standard [µ1]: 5/ 10/ 25/ 50/100/150/ 250/ (doppelt angesetzt)
 - 0,5 N HClO₄ [μl]: 245/240/225/200/150/100/ ----/
- + Reaktionslösung [μl]: jeweils 500 μl
- b) Membranprobe [µl]: 50
- + 0,5 N HClO₄ [μl]: 200
- + Reaktionslösung [µ1]: 500

Die Ansätze werden für 18 Stunden bei 30° C im Wasserbad inkubiert und die Absorption bei 600 nm gegen den Blindwert (250 µl 0,5 N HClO₄+ 500 µl Reaktionslösung) gemessen. Der DNA-Gehalt der Proben wird über lineare Regressions der Eichgerade ermittelt.

2.9. Proteinbestimmung

BCA-Lösung:

	0	
	1 g	4,4´-Dicarboxy-2,2´-Biquinoline (BCA) Dinatriumsalz (SIGMA)
+	2 g	Na ₂ CO ₃
+	160 mg	Natriumtartrat
+	5 ml	2 N NaOH
+	950 mg	NaHCO ₃
+	70 ml	A. demin

+ 2 N NaOH ad pH 11,25

ad 100 ml mit A. demin. auffüllen

Kupfersulfatlösung:

4 g Cu_2SO_4 ad 100 ml A. demin.

Reaktionslösung:

100 Teile BCA-Lösung + 2 Teile Kupfersulfatlösung

BSA-Standardlösung (2µg/µl BSA):

200 mg BSA, Fraction V (SERVA) ad 100 ml A. demin.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den isolierten Erythrozytenmembranen erfolgt mit der BCA (Bicinchoninic Acid)-Methode (SMITH et al., 1985). Um eine möglichst genaue Proteinbestimmung zu erzielen, muß die Probe vollständig gelöst sein. Daher werden die Membranproben (3 μ l) mit A. demin. auf eine Volumen von 25 μ l gebracht, mit 25 μ l 2 % SDS-Lösung versetzt und für 30 min bei 36°C im Wasserbad inkubiert. Damit eine Beeinflussung der Absorption berücksichtigt werden kann, wird der BSA-Standard auch mit 2 % SDS versetzt. Jede Verdünnung wird doppelt angesetzt.

Pipettierschema:

- a) BSA-Standard [μ l]: 5/10/15/20/25/ (doppelt angesetzt)
- + A. demin. [μ l]: 20/ 15/ 10/ 5/ ---/
- + 2 % SDS-Lösung [μ l]: jeweils 25 μ l
- + Reaktionslösung [μl]: jeweils 1000 μl
- b) Membranprobe [µ1]: 50
- + Reaktionslösung [µ1]: 1000

Nach Zugabe der Reaktionslösung werden die Ansätze auf einem Whirlmix durchmischt und dann für 30 min bei 36°C im Wasserbad inkubiert. Die Absorption der Proben wird dann bei 592 nm gegen den Blindwert (50 μ l 1% SDS-Lösung + 1000 μ l Reaktionslösung bestimmt. Der Proteingehalt der Membranproben wird über die Gleichung der Regressionsgeraden des BSA-Standards ermittelt.

2.10. Bestimmung des Proteingehaltes im Trockengewicht

Zur Bestimmung des Proteinanteiles der Erythrozytenmembranen im Trockengewicht wird eine Membranfraktion zwei Tage bei 4°C gegen 3 l A. demin. dialysiert, um die Saccharose und Puffersalze zu entfernen. Das A. demin. wird dreimal am Tag gewechselt. Zum Dialysieren wird ein Visking-Schlauch (SERVA) mit einem durchschnittlichem Ausschlußvolumen von 30 kDa verwendet. Ein genau definiertes Volumen der dialysierten Membranen wird in ein Rollrandglas mit bekannter Masse überführt und gefriergetrocknet. Nach der Trocknung wird das Glasgefäß fünfmal gewogen, um das Trockengewicht der Membranen zu bestimmen. Von einem Aliquot der dialysierten Membransuspension wird der Proteingehalt bestimmt, woraus dann der Proteingehalt der gefriergetrockneten Probe ermittelt werden kann.

2.11. Saure Harnstoffgelelektrophorese

Bei diesem Elektrophoresesystem (FALK et al., 1996 modifiziert) werden die unter dissoziierenden Bedingungen (8 M Harnstoff und 5% Essigsäure) mit dem nichtionischen Detergenz Triton X-100 (Sigma) löslichen Membranproteine aufgetrennt. Im homogenen Gel ist das Trennkriterium die Eigenladung der Polypeptide, im Gradientengel ihr Molekulargewicht.

2.11.1. Saure Harnstoffgelelektrophorese im homogenen Gel (8%T, 1% C)

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (60%T/1%C): 29,7 g Acrylamid (SERVA) + 0,3 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid (SERVA) ad 50,0 ml A. demin.

12 M Harnstofflösung: 7,2 g Harnstoff ad 10,0 ml A. demin

60%-Ammoniumpersulfatlösung: 600 mg Ammoniumpersulfat + 1 ml A. demin.

Trenngellösung (8 %T, 1% C):

- 1,2 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
- + 6,0 ml 12 M Harnstofflösung
- + 0,750 ml Eisessig
- + 1,050 ml A. demin.
- + 25 µl Ammoniumpersulfatlösung
- + 25 µl TEMED

Sammelgellösung:

- 0,317 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
- + 3,667 ml 12 M Harnstofflösung
- + 0,250 ml Eisessig
- + 0,766 ml A. demin.
- + 50 µl Ammoniumpersulfatlösung
- + 25 µl TEMED

Probenpuffer:

- 3,50 ml 12 M Harnstoff-Lösung
- + 0,25 ml Eisessig
- + 0,40 ml 2-Mercaptoethanol
- + 0,10 ml TX-100
- + 0,75 ml A. demin.

Elektrodenpuffer:

50 ml Eisessig

+ 950 ml A. demin.

Die Gellösungen werden entgast und dann zunächst die Katalysatoren zur Trenngellösung hinzugegeben. 8 ml dieser Gellösung werden dann in die Gießkassette des Mini-Protean-II Systems (BIORAD) eingefüllt und mit A. demin. vorsichtig überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels (mind. 1 h), wird das Wasser abgegossen, der Probenkamm eingesetzt sowie die mit Katalysatoren versetzte Sammelgellösung eingefüllt. Wenn das Sammelgel fertig polymerisiert und der Kamm entfernt ist, werden die Taschen mit Elektrodenpuffer gespült.

Die Proben werden 1+1 in Probenpuffer resuspendiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend zentrifugiert man für 15 min bei 20.000 g. Der Überstand wird für 5 h bei 100 V aufgetrennt. Die Gelfixierung und -färbung verläuft wie bei SDS-Gelen.

2.11.2. Saure Harnstoffgelelektrophorese im 5-30% Gradientengel

In der sauren Harnstoffgradienten-PAGE (8M Harnstoff im Sammelgel, 2M im Trenngel) werden die Membranproteine für 2h/100V konstant und dann 12 h/200V aufgetrennt. Die eingesetzten Eichproteine sind in Tabelle 3 (Nr. 3-8) angegeben. Die Probenvorbereitung erfolgt wie in 2.11.1, die Molekulargewichtsbestimmung wie in 2.12.3 beschrieben.

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (60%T/1%C):

29,7 g Acrylamid (SERVA) + 0,3 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid (SERVA) ad 50.0 ml A, demin.

12 M Harnstofflösung:

7,2 g Harnstoff ad 10,0 ml A. demin.

60%-Ammoniumpersulfatlösung: 600 mg Ammoniumpersulfat + 1 ml A. demin.

60% Glyzerin:

60 ml Glyzerin ad 100 ml A. demin.

schwere Trenngellösung:

2,000 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

- + 1,000 ml 60% Glyzerin
- + 0,333 ml 100% Essigsäure
- + 0,667 ml 12M Harnstofflösung

+ 6,0 µl TEMED

+ 6,0 µl 60%-Ammoniumpersulfatlösung

leichte Trenngellösung:

- 0,333 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
- + 0,333 ml 100% Essigsäure
- + 0,667 ml 12M Harnstofflösung
- + 2,667 ml A. demin.

+ 6,0 µl TEMED

+ 6,0 µl 60%-Ammoniumpersulfatlösung

Sammelgellösung:

- 0,317 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
- + 3,667 ml 12 M Harnstofflösung
- + 0,250 ml Eisessig
- + 0,766 ml A. demin.
- + 50 µl Ammoniumpersulfatlösung
- + 25 μl TEMED

Um eine gleichmäßige Polymerisation zu gewährleisten, werden die Gellösungen zunächst für mindestens 15 min entgast. Vor dem Einfüllen der Trenngellösungen in den Gradientenmischer (Hoefer) wird TEMED hinzugefügt. Die Ammoniumpersulfatlösung kommt erst hinzu, wenn beide Kammern des Mischers gefüllt sind. Nach dem Gießen des Gradienten wird das Gel vorsichtig mit A. demin. überschichtet und mindestens eine Stunde zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Anschließend wird das Wasser abgegossen, der Probenkamm eingesetzt und die mit den Katalysatoren versehene Sammelgellösung eingefüllt (Höhe des Sammelgels 3-6 mm). Wenn das Sammelgel auspolymerisiert sowie der Probenkamm entfernt ist, werden die Taschen mit Elektrodenpuffer mehrmals gespült, um eventuell nicht auspolymerisierte Reste der Gellösung auszuwaschen.

2.12. Diskontinuierliche SDS-Polyarcylamidgradientengelelektrophorese

Zur Analyse und Molekulargewichtsbestimmung der Membranproteine werden diese unter denaturierenden Bedingungen in einer diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach LAEMMLI (1970, modifiziert) aufgetrennt. Aufgrund der besseren Auflösung der unterschiedlich schweren Proteinbanden (ca. 15-240 kDa) wird ein 5-15 % Polyacrylamidgradientengel für die elektrophoretische Auftrennung verwendet (FAIRBANKS et al., 1988). Das Gießen der Gradientengele erfolgt wie unter 2.11.2 beschrieben. Die Elektrophoresen werden in einem Mini-Protean-II System (BIORAD) durchgeführt.

Sammelgelpuffer, 4x konzentriert:

- + 0,40 g SDS (ICN)
- + 80 ml A. demin.
- + 4 N HCl ad pH 6,8

ad 100 ml A. demin

Trenngelpuffer, 4x konzentriert:

23,64 g Tris (ICN) + 0,4 g SDS (ICN) + 80 ml A. demin. + 4 N HCl ad pH 8,8 ad 100 ml A. demin. Acrylamidlösung (40% T, 3% C): Plus one ReadySol IEF Fertiggellösung (Pharmacia)

Ammoniumpersulfatlösung (Per): 400 mg Ammoniumpersulfat + 1 ml A. demin.

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (SERVA)

10 % SDS-Probenpuffer pH 6,8: 1,25 ml Sammelgelpuffer + 1 g SDS (ICN) ad 10 ml A. demin.

10 % SDS/5 % ME-Probenpuffer pH 6,8: 950 μl 10 %-SDS-Probenpuffer + 50 μl 2-Mercaptoethanol (ME)

Bromphenolblaulösung:

- 8 ml Glyzerin
- + 1 ml 1 % Bromphenolblau in A. demin.
- + 1 ml A. demin.

Elektrodenpuffer pH » 8,3:

4,03 g Tris (ICN) + 14,4 g Glycin (ICN)

+ 1 g SDS (ICN)

ad 11A. demin.

Tabelle 2: Pipettierschema für ein 5-15%-Gradientengel.

Reagenzien	leichte Trenngellösung	schwere Trenngellösung	Sammelgellösung
ReadySol IEF	0,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
Trenngelpuffer	1,0 ml	1,0 ml	
Sammelgelpuffer			1,0 ml
60 % Glyzerin		1,0 ml	
A. demin.	2,5 ml	0,5 ml	2,5 ml
TEMED	2,0 µl	2,0 µl	5,0 µl
Per	4,0 µl	4,0 µl	10,0 µ1

2.12.1. Probenvorbereitung und Trennbedingungen

Die Membranproben von Tilapien- und Humanerythrozyten (Proteingehalt: $50 \pm 2 \mu g$) werden 1+1 mit Probenpuffer versetzt und dann für 30-45 min bei 40°C im Wasserbad inkubiert (SCHÄGGER, 1994). Als Kontrolle für zytoplasmatische Verunreinigungen wird eine Hämolysatprobe mit aufgetrennt, deren Hämoglobinkonzentration doppelt so hoch ist, wie der höchste in den Tilapienmembranproben gemessene Hb-Gehalt.

Zur Molekulargewichtsbestimmung laufen 5 µl des Eichproteinstandards "Calibration Kit for Electrophoresis, High Molecular Weight" (Pharmacia) sowie 1 µl β -Galaktosidase [1mg/ml]

(Sigma) und 1 μ l α -Lactalbumin [1mg/ml] (Sigma) in einer Tasche mit. Kontrolle und Eichproteine werden genauso wie die Membranproben vorbereitet. Nach der Inkubation werden die Proben zum Beschweren mit 5 μ l Bromphenolblau-Glyzerin-Lösung gemischt und mit Kapillarspitzen in die Geltaschen gefüllt. Das Auftragsvolumen beträgt 15 μ l.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 100 V konstanter Spannung im Sammelgel und 200 V konstanter Spannung im Trenngel. Zur Kühlung steht die Kammer in einem Eisbad. Die Elektrophorese wird kurz vor Austreten der Bromphenolblaubande abgebrochen.

2.12.2. Gelfixierung und Proteinfärbung

12,5% TCA: 125 g Trichloressigsäure (TCA) ad 1 l A. demin.

0,2% Coomassie-Stammlösung:

- 20 g Coomassie Brilliant Blue G250 (SERVA)
- + 900 ml Methanol
- + 100 ml A. demin.

20 % Essigsäure

Färbelösung (0,1% Coomassie Brilliant Blue G250 in 45% Methanol/10% Essigsäure)

- 1 Teil Coomassie-Stammlösung
- + 1 Teil 20% Essigsäure

Zum Fixieren der Proteinbanden wird das Gel für mindestens 1h in 12,5 % Trichloressigsäure auf einem Schüttler inkubiert. Die Färbung erfolgt über Nacht in der frisch angesetzten Färbelösung. Entfärbt wird das Gel durch mehrmaliges Waschen in 20% Essigsäure bis der Hintergrund klar ist.

2.12.3. Molekulargewichtsbestimmung

Zur Molekulargewichtsbestimmung werden Eichproteine (EP) bekannter Größe eingesetzt. Trägt man die rf-Werte (rf-Wert: Laufstrecke der Proteinbande/Gesamttrennstrecke) der Standardproteine gegen den dekadischen Logarithmus ihrer Molekulargewichte auf, erhält man eine Eichgerade. Die relativen Molekulargewichte der aufgetrennten Membranproteine lassen sich anhand ihrer rf-Werte aus der linearen Regression der Eichgeraden berechnen. Weil sich bei der geringen Größe der Gele (55 x 80 x 1,5 mm) Meßfehler sehr stark auswirken, werden die rf-Werte nicht direkt vom Gel, sondern anhand von 20x30 cm großen Gelfotos ermittelt.

	r i i i i i i i i i i i i i i i i i i i	
Eichprotein	Molekulargewicht (MW)	log MW
1. Thyreoglobulin Untereinheit	330 kDa	5,519
2. Ferritin, große Untereinheit	220 kDa	5,342
3. β-Galaktosidase	116 kDa	5,064
4. Rinderserumalbumin (BSA)	67 kDa	4,826
5. Katalase	60 kDa	4,778
6. Lactatdehydrogenase	36 kDa	4,556
7. Ferritin, kleine Untereinheit	18,5 kDa	4,267
8. α-Lactalbumin	14,4 kDa	4,158

Tabelle 3: Molekulargewichte der verwendeten Eichproteine.

2.13. Elektrotransfer von Proteinen aus PAGE-Gelen auf PVDF-Membranen

Für weitere Analysen müssen die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Membranproteine auf eine Trägerfolie überführt werden, um sie z. B. Antikörpern oder Lektinen zugänglich zu machen. Der Transfer erfolgt im Tankblotverfahren in einem Mini-Protean II System (BIO RAD). Als proteinbindende Trägermatrix dient eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran mit 0,22 µm Porendurchmesser (BIO RAD).

Transferpuffer pH 8,3 (25 mM Tris,192 mM Glycin): 3,03 g Tris (ICN) + 14,40 g Glycin (ICN) ad 1 1 A. demin.

100% Methanol

50mM TBS-Puffer pH 7,4: 6,060 g Tris (ICN) + 4,383 g NaCl + 950 ml A. demin. <u>+ 4 N HCl ad pH 7,4</u> ad 1 l A. demin.

BSA-Blockierungslösung (5 % BSA in 50mM TBS pH 7,4): 1,00 g BSA (SERVA) + 0,02 g NaN₃ ad 20 ml TBS pH 7,4

Die Kunstfasermatten des Mini-Protean II-Systems sowie die auf Gelgröße zugeschnittenen GB 004-Filterpapiere (Schleicher & Schuell) werden im Transferpuffer vorinkubiert. Zum Zusammenbau wird der Kunststoffrahmen aufgeklappt und auf die untere, schwarze Hälfte eine Fasermatte und ein Filterpapier gelegt. Nun folgt das Polyacrylamidgel. Die PVDF-Membran wird zur Benetzbarkeit kurz in Methanol getaucht und dann luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Abschließend folgen wieder ein puffergetränktes Filterpapier sowie die zweite Fasermatte. Durch Zusammenklappen des Rahmens werden die einzelnen Lagen fest aneinander gepreßt und können in der Tank-Blot-Kammer nicht mehr verrutschen. Der Elektrotransfer findet entsprechend der Empfehlung des Herstellers bei 100 V/250 mA für eine Stunde statt. Nach Abschluß des Transfers wird der für Antikörper- oder Lektininkubation vorgesehene Teil der PVDF-Membran über Nacht in einer 5 % BSA-Lösung inkubiert. Dadurch werden alle noch freien Membranbereiche, die Protein binden könnten, mit BSA abgesättigt.

2.14. Coomassiefärbung von PVDF-Membranen

Zur Anfärbung der Eichproteine und der transferierten Membranproteine wird die PVDF-Membran für 5 min mit einer 0,05% Coomassie G-250-Lösung in 90% Methanol/10% Essigsäure überschichtet. Entfärbt wird in 50% Methanol.

2.15. Solubilisierung von Membranproteinen mit Triton X-100

Während das anionisches Detergenz SDS zur vollständigen Solubilisierung der Membranproteine führt, lassen sich mit Triton X-100 (TX-100), einem nichtionischen Detergenz, integrale (intrinsische) Membranproteine herauslösen, während periphere (extrinsische) Polypeptide im Membran- oder Zytoskelett verbleiben.

10 μ l Erythrozytenmembranen werden mit 20 μ l 2% TX-100 in Sammelgelpuffer gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die unlöslichen Membranbestandteile werden für 15 min bei 20.000g abzentrifugiert und der Überstand (TX-lösliche Fraktion) abpipettiert. Um noch vorhandene lösliche Anteile herauszuwaschen, wird das Sediment (TX-unlösliche Fraktion) erneut in 100 μ l 2% TX-100 resuspendiert und wie beschrieben abgetrennt. Der nach der ersten Detergenzinkubation gewonnene Überstand wird ebenfalls noch einmal für 15 min bei 20.000g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile niederzuschlagen.

Beide TX-Fraktionen werden mit A. demin. auf das gleiche Volumen gebracht, 1+1 mit SDS/ME-Probenpuffer versetzt und wie unter 2.12.1 beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt.

2.16. Nachweis von Glykoproteinen mit Perjodsäure-Schiffs Reagenz (PAS)

Die PAS (Periodic Acid Schiffs Reagenz)-Färbung ist ein unspezifischer Nachweis von Glykoproteinen. Durch die Oxidation des Kohlenhydratanteils mit Perjodsäure werden die Hydroxylgruppen der Zuckermoleküle in Aldehydgruppen überführt, die dann mit dem Schiffs Reagenz einen roten Farbstoff bilden.

2.16.1. PAS-Färbung von SDS-Gelen

Fixierlösung I: 400 ml Methanol + 50 ml Eisessig ad 1 l A. demin.

Oxidationslösung (0,7 % Perjodsäure in 5% Essigsäure),vor Gebrauch ansetzen: 700 mg Perjodsäure + 5 ml Eisessig ad 100 ml A. demin.

Reduktionslösung (0,2% Natriumhydrogensulfit): 0,5 ml 39% Natriumhydrogensulfitlösung

+ 97 ml 5% Essigsäure

Schiffs Reagenz für die Mikroskopie

Fixierlösung II: 200 mg Kaliumdisulfit <u>+ 40 ml A. demin.</u> ad 100 ml A. demin.

Die über Nacht fixierten SDS-Gele werden für die PAS-Färbung zunächst 3 Stunden in der Oxidationslösung auf einem Schüttler inkubiert und anschließend weitere 3 Stunden in einer 0,2% Natriumhydrogensulfitlösung gelagert. Zur Färbung wird das Gel dann für mindestens 18 Stunden in Schiffs Reagenz überführt. Daran schließt sich für 1,5 h eine Nachfixierung an. Entfärbt wird mit 40% Methanol/5% Essigsäure.

2.16.2. PAS-Färbung von Blots

Oxidationslösung (0,2% Perjodsäure): 200 mg Perjodsäure + 100 ml A. demin. Reduktionslösung I (0,2% Natriumhydrogensulfit):

0,5 ml 39% Natriumhydrogensulfitlösung

+ 97 ml 5% Essigsäure

Schiffs Reagenz für die Mikroskopie

Reduktionslösung II:

- 0,5 ml 39% Natriumhydrogensulfitlösung
- + 40 ml Methanol
- + 5,0 ml Eisessig

ad 100 ml A. demin.

Zur PAS-Färbung von PVDF-Membranen (WAN & VAN HUYSTEE, 1993) werden die Blotfolien zunächst für 45 min in 0,2% Perjodsäure und dann für 10 min in 0,2% Natriumhydrogensulfit inkubiert. Gefärbt wird 1 h in Schiffs Reagenz, gefolgt von einer Inkubation in der Reduktionslösung II für 10 min. Entfärbt wird mit 50% Methanol.

2.17. Kopplung der Erythrozytenoberfläche mit Sulfobiotin-X-NHS

Kopplungspuffer 310 mosmol, pH 8,0:

0,336 g KH₂PO₄

+ 9,464 g Na₂HPO₄ + 5,070 g NaCl

ad 11A. demin.

Sulfobiotin-X-NHS-Lösung:

4,5 ml Kopplungspuffer

+ 50 mg Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-hexonate (CALBIOCHEM)

Phosphatpuffer (PBS) 310 mOsm, pH 7,4:

1,82 g KH₂PO₄

+ 9,50 g Na₂HPO₄

+ 5,15 g NaCl

ad 11A. demin.

Durch die Biotinilierung intakter Tilapienerythrozyten lassen sich Moleküle auf der Zelloberfläche markieren und nach der elektrophoretischen Auftrennung im Blot mit Streptavidin spezifisch nachweisen. Das hier beschriebene Verfahren basiert auf den Angaben von GODING (1996) sowie ALTIN & PAGLER (1995).

Zur Kopplung werden über Percollgradienten isolierte und gewaschene, rote Blutkörperchen (s. 2.4) verwendet. 2 ml Erythrozytensediment werden in 4,5 ml isoosmotischem Kopplungspuffer pH 8,0 resuspendiert und bei Raumtemperatur leicht abzentrifugiert, damit die oberste Schicht zellfrei ist. Anschließend werden direkt 50 mg Sulfobiotin-X-NHS, hinzugegeben und die Zellsuspension sofort geschüttelt. Die Reaktion findet für 30 min bei Raumtemperatur statt. Nach der Kopplung werden die Erythrozyten abzentrifugiert und für 15 min in isoosmotischer PBS pH 7,4/0,1 M Ethanolaminlösung inkubiert, um noch reaktive Biotinester zu binden. Danach werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Membrangewinnung erfolgt wie beschrieben.

2.18. Nachweis biotinmarkierter Moleküle

Tris-Puffer, 50 mM TBS, 150 mM NaCl, pH 7,4:

6,060 g Tris (ICN)

- + 8,766 g NaCl
- + 950 ml A. demin
- + 4 N HCl ad pH 7,4

ad 11A. demin

Streptavidin-AP-Inkubationspuffer, 50 mM TBS, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH 7,4:

- + 10 μl Streptavidin-AP (BIO RAD)
- + 10 μ1 Tween-20

+ 0,5 g BSA (SERVA)

ad 10 ml TBS pH 7,4

Blot-Waschpuffer, 20mM TBS, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7,4:

- 2,42 g Tris (ICN)
- + 29,24 g NaCl
- + 0,5 ml Tween-20
- + 950 ml A. demin
- + 4 N HCl ad pH 7,4

ad 11A. demin.

AP-Reaktionspuffer, 100 mM TBS, 1 mM MgCl₂·6H₂O, pH 9,5:

- 12,10 g Tris (ICN)
- $+ \qquad 0,203 \ g \ MgCl_2 \ 6H_2O$
- + 950 ml A. demin.
- + 4 N HCl ad pH 9,5

ad 11A. demin.

NBT-BCIP-Lösung (vor Gebrauch angesetzt):

6 mg Nitroblue Tetrazolium chloride, NBT (SERVA)

- + 3 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphate-p-toluidine salt, BCIP (SERVA)
- + 700 μl Dimethlyformamid
- + $300 \,\mu l$ A. demin.

AP-Färbelösung (vor Gebrauch angesetzt):

- 1 ml NBT/BCIP-Lösung
- + 20 ml AP-Reaktionspuffer

Biotin markierte Moleküle werden durch die Bindung von Streptavidin-AP nachgewiesen. Streptavidin ist ein nichtglykosilertes Molekül aus *Streptomyces*, das wie Avidin eine sehr hohe Bindungsaffinität zu Biotin aufweist (CHAIET & WOLF, 1964). Die Visualisierung erfolgt über eine Farbstoffbildung durch das an Streptavidin gekoppelte Enzym Alkalische Phosphatase (AP).

Die über Nacht mit 5% BSA-Lösung blockierten Blotmembranen werden für 1 Stunde auf dem Schüttler in Streptavidin-AP-Inkubationspuffer gelagert. Überschüssiges und unspezifisch gebundenes Streptavidin-AP wird durch Spülen der PVDF-Folien für 3 x 5 min mit Blot-Waschpuffer entfernt. Abschließend werden die Membranen für 5 min in AP-Reaktionspuffer inkubiert.

Zur Färbung werden die Blotfolien in die frisch angesetzte AP-Färbelösung überführt. Dabei wird die PVDF-Membran so orientiert, daß die ehemals dem Gel aufliegende Seite zum Boden der Färbeküvette zeigt. Dies reduziert die Hintergrundfärbung der Blots durch ausfallenden Farbstoff. Der Färbevorgang wird durch mehrfaches Spülen der Membran mit Leitungswasser beendet. Die Folien werden bei Raumtemperatur zwischen Filterpapieren getrocknet.

2.19. Nachweis spezifischer Membranproteine mit Antikörpern

Antikörperlösung: Inkubationspuffer mit 5% BSA, 0,1% Tween-20, pH 7,4

- 20 ml Inkubationspuffer
- 1 g BSA (SERVA)
- + 20 μl Tween-20

+

+ Antikörper entsprechend angegebener Verdünnung.

Zur Identifizierung einzelner Membranproteine werden entsprechende mono- und polyklonale Antikörper (Tab. 4) eingesetzt. Nach dem Blotten der Erythrozytenmembranproteine wird die PVDF-Folie über Nacht im Kühlschrank mit Blockierungspuffer überschichtet, um alle freien Bindungsstellen der Membran mit BSA abzusättigen. Der Blot wird dann für 1 h in der Antikörperlösung auf dem Schüttler inkubiert und 3x5 min mit Blot-Waschpuffer gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen.

Zum Nachweis des gebundenen Primärantikörpers wird ein gegen ihn gerichteter, mit alkalischer Phosphatase (AP) markierter Sekundärantikörper eingesetzt. Um unspezifische Bindungen dieses zweiten Antikörpers mit der Blotfolie zu vermeiden, wird die PVDF-Membran mit einem unmarkierten Sekundärantikörper (50 μ g/ml Antikörperlösung ohne Tween 20) für 1 h vorinkubiert und einmal mit Waschpuffer gespült. Danach lagert der Blot für 1 h auf dem Schüttler in der Lösung des AP-gekoppelten zweiten Antikörpers. Anschließend wird die PVDF-Membran wieder 3x5 min mit Waschpuffer gespült. Darauf folgt der AP-Nachweis.

Zur Kontrolle, ob der Primärantikörper spezifisch gebunden hat, werden Blots parallel mit dem jeweiligen ungerichteten Isotyp (Maus IgG1, IgG2a, IgM, Kaninchen IgG) inkubiert und genauso behandelt, wie zuvor beschrieben . Alle Antikörper stammen von SIGMA.

Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Antikörper zum Nachweis von Membranproteinen.

Primärantikörper	Isotyp	Verdünnung
Anti-Humanerythrozyten-Ca ²⁺ -ATPase, Mab	Maus IgG2a	1:100
Anti- Humanerythrozytenspektrin (α + β), Mab	Maus IgG1	1:400
Anti-α-Tubulin (aus Seegurke), Mab	Maus IgG1	1:100
Anti-Tropomyosin (aus Huhn), Mab	Maus IgG1	1:100
Anti-Myosin (leichte Ketten 20K aus Huhn), Mab	Maus IgM	1:100
Anti-Aktin (synthetisches C-terminales Aktinpeptid)	Kaninchen IgG	1:100

Tabelle 5: Alkalische Phosphatase markierte Sekundärantikörper.

AP markierte Sekundärantikörper	gezogen in	Verdünnung
Anti-Kaninchen-IgG (γ-Ketten spezifisch), Mab	Maus, IgG1	1:8000
Anti-Maus-IgM (µ-Ketten spezifisch)	Ziege	1:1000
Anti-Maus-IgG (γ-Ketten spezifisch)	Ziege	1:1000
Anti-Maus polyvalent (IgG, IgA, IgM)	Ziege	1:1000

2.20. Nachweis von Glykoproteinen mit Lektinen

Inkubationspuffer: 50 mM TBS, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂6H₂O, 1 mM CaCl₂2H₂O, pH

7,4:

- 6,060 g Tris (ICN) 8,766 g NaCl
- + 8,766 g NaCl + 115 mg MgCl₂·6H₂O
- + 115 mg MgCl₂·6H₂O + 75 mg CaCl₂·2H₂O
- + $75 \text{ mg} \text{ CaC}_{12} 2\text{H}_{2}\text{C}$ + 950 ml A. demin.
- + 4 N HCl ad pH 7,4

ad 11A. demin.

Lektinlösung: Inkubationspuffer mit 5% BSA, 0,1% Tween-20, pH 7,4 20 ml Inkubationspuffer

- + 1 g BSA (SERVA)
- + $20 \,\mu l$ Tween-20
- + Lektin ad 20 µg/ml Endkonzentration.

Lektin	Abkürzung	Hemmstoff
Maackia amurensis II (Vector)	MAA II	0,2 M N-Acetylneuraminsäure
Sambucus nigra (SIGMA)	SNA	0,2 M N-Acetylneuraminsäure
Galanthus nivalis (Vector)	GNA	0,2 M Mannose
Hippeastrum Hybrid (Vector)	HHA	0,2 M Mannose + 1% Mannan
Lycopersicon esculentum (Vector)	LEA	0,2 M Chitotriose
Phytolacca americana (Sigma)	PWM	0,2 M Chitotriose
Solanum tuberosum (Vektor)	STA	0,2 M Chitotriose
Artocarpus integrifolia (Vector)	AIA	0,2 M Galaktose
Abrus precatorius (SIGMA)	APA	1% Galaktan
<i>Ricinus communis</i> 60 (SIGMA)	RCA ₆₀	0,2 M Galaktose
Helix pomatia (SIGMA)	HPA	0,2 M N-Acetylgalaktosamin
<i>Glycine max</i> (Vektor)	SBA	0,2 M N-Acetylgalaktosamin
Vicia villosa (SIGMA)	VVA	0,2 M N-Acetylgalaktosamin
Tetragonolobus purpurea (SIGMA)	TPA	0,2 M L-Fucose

Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten Lektine und der verwendeten Hemmstoffe.

Zum Nachweis bestimmter Kohlenhydratdeterminanten werden verschiedene Biotin markierte Lektine eingesetzt. Lektine sind Moleküle, die spezifisch an die terminalen Zuckerreste von Glykokonjugaten binden. Nach dem Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Membranproteine auf die PVDF-Folie, wird diese über Nacht im Kühlschrank mit Blockierungspuffer überschichtet, um alle freien Bindungsstellen der Blotmembran mit BSA abzusättigen. Die so blockierte Membran wird dann für eine Stunde mit Lektinlösung (20µg Lektin/ml) auf dem Schüttler inkubiert und anschließend für 3x5 min mit Blotwaschpuffer gespült, um nicht bzw. unspezifisch gebundenes Lektin zu entfernen. Der Nachweis des gebundenen Lektins erfolgt mit Streptavidin-AP und anschließender AP-Färbung.

Zur Überprüfung, ob die Lektinbindung spezifisch durch Kohlenhydratreste vermittelt wird, werden in Kontrollblots parallel mit 0,2 M Hemmzucker bzw. 1% Hemmstoff vorinkubierte Lektine (mind. 30 min Inkubationszeit) in der gleichen Konzentration eingesetzt.

III. ERGEBNISSE

3.1. Blutabnahme und Erythrozytengewinnung

Je nach Größe der Tilapien können aus der Schwanzvene zwischen 2 und 12 ml Blut abgenommen werden. Nach der diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradientenzentrifugation der gewaschenen und 1+1 in Puffer resuspendierten Blutzellen bleiben die Thrombo- und Leukozyten als feine Bande auf dem Trennkissen liegen, während die roten Blutkörperchen zu Boden sedimentieren (Abb. 1). In May-Grünwald-Giemsa gefärbten Ausstrichen dieser Zellfraktion konnten keine weißen Blutkörperchen nachgewiesen werden. Durch Waschen, Dichteabtrennung und erneutes Waschen läßt sich ein hochreines Erythrozytensediment gewinnen, das die Grundlage für die Membranpräparation bildet. Teilweise finden sich Erythrozyten in der abgetrennten Thrombo- und Leukozytenfraktion, die der Bande dann einen schwachen Rotschimmer verleihen.



Abb. 1: Diskontinuierlicher 30%/55%-Percoll-Gradient zur Isolierung der Erythrozyten aus Fischblut. E: Erythrozyten W: Thrombo- u. Leukozytenbande



Abb. 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme Paraformaldehyd (4%)-fixierter Erythrozyten von *Oreochromis niloticus* K: Kern.

Abbildung 2 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Darstellung der isolierten roten Blutkörperchen von *Oreochromis niloticus*. Es handelt sich um flach-elliptische Erythrozyten mit einem ovalen Kern. Dieser liegt unter der Auswölbung der Plasmamembran in der Mitte. Um den Kern herum sind die roten Blutkörperchen bikonkav geformt, während die Zellen in der Seitenansicht durch den hervorspringenden Kern insgesamt als bikonvex erscheinen. Die Größe der Erythrozyten beträgt $8,7 \pm 0,52 \ \mu m \ x \ 5,5 \pm 0,55 \ \mu m \ (n=10)$. Daraus ergibt sich ein Längen/Breitenverhältnis von 1:0,63. Die Höhe der roten Blutkörperchen am Rand liegt bei $0,64 \pm 0,06 \ \mu m$.

3.2. Isolierung der Erythrozytenmembranen

Die hämolysierten und homogenisierten roten Blutkörperchen werden über einen diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt, um die Membranen von zytoplasmatischen Bestandteilen und den Kernen zu separieren. Abb. 3 zeigt eine solche Auftrennung.



Abb. 3: Isolierte Erythrozytenmembranen im diskontinuierlichen Saccharosegradienten (15%/30%/60%). M: Membranbande K: abzentrifugierte Kerne

Am Boden des "ultraclear"-Gefäßes befinden sich die abzentrifugierten Kerne und nicht homogenisierten Zellen. Es folgt das 60%-Saccharosekissen. An der Grenze zwischen der 60%- und 30%-Saccharoselösung liegt die gräuliche Erythrozytenmembranbande. Darüber befinden sich das 30%- und 15%-Dichtekissen sowie der Homogenisationspuffer. Alle Lösungen sind klar und farblos.

An den Grenzschichten zwischen Homogenat und Auftragskissen bzw. zwischen der 15%und 30%-Saccharoselösung lassen sich im Phasenkontrastmikroskop keine Membranstrukturen erkennen. Entsprechendes gilt auch für Proben aus dem 30%- und 60%-Trennkissen. Die durch das Homogenisieren isolierten Erythrozytenmembranen durchwandern also während der Zentrifugation vollständig die beiden leichteren Saccharoselösungen und reichern sich erst auf dem 60%-Dichtekissen, das für sie impermeabel ist, an. Durch das Abzentrifugieren der hämolysierten Erythrozyten kann der Hämoglobingehalt in der Zellsuspension soweit reduziert werden, daß nach der Membranpräparation der Homogenisationspuffer wie in Abb.3 zu sehen, farblos erscheint.

3.3. Proteingehalt der Erythrozytenmembranen

Zur vollständigen Solubilisierung für die Proteinbestimmung werden die Erythrozytenmembranen und zur Vergleichbarkeit auch der BSA-Standard mit SDS vorinkubiert. Die Korrelation der BSA-Eichgeraden (Abb.4) beträgt $r^2 = 0,9995$. Die Zugabe von SDS beeinträchtigt somit nicht die Proteinbestimmung mit BCA.


Abb. 4: BSA-Eichgerade zur Proteinbestimmung mit BCA

Eine Häufigkeitsverteilung der Proteinkonzentration von 75 Membranproben gibt Abb. 5 wieder. Der Proteingehalt in einem Mikroliter isolierter Erythrozytenmembranen beträgt je nach Präparation 5,3 bis 29,3 µg. In 46 Fällen liegt die Proteinkonzentration zwischen 10 und 19,9 µg/µl ($\xi = 14,6 \pm 5,5 µg/µl$). Der Proteingehalt pro µl Membransuspension stellt nur einen Richtwert dar und ist abhängig vom Flüssigkeitsvolumen am Ende der Aufarbeitung.

Für die Bestimmung des Proteinanteils im Trockengewicht werden die Zellmembranen zuvor dialysiert, um die Saccharose und Salze zu entfernen. Im Anschluß an die Dialyse verbleiben 1,5 ml Erythrozytenmembransuspension mit einer Proteinkonzentration von 1,07 μ g/ μ l bzw. 1605 μ g Gesamtprotein. Nach Gefriergetrocknung haben diese Membranen ein Gewicht von 3050 μ g. Damit beträgt der Proteinanteil in den Erythrozytenmembranen 0,526 μ g pro 1 μ g Lyophilisat, also 52,6 %. Die isolierte Membranfraktion enthält jedoch im Mittel noch 1,7 % DNA (s. Kap. 3.5), die nicht mit BCA reagiert. Zieht man diese DNA-Kontamination vom Trockengewicht der Membranen ab, dann beträgt der Proteingehalt 53,5 %. Hämolysatreste konnten nach der Dialyse nicht mehr nachgewiesen werden.



Abb.5: Häufigkeitsverteilung der Proteinkonzentration in 75 Membranproben

3.4. Bestimmung des Hämolysatanteils in den Erythrozytenmembranen

Als Indikator für zytoplasmatische Verunreinigungen wird der Hämoglobingehalt in der isolierten Membranfraktion bestimmt, um eine Aussage über die Reinheit der gewonnenen Erythrozytenmembranen treffen zu können. Die Pseudoperoxidaseaktivität des Hämoglobins wird mit TMB nachgewiesen.



Abb. 6: Umsetzung von TMB durch 1:1000 verdünntes Hämolysat

Die Extinktion des umgesetzten TMB in Abhängigkeit von der Konzentration des Hämolysates verläuft linear (Abb. 6). Die Korrelation der Reaktion beträgt $r^2 = 0,9992$ und erlaubt eine sichere Analyse des Hämolysatanteils in den gewonnenen Zellmembranen.

Von 75 analysierten Membranproben weisen 43 eine Hämolysatkontamination unter 1% auf (Abb. 7). In 25 Fällen liegt der Anteil bei 1,00 – 1,79%. Sechs Proben mit einem Hämolysatanteil von 2,2 – 2,79% fallen aus dem Verteilungsmuster heraus. Ohne diese "Ausreißerwerte" beträgt der Anteil der zytoplasmatischen Verunreinigungen in den isolierten Erythrozytenmembranen 0,90% \pm 0,44% (n = 69). Die Reinheit der Membranfraktion beträgt somit im Durchschnitt 99,1 %.



Abb. 7: Häufigkeitsverteilung der Hämolysatkontamination in den Membranen (Klassengröße 0,2%).

3.5. Bestimmung des DNA-Gehaltes in den Erythrozytenmembranen

Als Indikator für die Kontamination der Membranen mit Erythrozytenkernen oder Kernfragmenten dient der DNA-Gehalt.



Abb. 8: Eichgerade zur Bestimmung des DNA-Gehaltes nach BURTON (1968).

Die Methode von BURTON (1968) zur DNA-Bestimmung ergibt eine Korrelation zwischen Nukleinsäurestandard (Kalbsthymus-DNA) und Extinktion von $r^2 = 0,9989$ (Abb. 8). Bezogen auf den Proteingehalt der Proben beträgt der DNA-Anteil in der isolierten Membranfraktion durchschnittlich 1,69% ± 0,416% (n=10). 50 µg Erythrozytenmembranen enthalten im Mittel 0,845 µg DNA, die bei der Bestimmung des Trockengewichtes zu berücksichtigen sind.

3.6. Elektrophoretische Auftrennung der Erythrozytenmembranproteine

Zur weiteren Charakterisierung werden die Erythrozytenmembranproteine durch Detergenzien in Lösung gebracht und anschließend in der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Eine Isolierung und Analyse der Tilapienmembranproteine unter nicht denaturierenden Bedingungen in den alkalischen Elektrophoresesystemen nach MAURER (1968) oder LAEMMLI (1970) ist nicht möglich. Unabhängig von den eingesetzten Detergenzien (n-Octylglukopyranosid, CHAPS, Triton X-100, Triton X-114) zeigt die Coomassiefärbung stets "verschmierte" Laufspuren, aber keine distinkten Banden.

Unter stark dissoziierenden (saure Harnstoff-PAGE) oder denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) lassen sich jedoch die Membrankomponenten der Tilapienerythrozyten untersuchen.

3.6.1. Saure Harnstoff-PAGE im homogenen 8%-Gel

In Anwesenheit von 8 M Harnstoff und 5% Essigsäure lassen sich einzelne Triton X-100 lösliche Membranproteine analysieren. Sie werden in dem homogenen 8%-Gel entsprechend ihrer Eigenladung getrennt (Abb. 9). Trotz der stark dissoziierenden Bedingungen fällt bei den Membranproben sowohl am Taschenboden, als auch an der Grenze von Sammelgel und Trenngel viel Protein aus. Es wird also nur ein Teil der gelösten Polypeptide aufgetrennt.



Abb. 9: Auftrennung der unter dissoziierenden Bedingungen TX-100 löslichen Erythrozytenmembrankomponenten im sauren, homogenen Harnstoffgel (8% T, 1% C). Spur 1: Oa, Spur 2: On, Spur 3: Om, Spur 4: Sg, Spur 5: Sm, Spur 6: Humanerythrozytenmembranen, Spur 7: Hämolysat. ◀ : fehlende Doppelbande bei Om.

Bei diesem Elektrophoreseverfahren zeigen sich einige Unterschiede zwischen den Membranproteinen von *Oreochromis mossambicus* (Abb. 9, Spur 3) und denen der übrigen Tilapien. Im oberen Bereich des Trenngels liegt bei ihnen eine kräftige Doppelbande, gefolgt von einer schwächer gefärbten. Bei Om jedoch wandert die kräftige Doppelbande weiter in das Trenngels ein. Anstelle der zweiten Doppelbande weist *O. mossambicus* nur eine Einzelbande (Abb. 9: ◀) auf, die im Vergleich zu den übrigen Tilapienproben eine höhere elektrophoretische Mobilität hat. Weitere Unterschiede in diesem Abschnitt lassen sich auf die Bandenintensität zurückführen. Sie finden sich nicht bei anderen Auftrennungen. Ansonsten ist das Bandenmuster der Tilapien einheitlich.

Von den 14 Banden der Humanerythrozytenprobe haben nur drei eine gleiche Lage mit Membranproteinen der Tilapien. Die Hämolysatspur weist lediglich eine sehr schwache Bande am Ende des Gels auf. Somit repräsentieren alle übrigen Coomassiebanden Membrankomponenten und keine zytoplasmatischen Verunreinigungen.

3.6.2. Saure Harnstoff-PAGE im 5-30% Gradientengel

Während bei der sauren Harnstoff-PAGE im homogenen Gel Ladungsunterschiede zwischen den einzelnen Membrankomponenten sichtbar werden, erlaubt die Auftrennung im 5-30%-Gradienten Aussagen über das Molekulargewicht der Proteinbanden. Die Regressionsgerade der Eichproteine (Abb. 10) hat eine Korrelation von $r^2 = 0,9802$. Daher ist die Bestimmung der Molekulargewichte mit einem größeren Fehler behaftet und kann nur Näherungswerte liefern. Dies gilt insbesondere für die Coomassiebanden oberhalb 116 kDa, die nicht mehr im Bereich der Eichproteinen liegen. In diesem Abschnitt befinden sich drei Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 168, 159 und 150 kDa (Abb. 11). Die beiden letzten Banden sind bei *Oreochromis mossambicus* (Abb.11, Spur 5) nur sehr schwach ausgebildet, was in anderen Auftrennungen jedoch nicht der Fall ist. Die unterschiedliche Bandenintensität ist

daher kein artspezifisches Merkmal. Entsprechendes gilt auch für die Proteinbanden zwischen 102 und 62 kDa, die bei Om teilweise deutlicher hervortreten.

Bei 116 kDa liegt die charakteristische, stark gefärbte Doppelbande. Sie ist jedoch anders als im homogenen Gel bei allen untersuchten Tilapien einheitlich und hat ein Molekulargewicht von 116 bzw. 112 kDa. Die bei *Oreochromis mossambicus* im sauren 8%-Gel vorgefundenen Unterschiede der Membranproteine (vergl. 3.6.1) sind somit ladungsbedingt und nicht von der Molekülgröße abhängig.



Abb. 10: Lineare Regression der Eichproteine im 5-30% Gradient der sauren Harnstoff-PAGE. $r^2=0.9802$. 1: β -Galaktosidase (116 kDa), 2: BSA (67 kDa), 3: Katalase (60 kDa), 4: LDH (36 kDa), 5: Ferritin (18,5 kDa Untereinheit), 6: α -Lactalbumin (14,4 kDa).



Abb. 11: Auftrennung der unter dissoziierenden Bedingungen löslichen Erythrozytenmembrankomponenten in der sauren Harnstoffgelelektrophorese (5-30%-Gradientengel). Spur 1: EP 5+6 (s. Abb. 10), Spur 2: EP 1-5, Spur 3: Oa, Spur 4: On, Spur 5: Om, Spur 6: Sg, Spur 7: Sm, Spur 8: Humanerythrozytenmembranen, Spur 9: Hämolysat. ◀ : fehlende Om-Bande

Unterhalb der Doppelbande liegt ein weiteres, deutlich schwächer gefärbtes Bandenpaar mit einem Molekulargewicht von 108 und 102 kDa. Nur bei *O. mossambicus* fehlt das 108 kDa große Polypeptid (Abb. 11, Spur 5:
). Dies stimmt mit der Auftrennung im homogenen Gel überein, wo ebenfalls in der Membranprobe von *Oreochromis mossambicus* eine Bande fehlt.

Vergleicht man das Bandenmuster der hier untersuchten Tilapien mit dem der humanen Erythrozytenmembranproteine, so gibt es nur fünf Polypeptide, die die gleiche Lage haben. Ihr Molekulargewicht beträgt 159, 86, 62, 51 und 44 kDa. Daß es sich hierbei um Membrankomponenten handelt, zeigt der Vergleich mit der Hämolysatprobe, die nur eine sehr schwache Bande auf Höhe des α -Lactalbumins aufweist.

3.6.3. Auftrennung der Erythrozytenmembranen in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE

Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) solubilisiert die Erythrozytenmembranproteine und denaturiert sie gleichzeitig. Durch die Interaktion zwischen den SDS-Kohlenwasserstoffketten und hydrophoben Proteinbereichen wird die Tertiär- und Sekundärstruktur der Membranpolypeptide zerstört. Das SDS unterbindet elektrostatische Wechselwirkungen und löst die stabilisierenden Wasserstoffbrücken auf. Es entstehen anionische Detergenz/ Protein-Mizellen, die ein annähernd konstantes Verhältnis von 1,4 g SDS pro 1 g Protein aufweisen. Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Mizellen im elektrischen Feld ist fast ausschließlich von der Polypeptidgröße abhängig (WESTERMEIER, 1990). Durch die Behandlung der Proben mit 2-Mercaptoethanol (ME) werden Disulfidbrücken aufgespalten und die Quatärstruktur der Proteine zerstört. Es kommt zu einer vollständigen Streckung der Polypeptide und somit zur Auftrennung nach Molekülgröße. Zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichtes (MW) und der relativen Wanderungsstrecke des Proteins im Gel (rf-Wert) besteht eine lineare Beziehung, die eine MW-Bestimmung erlaubt (Abb. 12). Der lineare Trennbereich der SDS-PAGE wird durch die Verwendung eines Porengradientengels erweitert und ermöglicht die Auftrennung innerhalb großer Molekulargewichtsbereiche.



Abb. 12: Lineare Regression der Eichproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE; r^2 =0,9954. 1: Thyreoglobulin (330 kDa-Untereinheit), 2: Ferritin (220 kDa-Untereinheit), 3: β -Galaktosidase (116 kDa), 4: BSA (67 kDa), 5: Katalase (60 kDa), 6: LDH (36 kDa), 7: Ferritin (18,5 kDa-Untereinheit), 8: α -Lactalbumin (14,4 kDa).

Abbildung 13 zeigt das Bandenspektrum einer Auftrennung der SDS/ME behandelten Erythrozytenmembran in einem 5-15%-Polyacrylamidgradientengel nach Färbung mit Coomassie G-250. Es reicht von etwa 14 bis knapp 250 kDa. Dieser Bereich wird von den Eichproteinen (14,4 - 330 kDa) abgedeckt.



Abb.13: Auftrennung der Erythrozytenmembranproteine in einem 5-15%-SDS-Gradientengel (Coomassiefärbung). A1-E4: Bezeichnung einiger Tilapienbanden (s. a. Tab. 7). Die Hauptbanden der Humanerythrozytenmembranproteine sind rechts angegeben. G3PD: Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase. Spur 1: Eichproteine, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat.

Die Auftrennung der Erythrozytenmembranen der untersuchten Tilapienarten in der SDS-Gradienten-PAGE ergibt 36 regelmäßig vorkommende Coomassiebanden. Daß es sich hierbei um Bestandteile der Zellmembran handelt, zeigt der Vergleich mit der Hämolysatprobe. Sie weist nur eine einzige Bande bei 15,4 \pm 0,74 kDa, welche die gleiche elektrophoretische Mobilität besitzt, wie die Hämoglobinbande der Humanerythrozytenprobe (Abb. 13: Spur 7 Auf gleicher Höhe liegt bei den Tilapienproben die Bande E4, die sich teilweise in eine Doppelbande aufspaltet. Alle übrigen Coomassiebanden stellen demnach Bestandteile der Erythrozytenmembran dar und sind nicht zytoplasmatischen Ursprungs.

Die Auswertung von 12 Gelen zeigt, daß die aufgetrennten Membrankomponenten der untersuchten Tilapienerythrozyten ein annähernd konstantes Muster ausbilden. Dieses Muster ermöglicht die Aufstellung einer Nomenklatur für die einzelnen Proteinbanden. Hierzu wird das Bandenspektrum in die Abschnitte A-E unterteilt (s. Abb. 13), innerhalb derer die regelmäßig auftretenden Coomassiebanden fortlaufend numeriert werden. Eine Übersicht der so beschrieben Banden liefert Tabelle 7. Die Einführung einer Bandenkennzeichnung erleichtert die Identifizierung und den Vergleich der einzelnen Membranproteine in den weiteren Untersuchungen. Dabei können jedoch im Rahmen dieser Arbeit nur zu einigen dieser Komponenten weitergehende Aussagen gemacht werden.

Teilweise sind einzelne Coomassiebanden einer Art stärker ausgeprägt als bei den anderen. Dies ist zum Beispiel in Abbildung 13 bei *Oreochromis mossambicus* (Spur 4) im Bereich von 14,4 bis 18,5 kDa der Fall. Diese Unterschiede in der Bandenintensität sind jedoch nicht konstant, sondern treten nur vereinzelt auf. Es handelt sich dabei um kein artspezifisches Merkmal.

Coomassiebande	Molekulargewicht [kDa]	Bemerkungen
A1	$243 \pm 9,9$	
A2	$227 \pm 7,3$	
A3	$200 \pm 4,6$	fehlt bei Sm
A4	$180 \pm 4,6$	fehlt bei Sm
B1	$153 \pm 4,1$	fehlt bei Sm
B2	$144 \pm 4,0$	fehlt bei Sm
B3	$119 \pm 3,6$	bei Sm
B3	111 ± 3.8	bei Oa, On, Om, Sg
B3a	$114 \pm 4,3$	nur Sm, fehlt bei Oa, On, Om, Sg
B4	$92,0 \pm 3,20$	z.T. Aufspaltung in Doppelbande
B5	$81,8 \pm 2,26$	
B6	$76,8 \pm 2,08$	
B7	$70,6 \pm 2,11$	
B8	$66,3 \pm 2,02$	
B9	$61,2 \pm 1,98$	z.T. Aufspaltung in Doppelbande
B10	$55,1 \pm 1,66$	
B11	$53,0 \pm 1,50$	
B12	$49,4 \pm 1,57$	
B13	$46,9 \pm 1,39$	
C1	$42,8 \pm 1,27$	
C2	$40,6 \pm 1,10$	
C3	$38,8 \pm 1,10$	
C4	$36,0 \pm 0,99$	
C5	$33,6 \pm 0,86$	
C6	$31,4 \pm 0,84$	
C7	$28,9 \pm 0,74$	
C8	$27,0 \pm 0,81$	
C9	$25,9 \pm 0,56$	
D1	$23,3 \pm 0,73$	
D2	$21,9 \pm 0,71$	
D3	$20,9 \pm 0,75$	
D4	$20,0 \pm 0,77$	
E1	17.4 ± 0.54	
E2	16.7 ± 0.57	z.T. Aufspaltung in Doppelbande
E3	15.1 ± 0.68	z.T. Aufspaltung in Doppelbande
E4	$13,8 \pm 0,63$	

Tabelle 7: Übersicht der regelmäßig auftretenden Membrankomponenten in der 5-15% SDS-PAGE(Molekulargewicht: Mittelwert ± Standardabweichung, n=12)

Abschnitt A reicht von knapp 250 bis 180 kDa und umfaßt vier Banden. Er beginnt mit den kräftigen Coomassiebanden A1 und A2, die charakteristisch für diesen Gelbereich sind und den Spektrinbanden der Humanerythrozytenmembranen in Lage und Bandenintensität gleichen. Ihnen folgen die schwächer ausgeprägten Banden A3 und A4.

Der nächste Abschnitt enthält die Banden B1 (152,9 \pm 4,09 kDa) bis B13 (46,9 \pm 1,39 kDa). Er wird durch die stark gefärbten Banden B1 und B3 gekennzeichnet. Von ihrer Ausdehnung im Gel ist B3 die größte und auffälligste Coomassiebande. Am Ende des B-Abschnittes unterhalb des 60 kDa Eichproteins findet sich ein charakteristisches Bandenmuster, das aus den Proteinen B10 bis B12 besteht. Die stärkeren Banden B10 und B12 umrahmen die feine, scharfe Bande B11. Sie bilden so ein leicht wiederzuerkennendes Triplett. Unmittelbar an B12 grenzt das nicht immer deutlich hervortretende Polypeptid B13. Direkt unterhalb dieser Abfolge beginnt Abschnitt C mit der kräftigen Coomassiebande C1. Diese knapp 43 kDa schwere Membrankomponente entspricht in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit und Bandenintensität dem Aktin der Humanerythrozyten. Der C-Abschnitt umfaßt 9 Banden, von denen C6 auf gleicher Höhe liegt wie das 36 kDa Eichprotein. Der Abschnitt D beginnt bei 23 kDa und enthält 4 Banden. Allerdings sind die letzten zwei Proteine oft nur schwer zu erkennen. Ebenfalls vier Banden umfaßt der unterhalb des 18,5 kDa Eichprotein liegende Abschnitt E. Wie Abbildung 13 veranschaulicht, spalten sich die Banden E2 und E3 teilweise in feine Doppelbanden auf. E3 hat die gleiche Lage im Gel wie die Hämolysatbande und das Hämoglobin in der Membranprobe der Humanerythrozyten.

Die Membranauftrennung der humanen, roten Blutkörperchen (Abb.13: Spur 7) entspricht in ihren Hauptfraktionen dem von FAIRBANKS et al. (1971) und STECK (1972) beschriebenen Muster (s. a. Tabelle 8). Zu Beginn liegen die beiden breiten, intensiv gefärbten Spektrinbanden. Das α -Spektrin, Bande 1, weicht mit 250, 3 ± 8,69 kDa um 10 kDa von den üblichen Angaben (240 kDa) ab, während Bande 2, das β -Spektrin, mit 223,2 \pm 6,50 kDa dem Literaturwert von 220 kDa fast genau entspricht. Direkt unterhalb des β-Spektrins befindet sich in Form einer feinen Linie die Bande 2.1, das Ankyrin. Darauf folgen mehrere feine Coomassiebanden, die den Proteinen 2.2 bis 2.9 entsprechen. Leicht zu erkennen anhand seiner großen Ausdehnung und starken Färbung ist der Anionenkanal (= Bande 3). Sein in der SDS-Gradienten-PAGE bestimmtes Molekulargewicht von 96-118 kDa differiert deutlich gegenüber den in der Literatur gefundenen Angaben von 90-100 kDa. Dies gilt auch für die nächsten zwei Banden 4.1 und 4.2. Hier sind die Unterschiede jedoch kleiner als 10%. Die Proteine 4.1 und 4.2 bilden unterhalb des Anionenaustauschers eine charakteristische Doppelbande. Anschließend folgen bis zu 7 Nebenbanden, deren Abschluß mit 47 kDa die Bande 4.9 bildet. Sie enthält die Proteine Demantin und p55. Bei 43 und 36 kDa liegen Aktin (Bd. 5) und Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (G3PD, Bd. 6), zwei intensiv gefärbte Banden. Dann kommen die Proteine 7 (Stomatin, 31 kDa) und 8 (23 kDa). Die letzte Coomassiebande ist Hämoglobin mit 15,5 kDa.

In der diskontinuierlichen SDS-Gradienten-PAGE werden nach Coomassiefärbung ungefähr dreieinhalbmal so viele Membranproteine (36) nachgewiesen wie im sauren Harnstoff-Gradientengel. Dazu zählen die markanten Banden A1, A2 oder B3 bzw. die Humanspektrine oder der Anionenkanal, die im sauren Elektrophoresesystem fehlen.

3.6.3.1. Vergleich der Bandenmuster von Tilapien- und Humanerythrozytenmembranen Der Vergleich des Bandenmuster menschlicher Erythrozytenmembranen mit dem Spektrum der vorgefundenen Membranproteine aus den roten Blutkörperchen der untersuchten Tilapien zeigt sowohl Übereinstimmungen in Lage und Aussehen einzelner Komponenten (s. Tab. 8), als auch deutliche Unterschiede.

Die Banden A1 und A2 haben mit 243,3 und 226,7 kDa nicht nur annähernd das gleiche Molekulargewicht wie das humane α - und β -Spektrin, sondern sie gleichen diesem auch in ihrer Ausprägung hinsichtlich Bandenbreite und Farbintensität.

Mit 200 sowie 180 kDa liegen die Tilapienproteine A3 und A4 im Bereich der Ankyrine 2.2 bzw. 2.3. Zumindest A4 unterscheidet sich aber deutlich von der feinen Ankyrinbande 2.3. Dies gilt auch für die kräftige Coomassiebande B1, auf deren Höhe sich die wesentlich schmälere und schwächer gefärbte Bande 2.6 der Humanerythrozyten befindet. Es ist fraglich, ob diese Membranproteine einander zugeordnet werden können.

Tabelle 8: Vergleich der Hauptproteinbanden von Human- und untersuchten Tilapienerythrozytenmembranen. a: FAIRBANKS et al. (1971), STECK (1972) b: LUX & PALEK (1995), c: HEAST (1982), d: Oa, On, Om, Sg, e: Sm

Human	-			Tilapien-	
erythrozy	ten	MW [kDa]	MW [kDa]	erythrozyter	1
Gelband	e ^a Protein ^{b+c}	lt. Literatur ^b	ermittelt	Gelbande	MW [kDa]
1	α-Spektrin	240	244,4 ±9,73	A1	$243 \pm 9,9$
2	β-Spektrin	220	223,2 ±6,50	A2	$227 \pm 7,3$
2.1	Ankyrin	210	$211,8 \pm 3,06$	-	-
2.2	Ankyrin	195/183 ^c	$186,4 \pm 2,91$?A3	$200 \pm 4,6$
2.3	Protein 2.3	175	$178,7 \pm 2,01$?A4	$180 \pm 4,6$
2.6	Protein 2.6	145	$150,1 \pm 2,72$?B1	$153 \pm 4,1$
3	Anionenkanal	90-100	$96,1 \pm 2,80$	B3 ?	110,7 ^d / 118,9 ^e
4.1	Protein 4.1	80	$86,0 \pm 2,72$?	
4.2	Pallidin	72	$79,1 \pm 2,19$?	
4.5/6	Protein 4.5 Region	n 52 ^c	$53,0 \pm 1,50$	B11	$53,0 \pm 1,50$
4.9	Demantin	48+52	$46,9 \pm 1,39$	B13	$46,9 \pm 1,39$
5	Aktin	43	$42,8 \pm 1,27$	C1	$42,8 \pm 1,27$
	Tropomodulin	43	$42,8 \pm 1,27$	C1	$42,8 \pm 1,27$
6	G3DP	35	$35,1 \pm 0,95$?C4	$36,0 \pm 0,99$
7	Stomatin	31	$31,4 \pm 0,84$	C6	$31,4 \pm 0,84$
8	Protein 8	23	$21,9\pm0,77$	D2	$21,9\pm0,77$
-	Hämoglobin		$15,5\pm0,62$	E3+E3´	15,1 + 15,6

Die Bande B3 entspricht von der Abfolge im Muster und ihrem Erscheinungsbild dem Anionenkanal. Beide Proteine bilden nach der Coomassiefärbung große, ca 0,5 cm (Bande 3) bzw. knapp 1 cm (B3) breite Banden aus. Sie differieren allerdings im Molekulargewicht. Der Anionenkanal hat eine Größe von 96 kDa, während B3 110 kDa (Oa, On, Om, Sg) respektive 120 kDa (Sm) schwer ist. Die auf Höhe des Anionenkanals befindlichen Banden B3a bis B6 können keinem Humanprotein zugeordnet werden. Der übrige Abschnitt B umfaßt den Bereich der Proteine 4.1 - 4.9.

Die charakteristische Doppelbande 4.1 / 4.2 der menschlichen Erythrozytenmembran hat in dieser Form keine Entsprechung im Bandenspektrum der roten Blutkörperchen der analysierten Tilapien. Sie besitzen in dieser Region die Proteine B5 und B6. Mit einem mittleren Molekulargewicht von 81,8 kDa liegt das Polypeptid B5 genau zwischen beiden Banden, während sich das 76,8 kDa große Protein B6 unterhalb von Protein 4.2 befindet. Die Banden B7, B 8 und B9 sind lagegleich mit nicht näher charakterisierten Membranproteinen der Humanerythrozyten. B11 hingegen liegt auf Höhe der Bande 4.5/6, während B13 mit 47 kDa dem Demantin (Bd. 4.9) entspricht. Demantin befindet sich wie B13 direkt oberhalb der Bande 5, die das gleiche Molekulargewicht (rd. 43 kDa) und Aussehen hat wie C1. Bande 5 enthält zwei Proteine: Aktin und Tropomodulin.

Die Abschnitte C und D des Tilapienbandenmusters beinhalten insgesamt 13 Banden. Die Auftrennung der Humanerythrozytenmembranen zeigt in diesem Bereich nur die 3 typischen Hauptkomponenten: G3PD, Stomatin und Protein 8. Sie liegen auf der Höhe von C4, C6 und D2. Während diese letzten beiden Banden in ihrer Erscheinung Stomatin bzw. Protein 8 gleichen, unterscheiden sich C4 und die Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase deutlich. G3PD stellt eine breite, intensiv gefärbte Bande vergleichbar dem Aktin dar. C4 hingegen ist eine sehr feine Coomassiebande.

Nach Protein 8 folgt mit $15,5 \pm 0,62$ kDa als letzte Bande das menschliche Hämoglobin. Es entspricht in seiner Lage der Hämolysatbande (Abb. 13: Spur 8) und der Bande E3, die sich in einigen Gelen teilweise in eine Doppelbande (E3+E3[^]) aufspaltet. Die restlichen Proteine E1, E2 und E4 sind nur bei Tilapienerythrozyten anzutreffen. In Unterschied zu den roten Blutkörperchen des Menschen weisen die Membranen der untersuchten Tilapien im niedermolekularen Bereich eine hohe Bandenanzahl auf.

3.6.3.2. Artspezifische Unterschiede im Bandenmuster der Erythrozytenmembranen

Der Vergleich der Bandenmuster der einzelnen Tilapienarten untereinander zeigt, daß trotz gleicher Proteinkonzentration in den Proben die Bandenintensität von Art zu Art schwanken kann. Entweder sind Banden in einem Gel wesentlich stärker gefärbt als dies bei den übrigen Arten (s. E1, E2 und E3 von Om; Abb. 13) der Fall ist, oder sie sind nur sehr schwach ausgeprägt, weshalb sie zu fehlen scheinen. Darüber hinaus können in einer Auftrennung zusätzlich einzelne Banden auftreten, sich in Doppelbanden aufspalten oder aber tatsächlich fehlen. Diese Unterschiede treten jedoch nicht regelmäßig auf und sind auch nicht auf eine Art beschränkt oder für sie charakteristisch. Die Auswertung der untersuchten zwölf Gradientengele ergibt vielmehr, daß das beschriebene Bandenmuster konstant und für alle Tilapienarten fast identisch ist.

Regelmäßige, artspezifische Eigenheiten im Bandenmuster finden sich nur bei *Sarotherodon melanotheron* (Tab. 9). Hier weicht das Spektrum der Erythrozytenmembranproteine an fünf Stellen von dem der übrigen untersuchten Tilapien ab. *S. melanotheron* fehlen unter anderem die Banden A4, B1 und B2.

Tabelle 9: Unterschiede im Coomassiebandenmuster der Erythrozytenmembrankomponenten von Sarotherodonmelanotheron im Vergleich zu Oreochromis aureus, O. niloticus, O. mossambicus und Sarotherodon galilaeus

Coomassiebande [kDa]	Bemerkungen
A4 : 179,6 ± 4,58	fehlt bei Sarotherodon melanotheron
B1 : 152,9 ± 4,09	fehlt bei Sarotherodon melanotheron
B2 : 144,1 ± 3,95	fehlt bei Sarotherodon melanotheron
B3 : 118 ± 3,60	B3 _{Sm} ca. 10 kDa schwerer als B3 bei Oa, On, Om und Sg
B3a : 113,7 ± 5,17	kommt nur bei Sm vor

Der auffallendste Unterschied jedoch ist die Bande B3. Dieses Membranprotein hat ein bei *Sarotherodon melanotheron* ein mittleres Molekulargewicht von 120 kDa und reicht in den Auftrennungen bis an die Bande A4 (180 kDa) der vier anderen Tilapien. Bei ihnen ist B3 mit 110 kDa rund 10 kDa kleiner. Aufgrund der Ausdehnung von B3_{Sm} besteht die Möglichkeit, daß die Polypeptide B1 und B2 bei *S. melanotheron* gar nicht fehlen, sondern im Bereich dieser Bande liegen und somit in der Coomassiefärbung nicht zu erkennen sind. Mit 114 kDa weist *S. melanotheron* unterhalb von B3 noch ein zusätzliches Membranprotein (B3a) auf, das den anderen Arten fehlt.

3.6.4. Vergleich reduzierter und nicht reduzierter Membranen

Die vergleichende Auftrennung reduzierter und nicht reduzierter Membranproben in der diskontinuierlichen 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE gilt dem Nachweis von Disulfidbrücken (R-S-S-R[^]) in Proteinen. Dadurch können Rückschlüsse auf Quartärstruktur gezogen werden. Läßt man im Probenpuffer das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol (ME) weg, bleiben die über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Polypeptidketten eines Moleküls erhalten. Es zerfällt also nicht in seine Untereinheiten und hat daher ein höheres Molekulargewicht als im reduzierten Zustand.

Die Auftrennung der nicht reduzierten Proben (Abb. 14, links) zeichnet sich durch eine zum Teil deutlich geringere Bandenschärfe und -intensität aus. Die Eichproteine zeigen ein verändertes Laufverhalten: Albumin, Katalase und α -Lactalbumin wandern im Vergleich zu den ME versetzten Proben weiter in das Gel ein. Die Albuminbande (67 kDa) liegt mit 56,4 kDa nicht mehr oberhalb, sondern direkt unterhalb der Katalase (60 kDa). Im hochmolekularen Bereich treten zwei neue, 523 und 450 kDa große Banden auf. Eine zusätzliche Bande befindet sich auch zwischen der kleinen Ferritineinheit und dem α -Lactalbumin.

Bei der nicht reduzierten Membranprobe sind keine neuen Banden hinzugekommen. Zwischen den Proteinen B3 und B5 ist die Laufspur durchgehend angefärbt, weshalb im Gegensatz zur reduzierten Probe einzelne Polypeptide in diesem Bereich nicht zu erkennen sind. Auffällig ist das Fehlen von B9 sowie die starke Ausprägung der Bande B11. In der ME behandelten Proben erscheint B11 als feine, scharfe Coomassiebande. Ebenfalls deutlich kräftiger als bei den reduzierten Membranproteinen ist die Bande C3. Weitere Unterschiede lassen sich nicht feststellen.



Abb. 14: Vergleich nicht reduzierter und reduzierter Erythrozytenmembranen von On nach Auftrennung in der diskontinuierlichen 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE. Links: EP und On nicht reduziert, rechts: On und EP reduziert. MW-Angaben: EP reduziert.

3.7. Solubilisierung von Membranproteinen mit Triton X-100

Das Löslichkeitsverhalten von Membranproteinen gegenüber dem nichtionischen Detergenz Triton X-100 (TX-100) erlaubt Rückschlüsse auf die Position der Polypeptide in der Plasmamembran. TX-100 solubilisiert integrale Proteine, die durch hydrophobe Domänen oder Seitenketten in der Lipiddoppelschicht verankert sind. Periphere Proteine hingegen, die über Wasserstoffbrücken an der zytoplasmatischen Seite der Membran assoziiert sind, werden in der Regel nicht isoliert. Sie bilden definitionsgemäß das Membran- oder Zytoskelett.



Abb. 15: Vergleich TX-löslicher und TX-unlöslicher Membrankomponenten nach Auftrennung in der diskontinuierlichen 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE (Proben reduziert). a (On): Spur 1: EP, Spur 2: Ausgangsprobe, Spur 3: TX-unlösliche Fraktion, Spur 4: TX-lösliche Fraktion. b (On): doppeltes Probenvolumen. Spur 1: Ausgangsprobe, Spur 2: TX-lösliche Fraktion. c (Sm): Spur 1: TX-lösliche Fraktion, Spur 2: TX-unlösliche Fraktion.

Auftrennungen der solubilisierten Membrankomponenten und der nicht löslichen Proteinmatrix sind in Abbildung 15 wiedergegeben. Nach dem Abzentrifugieren des TX-löslichen Überstandes verbleiben im Sediment die Fraktion der Zytoskelettproteine. Hierzu zählen die markanten Banden A1, A2, A4, B1, B7, B9, B10, B12 und C1. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse aus drei Solubilisierungsversuchen mit Erythrozytenmembranen von *Oreochromis niloticus* (On) gibt Tabelle 10. Bei Sm erkennt man mit 179,2 , 151,7 und 141,2 kDa drei Polypeptide, die den Banden A4, B1 und B2 entsprechen (Abb. 15c: Spur 2). Sie fehlen also im Vergleich zu den anderen hier untersuchten Tilapienarten nicht, sondern werden nur von der Bande B3, die eine Ausdehnung von ungefähr 120-180 kDa hat, überdeckt. Mit 134,6 und 128,4 kDa befinden noch zwei weitere Proteine im Bereich von B3. Auch bei On gibt es innerhalb von B3 vergleichbare Proteine, die in Abbildung 15a jedoch nur schwach zu erkennen sind.

TX-unlöslich [kDa]	CBB-Bandenmuster [kDa]	TX-löslich [kDa]
	neu	$371,1 \pm 30,39$
	neu	$273,7 \pm 11,19$
$250,5 \pm 2,69$	A1 (243,3 ± 9,87)	
$225,9 \pm 6,58$	A2 (226,7 ± 7,29)	
$201,4 \pm 0,21$	A3 (200,0 ± 4,56)	
$180,5 \pm 1,63$	A4 (179,6±4,58)	
$152,8 \pm 5,59$	B1 (152,9 ± 4,09)	
$147,2 \pm 1,65$	B2 (144,1 ± 3,95)	
$138,8 \pm 3,00$	neu ("in B3")	
$123,7 \pm 2,26$	neu ("in B3")	
	B3 (110,7 ± 3,79)	$110,7 \pm 7,20$
	neu	$102,6 \pm 1,09$
	B4 (92,0 ± 3,20)	$92,2 \pm 2,93$
	B5 (81,8 ± 2,26)	$81,8 \pm 0,20$
	B6 (76,8 ± 2,08)	$75,6 \pm 2,25$
$68,5 \pm 1,42$	B7 (70,6 ±2,11)	$71,2 \pm 1,36$
	B8 (66,3 ± 2,02)	$64,5 \pm 1,98$
$62,8 \pm 2,05$	B9 (61,2 ± 1,98)	$62,8 \pm 2,05$
54,0 ±1,43	B10 (55,1 ± 1,66)	$54,0 \pm 1,43$
	B11 (53,0 ± 1,50)	$51,9 \pm 1,38$
48,9 ±1,87	B12 (49,4 ± 1,57)	$48,9 \pm 1,87$
$46,1 \pm 1,56$	B13 (46,9 ± 1,39)	$46,1 \pm 1,56$
$45,9 \pm 0,14$	C1 (42,8 ± 1,27)	
	C2 (40,6 ± 1,10)	$39,3 \pm 1,24$
	C3 (38,8 ± 1,10)	$37,8 \pm 1,47$
	C4 (36,0 ± 0,99)	$34,2 \pm 1,63$
	C5 (33,6 ± 0,86)	$32,2 \pm 1,26$
	C6 (31,4 ± 0,84)	$29,8 \pm 1,04$
$28,9 \pm 0,42$	C7 (28,9 ± 0,74)	$27,5 \pm 0,89$
	C8 (27,0 ± 0,81)	$24,9 \pm 1,31$
$24,4 \pm 1,21$	C9 (25,9 ± 0,56)	
$23,8 \pm 0,42$	D1 (23,3 ± 0,73)	$23,8 \pm 0,42$
	D2 (21,9 ± 0,71)	$23,3 \pm 1,14$
	D3 (20,9 ± 0,75)	$21,6 \pm 1,63$
	D4 (20,0 ± 0,77)	?
	E1 (17,4 ± 0,54)	$17,8 \pm 0,65$
16,4 + 15,8	E2 (16,7 ± 0,57)	$16,4 \pm 0,47$
$14,6 \pm 0,83$	E3 (15,1 ± 0,68)	15,2 + 14,6
$13,8 \pm 0,54$	E4 (13,8 ± 063)	$13,8 \pm 0,54$

 Tabelle 10: TX-100 lösliche und unlösliche Erythrozytenmembranproteine von Oreochromis niloticus nach drei Solubilisierungsversuchen mit Triton X-100.

Das Vorkommen der Zytoskelettproteine A1, A2, A4, B1 und C1 in der TX-löslichen Fraktion von *Oreochromis niloticus* (Abb.15a: Spur 4) ist auf eine Kontamination mit Sediment beim Abpipettieren zurückzuführen. In einem Versuch mit doppelter Probenmenge und Absaugen nur eines Teils des löslichen Überstandes fehlen die angeführten Banden (Abb. 15b: Spur 2). Auch bei *Sarotherodon melanotheron* tauchen diese Polypeptide nicht in der

TX-löslichen Fraktion auf (Abb. 15c: Spur 1). Die überwiegende Zahl der Proteine läßt sich mit Triton X-100 aus der Erythrozytenmembran extrahieren. Die mengenmäßig dominierende Bande ist jedoch B3. Weitere integrale Polypeptide sind B4-B6, B11 und C2-C8. Hinzu kommen zwei neue Proteine mit einem Molekulargewicht von rund 270 und 370 kDa. Sie sind in den Ausgangsproben nicht zu erkennen, sondern erst nach dem Herauslösen mit TX-100. Die 270 kDa Komponente liegt im oberen Bereich der Bande A1 bzw. grenzt an sie. Einige Banden wie z.B. B7, B10, B12, B13, C7, D1 oder auch E2-E4 finden sich sowohl in der TX-löslichen, als auch in der unlöslichen Fraktion.

3.8. PAS-Färbung

Der Nachweis glykosilierter Membrankomponenten nach der Elektrophorese durch die Oxidation mit Perjodsäure und anschließender Umsetzung mit Schiffs Reagenz führt zur Ausbildung fuchsinroter Banden in den Polyacrylamidgelen. Abbildung 16 zeigt ein solches PAS gefärbtes Gel (links) zusammen mit dem coomassiegefärbten Vergleichsabschnitt. Durch die unterschiedliche Behandlung der Gelhälften während des jeweiligen Färbeverfahrens quellen beide Abschnitte verschieden stark. Dies wird durch eine mehrtägige Inkubation der Gradientengele in 10% Essigsäure weitestgehend aufgehoben. Während der gemeinsamen Lagerung kommt es zu einer teilweisen Anfärbung der Proteine im PAS-Abschnitt. Aus dem Vergleichsgel herausgelöster Coomassiefarbstoff bindet an die Banden A1, A2, B13 und C1. Dies erleichtert die Ausrichtung der Gelhälften und minimiert den Fehler in der Molekulargewichtsbestimmung. Insgesamt vier PAS-Gele werden ausgewertet.



Abb. 16: PAS-Färbung (rot) der Erythrozytenmembranproteine nach Auftrennung in der diskontinuierlichen 5-15%-SDS- Gradienten-PAGE (rechts CBB gefärbter Gelabschnitt). Spur 1: Hämolysat, Spur 2: Humanerythrozytenmembranen, Spur 3: Oa, Spur 4: On, Spur 5: Om, Spur 6: Sg, Spur 7: Sm, Spur 8: On, Spur 9: EP. Balken: schwache PAS-Banden.

Das PAS-Färbung des Gradientengels zeigt bei den Humanerythrozytenmembranen fünf Banden. Das erste und am intensivsten gefärbte PAS-Protein hat ein Molekulargewicht von $87,3 \pm 3,9$ kDa. Gleich darunter folgt eine schmale, $82,1 \pm 2,1$ kDa große PAS-Bande. Mit $61,6 \pm 3,1$ kDa ist das dritte PAS-Polypeptid nur sehr schwach zu erkennen. Die nächsten zwei PAS-positiven Proteine zeigen wieder eine stärkere Reaktion und haben ein Molekulargewicht von $42,1 \pm 1,9$ bzw. $38,3 \pm 1,9$ kDa. Unterhalb der (gestörten) Lauffront liegen weitere PAS-positive Komponenten.

Bei den Tilapienerythrozytenmembranen lassen sich mit der PAS-Färbung nur zwei Glykoproteine im Polyacrylamidgel nachweisen. Die dominierende PAS-Bande ist das Protein B3 mit 107, $5 \pm 2,0$ kDa bei *O. aureus, O. niloticus, O. mossambicus* und *S. galilaeus* sowie mit 120,7 \pm 1,4 kDa bei *S. melanotheron*. Neben dieser starken PAS-Reaktion gibt es noch eine wesentlich schwächere PAS-Bande mit 59,4 \pm 1,0 kDa. Dieses Glykokonjugat, das stets bei *Sarotherodon melanotheron* am deutlichsten ausgeprägt ist, liegt auf Höhe der Coomassiebande B9. Weitere, nicht in jeder PAS-Färbung zu sehende positive Abschnitte befinden sich bei 200 kDa auf Höhe der Bande A3 sowie zwischen B5-B9. Teilweise ist oberhalb der Bande A1 noch eine PAS-Färbung zu erkennen. Deutlich ist die PAS-Reaktion unterhalb der Lauffront.

Während mit B3 und B9 bei den Tilapien lediglich zwei Proteine nachgewiesen werden, finden sich in den Membranen der roten Blutkörperchen des Menschen fünf PAS-Banden. Eine Übereinstimmung zwischen den PAS-Proteinen aus Tilapien- und Humanerythrozyten besteht möglicherweise im 60 kDa Bereich. Sowohl die untersuchten Tilapien weisen hier mit 59,4 \pm 1,0 kDa eine PAS-Bande auf als auch die Humanmembranen mit 61,6 \pm 3,1 kDa. Gemeinsam reagieren in allen Membranproben Komponenten, die im Gel vor der Ionenfront wandern. Die Hämolysatprobe dagegen enthält kein PAS positives Material.

Zur Überprüfung, ob es sich bei den PAS-Banden um integrale oder periphere Proteine handelt, werden die Erythrozytenmembranen in Triton X-100 solubilisiert und der Überstand (TX-lösliche Fraktion) sowie das Sediment (TX-unlösliche Fraktion) in der SDS-PAGE aufgetrennt. Um einen direkten Vergleich zwischen Coomassie- und PAS-Banden zu ermöglichen, werden anschließend die Membrankomponenten aus dem Gel auf eine PVDF-Folie geblottet und dann gefärbt (Abb. 17). Im Unterschied zum Polyacrylamidgel verändert die PVDF-Folie bei den unterschiedlichen Färbemethoden nicht ihre Größe. Es treten keine Quellungsartefakte auf, die den Bandenvergleich erschweren und die Molekulargewichtsbestimmung beeinflussen. Gleichzeitig wird ein Überfärben von PAS-Banden mit Coomassie verhindert. Weil die PAS-Reaktion im Gel teilweise sehr schwach war und beim Elektrotransfer nicht alle Proteine zu 100% aus dem Gel auf die Blotfolie übertragen werden, ist bei diesem Ansatz die Probenmenge auf 100 µg Erythrozytenmembranen verdoppelt worden. Abbildung 17 zeigt, daß sich sowohl bei Oreochromis niloticus, als auch beim Menschen die PAS gefärbten Proteine mit Triton X-100 aus der Membran der roten Blutkörperchen herauslösen lassen. Es handelt es sich bei den PAS-Banden also um membranintegrale Proteine. Die beiden TX-unlöslichen Fraktionen (Abb. 17: Spur 3 und 6) reagieren zum Teil sehr schwach im Bereich der herausgelösten PAS-positiven Polypeptide.

Der Vergleich der humanen PAS-Banden mit der Coomassiefärbung (Abb. 17: Spur 7) läßt klar erkennen, daß die erste Bande (90,6 kDa) im unteren Bereich des Anionenkanals liegt und die zweite PAS-Bande (80,0) auf Höhe des Proteins 4.1. Der Anionenkanal selbst ist nicht gefärbt. Mit 65,5 kDa befindet sich das dritte PAS-Polypeptid im Bereich der Bande 4.5 und ist auch im Blot nur schwach zu erkennen. Die vierte PAS-Bande (41,7 kDa) hat die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie das Aktin. Darunter folgen mit 36,8 und 35,0 kDa zwei weitere Glykoproteine, von denen das kleinere auf Höhe der Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase liegt. Dieses 35 kDa Protein ist in Abbildung 16 aufgrund der Überfärbung mit Coomassie nicht zu sehen. In Gelen, bei denen sich kein Coomassie angelagert hat, ist diese Bande dagegen anzutreffen. Zusätzlich zu den Ergebnissen aus der

Gelfärbung tauchen auf der PVDF-Membran mit 24,6 und 21,2 kDa zwei neue PAS-Banden auf. Sie liegen oberhalb der Proteine 7 bzw. 8.



Abb.17: PAS-Färbung TX-löslicher und TX-unlöslicher Membrankomponenten von On (Spur 2-4) und Humanerythrozyten (Spur 5-7) nach Auftrennung in der diskontinuierlichen 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: On Ausgangsprobe CBB und PAS gefärbt, Spur 3: On, TX-unlösliche Fraktion (PAS), Spur 4: On, TX-lösliche Fraktion (PAS), Spur 5: Humanerythrozytenmembranen, TX-lösliche Fraktion (PAS), Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Ausgangsprobe CBB und PAS gefärbt, Spur 8: EP. Balken: PAS-Banden bei 365, 284 und 266 kDa. ◀ : Humane PAS-Banden

Verglichen mit den PAS-Färbungen im Gel, lassen sich auch bei *O. niloticus* auf der PVDF-Membran unter anderem durch die größere Probenmenge weitere Banden erkennen. Die TXlösliche Fraktion (Abb. 17: Spur 4) zeigt im hochmolekularen Bereich von der Trenngelkante bis 365 kDa eine durchgehende intensive Reaktion. Direkt oberhalb des Proteins A1 liegt mit 284 kDa eine kräftige PAS-Bande, die im Coomassie gefärbten Abschnitt nur als stärkere Hintergrundfärbung zu erkennen ist. Ein weiteres, 266 kDa großes Glykoprotein befindet sich auf gleicher Höhe wie A1. Es wird jedoch im Gegensatz zu diesem durch Triton X-100 aus der Erythrozytenmembran gelöst. Die Bande A1 enthält also mindestens zwei Polypeptide: ein peripheres Membranprotein und ein integrales Glykoprotein, das nicht mit CBB G-250 nachgewiesen wird.

Die zwei übrigen PAS gefärbten Proteine auf Höhe von B3 (120 kDa) und B9 (65,5 kDa) bestätigen die Ergebnisse aus der Gelfärbung. Trotz der Unterschiede im Molekulargewicht ist die Zuordnung der Banden aufgrund des Vergleichs mit der Coomassiefärbung eindeutig. Der Vergleich der beiden TX-löslichen Fraktionen zeigt, daß B9 und die dritte PAS-Bande der Humanerythrozyten die gleiche Lage haben.Zwischen den Banden B3 und B9 ist eine diffuse PAS-Reaktion zu erkennen, die auch teilweise im Gel zu finden ist. Im Unterschied zum Gradientengel ist die Färbung unterhalb der Lauffront auf dem Blot nur sehr schwach ausgeprägt.

Zur Überprüfung, ob die PAS-Proteine Disulfidbrücken enthalten, werden reduzierte und nicht reduzierte Erythrozytenmembranen von *Oreochromis niloticus* aufgetrennt (Abb. 18). Die unterschiedliche Probenvorbehandlung führt zu keiner Veränderung des Molekulargewichtes der PAS-Banden bei 280 kDa, B3 und B9. Diese Glykoproteine besitzen somit keine über Disulfidbrücken gebundenen Untereinheiten. Der Vergleich mit dem Coomassiebandenmuster zeigt jedoch, daß in der nicht reduzierten Probe die Bande B9 fehlt. Somit müssen B9 und die auf gleicher Höhe liegende PAS-Bande zwei verschiedene Proteine sein. Ein Unterschied zwischen beiden Ansätzen besteht in der Bandenschärfe. Das 280 kDa PAS-Protein tritt in der SDS/ME versetzten Probe klar hervor, während es unter nicht reduzierenden Bedingungen nur schwach zu erkennen ist. Genau umgekehrt sind die Verhältnisse bei einem 52,0 kDa großen PAS-Protein, das im nicht reduziertem Zustand deutlich hervortritt. Allgemein ist festzuhalten, daß die Intensität der PAS-Reaktion von Färbung zu Färbung variiert. Deutlich wird dies beim Vergleich der *O. niloticus* Proben in Abb. 16 (Spur 4), Abb. 17 (Spur 2) und Abb. 18 (Spur 4). Trotz gleicher Proteinkonzentration reagiert die 280 kDa Bande im Gel nicht, in Abb. 17 äußert schwach, in Abb. 18 dagegen sehr kräftig.



Abb. 18: PAS-Färbung nicht reduzierter und reduzierter On-Membranen nach Auftrennung in der diskontinuierlichen 5-15%-SDS-Gartienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Nicht reduzierte Proben: Spur 1: EP, Spur 2: On (CBB-Färbung), Spur 3: On (PAS-Färbung). Reduzierte Proben: Spur 4: On (PAS-Färbung), Spur 5: On (CBB-Färbung), Spur 6: EP. ▶: 280 kDa PAS-Bande

3.9. Nachweis biotinilierter Membranproteine

Zur Markierung von Oberflächenproteinen der Erythrozytenmembran wird ein wasserlöslicher Biotinester an die aufgereinigten, roten Blutkörperchen von *Sarotherodon melanotheron* und *Oreochromis niloticus* gekoppelt. Nach 30 minütiger Inkubation der Tilapienerythrozyten mit Sulfobiotin-X-NHS finden sich keine Anzeichen von Hämolyse. Das Inkubationsmedium ist farblos ebenso die jeweiligen Überstände des Waschpuffers nach dem Zentrifugieren der Zellen. Aus der Coomassiefärbung in Abb. 19 und 20 geht hervor, daß es keine Lageunterschiede zwischen unbehandelten (jeweils Spur 2) und biotinmarkierten Proteinbanden (jeweils Spur 3) gibt. Die Kopplung des Biotinester an die Oberflächenmoleküle der Erythrozytenmembran hat demnach zu keiner meßbaren Veränderung des Molekulargewichtes geführt. Damit ist ein direkter Vergleich zwischen Biotinmarkierung und Coomassiebanden möglich. Der Nachweis der biotinilierten Proteine erfolgt durch die Bindung von Streptavidin-AP (jeweils Spur 4). Das Streptavidin reagiert nur mit den Biotinresten, denn die Inkubation mit unmarkierten Erythrozytenmembranproteinen führt zu keiner Bandenbildung (jeweils Spur 5). Die Bindung des Streptavidin-AP an die biotinilierten Polypeptide ist also spezifisch.



Abb. 19 und 20: Nachweis biotinmarkierter Erythrozytenmembranproteine von On (Abb. 19) und Sm (Abb. 20) nach Auftrennung in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Ausgangsprobe (CBB-Färbung); Spur 3: biotinilierte Probe (CBB-Färbung), Spur 4 Biotinnachweis mit Streptavidin-AP; Spur 5: Reaktion der Ausgangsprobe mit Streptavidin-AP. Balken: biotinilierte Banden im Bereich von B3

Die Biotinilierungsansätze weisen zum Teil eine starke, fast durchgehende Hintergrundfärbung auf (Abb. 20), die den Nachweis schwach gefärbter Banden verhindert. Lediglich stärker markierte Proteine können sicher identifiziert werden. Eine Übersicht der biotinmarkierten Membrankomponenten von *O. niloticus* und *S. melanotheron* aus drei Kopplungsreaktionen gibt die Tabelle 11 wieder.

Nach den beiden Kopplungsversuchen mit *Oreochromis niloticus* Erythrozyten lassen sich im Blot zehn gemeinsame Biotinbanden nachweisen (s. Tab. 11). Zu den am stärksten markierten Membranproteinen zählt ein knapp 100 kDa großes Polypeptid, das direkt unter B3 liegt. Es folgen die 92 kDa schwere Bande B4 und das Protein E1. Die Bande E1 reagiert mit Abstand am kräftigsten. Charakteristisch für *Oreochromis niloticus* ist der intensiv gefärbte Bereich zwischen 90 und 60 kDa. Hier ist die Reaktion durchgehend so stark, daß keine Einzelbanden zu erkennen sind. In beiden Biotinilierungsansätzen werden die Proteine B3, B9, B10 und C1 eindeutig nicht markiert.

Biotinilierte Banden On [kDa]	CBB-Bandenmuster [kDa]	Biotinilierte Banden Sm [kDa]
248,7*	A1 (243,3 ± 9,87)	
$193,6 \pm 3,1$	über A4 (180 \pm 4,6)	
163,0 ±4,8	über B1 ($153 \pm 4,1$)	
	innerhalb von B3 _{Sm}	169,3 ± 3,2
	$B3_{Sm}$ (118,9 ± 5,2)	121,2 ± 0,6
$98,8 \pm 2,0$	unter $B3_{On}$ (111 ± 4,3)	99,9 ± 1,6
91,6 ± 3,5	B4 (92,0 ± 3,20)	90,7 ± 1,0
87,7 – 58,6	zw. B4 und B10	
	B9 (61,2 ± 1,98)	$63,3 \pm 1,0$
46,8*	B12 (49,4 ± 1,57)	
41,7 – 36,5	zw. C1 und C4	
$32,9 \pm 1,1$	C5 (33,6±0,86)	
$31,0 \pm 0,6$	C6 (31,4 ± 0,84)	
28,1*	C7 (28,9 ± 0,74)	28,9*
26,8*	C8 (27,0 ± 0,81)	$26,4 \pm 0,2$
$25,3 \pm 0,7$	C9 (25,9 ± 0,56)	$24,9 \pm 0,3$
$24,1 \pm 0,2$	D1 (23,3 ± 0,73)	$22,9 \pm 0,1$
	D4 $(20,0 \pm 0,77)$	$20,2 \pm 0,2$
$18,0 \pm 0,2$	E1 (17,4 ± 0,54)	

 Tabelle 11: Biotinilierte Erythrozytenmembranproteine von O. niloticus und S. melanotheron. (n=2. *: nur in einem Kopplungsversuch markierte Banden) Intensiv gefärbte Proteine sind fett hervorgehoben.

Die in Tabelle 11 mit einem * versehenen Banden sind nur in einem Biotinilierungsversuch (Abb.19) zu finden. Hier zeigen sich noch Reaktionen auf Höhe der Banden A1, B12, C7 und C8. Der unterhalb der Bande C1 gefärbte Bereich entspricht den Proteinen C2 und C3.

Die drei Biotinilierungsansätze mit *Sarotherodon melanotheron* Erythrozyten ergeben neun gemeinsame Banden. Aufgrund der hohen Hintergrundfärbung lassen sich nur stärker markierte Membrankomponenten erkennen. Deutliche Reaktionen finden sich mit 170 und 120 kDa am Beginn und am Ende der Bande B3, sowie bei einem 100 kDa großen Protein oberhalb der ebenfalls intensiver gefärbten Bande B4. Zu den stärker biotinilierten Proteinen zählen weiterhin die Polypeptide B9, C8 und C9. Außerdem bindet Streptavidin noch an die Banden D1, D4 und in einem Ansatz an C7. Negativ sind die Polypeptide A1, A2 und C1.

Vergleicht man die Biotinilierung von Erythrozyten aus *Sarotherodon melanotheron* und *Oreochromis niloticus* so gibt es ein übereinstimmende Reaktionen bei 100 kDa, den Banden B4, C9, D1 und E1. Allerdings ist $E1_{On}$ sehr viel stärker markiert. Dies gilt in einzelnen Versuchen auch für die Proteine C7_{On} und C8_{On}. Bei beiden Tilapienarten kommt es in allen Ansätzen zu keiner Markierung des Polypeptides C1. Die Unterschiede in der Biotinilierung von *S. melanotheron* und *O. niloticus* Erythrozyten liegen zum Einen in der Bande B3, die bei *O. niloticus* weder im oberen, noch im unteren Bereich eine Biotinkopplung aufweist. Zum Anderen fehlt den roten Blutkörperchen von *S. melanotheron* die starke Reaktion zwischen 60 und 90 kDa.

3.10. Charakterisierung der Membranproteine mit Antikörpern

Zum spezifischen Nachweis einzelner Proteine werden die geblotteten Membranproben mit verschiedenen Antikörperlösungen inkubiert, die gegen charakteristische Membranproteine menschlicher bzw. kernhaltiger Erythrozyten gerichtet sind.



3.10.1. Anti-Humanerythrozytenspektrin (a+b)-Antikörper

Dieser monoklonale Antikörper bindet durchgehend bei allen Tilapienproben intensiv an die Proteine A1 und A2. Ebenso ist die Reaktion mit dem menschlichen β -Spektrin sehr stark, während das α -Spektrin hingegen nur schwach interagiert (Abb. 21). Das unterschiedliche Bindungsverhalten gegenüber den Humanspektrinen entspricht den Angaben des Herstellers. Auch der Nachweis weiterer Polypeptide unterhalb 220 kDa. Bei den Tilapien werden insbesondere noch die Banden B1 (151,8 kDa) und B2 (137,8 kDa) detektiert. Der Vergleich mit der Kontrolle (Abb. 23) zeigt, daß der Nachweis spezifisch ist. Die Inkubation mit IgG1-Antikörpern, die nicht gegen Spektrin gerichtet sind, führt zu keiner Bandenbildung auf Höhe der angesprochenen Proteine.

3.10.2. Anti-Ca²⁺-ATPase-Antikörper

Der monoklonale Antikörper gegen die Ca²⁺-ATPase aus den roten Blutkörperchen des Menschen weist eindeutig Unterschiede zwischen Erythrozytenmembranen von *Sarotherodon melanotheron* und den übrigen Tilapien nach (Abb. 22). Während *S. melanotheron* keine oder nur eine sehr schwache Reaktion bei 116 kDa zeigt, bindet der Antikörper bei den anderen Arten intensiv an zwei 175 und 150 kDa große Banden. Der Vergleich mit der Coomassie-färbung zeigt, daß diese beiden Proteine sich nicht mit CBB G-250 nachweisen lassen. In der Spur der Humanmembranen interagiert der Antikörper auch nur schwach bei 240 k Da, 200,6 kDa, 138,6 kDa und 105 kDa. Eine Übereinstimmung mit den Tilapienbanden gibt es nicht.

Abb. 21: Immunoblot mit einem monoklonalen Anti-Humanspektrin-Antikörper nach Auf-trennung der Membranproteine in der diskontinuierlichen 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat.



Abb. 22: Immunoblot mit einem monoklonalen Anti-Ca²⁺-ATPase-Antikörper nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: Hämolysat, Spur 2: Humanerythrozytenmembranen, Spur 3: Oa, Spur 4: On, Spur 5: Om, Spur 6: Sg, Spur 7: Sm, Spur 8 Oa, Spur 9: EP.



Abb. 23: Maus IgG1 Kontrollblot nach Auftrennung der Erythrozytenmembranproteine in der diskontinuierlichen 5-15% SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm Spur 7: Humanerythrozytenmembranen , Spur 8: Hämolysat.

3.10.3. Anti-a-Tubulin-Antikörper

Der monoklonale Anti-α-Tubulin-Antikörper bindet in zwei Blots jeweils an ein 55,1 kDa großes Protein, das der Bande B10 im Bandenspektrum entspricht (Abb. 24). Diese Bande findet sich bei allen untersuchten Tilapienmembranproben. Trotz des annähernd gleichen Proteingehaltes fällt bei Oa die Reaktion immer am schwächsten aus. Eine entsprechende Bande wird weder bei den menschlichen Erythrozytenmembranproteinen nachgewiesen, noch reagiert der Antikörper in diesem Bereich mit der Hämolysatprobe.

Im unteren Abschnitt des Blots ist die Auftrennung im Gel bzw. der Elektrotransfer der Membranproteine gestört worden. Die in diesem Bereich nachgewiesenen Banden sind auf eine unspezifische Wechselwirkung zurückzuführen, wie der Vergleich mit der Kontrolle (Abb. 23) zeigt.



Abb. 24: Immunoblot mit einem monoklonalen Anti- α -Tubulin-Antikörper nach Auftrennung der Membranproteine in der diskontinuierlichen 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat.

3.10.4. Anti-Aktin-Antikörper

Der aus Kaninchen stammende Anti-Aktin-Antikörper erkennt ein 42,6 kDa großes Protein, das gleiche elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit hat wie das Tilapienpolypeptid C1 oder die Bande 5 der Humanerythrozytenmembranen (Abb. 25). Die Reaktion ist bei allen Proben einheitlich und sehr intensiv. Darüber hinaus bindet der Antikörper noch an Humanbanden mit 35,3, 27,8 und 21,5 kDa. Die letzten beiden Proteine werden auch bei On und Om nachgewiesen. Es gibt keine Antikörperbindung in der Hämolysatspur und auch die Kontrolle mit Kaninchen IgG zeigt keine Banden an. Das polykonale Antiserum reagiert also spezifisch mit den Membrankomponenten.



Abb. 25: Immunoblot mit einem polyklonalen Anti-Aktin-Antikörper nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: Hämolysat, Spur 2: Humanerythrozytenmembranen, Spur 3: Oa, Spur 4: On, Spur 5: Om, Spur 6: Sg, Spur 7: Sm, Spur 8: Oa, Spur 9: EP.



3.10.5. Anti-Tropomyosin-Antikörper

Abb. 26: Immunoblot mit einem monoklonalen Anti-Tropomyosin-Antikörper nach Auf-trennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat.

Der monoklonale Anti-Tropomyosin-Antikörper bildet nur eine starke Bande bei Om aus (Abb. 26). Mit einem Molekulargewicht von 35,2 kDa entspricht sie der Bande C4. Anhand dieses Merkmales läßt sich *Oreochromis mossambicus* von allen übrigen Arten unterscheiden. Unspezifische Bindungen sind zwischen 16,8 und 15,1 kDa anzutreffen.



3.10.6. Anti-Myosin (Leichte Kette)-Antikörper

Abb. 27: Immunoblot mit einem monoklonalen Anti-Myosin (Leichte Kette)-Antikörper nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat.

Der gegen die 20 kDa große, leichte Kette des Myosins gerichtete monoklonale Antikörper bindet bei allen untersuchten Tilapienarten (Abb. 27) mit 16,4 kDa am stärksten im Bereich der Bande E2 (16,7 kDa), die bei *O. aureus* und *O. niloticus* als Doppelbande ausgebildet ist. Bei *S. melanotheron* reagiert der Antikörper nur auf Höhe des Proteins E2. Es ist die einzige Bande, die im Immunoblot nachgewiesen wird. Dadurch unterscheidet sich diese Art von den anderen untersuchten Tilapien. Bei ihnen reagiert der Anti-Leichtkettenmyosin-Antikörper noch bei 14,7 kDa auf Höhe der Bande E3 (15,1 kDa), während die Hämolysatprobe negativ bleibt. Die Bandenintensität von E3 ist unterschiedlich. Sie steigert sich von *O. aureus* über *O. niloticus* und *O. mossambicus* bis zu *S. galilaeus*. Bei diesen vier Arten wird auch mit 19,2 kDa das Membranprotein D4 (20,0 kDa) nachgewiesen. Weiterhin bindet der monoklonale Antikörper mit 21,5 kDa an das Polypeptid D2 (21,9 kDa) von *O. mossambicus* und *S. galilaeus*. Die Humanerythrozytenmembranen zeigen bei 21,9 und bei 19,7 zwei kräftigere Banden sowie eine schwächere bei 18,7 kDa. Vom Molekulargewicht entspricht dies den Tilapienproteinen D2, D4 und E1. Im Unterschied zu den Tilapien jedoch erfolgt keine Bindung zwischen 15,7 und 16, 4 kDa.

Während die bisher verwendeten Antiseren und monoklonalen Antikörperlösungen aus Immunoglobulinen der Klasse G (IgG) bestanden, ist der Anti-Myosin (Leichte Kette)-Antikörper ein IgM. Zur Überprüfung, ob die beschriebenen Banden auf eine spezifische Bindung des eingesetzten Antikörpers zurückzuführen sind oder aber nur auf unspezifischen Wechselwirkungen beruhen, wird ein zweiter Blot mit einem nicht gegen Leichtkettenmyosin gerichteten Kontrollantikörper in der gleichen Konzentration und für die gleiche Dauer inkubiert (Abb. 28).

Der Kontrollblot zeigt, daß sich die IgM-Moleküle stark an die Banden E1 bzw. E3 von O. *mossambicus* und in abgeschwächter Form an die Bande E2 anlagern. Verglichen mit dem Anti-Leichtkettenmyosin-Antikörper ist die Reaktion mit E1 und E3 sogar kräftiger bzw. gleich. Die Bindung an das Protein $E2_{Om}$ hingegen ist deutlich geringer. Dies bedeutet, daß die Reaktion des monoklonalen Anti-Myosin-Antikörpers mit den Membrankomponenten E1 und E3 von O. *mossambicus* anders als bei E2 nicht von unspezifischen Wechselwirkungen unterschieden werden kann.

Auffallend ist, daß die im Kontrollblot verwendete IgM-Charge sowohl bei allen untersuchten Membranproben mit der Bande E3, als auch mit einer Komponente aus der Hämolysatprobe interagiert. Sie unterscheidet sich darin vom eingesetzten monoklonalen Antikörper. Aufgrund dieser Wechselwirkung ist es fraglich, ob die Bindung des Anti-Leichtkettenmyosin-Anikörpers bei E3 spezifisch ist, auch wenn diese zum Teil deutlich stärker verläuft. Die Banden D2 und D4 werden im Kontrollblot nicht nachgewiesen.



Abb. 28: Kontrollblot mit Maus IgM nach Auftrennung der Erythrozytenmembranproteine in der diskontinuierlichen 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat.

3.11. Charakterisierung der Membranproteine mit Lektinen

Die PAS-Reaktion färbt unabhängig von der Kohlenhydratzusammensetzung nur stark glykosilierte Membranproteine bzw. Glykoproteine in hoher Konzentration an. Lektine dagegen sind nicht nur wesentlich sensitiver, sie ermöglichen auch Rückschlüsse auf die terminalen Kohlenhydratreste der Glykokonjugate. Von den 14 eingesetzten Lektinen binden zehn an die geblotteten Erythrozytenmembrankomponenten. STA, HPA, VVA und SBA zeigen im Blot keine Reaktion. Inkubiert man die Lektinlösungen zuvor mit dem jeweiligen Hemmzucker bzw. Hemmstoff, bleibt eine Interaktion mit den Tilapienproben aus. Lediglich die Humanmembranen zeigen noch eine abgeschwächte Reaktion. Da dies auf eine unspezifische Bindung schließen läßt, werden die bei den Humanproben vorgefundenen Ergebnisse nicht weiter diskutiert.

Wie bei der Gelfärbung treten auch innerhalb der Lektinblots bei den einzelnen Arten unterschiedlich starke Reaktionen bei ein und derselben Bande auf. Teilweise führen einige Lektine zu einer intensive Hintergrundfärbung oder binden durchgehend über weite Bereiche, ohne daß diese Reaktion bestimmten Coomassiebanden zugeordnet werden kann. Soweit möglich, werden die Ergebnisse der eingeführten Nomenklatur folgend vorgestellt. Der Einfachheit halber werden Lektinbanden, die auf Höhe der bekannten Proteinbanden (s. Tab. 7, S.36) liegen und diesen in ihrer Ausprägung gleichen mit der entsprechenden Bandenbezeichnung benannt. Ob es sich dabei tatsächlich um ein und dasselbe Membranprotein handelt, läßt sich mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht klären.

3.11.1. N-Acetylneuraminsäure (NANA) spezifische Lektine

Die Reaktion der beiden NANA-spezifischen Lektine MAA II und SNA gegenüber den geblotteten Membrankomponenten ist in Abb. 29 und 30 dargestellt.



Abb. 29: Lektinblot mit MAA II nach Auftrennung der Membranproteine in diskontinuierlichen der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat.

3.11.1.1. Maackia amurensis Lektin II (MAA II)

MAA II bindet immer an A1, während A2 stets negativ ist (Abb. 29). Der Bereich zwischen A2 und B12 reagiert uneinheitlich. *O. niloticus* ist hier durch eine kräftige, 198 kDa schwere Bande (A3) gekennzeichnet. *O. mossambicus* hingegen zeigt als einzige Art eine deutliche Lektinbindung auf Höhe von A4 (181 kDa). Bei allen drei *Oreochromis*-Spezies ist B2 (145 kDa) positiv. Den *Sarotherodon*-Arten fehlt diese Bande. Unterhalb von B3 besitzt Sm eine 113,4 kDa große Bande, die bei den anderen Tilapien nicht vorkommt. Sie entspricht von ihrem Molekulargewicht der Bande B3a, die nur für *S. melanotheron* typisch ist.

Charakteristisch ist die intensive MAA II-Bindung auf der Hälfte der Trennstrecke. Sie differiert von Art zu Art. *O. aureus* zeigt eine starke Reaktion zwischen 90,7 und 64,8 kDa. Bei *O. niloticus* verschiebt sich diese Zone immer etwas in den höher molekularen Bereich (92,7 - 66,3 kDa). Die Region der intensivsten Färbung weist *O. mossambicus* zwischen 79,3 und 64,1 kDa auf. Sie ist in ihrer Ausdehnung etwa um ein Drittel kleiner als bei den anderen *Oreochromis*-Arten. Auch *S. galilaeus* besitzt nur einen schmalen Abschnitt starker Lektinbindung, der von 90,7 bis 69,3 kDa reicht. Der MAA II positive Bereich von *S. melanotheron* gleicht dem von *O. mossambicus* und liegt zwischen 77,5 und 66,3 kDa. Durch die kräftig Reaktion auf Höhe von B9 (59,3 kDa) kommt es zur Ausbildung einer großen Doppelbande. Diese Reaktion ist typisch für *S. melanotheron*.

Mit Beginn von B10 erscheint das MAA II-Bandenspektrum zwischen den Arten einheitlich. Die Unterschiede beschränken sich meist auf die Bandenintensität. In einigen Fällen sind Banden als Doppelbanden ausgebildet. C1 ist bei allen Arten nicht gefärbt. Das im Abschnitt E vorgefundene Bandenmuster entspricht der Coomassiefärbung. Die Hämolysatprobe bildet eine Bande auf Höhe von E3 aus.

Auf Höhe folgender CBB-Banden liegen MAA II-positive Proteine: A1, A3 (Oa, On, Sm), B3 (schwach), B4 (Oa, On, Sm) B9, B12, B13, C2, C5, D2, E1-E4, Hämolysat MAA II negative Banden: A2, B1, C1, C4 (Oa, Sg)



3.11.1.2. Sambucus nigra Lektin (SNA)

Abb. 30: Lektinblot mit SNA nach Auftrennung der Membranproteine in der diskontinuierlichen 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: Oa, Spur 4: On, Spur 5: Om, Spur 6: Sg, Spur 7: Sm Spur 8: Humanerythrozytenmembranen, Spur 9: Hämolysat.

Wie MAA II bindet auch das Holunderlektin SNA (Abb. 30) bei allen Tilapien an die Bande A1, nicht jedoch an A2. Im Unterschied zum *Maakia*-Lektin reagiert SNA allerdings nicht mit dem Protein B3. *S. melanotheron* hebt sich im hochmolekularen Bereich deutlich von den

anderen untersuchten Tilapien ab. So kommt es im Abschnitt von A2 bis B3 zu keiner Lektinbindung, und auch das positive Polypeptid bei B1 (155 kDa) fehlt *S. melanotheron*. Die kräftige SNA-Bande auf Höhe von B2 weisen alle Arten auf. Ebenso die 118 kDa große Bande innerhalb von B3. Sie ist weder im MAA II-Blot noch in der Coomassiefärbung nachzuweisen. Vergleichbar mit MAA II gibt es auch beim Holunderlektin zwischen 80 und 60 kDa eine Zone verstärkter Bindungsaktivität. Sie ist jedoch längst nicht so intensiv wie bei MAA II. Unterhalb dieser Region ist das Bandenmuster sehr einheitlich und zeigt besonders im niedermolekularen Bereich ab C6 (30 kDa) eine große Anzahl von SNA-positiven Banden, die stark gefärbt sind.

Auf Höhe folgender CBB-Banden liegen SNA-bindende Membranproteine: A1, A3, B1, B2, B4, B9, B10, C2, C4, C5, C6, C7, C8, C9, D1, D2, D4, E1, E2 und E3. Die Hämolysatprobe ergibt eine Bande auf der Höhe von E3. Nicht mit SNA reagieren die Coomassiebanden A2, B3, C1, C3, und D3.

Vergleicht man die Bindungsmuster von MAA und SNA, so werden folgende Komponenten der Tilapienerythrozyten von beiden Lektinen angezeigt: A1, B2 (nicht Sm), Unterkante C1, C2, C5, E1-E3. Ein ähnliches Reaktionsverhalten besteht weiterhin im Bereich zwischen den Banden B6 und B9. Auch wenn SNA hier wesentlich schwächer bindet. Gemeinsam ist beiden Lektinen darüber hinaus, daß es keine Interaktion auf Höhe der Banden A2 und C1 gibt.

3.11.2. Mannose spezifische Lektine



3.11.2.1. *Hippeastrum* Hybrid Lektin (HHA)

Abb. 31: Lektinblot mit HHA nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat. C9: HHA-positive Bande auf Höhe von C9 (artcharakteristisch für Sm). Das Amaryllislektin zeigt bei *O. niloticus, S. galilaeus* und *S. melanotheron* ein 385 kDa schweres Glykoprotein an, das sich durch CBB G-250 nicht anfärben läßt (Abb. 31). Auffällig ist bei allen Tilapienproben die intensive Bindung des Lektins an A1, während A2 keine Reaktion mit HHA zeigt. Wiederum unterscheidet sich *S. melanotheron* von den übrigen Tilapien im Bereich der Bande B1. HHA interagiert nur im unteren Bereich (147 kDa) mit B1. Die obere Hälfte bleibt ungefärbt, wie der Vergleich mit der Coomassiefärbung verdeutlicht. Bei Sm fehlt diese 147 kDa Bande. Statt dessen findet sich hier eine 144 kDa große HHA-Bande, die von ihrer Lage und dem Molekulargewicht der Bande B2 entspricht. Dieses Bindungsmuster gleicht dem SNA-Blot, wo bei Oa-Sg auf Höhe von B1 und B2 stets zwei Banden vorkommen, während Sm nur eine Bande lagegleich zum Protein B2 aufweist.

Wie schon bei SNA hebt sich B3 deutlich von der zwischen den Spuren erkennbaren Hintergrundfärbung als helle Negativbande ab. Direkt unter B3 bindet SNA bei *O. mossambicus* und *S. melanotheron* an ein 103,7 kDa großes Protein. Darauf folgen mit 89,1 und 81,1 kDa zwei intensiv gefärbte Banden, die von ihrer Größe und Abfolge im Muster B4 und B5 entsprechen. B5 spaltet sich teilweise in eine Doppelbande auf. Zwischen 74 und 60 kDa bindet HHA in einen unterschiedlich weiten Bereich. Damit ähnelt HHA dem Bindungsverhalten von SNA in diesem Abschnitt.

Artcharakteristisch ist die Reaktion von HHA bei C9. Die kräftige, 26,1 kDa große Bande wird nur bei *S. melanotheron* angezeigt (s. Markierung in Spur 6, Abb. 31). C1 weist wiederum keine Lektinrezeptoren auf. HHA positive Banden: A1, B4, B5, B10, B12, B13, C5, C9 (nur Sm). HHA negative Banden: A2, B3, B6, B11, C1.



3.11.2.2. Galanthus nivalis Lektin (GNA)

Abb. 32: Lektinblot mit GNA nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat. C9: GNA-positive Bande auf Höhe von C9 (artcharakteristisch für Sm). Die Inkubation der geblotteten Erythrozytenmembranproteine mit GNA ergibt ein Bandenmuster (Abb. 32), das dem von HHA gleicht. Wiederum wird bei On, Om und Sg ein 380 kDa großes Glykoprotein nachgewiesen, daß sich nicht durch CBB-250 angefärben läßt. Ebenso reagiert bei allen Arten die Bande A1 sehr stark mit dem mannosespezifischen Lektin, während A2 keine GNA-Bindungsstellen aufweist. Nur direkt unter diesem Protein gibt es bei 212,8 kDa eine Reaktion. Das Lektin interagiert in der unteren Hälfte von B1, nicht jedoch bei Sm. Hier liegt wie beim HHA-Blot auf Höhe von B2 eine positive Bande (140,5 kDa) die den übrigen vier untersuchten Tilapien fehlt. Im Gegensatz zu HHA bindet GNA schwach an B3. *S. melanotheron* weist innerhalb von B3 eine 123,3 kDa große Bande auf.

Om, Sg und Sm besitzen der Grenze zu B3 bei 107,5 kDa eine GNA-positive Bande. B4 und B5 werden bei allen Arten angezeigt. Wie im HHA-Blot reagiert B5_{Oa} als eine starke Bande, während sonst eine Doppelbande ausgebildet wird. Zwischen 80 und 60 kDa (B6-B9) bindet GNA bei den beiden *Sarotherodon*-Arten durchgehend und gleichmäßig. Distinkte Banden werden nicht angezeigt. On weist von 75,4-67,2 kDa eine intensivere Färbung auf. Oa reagiert von 82,7 bis 65,7 kDa stark mit dem Lektin. Lagegleich zu B10 (58,5 kDa) findet sich bei allen Arten eine GNA-positive Bande. Dies gilt ebenso für B13 (47,1 kDa). Unzweifelhaft ist das Ausbleiben einer Reaktion auf Höhe von C1 (45,4 kDa) und die Färbung einer Bande direkt unterhalb von C1. C2 C5 und C6 sind wiederum bei allen Arten vorhanden. GNA interagiert nur bei Sm auf Höhe der Bande C9 (25,4 kDa) und bestätigt damit das Ergebnis des HHA-Blots. C9 enthält ein mannosehaltiges Glykoprotein, das im Rahmen dieser Untersuchung artspezifisch für Sm ist. In der Hämolysatspur bindet GNA auf Höhe von E3.

3.11.3. N-Acetylglucosamin spezifische Lektine

Von den drei GlcNAc-spezifischen Lektinen LEA, PWM und STA reagiert STA nicht mit den geblotteten Membrankomponenten der untersuchten Tilapienerythrozyten.



3.11.3.1. Lycopersicon esculentum Lektin (LEA)

Abb. 33: Lektinblot mit LEA nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: Oa, Spur 4: On, Spur 5: Om, Spur 6: Sg, Spur 7: Sm, Spur 8: Humanerythrozytenmembranen, Spur 9: Hämolysat. Das Tomatenlektin LEA bindet besonders intensiv an Erythrozytenmembrankomponenten von *O. niloticus* (Abb. 33, Spur 4) und kann bei entsprechender Verdünnung als artspezifisch angesehen werden. Im hochmolekularen Bereich von 450-200 kDa zeigt sich einzig bei On eine durchgehende, starke Färbung. Innerhalb dieser Region deutet sich zwischen 342-310 kDa eine Bande an. Die übrigen Tilapienmembranproben reagieren in diesem Abschnitt entweder äußerst schwach oder überhaupt nicht (Oa). Bei Sg und Sm lassen sich etwas deutlichere Reaktionen bei 310-200 kDa bzw. 323-275 kDa finden, die jeweils als eine Bande gedeutet werden können. Mit Coomassie werden in dieser Zone keine Proteine nachgewiesen.

Der Bereich zwischen 197 und 147 kDa ist ebenfalls nur bei On stark gefärbt. Innerhalb dieser Zone befinden sich drei Banden mit einem Molekulargewicht von 190 kDa, 168 kDa und 158 kDa. Diese Proteine lasen sich jedoch nicht eindeutig in das bekannte Bandenmuster einordnen, da die coomassiegefärbte Referenzprobe oberhalb von B1 eine untypische Auftrennung zeigt. B3 ist bei allen Tilapien schwach gefärbt. In ihrem unteren Bereich kommt es jedoch zu einer verstärkten Lektinbindung bei 100 (Oa-Sg) bzw. 105 kDa (Sm). Eine 94,8 kDa große Bande ist bei On und Om deutlich, bei den übrigen Arten sehr schwach zu erkennen. Oa weist noch bei 40,5 kDa (C3) eine sehr schwache Bande auf.



3.11.3.2. Phytolacca americana ("Pokeweed") Lektin (PWM)

Abb. 34: Lektinblot mit PWM nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: Oa, Spur 4: On, Spur 5: Om, Spur 6: Sg, Spur 7: Sm, Spur 8: Humanerythrozytenmembranen, Spur 9: Hämolysat.

Das ebenfalls GlcNAc-spezifische Lektin PWM der Kermesbeere zeigt ein grundsätzlich anderes Reaktionsmuster (Abb. 34) als LEA. Alle Tilapienmembranproben reagieren fast einheitlich. Eine Lektinbindung oberhalb von A1 gibt es nicht. A1 selbst ist die einzige, intensiv gefärbte Bande im hochmolekularen Bereich. Schwach positiv reagieren noch B4 und B5.

Die Bande C8 ist etwas deutlicher hervorgehoben und auf Höhe von D2 (26,9 kDa) wird ebenfalls eine Bande nachgewiesen. Im niedermolekularen Bereich liegen 3 Banden, die von ihrer Lage E1 bis E3 entsprechen. In der Hämolysatspur findet sich eine Bande auf Höhe von E3.

3.11.4. Galaktose spezifische Lektine

3.11.4.1. Artocarpus integrifolia Lektin (AIA)



Abb. 35: Lektinblot mit AIA nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat.

AIA bildet ein einheitliches Bandenmuster aus (Abb. 35). Lediglich Oa reagiert zum Teil sehr schwach. Auffällig ist eine diffuse Färbung im hochmolekularen Bereich, die sich bis auf 250 kDa erstreckt und auch A1 umfaßt, ohne daß dieses Protein konkret nachgewiesen wird. Bei *O. mossambicus* ist eine schwache Bande (135,3 kDa) innerhalb von B3 anzutreffen.

In allen Spuren reagiert das Lektin stark mit B4 und B5, der "Doppelbande" unterhalb B3. Auch B10 (57,4kDa) weist AIA-Rezeptoren auf. Während bei C1 erneut eine Lektinbindung ausbleibt, wird wieder eine Bande direkt unter C1 und C2 nachgewiesen. Weiter bindet AIA noch stark an C5 (34,4 kDa), C6 (31,9 kDa) sowie C7 (28,9 kDa). Mit 28,2 kDa liegt bei On, Om und Sm eine feine Bande innerhalb von C8. Sie entspricht in ihrer Ausprägung nicht der starken gefärbten Coomassiebande C8. Bei allen Arten weist D2 (22,1 kDa) eine AIA-Bindungsstelle auf. Auch E3 und die Hämolysatbande sind positiv.

3.11.4.2. Abrus precatorius Lektin (APA)

APA zeigt ein ähnliches Bandenmuster (Abb. 36) wie AIA. Im hochmolekularen Bereich gibt es wiederum eine diffuse Färbung, die im Bereich von A1 intensiver wird. Eine scharfe, distinkte Bande, wie man sie nach der Inkubation mit MAA II, HHA oder PWM sieht, wird jedoch nicht ausgebildet. Auffällig ist eine deutliche, 141,6 kDa "große" Negativbande in der unteren Hälfte von B1. Sie liegt mit 135 kDa bei *S. melanotheron* innerhalb von B3 und grenzt so diese Art von den restlichen vier Tilapien ab.



Abb. 36: Lektinblot mit APA nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat.

Im Unterschied zu AIA interagiert das Abruslektin deutlich mit der Bande B3, wobei die sehr starke Reaktion von $B3_{Sg}$ hervorzuheben ist. Bei allen Tilapienarten weist der untere Bereich von B3 eine höhere Lektinbindung auf. Die Proteine B4 (90,3 kDa) und B5 (80,2 kDa) besitzen APA-Rezeptoren. Wie aus dem Vergleich mit der Coomassiefärbung hervorgeht, sind B10, die Unterkante von C1 sowie C2, C5, C7 und C8 gefärbt. Im Abschnitt D reagieren bei 22,9 und 21,8 kDa die Proteine D1 und D2. Mit 17,1 und 14,9 kDa sind E1 und E3 die letzten Banden, an die APA bindet. Auf Höhe von E3 liegt die ebenfalls positive Hämolysatbande.

3.11.4.3. Ricinus communis 60-Lektin (RCA 60)

Das Bindungsmuster von RCA ₆₀ (Abb. 37) unterscheidet sich deutlich von den beiden zuvor beschriebenen Blots galaktosespezifischer Lektine. Zwar gibt es auch bei RCA ₆₀ eine Lektinbindung im hochmolekularen Abschnitt, doch sie ist auf den Bereich von 340-285 kDa begrenzt und überdeckt nicht A1 oder A2; diese Banden bleiben ungefärbt. Mit Ausnahme von *S. melanotheron* wird oberhalb von B1 ein 157,6 kDa großes Protein nachgewiesen, das nicht von CBB G-250 angefärbt wird. Diese Bande erkennt man bei On-Sg deutlich, während sie bei Oa nur schwach ausgeprägt ist. *S. melanotheron* läßt sich anhand dieses Merkmals mittels RCA ₆₀ von den übrigen vier Tilapien unterscheiden. Weiterhin grenzt sich diese Art durch das Fehlen der Negativbande auf Höhe von B1 ab.

Neben *S. melanotheron* kann aber auch *S. galilaeus* von den anderen Tilapien unterschieden werden. Denn die Membrankomponenten dieser *Sarotherodon*-Spezies reagiert am stärksten mit diesem Lektin. Die Bindung von RCA ₆₀ ist dabei noch intensiver als die von APA.

Ricin ist neben APA das einzige der eingesetzten Lektine, das deutlich an die Bande B3 bindet. Dieses Protein interagiert bei allen Arten sehr stark, wobei die Intensität im unteren Bandenbereich zu nimmt. Ein weiterer Ligand für RCA $_{60}$ ist C8. Keine Lektinbindung gibt es an C1 sowie in den Abschnitten D und E, auch die Hämolysatprobe ist negativ.



Abb. 37: Lektinblot mit RCA ₆₀ nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: Oa, Spur 4: On, Spur 5: Om, Spur 6: Sg, Spur 7: Sm, Spur 8: Humanerythrozytenmembranen, Spur 9: Hämolysat.

3.11.5. Fucose spezifische Lektine

3.11.5.1. Tetragonolobus purpurea Lektin (TPA)

TPA bindet an eine Vielzahl von Einzelbanden (Abb. 38), die sich fast alle durch den Vergleich mit der Coomassiefärbung dem bekannten Bandenmuster zuordnen lassen. Eine intensive Lektinbindung zeigt A1, während es bei A2 keine Reaktion gibt. Der Bereich zwischen A2 und B1 ist bei den *Oreochromis*-Proben nur schwach, bei den *Sarotherodon*-Proben dagegen stärker gefärbt. B1 bindet TPA nur in der unteren Bandenhälfte bei 147,5 kDa, der obere Teil bleibt ungefärbt. Bei Sm fehlt diese Bande. Mit 144,0 kDa wird B2 bei allen Arten nachgewiesen.

Auffällig ist die unterschiedliche Bindungsaffinität von TPA gegenüber B3. Bei den *Oreochromis*-Arten bleibt eine Reaktion aus, während es bei beiden *Sarotherodon*-Arten zu einer Interaktion kommt. Innerhalb von B3 findet sich bei Oa bis Sg eine 134,5 kDa schwere Bande, die bei Sm nicht zu erkennen ist. Jedoch besitzt Sm eine 128,1 kDa großes, fucosehaltiges Protein, das in den Proben der übrigen Tilapien fehlt.

Außer Oa weisen alle Arten mit 105,0 kDa eine Bande unterhalb von B3 auf. Ihr folgen mit B4, B5, B7, B8 und B10 bis B13 weitere positive Banden. Im Abschnitt C bleiben C1 und C4 wieder ungefärbt, während C2, C3, C6 und C7 mit TPA reagieren. Eine sehr deutliche Interaktion mit dem Lektin gibt es bei D2 (22,2 kDa) sowieE1 und E3. Auch die Hämolysatprobe bildet eine TPA-positive Bande auf Höhe von E3 aus.



Abb. 38: Lektinblot mit TPA nach Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE und Elektrotransfer auf PVDF-Folie. Spur 1: EP, Spur 2: Oa, Spur 3: On, Spur 4: Om, Spur 5: Sg, Spur 6: Sm, Spur 7: Humanerythrozytenmembranen, Spur 8: Hämolysat. *: 128 kDa-Bande in $B3_{Sm}$.
IV. DISKUSSION

4.1. Reinheit der Erythrozytenmembranfraktion

Die ausdifferenzierten roten Blutkörperchen der Teleostei sind typischerweise abgeflachte elliptische Zellen. Sie besitzen in der Mitte einen hervorspringenden ovalen Kern, der ihnen eine bikonvexe Form verleiht (COHEN, 1991; GLOMSKI et al., 1992; ROWLEY et al., 1988). Die rasterelektronenmikroskopische Abbildung der Erythrozyten von *Oreochromis niloticus* zeigt, daß auch die roten Blutkörperchen der Tilapien diesem Typus entsprechen. Um den Kern herum sind die Zellen jedoch konkav geformt. Die gleiche Beobachtung wurde auch bei Erythrozyten der Regenbogenforelle *Salmo gairdneri irideus* (YAMAMOTO & IUCHI, 1975) und des Leopardfrosches *Rana pipiens* (COHEN, 1991) gemacht. Genaugenommen besitzen diese roten Blutkörperchen also eine bikonvexe-bikonkave Form, wobei es sich möglicherweise um ein Präparationsartefakt handelt. Funktionell macht dieses Zellprofil jedoch Sinn, denn es verkürzt die Diffusionsstrecke des Sauerstoffs zum Hämoglobin.

4.1.1. DNA-Kontamination

Im Vergleich zu anderen kernhaltigen Zellen weisen die Erythrozyten der Fische, wie auch die der Amphibien und Sauropsiden, nur relativ wenig zytoplasmatische Organellen auf (BARTELT et al. 1984). Untersuchungen an den roten Blutkörperchen der Regenbogenforelle zeigen, daß mit fortschreitender Differenzierung Mitochondrien, Golgi-Komplex, rauhes und glattes endoplasmatisches Reticulum sowie Ribosomen und Polyribosomen abgebaut werden. Zum Ende ihrer Entwicklung sind die Erythrozyten der Knochenfische weitestgehend frei von Organellen bzw. Kompartimenten und zeichnen sich durch ihre elliptische bikonvexe Gestalt sowie einem stark kondensierten ovalen Zellkern aus (LANE et al., 1982; SEKHON & BEAMS, 1969; YAMAMOTO & IUCHI, 1975). Solche reifen roten Blutkörperchen werden, wie die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zeigt, über den diskontinuierlichen Percolldichtegradienten isoliert. Mit Ausnahme der Zellkerne und gelöster Zellinhaltsstoffe anschließenden Gewinnung der Erythrozytenmembranen können daher bei der Verunreinigung durch Organellen oder Zellkompartimente vernachlässigt werden. Dafür sprechen auch die Befunde an ausdifferenzierten Hühnererythrozyten. ZENTGRAF et al. (1971) haben festgestellt, daß Plasma- und Kernmembran durchschnittlich 54,2% bzw. 45,6% des Gesamtmembrangehaltes einer Zelle ausmachen, der Membrananteil der Organellen jedoch niemals 1% übersteigt.

Die Kontamination der Erythrozytenmembranfraktion mit Zellkernen wird über den DNA-Gehalt bestimmt. Er liegt mit 1,69 % (16,9 µg DNA/1 mg Protein) innerhalb der in der Literatur angeführten Werte. CHAN (1977) isoliert die Membranen von Hühnererythrozyten ebenfalls durch Zellaufschluß in einem Dounce-Homogenisator und anschließender Anreicherung über einen diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (28%/50%). Der DNA-Anteil in der zweimal gewaschenen Membranfraktion beträgt hier 3%. SHELTON (1973) gibt einen DNA-Gehalt von 2,6% in den durch Homogenisation mit einem Sorvall-Omnimixer gewonnenen Membranen der roten Blutkörperchen von Gänsen an. Nach dem Aufschluß von Truthahnerythrozyten mit einem Polytron-Homogenisator findet CALDWELL (1976) in den isolierten Membranen einen DNA-Anteil von 0,55 %, während BEAM et al. (1979) nach Ultraschallbehandlung auf einen Gehalt von 0,86% kommen. Eine DNA freie Membranfraktion aus roten Blutkörperchen des Ochsenfrosches erhalten OKAZAKI et al. (1984), indem sie nach Ultraschallaufschluß der Zellen die über einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten (20%/70%) isolierten Plasmamembranen nochmals für 16 Stunden über einen linearen Dichtegradienten aus Saccharose (20-70%) auftrennen. Die Kontamination der Membranfraktion aus Tilapienerythrozyten mit Kernmembranen kann bei einem DNA-Gehalt von etwa 1,7 % sicherlich vernachlässigt werden. Ursache dieser Verunreinigung dürften an den Membranen haftende Fragmente der Zellkerne sein, die während der Homogenisation durch die starken Scherkräfte zerstört wurden. Intakte Zellkerne konnten bei der Betrachtung der isolierten Erythrozytenmembranen unter dem Phasenkonstrastmikroskop nicht gefunden werden.

Die Zellkerne der roten Blutkörperchen von Teleosteern sind sehr empfindlich. HÄGER-STRAND et al. (1999) beschreiben, daß ein 5 mM Phosphatpuffer pH 7,4 mit 1 mM EDTA, der zur Hämolyse von Neunaugenerythrozyten verwendet wird, bei den roten Blutkörperchen von Forellen zur Freisetzung von Chromatin und so zum Gelieren der gesamten Probe führt. Tilapienerythrozyten reagieren in der gleichen Weise, wenn zur Membranisolierung Phosphatpuffer verwendet wird. Aus diesem Grunde wird ein mit 5 mM MgCl₂ supplementierter HEPES-Puffer bei der Aufarbeitung der roten Blutkörperchen von Tilapien eingesetzt. Für die Stabilität der Kernmembran und die Integrität der Erythrozytenkerne während der Hämolyse mit einem hypoosmotischen Puffer ist die Anwesenheit von Magnesiumionen entscheidend (CALDWELL, 1976; CHAN, 1977 und WATTS & WHEELER, 1978).

4.1.2 Hämolysat-Kontamination

Neben DNA enthält die Membranfraktion der Tilapienerythrozyten bezogen auf ihren Proteingehalt noch durchschnittlich 0,9% zytoplasmatischer Verunreinigungen. Über die Hälfte der untersuchten Proben hat einen Hämolysatgehalt zwischen 0 und 1%. Dies deckt sich mit den Befunden von CHAN (1977), der in isolierten Hühnererythrozytenmembranen einen Hämoglobingehalt bis maximal 1% gefunden hat. CALDWELL (1976) und OKAZAKI et al. (1984) weisen keinen roten Blutfarbstoff mehr in den Membranpräparationen nach. BLANCHET (1974) hingegen gibt einen Hämoglobinanteil von 8,3 bzw. 9,2% an. In der Literatur finden sich, wenn überhaupt, nur Angaben zum Resthämoglobingehalt der Membranfraktionen. Neben dem roten Blutfarbstoff enthalten Erythrozyten jedoch noch eine Reihe von zytosolischen Enzymen, wie zum Beispiel Superoxiddismutase, Katalase oder Glutathion-Peroxidase. Alle drei Enzyme sind an der Eliminierung zellschädigender Sauerstoffverbindungen beteiligt und kommen auch in den roten Blutkörperchen von Fischen vor (FALCIONI et al., 1992).

Im Gegensatz zu den oben zitierten Untersuchungen gestattet der für diese Arbeit entwickelte Hämoglobinnachweis die Detektion aller hämhaltigen Proteine und Peroxidasen in der Membranfraktion. Es werden also außer dem roten Blutfarbstoff auch Katalase und Glutathion-Peroxidase bestimmt. Die Methode beruht auf der pseudoenzymatischen Eigenschaft der Hämgruppe 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) zu oxidieren (HOLTZHAUER, 1996). Gleichzeitig ist TMB ein Chromogen und Substrat für die Aktivitätsbestimmung von Peroxidasen (ANDREWS & KRIPINSKI, 1981; BOS et al., 1981). Deshalb wird als Standard nicht Hämoglobin, sondern verdünntes Erythrozytenhämolysat verwendet, was eine direkte Aussage über die zytoplasmatische Kontamination der isolierten Plasmamembranen erlaubt. Für den Fall, daß an der Nachweisreaktion auch membranintegrale, hämhaltige Enzyme beteiligt sind, reduziert sich entsprechend der berechnete Hämolysatgehalt in den Proben. Das TMB-Verfahren ermöglicht insofern keine absolute Bestimmung der zytoplasmatischen Verunreinigungen, sondern gibt nur einem relativen Maximalwert an. Die Reinheit der Membranfraktion ist unter Umständen sogar noch größer. Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die hier eingesetzten Methoden zur Aufarbeitung des Tilapienblutes eine fast kontaminationsfreie Gewinnung von Erythrozytenmembranen ermöglichen. Der Reinheitsgehalt liegt dabei im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Angaben für Zellmembranpräparationen aus kernhaltigen roten Blutkörperchen oder übertrifft diese zum Teil.

4.2. Proteinbestimmung und Proteingehalt der Erythrozytenmembranen

Der Proteingehalt der Erythrozytenmembranen von *Oreochromis niloticus* im Trockengewicht beträgt 52,6%. Berücksichtigt man die durchschnittliche Kontamination der Probe mit DNA, erhöht sich dieser Wert auf 53,5%. Hämolysatreste konnten nach der Dialyse nicht mehr nachgewiesen werden. Dies entspricht genau dem Eiweißanteil in Membranen der roten Blutkörperchen des Glatthaies *Mustelus canis*, der ebenfalls 53,5% beträgt (WARREN et al., 1979). Für Humanerythrozyten werden annähernd vergleichbare Werte von 49% (ROSENBERG & GUIDOTTI, 1968) und 55% (BAKERMAN & WASEMULLER, 1967; LUX & PALEK, 1995) angegeben. Demgegenüber ist der Proteingehalt der Erythrozytenmembranen von Hühnern mit 60,3% (ZENTGRAF et al., 1971) deutlich höher.

Voraussetzung für eine vergleichende Analyse der Membranproben ist die genaue Proteinbestimmung. Ein bewährtes Verfahren hierfür ist die Methode von LOWRY (1951). Doch nach MARKWELL et al. (1978) inhibiert Saccharose im LOWRY-Test die Ausbildung des Farbkomplexes. Aus diesem Grunde wird die Proteinkonzentration der über einen Saccharosegradienten isolierten Erythrozytenmembranen mit der BCA-Methode bestimmt, bei der Saccharose keine Störung zeigt (SMITH et al., 1985). Ein weiterer Vorteil des BCA-Verfahrens verglichen mit der Proteinbestimmung nach LOWRY (1951) ist seine geringere Variabilität gegenüber den unterschiedlichsten Polypeptiden und die Linearität über einen größeren Konzentrationsbereich (STOSCHECK, 1990).

Wie beim LOWRY-Test basiert die Farbreaktion auf einer Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} , das dann mit dem BCA-Reagenz einen violetten Komplex bildet (SMITH et al., 1985). Zur vollständigen Lösung der Proteine werden die isolierten Erythrozytenmembranen mit SDS vorinkubiert. Dies ist notwendig, weil sich Proben trotz der stark alkalischen Bedingungen des Nachweises (pH 11,25) nicht komplett lösen. Die Solubilisierung von Membran- und Lipoproteinen mit SDS zur exakten Proteinbestimmung beschreiben schon HESS et al. (1978) und MARKWELL et al. (1978). Obwohl SDS als anionisches Detergenz mit den Kupferionen in Wechselwirkung treten kann, wird der Nachweis bei einer SDS-Endkonzentration von 0,05% in der Probe nicht weiter gestört. Die Regression der Eichgeraden des SDS haltigen BSA-Standards beträgt $r^2 = 0,9995$. SMITH et al. (1985) geben an, daß SDS-Konzentrationen bis 1% zu keiner nennenswerten Beeinflussung der BCA-Proteinbestimmung führen.

4.3. Auftrennung der Membranproteine in der sauren Harnstoff-PAGE

Für die weitere Analyse werden die Membranproben (~ 50 µg Protein) in unterschiedlichen Elektrophoresesystemen untersucht. Der Versuch, die durch das nichtionische Detergenz Triton X-100 herausgelösten Membranproteine der Tilapienerythrozyten unter "nativen", also nicht denaturierenden Bedingungen im alkalischen Puffersystem aufzutrennen, führt jedesmal zu starken Schmierbanden. Ursache hierfür kann ein hoher Lipidanteil in der Probe sein (WESTERMEIER, 1990) und/oder eine starke Hydrophobizität der Tilapienproteine. Hydrophobe Membranpolypeptide können selbst bei Anwesenheit von Detergenzien so stark aggregieren, daß eine elektrophoretische Auftrennung nicht oder nur unvollständig möglich ist (VON JAGOW et al., 1994). Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich weder durch den Wechsel des Detergenzes, durch enzymatischen Verdau der Phospholipide oder durch das Ausschütteln der Membranlipide mit organischen Lösungsmitteln auswertbare Trennergebnisse erzielen. Da bei den beiden letztgenannten Methoden die Lipide weitgehend aus der Probe entfernt werden, scheint die Hydrophobizität der Membranproteine der Tilapienerythrozyten Ursache für die schlechte Auftrennung zu sein. In diesem Punkt unterscheiden sich die Triton X-100 löslichen Polypeptide der untersuchten Tilapien von denen aus Humanerythrozyten. Letztere lassen sich im nativen Zustand problemlos elektrophoretisch separieren.

Um die Aggregation der vermutlich stark hydrophoben Membranproteine aus den Tilapienerythrozyten zu minimieren, werden sie unter stark dissoziierenden Bedingungen gelöst und in sauren Harnstoffgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Bei dieser Methode, die eigentlich für die Globinkettenanalyse entwickelt wurde (FALK, 1994), fällt zwar noch immer viel Probenmaterial am Taschenboden und am Übergang zum Trenngel aus, dennoch können im Gegensatz zu allen anderen Verfahren distinkte Einzelbanden reproduzierbar nachgewiesen werden.

Im homogenen Gel der sauren Harnstoff-PAGE kann *Oreochromis mossambicus* anhand von Ladungsunterschieden einzelner Membrankomponenten von den übrigen vier untersuchten Arten unterschieden werden. Zusätzlich fehlt im Bandenmuster eine Proteinbande. Dieses Merkmal wird durch die Auftrennung in einem sauren Harnstoff-Gradientengel (5-30%) bestätigt. Das Molekulargewicht der fehlenden Bande beträgt etwa 108 kDa. Die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der drei Membranproteine von *O. mossambicus* im homogenen Gel ist dagegen nicht auf eine abweichende Molekülgröße zurückzuführen. In der Gradientengelelektrophorese weisen diese Banden mit 116, 112 und 102 kDa die gleiche Lage auf, wie die der anderen Tilapien. Im Gegensatz zum homogenen Gel werden im Gradientengel die Polypeptide nur nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Entsprechend sind die im homogenen 8%-Gel festgestellten Unterschiede nur durch die Eigenladung der Proteine bedingt. Eine Diskussion der Ergebnisse mit Befunden aus der Literatur ist nicht möglich, weil Erythrozytenmembranen mit diesem Verfahren bisher noch nicht untersucht wurden.

Verglichen mit der SDS-PAGE werden in der sauren Harnstoffgelelektrophorese nach Coomassiefärbung mit 12-15 deutlichen Banden nur etwa halb so viele Polypeptide angefärbt. Beispielsweise fehlen bei den Tilapien die charakteristischen Proteine A1, A2 sowie B3 bzw. die Spektrine und der Anionenkanal bei den humanen Erythrozytenmembranen. Für die geringere Bandenzahl sind mehrere Faktoren verantwortlich. Einerseits fällt im Gegensatz zur SDS-PAGE ein Teil der Proteine aus und wird nicht aufgetrennt. Andererseits hat Triton X-100 ein deutlich geringeres Solubilisierungsvermögen als SDS. Während SDS unspezifisch alle Polypeptide aus der Erythrozytenmembran löst, isoliert Triton X-100 nur integrale Membranproteine (YU et al., 1972). So werden zumindest bei pH 7,4 die Tilapienbanden A1 und A2 sowie die Humanspektrine durch Triton X-100 nicht in Lösung gebracht. Doch auch TX-100 lösliche Proteine wie das Polypeptid B3 aus den Erythrozytenmembranen der Tilapien oder der Anionenkanal aus den menschlichen, roten Blutkörperchen lassen sich im sauren Elektrophoresesystem nicht analysieren. Entweder sind diese Polypeptide so hydrophob, daß sie trotz der stark dissoziierenden Bedingungen ausfallen, oder aber sie wandern aus dem Gel heraus. Triton X-100 ist ein nichtionisches Detergenz, das anders als das anionische SDS nicht die Ladung der solubilisierten Proteine verändert. Daher ist es möglich, daß gelöste Membrankomponenten, die einem hohen isoelektrischen Punkt haben, in der sauren Harnstoffgelelektrophorese zur Kathode laufen, anstatt in das Gel einzuwandern.

4.4. Auftrennung der Membranproteine in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE

Die weitere Analyse der Erythrozytenmembranen findet unter denaturierenden Bedingungen in der SDS-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) statt. Im Gegensatz zur sauren Harnstoffgelelektrophorese ist die SDS-PAGE eine gängige Methode zur Analyse von Erythrozytenmembranproteinen. Das anionische Detergenz SDS lagert sich in einem Verhältnis von 1,4 g pro 1 g Protein an die Polypeptide an. Es entstehen negativ geladene Detergenz/Protein-Mizellen, deren Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld fast ausschließlich von der Polypetidgröße abhängt (WESTERMEIER, 1990). Das entscheidende Trennkriterium in der SDS-PAGE ist somit das Molekulargewicht der solubilisierten Proteine.

Die Membranproben werden zur gleichmäßigen Beladung nicht, wie bei wasserlöslichen Polypeptiden üblich, für drei bis zehn Minuten mit SDS aufgekocht, sondern für 30 Minuten bei 40°C im SDS-Probenpuffer inkubiert (SCHÄGGER, 1994). Grund hierfür ist die Beobachtung, daß Membranproteine bei höheren Temperaturen im SDS-Probenpuffer zur Aggregation neigen und während der Elektrophorese am Taschenboden bzw. am Übergang Sammelgel/Trenngel ausfallen oder "schmierende" Banden verursachen (HENNESEY & SCARBOROGH, 1989; SCHÄGGER, 1994). Hierdurch kann es unter Umständen zum kompletten Verlust von bestimmten Bestandteilen einer Probe kommen (SCHÄGGER, 1994; SOULIÉ et al., 1996). Vermutlich entfalten sich beim Erhitzen der Polypeptidketten hydrophobe, intramolekulare Domänen, die dann während des Abkühlens hydrophobe Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ausbilden (SCHÄGGER, 1994). Die Coomassie gefärbten Gele zeigen, daß durch die 40°C SDS-Inkubation der Erythrozytenmembranen ein Ausfallen der Proteine am Taschenboden oder an der oberen Trenngelkante verhindert wird. Es werden also mit dieser Methode anders als bei der sauren Harnstoff-PAGE die Membranproteine vollständig in Lösung gebracht und aufgetrennt. Dabei verdeutlicht die Regressionsgerade der Eichproteine ($r^2 = 0.9954$), daß zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und dem Molekulargewicht der Polypeptidketten eine lineare Beziehung besteht. Dies bedeutet, daß die Proteine auch bei 40°C vollständig mit SDS beladen werden.

Im Gegensatz zur sauren Harnstoffgelelektrophorese ist die SDS-PAGE eine gängige Methode zur Analyse von Erythrozytenmembranproteinen. FAIRBANKS et al. (1971) untersuchten als eine der Ersten die Membran der menschlichen, roten Blutkörperchen in einer kontinuierlichen SDS-Elektrophorese. Die Auftrennung ergab regelmäßig zwischen 20 und 30 verschiedene Polypeptide. Auffallend waren dabei sechs Coomassiebanden, auf die ca. Zweidrittel des Proteingehaltes entfielen. Weil zunächst die Funktion dieser Proteine noch nicht bekannt war, wurden sie entsprechend ihrer Abfolge im Gel als Bande 1-6 benannt (FAIRBANKS et al., 1971). STECK (1972) erweiterte dieses Spektrum auf sieben Hauptkomponenten und stellte fest, daß die Bande 4 aus zwei Polypeptiden besteht, die er als Protein 4.1 und 4.2 bezeichnete. Die von FAIBANKS et al. (1971) und STECK (1972) begründete Nomenklatur wird bis heute fortgeführt. Neu entdeckte Membranproteine werden den jeweiligen Hauptbanden zugeordnet und erhalten eine binominale Bezeichnung. Eine zweidimensionale Auftrennung der Polypeptide mittels isoelektrischer Fokussierung und SDS-PAGE zeigt, daß sich die menschliche Erythrozytenmembran aus über 100 verschiedenen Polypeptiden zusammensetzt (MOHANDAS & EVANS, 1994), von denen jedoch nur zwölf (Bande 1, 2, 2.1, 2.9, 3, 4.1, 4.2, 4.9, 5, 6, 7, 8) als Hauptproteine angesehen werden (LUX & PALEK, 1995).

4.5. Aufbau der Humanerythrozytenmembran

Die Kenntnis über die Anordnung und Funktion dieser Proteine ist wichtig, um Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der Erythrozytenmembranen der untersuchten Tilapien ziehen zu können. Aus diesem Grund soll zunächst auf den Aufbau der Humanerythrozytenmembran eingegangen werden. Wichtige Übersichten hierzu geben HEAST (1982), BENNETT (1985), CHASIS & SHOHET (1987), LIU & DERICK (1992), LUX & PALEK (1995) und MOHANDAS & GASCARD (1999). Die bisherigen Ergebnisse lassen sich in der folgenden Modellvorstellung vereinfacht zusammenfassen. Danach besteht die humane Erythrozytenmembran aus einer Lipiddoppelschicht, die auf ihrer zytoplasmatischen Seite mit einem Netzwerk aus peripheren Proteinfilamenten, dem Membranskelett, verbunden ist. Dieses Membranskelett ist einerseits entscheidend für die Aufrechterhaltung der Zellform und die mechanische Stabilität der Plasmamembran, andererseits gewährleistet es die hohe Flexibilität und Elastizität der roten Blutkörperchen.



Abb. 40: Schematisches Modell der Humanerythrozytenplasmamembran nach LUX & PALEK (1995). In der Lipiddoppelschicht befinden sich neben Glykophorin A (GPA) die integralen Membranproteine Bande 3 (3) und Glykophorin C (GPC). Sie bilden die Bindungsstellen für die peripheren Polypeptide Ankyrin und Protein 4.1 (4.1), an welchen das Membranskelett verankert ist. An dieser Interaktion sowie an der Ausbildung des aus einem Netzwerk von Spektrin- und Aktinfilamenten bestehenden Membranskelettes sind eine Reihe peripherer Proteine beteiligt: Pallidin (4.2), Protein p55, Demantin (4.9), Adducin, Tropomyosin und Tropomodulin. Die membranintegralen Polypeptide Bande 3, Glykophorin A und C besitzen auf ihren extrazellulären Domänen verzweigte Kohlenhydratketten.

Das Membranskelett setzt sich aus mehreren Polypeptiden zusammen: Spektrin, Aktin, Ankyrin, Adducin, Tropomyosin, Tropomodulin sowie den Proteinen 4.1 und 4.2. Spektrin ist ein flexibles, stabförmiges Molekül, das aus zwei nichtidentischen Untereinheiten, dem α und β -Spektrin (Bande 1 bzw. 2), besteht. Es liegt überwiegend als Tetramer ($\alpha\beta$)₂ vor. Die Spektrine werden durch Aktin (Bande 5) miteinander verbunden. Die Länge der Aktinfilamente unterliegt der Kontrolle von Tropomodulin und Tropomyosin. Durchschnittlich sechs Spektrin-Tetramere lagern sich jeweils an ein Aktinfilament an. Die gebildeten Spektrin-Aktin Komplexe werden durch Protein 4.1 und Adducin (Bande 2.9) stabilisiert. Dadurch entsteht ein Netzwerk aus annähernd hexagonalen Maschen. Die Verbindung dieses Membranskelettes mit der Lipiddoppelschicht vermittelt Ankyrin (Bande 2.1). Ankyrin weist sowohl für Spektrin, als auch für den in der Plasmamembran liegenden Anionenkanal (Bande 3) eine Bindungsstelle auf. Verstärkt wird diese Interaktion durch Protein 4.2, das die Anlagerung von Ankyrin an den Anionenkanal unterstützt. Ein weiterer Verankerungspunkt des Membranskelettes in der Lipiddoppelmembran ist die Bindung von Protein 4.1 an das Transmembranprotein Glykophorin C.

4.6. Bisheriger Kenntnisstand über den Membranaufbau von Teleosteererythrozyten

Über den Membranaufbau der roten Blutkörperchen von Teleosteern ist bisher nur sehr wenig bekannt. In den Arbeiten ROWLEY et al. (1988) und GLOMSKI et al. (1992) über Fischerythrozyten gibt es keinerlei Informationen über die Erythrozytenmembran der Knochenfische. Auch COHEN (1991) geht in seiner Übersicht über das Zytoskelett der kernhaltigen, roten Blutkörperchen nicht näher auf die Membran der Teleosteererythrozyten ein. Angaben zur elektronenmikroskopischen Ultrastruktur machen FAWCETT (1959) und FAWCETT & WITEBSKY (1964) für den Austernfisch (*Opsanus tau*), WEINREB & WEINREB (1965) und COHEN (1978) für den Goldfisch (*Carassius auratus*) sowie KREUTZMANN & JONAS (1978) für den Aal (*Anguilla anguilla*) und die Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*).

CASSOLY et al. (1989) vergleichen allgemein die Polypeptidzusammensetzung der Erythrozytenmembranen von Mensch, Huhn und der Forelle Salmo gairdneri, ohne jedoch einzelne Banden genauer zu beschreiben und zu charakterisieren. Als einzige Membranproteine sind bislang der Anionenkanal (HÜBNER et al., 1992; MICHEL & RUDLOFF, 1989; MOTAIS et al., 1992; ROMANO & PASSOW, 1984) und der Na⁺/H⁺-Austauscher von Forellen (MALAPERT et al., 1998; VAN NORREN et al., 1997) näher untersucht und analysiert worden. Eine weitergehende Charakterisierung der Zellmembran der roten Blutkörperchen von Knochenfischen liegt bisher noch nicht vor. Nach GLOMSKI et al. (1992) kann zwar der Aufbau der Erythrozytenmembran des Haies Mustelus canis als Modell für Knorpel- und Knochenfische angesehen werden, doch die Arbeiten über die Haierythrozyten beschäftigen sich ausschließlich mit dem membranassoziierten Zytoskelett. Sie behandeln also nur einen Teil der Membranproteine. Eine Übersicht der Hauptmembrankomponenten, wie sie für die roten Blutkörperchen des Menschen und anderer Säugetiere existiert, fehlt bei allen Untersuchungen kernhaltiger Erythrozyten. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden deshalb zunächst mit dem Aufbau der Humanerythrozytenmembran verglichen und dann, soweit vorhanden, mit den Analysen von Plasmamembranen anderer kernhaltiger roter Blutkörperchen diskutiert.

4.7. Vergleich der Membranproteine aus Human- und Tilapienerythrozyten

Der Vergleich der Erythrozytenmembranproteine der Tilapien mit Literaturangaben wird durch mehrere Umstände erschwert. In vielen Arbeiten fehlen Angaben zum Molekulargewicht der einzelnen Polypeptide und die Banden werden nicht weiter charakterisiert oder identifiziert. Je nach verwendetem Elektrophoresesystem erhält man unterschiedliche Bandenmuster der gleichen Membranprobe. Das diskontinuierlichen Puffersystem nach LAEMMLI (1970) hat im Vergleich zum FAIRBANKS-System eine höhere Trennleistung. Zwischen den Banden 4.2 und 5 können bis zu 15 weitere Proteine detektiert werden (THOMPSON & MADDY, 1982). Entsprechend der Methode kann nicht nur die Bandenzahl variieren, sondern auch das Molekulargewicht einzelner Proteine. Auf diesen Umstand weisen schon GRANGER et al. (1982) hin, ohne ihn erklären zu können. Goblin, ein dem Ankyrin analoges Protein aus den Erythrozytenmembranen der Vögel, liegt in den Auftrennungen von BEAM et al. (1979) und ALPER et al. (1980) mit einer Molekülgröße von 230 kDa zwischen dem α- und β- Spektrin. In den Untersuchungen von GRANGER et al. (1982), REPASKY et al. (1982) und MOON & LAZARIDES (1984) hat Goblin dagegen eine deutlich geringere Wanderungsgeschwindigkeit in der Elektrophorese. Es liegt mit ca. 260 kDa oberhalb der α-Spektrinbande.

Die Beispiele zeigen, daß die Bestimmung einzelner Membranproteine durch einen Vergleich von Molekulargewicht, Ausprägung und Lage im Bandenmuster nicht immer möglich ist. Für die Identifizierung der Coomassiebanden der untersuchten Tilapienerythrozyten werden daher weitere differenzierende Kriterien herangezogen. Neben der Reaktion mit Antikörpern gehört hierzu insbesondere das Löslichkeitsverhalten gegenüber Triton X-100. Während die spezifische Bindung von Antiseren und monoklonalen Antikörpern einen gezielten Nachweis bestimmter Polypeptide ermöglicht, lassen sich durch die Solubilisierungsfähigkeit in Triton X-100 Aussagen über die Anordnung der Proteine in der Erythrozytenmembran zu. YU et al. (1972) konnten zeigen, daß dieses nichtionische Detergenz aus den roten Blutkörperchen des

Menschen integrale Membranproteine herausgelöst, die mit einem hydrophoben Abschnitt die Membran durchziehen. Zu ihnen gehören alle PAS gefärbten Glykoproteine. Zurück bleibt eine fibrilläre Proteinmatrix, deren Maschenwerk nach YU et al. (1972) eine Skelettfunktion ausüben könnte. Sie setzt sich aus peripheren, PAS-negativen Polypeptiden zusammen, die durch Veränderung der Ionenstärke in Lösung gebracht werden und über Wasserstoffbrücken mit der Membraninnenseite verbunden sind (STECK & YU, 1972). Definitionsgemäß wird die Triton X-100 unlösliche Polypeptidfraktion als Membranskelett bezeichnet (BENNETT, 1985; LUX & PALEK, 1995).

Nach Auftrennung der Tilapienerythrozytenmembranen unter reduzierenden Bedingungen in der SDS-Gradienten-PAGE kann ein Muster aus 34 regelmäßig vorkommenden Coomassiebanden identifiziert werden. Es beginnt mit den Banden A1 und A2, die von ihrer Lage, als auch von ihrer Konzentration den humanen Spektrinbanden gleichen. Spektrin ist ein stabförmiges, flexibles Protein, das bis zu 75% des Erythrozytenmembranskeletts ausmacht (BRANTON et al., 1981) und einen Anteil von 20-25% an den Membranproteinen der menschlichen, roten Blutkörperchen hat (MOHANDAS & EVANS, 1994). Es besteht aus einer α - (Bande 1) und einer β -Untereinheit (Bande 2), deren Molekulargewichte in der SDS-PAGE etwa 240 bzw. 220 kDa betragen (BRANTON et al., 1981; HEAST, 1982; LUX & PALEK, 1995). Anderen Autoren zur Folge hat das α -Spektrin eine Größe von 250 (MARCHESI, 1979) oder 260 kDa (BENNETT, 1985; MOHANDAS & EVANS, 1994), während beim β -Spektrin die Angaben bei 215 kDa (STECK, 1972; 1974) und 225 kDa (BENNETT, 1985; MARCHESI, 1979) liegen.

4.7.1 Spektrine

Das mittlere Molekulargewicht der Banden A1 und A2 von 243 bzw. 226 kDa entspricht den Literaturwerten für Humanerythrozytenspektrine. Als Triton X-100 unlösliche Polypeptide sind sie wie Spektrin Bestandteil des Membranskelettes. Ein gegen α - und β - Spektrin aus Humanerythrozyten gerichteter monoklonaler Antikörper (Klon SB-SP1) bindet bei allen in dieser Arbeit untersuchten Tilapien sehr stark und spezifisch an die Proteine A1 und A2. Die annähernde gleiche Ausprägung der Banden, das übereinstimmende Molekulargewicht, die Zugehörigkeit zum Membranskelett sowie die Reaktion mit dem monoklonalen Anti- α/β -Spektrin-Antikörper legen den Schluß nahe, daß es sich bei den Tilapienbanden A1 und A2 um Spektrine handelt.

Das Bindungsverhalten des Antikörpers deutet allerdings auf immunologische Unterschiede zwischen der Bande A1 und dem humanen α -Spektrin hin. Obwohl beide Proteine in der Coomassiefärbung sehr starke Banden ausbilden, also in ähnlich hoher Konzentration vorkommen, reagiert der monoklonale Antikörper deutlich schwächer mit dem humanen α -Spektrin. Die Bindung an die beiden Tilapienbanden dagegen ist annähernd gleich und etwas geringer ausgeprägt als beim menschlichen β -Spektrin. Die Proteine A1, A2 und das menschliche β -Spektrin weisen also bezüglich des erkannten Epitopes untereinander eine größere immunologische Übereinstimmung auf als mit humanem α -Spektrin.

Unterschiede zwischen den α -Spektrinen aus kernhaltigen Erythrozyten und dem α -Humanspektrin wurden auch bei anderen Arten festgestellt. Das Membranskelett des Haies *Mustelus canis* besteht neben Aktin überwiegend aus Spektrin (COHEN et al., 1982). Das Molekulargewicht dieser Haispektrine liegt bei 245 und 220 kDa. Im Gegensatz zum α -Spektrin des Menschen sind jedoch das 245 kDa Protein (D245) und ein 150-155 kDa Polypeptid von *Mustelus canis* in der Lage, Calmodulin zu binden (BARTELT et al., 1982 und 1984). Beide HaiMembranskelettproteine reagieren nur mit Antiseren gegen Fodrin, nicht aber mit einem polyklonalen Antikörper gegen menschliches α -Spektrin (BARTELT et al., 1984).

Fodrin ist ein calmodulinbindendes Zytoskelettprotein aus der Gruppe der Spektrine. Es besteht aus einer α und β Untereinheit von ~ 250 bzw. ~ 240 kDa und wurde zuerst aus Meerschweinchenaxonen isoliert (LEVINE & WILLARD, 1981). Seitdem wurde es im Zytoskelett unterschiedlichster Zelltypen nachgewiesen (GLENNEY & GLENNEY, 1983). Fodrin ist identisch mit dem Nicht-Erythrozytenspektrin der Mammalia (WINKELMANN & FORGET, 1993).

Wie das Haispektrin D245 oder das α -Spektrin aus Hühnererythrozyten bindet α -Fodrin vergleichbare Mengen an Calmodulin und zerfällt nach Proteolyse in ein 150 kDa großes, calmodulinbindendes Fragment, das ebenfalls mit Anti-Fodrin-Antikörpern reagiert (BARTEL et al., 1984). Die Autoren folgern daraus, daß die 245 kDa große Spektrinuntereinheit von *Mustelus canis* funktionell, als auch immunbiologisch homolog zum α -Fodrin ist und durch Proteolyse in ein 155 kDa Membranprotein abgebaut wird. Zu den gleichen Ergebnissen kommen GLENNEY et al. (1982) bei ihren Untersuchungen über Spektrine aus den roten Blutkörperchen des Huhnes. Sequenzanalysen belegen, daß die Erythrozytenmembranen der Vögel ein Nicht-Erythrozytenspektrin (α -Fodrin) der Mammalia und ein den Säugern homologes β -Spektrin enthalten (WINKELMANN & FORGET, 1993).

Auch bei den untersuchten Tilapienarten bindet der monoklonale Anti-Humanerythrozytenspektrin-Antikörper im Immunoblot an ein 153 kDa großes, peripheres Protein (Bande B1), das in den Membranen der menschlichen roten Blutkörperchen nicht enthalten ist. Es gleicht damit dem von BARTELT et al. (1984) beschriebenen 150-155 kDa schweren Fragment des Hai- bzw. Hühnerspektrins. Diese Befunde legen nahe, daß die Tilapienbande A1 ebenfalls homolog zum α -Fodrin ist. Dafür spricht auch die Tatsache, daß nach BENNETT (1990) die α -Erythrozytenspektrine der Mammalia als spezialisierte, abgeleitete Moleküle anzusehen sind, denen im Gegensatz zu den übrigen α -Untereinheiten eine Calmodulinbindungsstelle fehlt. Ihre Übereinstimmung mit α -Spektrinen, die nicht aus Mammaliaerythrozyten (= α -Fodrine) stammen, beträgt nur 50-60%, während diese Fodrine untereinander mindestens zu 90% identisch und damit hochkonservativ sind (BENNETT, 1990).

Außer in dieser Arbeit werden Spektrine bei Knochenfischen bisher nur für *Salmo gairdneri* (CASSOLY et al., 1989; MICHEL & RUDLOFF, 1989) beschrieben. Dabei gibt es unterschiedliche Aussagen über die relative Spektrinmenge. CASSOLY et al. (1989) stellen in einer Untersuchung der Erythrozytenmembranen von Regenbogenforelle, Huhn und Mensch fest, daß der Spektringehalt bei *Salmo gairdneri* auffällig niedrig ist. MICHEL & RUDLOFF (1989) hingegen stellen in Bezug auf Molekulargewicht, Bandenausprägung und Coomassiefärbung keine nennenswerten Unterschiede zwischen Maus- und Forellenspektrin fest. Diese Beobachtungen decken sich mit den bei Tilapien vorgefundenen Verhältnissen, denn die Erythrozytenmembranen von Maus und Mensch zeigen hinsichtlich der Spektrine keine Differenzen (WHITFIELD et al., 1983). Der in den Forellenerythrozyten vorgefundene hohe bzw. niedrige Spektringehalt läßt vermuten, daß die Konzentration dieser Proteine in Abhängigkeit von der Methode der Membrangewinnung schwankt. Verantwortlich könnten auch Proteasen sein, denn Spektrine sind sehr anfällig gegenüber proteolytischen Enzymen (BEPPU et al. 1994; WEISE & INGRAM, 1976).

4.7.2. Ankyrine und Schwerkettenmyosin

Die auf die Tilapienspektrine folgenden Polypeptide A3 und A4 weisen artspezifische Unterschiede bei *Sarotherodon melanotheron* auf. Während $A3_{Sm}$ ein mittleres Molekulargewicht von 209 kDa hat, beträgt es bei *S. galilaeus* und den drei *Oreochromis*-Arten 200 kDa. Das 180 kDa große Protein A4 scheint hingegen im Bandenmuster von *S. melanotheron* zu fehlen. Die Solubilisierungsversuche mit Triton X-100 zeigen jedoch, daß dieses Polypeptid ebenso wie die Proteine B1 und B2 nicht fehlt, sondern nur von der Bande B3 überlagert wird. Dieses Membranprotein umfaßt nämlich einen Molekulargewichtsbereich von 120-180 kDa. Unter den gewählten Trennbedingungen läßt sich *Sarotherodon melanotheron* daher aufgrund dieser Überlagerung der Bande A4 von den übrigen untersuchten Tilapienarten unterscheiden.

Die Proteine A3 und A4 liegen in der Region der menschlichen Ankyrinbanden und lassen sich wie diese nicht durch Triton X-100 aus der Membran herauslösen. Ankyrin vermittelt in den Humanerythrozyten die Anheftung des Membranskelettes an die Plasmamembran, indem es die Spektrintetramere mit den zytoplasmatischen Domänen der Anionenkanäle untereinander verbindet (LUX & PALEK, 1995). Zur Gruppe der Ankyrine zählen nach PETERS & LUX (1993) in menschlichen roten Blutkörperchen die Proteine 2.1 (210 kDa), 2.2 (195 kDa), 2.3 (175 kDa) und 2.6 (145 kDa). Älteren Auffassungen zur Folge stellen die Banden 2.2 –2.6 proteolytische Fragmente des Ankyrins 2.1 dar (BENNETT & STENBUCK, 1980; BRANTON et al., 1981). BENNETT & GILLIGAN (1993) haben jedoch festgestellt, daß zumindest Protein 2.2 ein alternatives Spliceprodukt des Ankyringens ist. Gegenüber der Coomassiefärbung können im Immunoblot mit einem Anti-Ankyrin-Antiserum noch acht weitere Proteine zwischen 320 und 117 kDa nachgewiesen werden (PETERS & LUX, 1993). Zwei dieser Ankyrine haben ein Molekulargewicht von 200 bzw. 183 kDa. Ob die Banden A3 und A4 eventuell diesen beiden Ankyrine-Antikörper im Immunoblot geklärt werden.

Für kernhaltige Erythrozyten ist ein dem Ankyrin vergleichbares Molekül bisher nur in den Membranen roter Blutkörperchen von Vögeln nachgewiesen worden. Es handelt sich hierbei um Goblin, ein Zytoskelettprotein, das zuerst von BEAM et al. (1979) aus Truthahnerythrozyten isoliert wurde. Hühnergoblin zeigt ausgeprägte Kreuzreaktionen mit Antiseren gegen Säugerankyrin und bildet Komplexe zwischen Spektrin und dem Anionenkanal aus. Auch der enzymatische Verdau mit Chymotrypsin liefert ein ähnliches Peptidmuster wie das Ankyrin aus Mammaliaerythrozyten (MOON & LAZARIDES, 1984). Aufgrund dieser strukturellen und funktionellen Übereinstimmungen sehen die Autoren Goblin als homolog zum Ankyrin an. Je nach Auftrennung hat dieses Protein ein Molekulargewicht von 230 oder 260 kDa und liegt daher zwischen den Spektrinenbanden (ALPER et al., 1980; BEAM et al., 1979) oder oberhalb des α -Spektrins (GRANGER et al., 1982; REPASKY et al., 1982; MOON & LAZARIDES, 1984). Ein vergleichbares Molekül, das auch beim Leopardfrosch (*Rana pipiens*) vorkommen soll (NIKINMAA, 1990), läßt sich jedoch in den Erythrozytenmembranen der untersuchten Tilapienarten nicht finden.

Neben Ankyrin kommt auch die schwere Kette des Myosins als Bestandteil der Bande A3 in Frage. Myosin ist ein peripheres Membranprotein der Humanerythrozyten, daß sich aus einer schweren Kette (200 kDa) und einer leichten Kette von 26 bzw. 19,5 kDa Größe zusammensetzt (WONG et al., 1985). Für die Annahme, daß die Bande A3 Schwerkettenmyosin enthält, sprechen die Übereinstimmung im Molekulargewicht und die Zugehörigkeit zum Membranskelett. Darüber hinaus geht aus der spezifischen Bindung eines monoklonalen Anti-Myosin (leichte Kette)-Antikörpers auf Höhe der Bande E2 hervor, daß Myosin ein Membranbestandteil der untersuchten Tilapienerythrozyten ist.

In kernhaltigen roten Blutkörperchen ist dieses Strukturprotein bisher nur beim Kammolch (*Triturus cristatus*) nachgewiesen worden. MONACO et al. (1982) finden sowohl in der SDSelektrophoretischen Auftrennung des Zytoskelettes, als auch der Membranproteine eine 200 kDa Bande, die auf gleicher Höhe liegt, wie das als Eichprotein eingesetzte Schwerkettenmyosin. Infolge dieser Lagegleichheit und des eindeutigen Myosinnachweises im Zytoskelett durch Immunfluoreszenz wird das 200 kDa große Polypeptid als Myosin angesehen (MONACO et al., 1982).

4.7.3. Spektrinfragmente

Wie schon erwähnt, reagiert das 153 kDa schwere Protein B1 sehr stark mit dem monoklonalen Anti-Humanerythrozytenspektrin-Antikörper. Es wird durch Triton X-100 nicht aus der Membran herausgelöst, ist also ein peripheres Polypeptid. Auch in den elektrophoretischen Auftrennungen der Erythrozytenmembranen des Hais Mustelus canis (BRATELT et al., 1984) und des Huhnes (REPASKY et al., 1982) wurden ähnliche, 150 kDa große, periphere Membranproteine gefunden, die mit Antikörpern gegen α-Spektrin bzw. α-Fodrin reagieren. Die Gemeinsamkeiten in Molekulargewicht, Anordnung im Membranskelett und Reaktion mit Anti-α-Spektrin-Antikörpern legen nahe, daß es sich jeweils um verwandte Moleküle handelt. BRATELT et al. (1984) und REPASKY et al. (1982) fassen dieses 150 kDa große Polypeptid als ein proteolytisches Spaltprodukt des α -Fodrin (= Spektrin) auf, da es gleichzeitig ein Calmodulin bindendes Protein ist. Für Proteolyse spricht nach REPASKY et al. (1982) die Tatsache, daß einerseits die Menge dieses Polypeptides sowohl in Abhängigkeit von der Dauer der Membrangewinnung, als auch der Probenlagerung zunimmt. Andererseits läßt sich seine Konzentration durch Inkubation der Erythrozytenmembranen mit Staphylokokken Protease V8, einer Serin-Endoproteinase, sowohl beim Hundshai, als auch beim Huhn deutlich steigern. MARTIN et al. (1995) haben festgestellt, daß bei dem durch Apoptose induzierten proteolytischen Abbau von Fodrin immer ein 150 kDa Fragment entsteht. Das Protein B1 ist somit vermutlich ein enzymatisches Spaltprodukt des α -Fodrin.

Der Einfluß von Proteasen auf das Proteinbandenmuster trotz niedriger Temperaturen und der Anwesenheit von Inhibitoren während der Membranpräparation ist bei JACKSON (1975) und WEISE & INGRAM (1976) für adulte bzw. embryonale Hühnererythrozyten sowie bei TAMAI (1982) für Erythrozyten des Ochsenfrosches dokumentiert. In allen Aufbereitungen finden sich Banden von 150 bis 158 kDa Größe, die auf Proteolyse zurückzuführen sind. Der α -Spektrinanteil in Membranproben embryonaler Hühnererythrozyten reduziert sich durch Proteinaseaktivität von 12,0 auf 3,9% des Membranproteingehaltes. Gleichzeitig steigt die Konzentration der proteolytischen Proteine P1 (150 kDa), P2 (156 kDa) und P4 (170 kDa) von 1,5 auf 8,7% an (WEISE & INGRAM, 1976). Diese Befunde zeigen, daß das α -Spektrin kernhaltiger roter Blutzellen schnell von Proteinasen abgebaut wird und dabei Fragmente in Größe der Bande B1 entstehen.

Trotz der Zugabe von Proteaseinhibitoren und des Arbeitens auf Eis bzw. bei 4°C im Zuge der Membranpräparation kann ein Proteinabbau nicht ausgeschlossen werden. Denn die Isolierung und Aufreinigung der Erythrozytenmembranen nimmt einen ganzen Tag in Anspruch. Neben zytoplasmatischen Proteasen, die bei der Hämolyse freigesetzt werden, sind zumindest für Säugererythrozyten auch mehrere membranständige Enzyme bekannt. FUJINO et al. (1998) haben eine 80 kDa Serin-Proteinase isoliert, die sowohl in der Membran, als auch im Zytoplasma von Humanerythrozyten vorkommt. KHAN et al. (1994a, b) beschreiben für die roten Blutkörperchen des Menschen zwei integrale Serin-Proteinasen, die mit Triton X-100 aus der Erythrozytenmembran herausgelöst werden können. Es handelt sich hierbei um die "multicatalytic proteinase" (MCP) und das "high molecular mass protein" (HMP). MCP hat neben einer chymotrypsin- und trypsinähnlichen Aktivität die Fähigkeit, Peptidylglutamylpeptide zu hydrolysieren (KHAN et al. 1994a). HMP hingegen weist eine chymotrypsinspezifische Aktivität auf und hat ein pH-Optimum bei 7,5 – 8,5. Es wird durch Chymostatin zu 100% inaktiviert, während PMSF oder der in dieser Arbeit eingesetzte Inhibitor Leupeptin nur eine 54 bzw. 65 %ige Hemmung bewirken (KHAN et al., 1994b). Die Funktion solcher Proteinasen besteht in dem Abbau oxidativ geschädigter Membranproteine (BEPPU et al., 1994; FUJINO et al., 1998). BEPPU et al. (1994) haben festgestellt, daß in Humanerythrozyten nach oxidativem Streß besonders Bande 3 und Spektrin durch membrangebundene Serin- und Metalloproteinasen abgebaut werden.

Die Vielzahl der Humanerythrozytenbanden, an die der monoklonale Anti-Spektrin-Antikörper, wie auch vom Hersteller angegeben, im Immunoblot bindet, deutet auf einen proteolytischen Abbau des Humanspektrins hin. Zwar findet sich kein der Bande B1 vergleichbares Polypeptid, dies dürfte jedoch an der unterschiedlichen Aminosäuresequenz des α -Spektrins und des vermutlichen α -Fodrins der Tilapien liegen. Inwieweit HMP oder MCP ähnliche Proteasen auch in kernhaltigen roten Blutkörperchen vorkommen, ist nicht bekannt. Da die Membran dieser Erythrozyten jedoch genauso oxidativem Streß ausgesetzt sind, scheint es möglich, daß sie ebenfalls entsprechende Proteinasen besitzen, welche durch Oxidation geschädigte Zellmembranproteine entfernen. Zumindest die multikatalytische Protease MCP kommt nach KHAN et al. (1994b) in allen daraufhin untersuchten eukaryotischen Zellen vor. SANCHEZ et al. (1995) haben das Enzym im Zytoplasma verschiedener Gewebe des Umberfisches *Micropogon opercularis* (Percoidei: Sciaenidae) nachgewiesen.

Aufgrund des scheinbaren Fehlens der Proteine B1 und B2 im Coomassiebandenmuster kann *Sarotherodon melanotheron* von den übrigen untersuchten Tilapien unterschieden werden. Beide Komponenten sind erst nach dem Herauslösen des Polypeptides B3 in der Triton X-100 löslichen Fraktion als Banden zu sehen. Im Immunoblot hingegen werden beide Proteine ebenso wie B1 und B2 der anderen Tilapien durch den monoklonalen Anti-Spektrin-Antikörper angezeigt. Dies zeigt, daß es sich bei den im Solubilisierungsversuch freigelegten 157,9 und 143,3 kDa schweren Banden tatsächlich um B1 und B2 handelt. Die Bande B2 ist ein peripheres Membranprotein, das gleichfalls ein Abbauprodukt des α -Fodrins zu sein scheint.

4.7.4. Anionenkanal (Bande 3)

Der auffälligste Unterschied im Coomassiebandenmuster besteht in dem Polypeptid B3 von *S. melanotheron*. Diese Bande erstreckt sich von ca. 120 bis 180 kDa und ermöglicht innerhalb der hier untersuchten Tilapien die sofortige und zweifelsfreie Identifizierung der Art *Sarotherodon melanotheron*. Bei den restlichen vier Buntbarschen umfaßt das Protein B3 nämlich nur einen Molekulargewichtsbereich von 110 bis 144 kDa.

B3 ähnelt in der SDS-Gradienten-PAGE dem 97-118 kDa großen Anionenkanal aus Humanerythrozyten, der auch als Bande 3 oder Anionenaustauscher bezeichnet wird. Bei Knochenfischen sind solche Bande 3-Proteine bisher aus den roten Blutkörperchen von *Salmo irideus* (ROMANO & PASSOW, 1984) und *Salmo gairdneri* (CASSOLY et al., 1992; MICHEL & RUDLOFF, 1989) nachgewiesen worden. Es handelt sich dabei jeweils um eine sehr breite, stark gefärbte Coomassiebande, die in ihrem Erscheinungsbild dem Anionenkanal der Säugererythrozyten gleicht. Während bei *Salmo irideus* die Bande 3 auf Höhe des humanen Polypeptides liegt (ROMANO & PASSOW, 1984), ist bei *Salmo gairdneri* das Molekulargewicht höher. CASSOLY et al. (1992) geben eine Molekülgröße von 110 kDa an. Nach MICHEL & RUDLOFF (1989) hat das isolierte Protein hat ein relatives Molekulargewicht von 116 kDa und reicht in der SDS-PAGE bis ca. 140 kDa. Damit entspricht es von seiner Größe genau dem Tilapienprotein B3.

Sowohl bei *Salmo irideus*, als auch bei *Salmo gairdneri* bindet ³H₂DIDS, ein spezifischer Inhibitor des Anionenkanals, selektiv an die Bande 3 (MICHEL & RUDLOFF, 1989; ROMANO & PASSOW, 1984). Die Aminosäuresequenz des Anionenaustauschers von *Salmo gairdneri* zeigt, daß das Protein wie bei der Maus oder dem Menschen aus einem N-terminalen, zytoplasmatischen und einem C-terminalen, transmembranen Abschnitt besteht. Während der N-terminale Bereich gegenüber der humanen Bande 3 eine Identität von lediglich 33% aufweist, sind es beim Transmembransegment, über das der Anionentransport erfolgt, 62% (HÜBNER et al., 1992). Vergleichende topologische Untersuchungen von ESPANOL & SAIER (1995) legen nahe, daß die Bande 3 der Forellenerythrozyten wie die Anionenaustauscherproteine aus den roten Blutkörperchen von Mensch, Maus und Huhn bzw. muriner Nieren- und Gehirnzellen über 14 Transmembranhelices in der Lipiddoppelschicht verankert ist. Die C-terminale Membrandomäne des Anionenkanals ist also eine konservative Struktur, die bei allen bisher untersuchten Vertebraten ähnlich angeordnet ist.

Deutliche Unterschiede finden sich dagegen im zytoplasmatischen N-Terminus und dem Ort der Glykolisierung. Die Bande 3 der Erythrozyten von *Salmo gairdneri* besitzt zwei Kohlenhydratketten, die auf der extrazellulären Schleife zwischen dem fünften und sechsten Transmembransegment liegen. Der Anionenkanal aus den roten Blutkörperchen des Menschen hingegen trägt nur eine N-glykosidisch über Asparagin gebundene Oligosaccharidkette, welche sich zwischen dem siebten und achten Transmembranabschnitt befindet (REITHMEIER, 1993).

Vergleicht man nun den Anionenkanal der Forellen und des Menschen mit dem Membranprotein B3 aus den Tilapienerythrozyten, ergeben sich viele Gemeinsamkeiten. Hinsichtlich der Molekülgröße und Ausdehnung im Gel ist die Bande 3 von *Salmo gairdneri* beinahe identisch mit B3 von *O. aureus, O. niloticus, O. mossambicus und S. galilaeus* (111–144 kDa). Damit liegt das Molekulargewicht um ca. 15 kDa höher, als beim menschlichen Anionenaustauscher. Bei *S. melanotheron* sind es 20 kDa. Alle B3-Proteine erscheinen wie die Anionenkanäle von Mensch und Forelle in der Coomassiefärbung als intensiv gefärbte, breit diffuse Banden. Weiterhin läßt sich B3 mit Triton X-100 aus der Plasmamembran herauslösen, ist also ebenfalls ein Transmembranprotein. Zudem handelt es sich ebenfalls um ein Glykoprotein, was durch die PAS-Färbung und die verschiedenen Lektinbindungsstellen (insbesondere für APA und RCA₆₀) verdeutlicht wird. Aufgrund dieser Übereinstimmungen kann das Tilapienerythrozytenmembranprotein B3 als Anionenkanal identifiziert werden.

Nach MICHEL & RUDLOFF (1989) ist der Anionenkanal der roten Blutkörperchen aus *Salmo gairdneri* mit 116 kDa das größte bis dahin bekannte Bande 3-Protein. Mit einem Molekulargewichtsbereich von ca. 120-180 kDa dürfte dies nun für B3 aus *S. melanotheron* gelten. Inwieweit das höhere Molekulargewicht auf eine längere Polypeptidkette oder aber einen größeren Kohlenhydratanteil zurückzuführen ist, ließe sich durch eine Deglykosilierung der B3-Proteine klären. Weist B3_{Sm} nach der vollständigen Abspaltung aller Zuckermoleküle im Vergleich zum Anionenkanal der anderen hier untersuchten Tilapien weiterhin ein höheres Molekulargewicht auf, so liegt dies an einer schwereren bzw. größeren Polypeptidkette.

Die große Breite der Bande 3 ist bedingt durch die heterogene Glykosilierung (LUX & PALEK, 1995). Weil die Zuckerdeterminanten kein SDS binden, verringert sich mit zunehmender Länge der Kohlenhydratkette die elektrophoretische Mobilität des Proteins. In Abhän-

gigkeit seines Glykosilierungsgrades wandert der Anionenkanal deshalb verschieden weit in das Gel ein. Dieser Effekt ist bei der Bande 3 der Tilapien infolge des hohen Saccharidgehaltes besonders ausgeprägt und erklärt die große Ausdehnung dieses Proteins in der SDS-PAGE. Daß der Anionenkanal der untersuchten Tilapien stärker glykosiliert ist als beim Menschen, verdeutlicht die PAS-Färbung. Während der humane Anionenaustauscher PAS-negativ ist, färbt sich die Bande 3 der Tilapien stark an, was bei der geringen Empfindlichkeit dieses unspezifischen Zuckernachweises auf einen hohen Kohlenhydratanteil schließen läßt. Nach JAY & CANTLEY (1986) entfallen ungefähr 8% des Molekulargewichtes der menschlichen Bande 3 auf Kohlenhydrate. Bei einem relativem Molekulargewicht von 90-100 kDa in der SDS-PAGE (JAY & CANTLEY, 1986; LUX & PALEK, 1995) wären dies etwa 7-8 kDa. Nach HÜBNER et al. (1992) beträgt der Saccharidanteil des Anionenkanals von *Salmo gairdneri* ca. 15 kDa und ist damit im Vergleich zum Menschen doppelt so hoch. Die Bande 3 der Regenbogenforelle und der untersuchten Tilapien gleichen sich gegenüber dem humanen Protein also nicht nur in ihrem fast identischen Molekulargewicht (Ausnahme: *S. melanotheron*), sondern auch in einer stärkeren Glykolisierung.

Der Anionenkanal katalysiert den Austausch von Cl⁻ und HCO₃⁻ durch die Plasmamembran der roten Blutkörperchen und übernimmt damit eine zentrale Funktion im CO₂-Transport der Wirbeltiere (NIKINMAA, 1997). In den peripheren Kapillaren diffundiert das von den Gewebszellen abgegebene CO₂ aufgrund des hohen Kohlendioxidpartialdruckes in die Erythrozyten und wird durch die zytoplasmatische Carboanhydrase in Hydrogenkarbonat umgewandelt (OH⁻ + CO₂ ?HCO₃⁻). Ein Großteil des in hohen Konzentrationen gebildeten HCO₃⁻ wird im Austausch gegen Chlorid über den Anionenkanal der roten Blutkörperchen in das Plasma abgegeben (HCO₃⁻Ery + Cl⁻_{Plasma} ?HCO₃⁻_{Plasma} + Cl⁻Ery). An den respiratorischen Epithelien diffundiert Kohlendioxid wegen des geringeren CO₂-Partialdruckes aus den Erythrozyten. Dadurch sinkt die CO₂-Konzentration in den roten BBlutkörperchen und die Gleichgewichtsreaktion der Carboanhydrase kehrt sich um (HCO₃⁻?CO₂ + OH⁻). Das intrazelluläre Hydrogenkarbonat der Erythrozyten wird in CO₂ überführt und an die Umgebung abgegeben. Infolge der verringerten HCO₃⁻-Konzentration in den roten Blutkörperchen befördert die Bande 3 nun im Austausch gegen Chlorid das im Blutplasma gelöste Hydrogenkarbonat in die Erythrozyten, wo es zu Kohlendioxid umgewandelt und ausgeatmet wird.

Der CO₂-Transport in den roten Blutkörperchen bei Fischen ist von Art zu Art verschieden, wie PERRY et al. (1996) bei einer vergleichenden Untersuchung an Forelle (*Oncorhynchus mykiss*), Aal (*Anguilla anguilla*), Butt (*Scophthalmus maximus*) und Katzenhai (*Scyliorhinus canicula*) festgestellt haben. Sie führen dies unter anderem auf eine veränderte Affinität bzw. Aktivität der jeweiligen Anionenkanäle zurück. Vielleicht sind solche Unterschiede der Grund für das hohe Molekulargewicht der Bande 3 von *S. melanotheron*.

Neben der physiologischen Bedeutung hat der Anionenkanal eine zentrale Funktion für den Aufbau und die Stabilität der Erythrozytenmembran. Das membranintegrale Protein ist in roten Blutkörperchen aus Säugetieren einer von zwei Verankerungspunkten des Membranskelettes in der Plasmamembran. Die Anheftung des Spektringerüstes wird durch Ankyrin vermittelt, das einerseits an die zytoplasmatische N-terminale Domäne der Bande 3 und andererseits an das β - Spektrin bindet (MOHANDAS & GASCARD, 1999). Auch bei den kernhaltigen, roten Blutkörperchen des Huhnes wird das Membranskelett über den Anionenkanal mit der Lipiddoppelschicht verknüpft (LAZARIDES, 1987; WOODS et al., 1988).

Unterhalb des Anionenkanals befindet sich mit $113,7 \pm 4,30$ kDa eine Bande bei Sarotherodon melanotheron, die im Proteinmuster der übrigen Arten nicht zu erkennen ist.

Mit diesem als B3a bezeichneten Polypeptid gibt es neben der Bande B3 und sowie dem Fehlen der Proteine B1 und B2 ein weiteres Merkmal, anhand dessen sich die Erythrozytenmembranen von *Sarotherodon melanotheron* in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE von denen der anderen vier Buntbarscharten unterscheiden. Zwischen Bande B3 und B4 kommen in der Coomassiefärbung je nach Auftrennung noch zwei bis fünf Banden vor. Wegen ihres unregelmäßigen Erscheinens werden sie jedoch nicht weiter berücksichtigt.

4.7.5. Na⁺/H⁺-Austauscher

Die 92 kDa große Bande B4 ist ein Oberflächenmolekül, was sich aus der Biotinilierung roter Blutkörperchen von *Oreochromis niloticus* und *Sarotherodon melanotheron* mit Sulfobiotin-X-NHS ergibt. Auch die Lektine MAA II, HHA, GNA, AIA, APA sowie TPA binden stark an das Polypeptid und zeigen an, daß diese Bande glykosiliert ist. Da Glykoproteine der Zellmembran nach bisheriger Kenntnis stets auf der Zelloberfläche angeordnet sind (LODISH et al. 1996; STRYER, 1990), bestätigen die Lektinblots das Ergebnis der Biotinkopplung. Auch die Solubilisierung mit Triton X-100 zeigt, das B4 ein Transmembranprotein ist.

MALAPERT et al. (1998) haben aus den Erythrozytenmembranen der Forelle *Oncorhynchus mykiss* ein 90 kDa großes, membranintegrales Glykoprotein isoliert, das von seiner Größe her der Bande B4 gleicht. Das Polypeptid ist stark glykosiliert, denn nach Abspaltung des Zuckeranteils durch Glykosidase F reduziert sich in der SDS-Elektrophorese sein Molekulargewicht um 25 auf 70 kDa. MALAPERT et al. (1998) identifizieren dieses Protein als einen β -adrenergen Na⁺/H⁺-Austauscher (β NHE), der durch Catecholamine, Forskolin oder cAMP-Analoga aktiviert wird. Durch die Bindung dieser Botenstoffe kommt es zu einem schlagartigen Anstieg des Einstroms von Natriumionen (100-fach) in die roten Blutkörperchen. Für jedes aufgenommene Na⁺-Ionen wird dabei ein H⁺ aus den Zellen ins Plasma abgegeben (MALAPERT et al.,1998). Die adrenerge Stimulation des β NHE erlaubt im Zusammenspiel mit dem Anionenkanal sowohl die Steuerung des intrazellulären pH-Wertes, als auch der Gesamtpufferkapazität des Blutes. Über den Einstrom von Na⁺ und Cl⁻ wird außerdem das Volumen der Fischerythrozyten regultiert (MOTAIS et al., 1992).

Der Na⁺/H⁺-Austauscher hat darüber hinaus noch eine entscheidende Bedeutung für die Atmung bei Fischen. Wenn der Sauerstoffgehalt im Blut unter eine kritische Konzentration sinkt, werden aus dem chromaffinen Gewebe die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin in das Blut abgegeben, die den Na⁺/H⁺-Austauscher aktivieren. Die einsetzende Protonenabgabe führt zu einem Anstieg des pH-Wertes in den Erythrozyten, wodurch sich die Sauerstoffbindungskapazität des Hämoglobins erhöht (MOTAIS et al., 1992; THOMAS & PERRY, 1992). Denn anders als bei den Elasmobranchia oder den Tetrapoda haben die Hämoglobine der Teleosteer eine geringe Pufferkapazität und einen großen Bohr/Haldane-Effekt. Der Na⁺/H⁺-Austausch spielt daher eine entscheidende Rolle in der Regulation der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins (NIKINMAA, 1997). Auf diese Weise können Fische auch bei geringem O₂-Partialdruck des Wassers überleben bzw. bei hohem Streß (Flucht/Beutejagd) eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Körpers gewährleisten.

Der Na⁺/H⁺-Austauscher ist bei einer Vielzahl von Fischen nachgewiesen worden, unterscheidet sich aber teilweise in seiner Catecholaminsensitivität (THOMAS & PERRY, 1992). So erfolgt beim Aal (*Anguilla anguilla*) die Aktivierung nicht durch hormonale Stimuli, sondern nur durch die Volumenreduktion der roten Blutkörperchen (ROMERO et al., 1996). Aufgrund seiner Bedeutung für Respiration, pH-Homöostase und Volumenregulation scheint es sehr wahrscheinlich, daß auch die Tilapienerythrozyten ein entsprechendes Transportprotein besitzen. Mit der Bande B4 weisen die Erythrozyten der untersuchten Tilapien ein Polypeptid auf, daß wie der Na⁺/H⁺-Austauscher aus den roten Blutkörperchen von *Oncorhynchus mykiss* ein membranintegrales Glykoprotein ist und mit 92 kDa ein fast identisches Molekulargewicht hat.

4.7.6. Protein 4.1

Ein auffallender Unterschied zwischen den Bandenmustern der untersuchten Tilapien und des Menschen liegt im Bereich der Proteine 4.1 und 4.2 (Pallidin). Sie bilden bei den Humanerythrozyten unterhalb des Anionenkanals eine charakteristische Doppelbande. Protein 4.1, ein 80 kDa großes Phosphoprotein, bindet mit hoher Avidität an das β- Spektrin und formt dabei eine Calmodulin abhängige Bindungsstelle für Aktin. Auf diese Weise wird die schwache Interaktion zwischen Aktin und Spektrin stabilisiert, wodurch die Ausbildung eines Spektrin-Aktin-Membranskelettes ermöglicht wird. Desweiteren verknüpft Protein 4.1 das Membranskelett mit der Lipiddoppelschicht, indem es an das transmembranäre Glykophorin C bindet (WORKMAN & LOW, 1998). Außer in roten Blutkörperchen kommen Protein 4.1 Polypeptide im Zytoskelett zahlreicher eukaryotischer Zellen vor (BENNETT & GILLIGAN, 1993; KELLY et al., 1991). Das 72 kDa große, periphere Protein 4.2 oder Pallidin bindet sowohl an die zytoplasmatische Domäne der Bande 3, als auch an Ankyrin und verstärkt somit wahrscheinlich die Interaktion dieser Polypeptide untereinander (PALEK und LUX, 1995).

Vergleicht man das Coomassiebandenmuster der Membranproteine von Human- und Tilapienerythrozyten, so fehlt den roten Blutkörperchen der untersuchten Tilapienarten die aus den Proteinen 4.1 und 4.2 gebildete Doppelbande. Zwar befindet sich mit $81,8 \pm 2,3$ kDa das Polypeptid B5 knapp unterhalb von Bande 4.1, doch im Gegensatz zu dieser ist B5 ein integrales Membranprotein. Es wird von Triton X-100 aus der Erythrozytenmembran der Tilapien herausgelöst. Damit kann das Tilapien-Protein B5 kein Bande 4.1 ähnliches Polypeptid sein. In den Erythrozyten der Forelle *Salmo gairdneri* (CASSOLY et al., 1989; MICHEL & RUDLOFF, 1989) und des Ochsenfrosches *Rana catesbeiana* (OKAZAKI et al., 1984; TAMAI, 1982), fehlen ebenfalls die Banden 4.1 und 4.2.

KELLY & REVERSADE (1997) haben anhand von cDNA Analysen beim Zebrafisch (Danio rerio) ein Bande 4.1 Protein nachgewiesen. Es hat in der SDS-Elektrophorese ein relatives Molekulargewicht von 70 kDa, und wird im Embryo sowie im Adultus in mehreren mesodermalen und neuroektodermalen Geweben expremiert. Auch wenn die roten Blutkörperchen des Zebrafisches nicht untersucht wurden, belegen die Analysen von KELLY & REVERSADE (1997) das Vorhandensein von Protein 4.1 bei Knochenfischen. WINARDI et al. (1995) haben nachgewiesen, daß Krallenfrosch (Xenopus laevis), Huhn, Hund, Maus und Mensch nur ein homologes Protein 4.1-Gen enthalten, das sowohl die erythrozytäre, als auch die gewebespezifische Form der Bande 4.1 codiert. Die unterschiedlichen Varianten entstehen durch alternatives Splicen der prä-mRNA. Übertragen auf die Befunde von KELLY & REVERSADE könnte dies bedeuten, daß auch Zebrafischerythrozyten möglicherweise ein etwa 70 kDa großes Protein 4.1 besitzen. Mit B7 enthalten die untersuchten Tilapienerythrozyten eine Bande, die wie das Protein 4.1 aus Danio rerio ein Molekulargewicht von 70 kDa hat und zugleich Bestandteil des Zytoskelettes ist. Ob es sich dabei wirklich um ein der Bande 4.1 ähnliches Polypeptid handelt, muß in weiteren Versuchen, z.B. im Immunoblot, überprüft werden.

Im Unterschied zu den bisher untersuchten Fischerythrozyten weisen die Membranen der roten Blutkörperchen aus Tauben (WATTS & WHEELER, 1978; DOCKHAM & VIDAVER, 1987), Truthähnen (CALDWELL, 1976) und Hühnern (CHAN, 1977, WEISE & INGRAM, 1976) in der SDS-PAGE eine Coomassiebande im Bereich des humanen Protein 4.1 auf.

Neuere Untersuchungen an Vogelerythrozyten zeigen, daß hier das Protein 4.1 in mehreren Varianten exprimiert wird. GRANGER & LAZARIDES (1984) haben in den roten Blutkörperchen des Huhnes sechs verschiedene Membranskelettproteine (87, 100, 115, 150, 160 sowie 175 kDa) identifiziert, die der Bande 4.1 aus Säugererythrozyten entsprechen. Ein gegen die 115 kDa Bande gezogenes Antiserum detektiert im Immunoblot nicht nur die übrigen fünf peripheren Polypeptide, sondern bindet außerdem selektiv an das Protein 4.1 aus Erythrozyten von Mensch, Maus, Ratte, Kaninchen, Schaf sowie Ziege. Eine zweidimensionale Peptidbandenanalyse ("Peptide Mapping") zeigt die sehr große Ähnlichkeit sowohl zwischen den 87, 100 115 und 175 kDa Varianten untereinander, als auch mit Protein 4.1 aus den roten Blutkörperchen von Kaninchen (GRANGER & LAZARIDES, 1984). Molekularbiologische Analysen bestätigen, daß alle 4.1 Polypeptide aus Hühnererythrozyten von einem einzigen Gen codiert werden (NGAI et al., 1987). Die Expression der verschiedenen Varianten im Hühnerembryo erfolgt zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Erythrozytenentwicklung (GRANGER & LAZARIDES, 1985). Die schrittweise Anreicherung dieser Isoformen führt wahrscheinlich zur endgültigen Stabilisierung des Membranskelettes am Ende der Erythropoese. Auch Truthahnerythrozyten weisen sechs Varianten des Proteins 4.1 auf, die jedoch alle um 3 kDa leichter sind. Den roten Blutkörperchen aus Enten fehlt die 115 und 175 kDa große Komponente (GRANGER & LAZARIDES, 1984). Ob auch Tilapien so eine Vielzahl von Bande 4.1-Varianten enthalten, läßt sich nur in Immunoblotanlysen klären. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war jedoch ein gegen Protein 4.1 gerichteter Antikörper im Handel nicht erhältlich.

4.7.7. Protein 4.2

Das Fehlen einer Protein 4.2 ähnlichen Bande in den bisher erwähnten Membranauftrennungen von Erythrozyten aus Fischen, Amphibien oder Vögeln ist auffallend, aber keineswegs auf kernhaltige, rote Blutkörperchen beschränkt. In einer vergleichenden Studie über die Zusammensetzung der Erythrozytenmembran von 44 verschiedenen brasilianischen Säugetierarten konnten GUERRA-SHINOHARA & BARETTO (1999) ebenfalls Protein 4.2 im Zytoskelett der Erythrozyten von Meerschweinchen (Cavia porcellus), Nutrias (Myocastor coypus), Agutis (Dasyprocta sp.) und Hauspferden (Equus caballus) nicht nachweisen. Mit Ausnahme der roten Blutkörperchen von Pferden fand sich bei allen übrigen Arten statt dessen eine hohe Ankyrinkonzentration. Anders als beim Menschen verursacht das Fehlen der Bande 4.2 bei diesen Arten keine Veränderung der Erythrozytenform oder der Stabilität der Erythrozytenmembran. Die Autoren vermuten daher, daß Protein 4.2 nicht zu den essentiellen Membranproteinen gehört und seine Funktion gegebenenfalls durch einen höheren Ankyringehalt ausgeglichen werden kann (GUERRA-SHINOHARA & BARETTO, 1999). Bis jetzt ist Protein 4.2 bei kernhaltigen Erythrozyten noch nicht beschrieben worden. Entweder wird seine Funktion durch ein anderes Membranprotein übernommen oder es kommt aufgrund des besonderen Aufbaus des Zytoskelettes in diesen roten Blutkörperchen nicht vor. Zusätzlich zum Membranskelett besitzen die kernhaltigen Erythrozyten nämlich noch ein Marginalband sowie Intermediärfilamente. Diese drei Elemente zusammen bestimmen Gestalt und mechanische Eigenschaften kernhaltiger roter Blutkörperchen (CENTONZE et al., 1986; COHEN, 1991, SLOBODA & DICKERSIN, 1980).

4.7.8. a- und b-Tubulin

Das Marginalband ist ein peripherer Mikrotubulistreifen, der sich direkt unterhalb des Membranskelettes in der Äquatorialebene der Erythrozyten befindet. Analysen an roten Blutkörperchen aus Hühnern haben ergeben, daß diese Mikrotubuli zu über 95% aus α - und β -Tubulin bestehen und einen kleinen Anteil an Tau-Protein enthalten (MURPHY & WALLIS, 1983). Auch die Auftrennung isolierten Marginalbandmaterials aus roten Blutkörperchen des Haies *Mustelus canis* in der SDS-PAGE ergibt drei Proteinbanden im Tubulinbereich (SANCHEZ et al., 1990). Dieses Coomassiebandentriplett entspricht in seiner Ausprägung und seinem Molekulargewicht genau dem charakteristischen Bandenmuster von B10 bis B12 der untersuchten Tilapienerythrozyten, mit dem einzigen Unterschied, daß B11 ein membranintegrales Protein ist.

Für die Annahme, daß es sich bei den Proteinen B10 und B12 um Komponenten des Marginalbandes handelt, spricht die Tatsache, daß nach den Solubilisierungsversuchen mit Triton X-100 beide Banden Bestandteile des Zytoskelettes enthalten. Außerdem reagiert B10 als einziges Membranprotein mit einem gegen α -Tubulin gerichteten monoklonalen Antikörper und hat mit 55 kDa auch das gleiche Molekulargewicht wie α -Tubulin. Da Mikrotubuli zu gleichen Teilen aus α - und β -Tubulin bestehen, entspricht B12 wahrscheinlich der β -Untereinheit, denn nach der Coomassiefärbung liegen B10 und B12 etwa im gleichen Verhältnis im Gel vor. Zwar weicht die Bande B12 mit knapp 50 kDa geringfügig vom Literaturwert für β -Tubulin von 53 kDa (KOOLMANN & RÖHM, 1998) ab, dies deckt sich jedoch mit der Feststellung, daß β -Tubulin aus Hühnererythrozyten eine höhere elektrophoretische Mobilität hat als die β -Variante aus isolierten Hirnmikrotubuli (MURPHY & WALLIS, 1983). Die Autoren geben allerdings kein Molekulargewicht an. Die vermutete Übereinstimmung von B12 mit β -Tubulin muß daher letztendlich mit einem spezifischen Antikörper im Immunoblot überprüft werden.

Das Marginalband hat zwei unterschiedliche Funktionen. Während der Erythropoese führt seine Ausbildung zur Abflachung der sphärischen Erythroblasten. Zerstört oder verändert man in dieser Phase das marginale Mikrotubuliband, kugeln sich die unreifen Erythrozyten wieder ab (BARRET & DAWSON, 1974) bzw. weisen eine abnormale Zellform auf (WINCKLER & SALOMON, 1991). Bei ausdifferenzierten roten Blutkörperchen fungiert das Marginalband als ein flexibler Rahmen, der mechanische Deformationen der Erythrozyten während der Passage durch die Kapillargefäße verhindert bzw. dafür sorgt, daß die Zellen nach einer Deformation wieder ihre ursprüngliche Gestalt einnehmen (JOSEPH-SILVERSTEIN & COHEN, 1984).

Das Marginalband wurde schon von MEWES (1904) als "Randstreifen" in Amphibienerythrozyten beschrieben, der aus einem Bündel parallel liegender Filamente besteht. Er traf aus einen Beobachtungen die Schlußfolgerung: "Es ist erhebt über jeden Zweifel, dass wir in dem Randstreifen ein festes und elastisches Gebilde vor uns haben, und dass der Randstreifen es ist, welcher die Form der roten Blutkörperchen bedingt." (MEWES, 1911 zit. nach BEHNKE, 1970). Diese Ergebnisse wurden jedoch Artefakte als angesehen (WEIDENREICH, 1905 zit. n. FAWCETT & WITEBSKY, 1964) und gerieten in Vergessenheit. Erst FAWCETT (1959) und FAWCETT & WITEBSKY (1964) konnten in Längs- und Querschnitten von Erythrozyten des Austernfisches (Opsanus tau) im Elektronenmikroskop unmittelbar unter der Plasmamembran einen Ring aus 18-24 Mikrotubuli in der Äquatorialebene der Zellen nachweisen und damit MEWES Beobachtungen bestätigen. Das Marginalband wurde seitdem in allen untersuchten roten Blutkörperchen von Fischen, Amphibien, Reptilien und Vögeln entdeckt sowie in Thrombozyten (Übersichten in BEHNKE, 1970; COHEN, 1978; COHEN, 1991; DESSER & WELLER, 1979; KREUTZMANN & JONAS, 1978; MASER & PHILPOTT, 1964). Als einzigen kernhaltigen Erythrozyten fehlt den roten Blutkörperchen des Flußneunauges ein marginales Band (HÄGERSTRAND et al., 1999). Da die Erythrozyten des Schleimaales (Myxine glutinosa) ein Mikrotubulisystem besitzen (SEKHON & MAXWELL, 1970; MATTISON & FÄNGE, betrachten 1977), HÄGERSTRAND et al. (1999) das Marginalband als ein ursprüngliches Merkmal der Craniotenerythrozyten, das im Laufe der Evolution sowohl bei den Neunaugen (kernhaltige

Erythrozyten), als auch bei den Säugetieren (kernlose Erythrozyten) sekundär verloren gegangen ist. Untersuchungen an verschiedenen Beuteltieren (COHEN et al., 1990) und der Maus (KOURY et al., 1987) belegen nämlich, daß die Zellen der ersten, noch kernhaltigen Erythrozytengeneration der Mammalia ("primitive erythrocytes"), die in den Blutinseln des Dottersackes entstehen, noch ein marginales Mikrotubuliband besitzen. Erst die definitiven, kernlosen Erythrozyten, die im Laufe der Entwicklung zunächst in Leber und Milz, später dann im Knochenmark gebildet werden, enthalten keinen Randstreifen mehr (COHEN et al., 1990; KOURY et al., 1987).

4.7.9. Protein 4.9 (Dematin)

Mit der 47 kDa schweren Bande B13 besitzen die Tilapienerythrozyten eine Membrankomponente, die im 5-15%-SDS-Gradientengel die gleiche elektrophoretische Mobilität hat, wie die Bande 4.9 aus Humanerythrozyten. Bande 4.9 enthält mit 48 und 52 kDa zwei periphere Membranproteine, die als Demantin bezeichnet werden (HUSAIN-CHISHTI et al. 1989). Demantin gehört wie Tropomyosin und Tropomodulin zu den aktinbinden Proteinen innerhalb der Erythrozytenmembran. Zusammen mit der Bande 4.9 wird häufig eine 55 kDa große endogene Proteinkinase isoliert. Dieses Enzym reguliert die Interaktion des Demantin mit Aktin. Durch Phosphorylierung von Protein 4.9 wird seine aktinbündelnde Eigenschaft inhibiert, während die Dephosphorylierung eine Interaktion wieder ermöglicht (HUSAIN-CHISHTI et al. 1989).

Auch in den Membranen der roten Blutkörperchen aus Hühnern ist Demantin nachgewiesen worden. FAQUIN et al. (1990) haben dort während der Erythropoese fünf verschiedene Demantinvarianten von 44, 47, 49, 50 und 52 kDa entdeckt, die zu unterschiedlichen Zeiten exprimiert werden. Demantin ist also nicht nur auf Säugererythrozyten beschränkt, sondern scheint bei der Differenzierung kernloser roter Blutkörperchen für die Stabilisierung des Membranskelettes eine wichtige Rolle zu spielen (BENNETT & GILLIGAN, 1993). Basierend auf dieser Annahme und der Tatsache, daß die Banden B13 und 4.9 nicht nur in ihrer Lage übereinstimmen, sondern auch periphere Membranproteine enthalten, scheint es wahrscheinlich, daß B13 Demantin enthält, zumal in den untersuchten Tilapienerythrozyten ebenfalls Aktin vorkommt. Zur Absicherung dieser Vermutung müßte überprüft werden, ob ein Anti-Demantin-Antikörper an B13 bindet.

4.7.10. Aktin und Tropomodulin

Mit der kräftigen Coomassiebande C1 weisen die untersuchten Erythrozytenmembranen der Tilapien ein Polypeptid auf, das in Lage und Erscheinung der Bande 5 der Humanerythrozyten gleicht. Bande 5 enthält die Proteine Aktin und Tropomodulin, deren Molekulargewicht in der SDS-PAGE 43 kDa beträgt (LUX & PALEK, 1995). Das in den roten Blutkörperchen vorkommende β -Aktin bildet ungefähr 35 nm lange Protofilamente, die sich aus 12 Aktinmonomeren zusammensetzen. Diese einheitliche Länge wird wahrscheinlich durch das Zusammenspiel der aktinbindenden Proteine Tropomodulin und Tropomyosin reguliert (MOHANDANAS & GASCARD, 1999). Aktin ist ein zentraler Membranbestandteil. In menschlichen Erythrozyten binden durchschnittlich sechs Spektrinenden an ein Aktinfilament, wodurch das hexagonale Gerüst des Membranskelettes gebildet wird. Auch in den kernhaltigen, roten Blutkörperchen besteht das Membranskelett aus einem von Aktin und Spektrin aufgebauten Netzwerk (CENTONZE et al., 1986; COHEN et al., 1982; COHEN, 1991). Aktin findet sich schon in der Erythrozytenmembran von Flußneunaugen (HÄGERSTRAND et al., 1999).

Das periphere Membranprotein C1 der Tilapienerythrozyten entspricht nicht nur mit einem Molekulargewicht von knapp 43 kDa dem Aktin, ist es als TX-100 unlösliche Komponente ebenfalls Bestandteil des Membranskelettes. Desweiteren bindet ein polyklonales Anti-Aktin-Antiserum, das gegen die hochkonservative C-terminale Region des Moleküls gerichtet ist, sehr stark an C1. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß die Bande C1 analog zur Bande 5 der Humanerythrozyten Aktin enthält. Ob dies auch für Tropomodulin gilt, das bislang in den Membranen kernhaltiger, roter Blutkörperchen noch nicht nachgewiesen worden ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

4.7.11. Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase

Unterhalb des Aktins folgt in der SDS-PAGE der Humanerythrozytenmembranen eine weitere kräftige Coomassiebande. Es ist die 35 kDa große Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (G3PD) oder Bande 6. In den roten Blutkörperchen des Menschen interagiert G3PD mit der sauren Aminosäuresequenz des N-terminalen zytoplasmatischen Bereiches der Bande 3. Durch die Bindung an den Anionenkanal wird dieses Enzym inhibiert. Ungefähr 65% der G3PD sind in den roten Blukörperchen des Menschen membranassoziiert (LUX & PALEK, 1995). Die Aktivität dieses Enzyms wurde auch in kernhaltigen Erythrozyten nachgewiesen, unter anderem in denen des Gelbbarsches *Perca flavescens* (NIKINMAA, 1990) oder des Karpfens *Cyprinus carpio* (WITTMANN & KALK, 1992). Dennoch fehlt den Erythrozytenmembranen der untersuchten Tilapien ein der Bande 6 vergleichbares Protein. An seiner Stelle befindet sich zwar mit einem Molekulargewicht von 36 kDa das Polypeptid C4, doch im Gegensatz zur humanen G3PD ist C4 nur eine sehr schwache Bande.

Die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase konnt ebenfalls nicht nachgewiesen werden in den Membranen der roten Blutkörperchen des Flußneunauges (HÄGERSTRAND et al., 1999), der Regenbogenforelle (CASSOLY et al., 1989), des Ochsenfrosches (OKAZAKI et al., 1984; TAMAI, 1982), der Gans (SHELTON, 1973), des Huhns (CASSOLY et al., 1989; CHAN, 1977; JACKSON, 1975) der Taube (DOCKHAM & VIDAVER, 1987, WATTS & WHEELER, 1978) und des Truthahns (CALDWELL, 1976). CASSOLY et al. (1989) führen das Fehlen der Bande 6 in den Erythrozytenmembranen von Forellen und Hühnern auf Unterschiede im zytoplasmatischen Abschnitt des Anionenkanals zurück. JAY (1983) hat festgestellt, daß der Bande 3 aus Hühnererythrozyten eine dem humanen Anionenkanal vergleichbare NH2-terminale Bindungsdomäne für G3PD fehlt. Die Analyse der Aminosäuresequenz der Bande 3 aus Salmo gairdneri zeigt, daß der zytoplasmatische N-Terminus des Proteins nur einen Tyrosinrest aufweist. Dieser liegt vor der prolinreichen Gelenkregion, unterhalb derer G3PDH bindet. Bei Menschen hingegen befinden sich zwei Tyrosinreste in diesem Bereich, die mit dem Enzym in Interaktion treten (HÜBNER et al., 1992). Wie beim Huhn kann das Fehlen der Bande 6 bei Salmo gairdneri auf eine zu schwache oder gar keine Assoziation des Proteins mit dem Anionenkanal zurückgeführt werden. Ob dies ein generelles Charakteristikum kernhaltiger Erythrozyten ist, kann nicht beantwortet werden. Doch bei allen bisher beschriebenen Membranproteinmustern findet sich kein Polypeptid, das der G3PD entspricht. Es ist deshalb anzunehmen, daß es sich bei dem Protein C4 aus der Erythrozytenmembranen der untersuchten Tilapien nicht um Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase handelt, sondern um ein anderes Polypeptid.

4.7.12. Tropomyosin

Im Immunoblot bindet ein monoklonaler Antikörper, der gegen Tropomyosin aus dem Muskelmagen von Hühnern gezogen wurde, stets an die Bande C4 von *Oreochromis mossambicus*. Dieser Antikörper interagiert nach Herstellerangaben selektiv mit der 39 und 36 kDa Tropomyosinbande. Das zu den aktinbindenden Proteinen gehörende Tropomyosin ist ein Dimer, dessen Untereinheiten in verschiedenen Isoformen vorkommen und ein Molekulargewicht zwischen 32 und 40 kDa besitzen. Ihre Funktion in Nichtmuskelzellen liegt in der Stabilisierung der Aktinfilamente (PITTENGER et al., 1994). In Humanerythrozytenmembranen besteht Tropomyosin aus einer 27- und 29 kDa-Untereinheit, die in der SDS-PAGE im Bereich der Bande 7 liegen (FOWLER & BENNETT, 1984). Im Immunoblot werden diese Proteine jedoch nicht angezeigt. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, daß die Membranen der menschlichen roten Blutkörperchen mit magnesiumfreiem PBS-Puffer gewonnen wurden. Unter diesen Bedingungen dissoziiert nämlich Tropomyosin während der Aufarbeitung der Erythrozytenmembran (BENNETT, 1985). Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß nur die Tropomyosinvariante von *Oreochromis mossambicus* das Epitop trägt, welches der monoklonale Antikörper erkennt. Diese Annahme erklärt auch, warum bei der Wiederholung der Immunoblots mit anderen Membranchargen der Antikörper stets nur an die Bande C4_{Om} gebunden hat. Danach besäße *Oreochromis mossambicus* in seiner Erythrozytenmembran eine Isoform des Tropomyosin, die in den roten Blutkörperchen der übrigen untersuchten Tilapienarten und des Menschen nicht vorkommt.

Tropomyosin zeigt wie viele andere Strukturproteine auch eine große Isoformdiversität. Sie wird durch eine differentielle RNA-Prozessierung der vier Tropomyosingene hervorgerufen. Allein vom α -Gen sind bisher neun verschiedene, zellspezifische Varianten des menschlichen Tropomyosins bekannt (PITTENGER et al., 1994). Das *TM5*-Gen bringt durch alternatives Splicen in Nichtmuskelzellen sogar elf verschiedene Isoformen hervor (DUFOUR et al., 1998). Es scheint daher durchaus möglich, daß *Oreochromis mossambicus* in seinen Erythrozyten eine Tropomyosinvariante besitzt, die in Bezug auf die in dieser Arbeit untersuchten Tilapienarten artspezifisch ist. Der monoklonale Anti-Tropomyosin-Antikörper (Klon TM 311) erlaubt somit eine eindeutige Identifizierung von *Oreochromis mossambicus*. Um die Validität dieses Merkmales zu testen, müssen jedoch weitaus mehr Individuen und Populationen sowie weitere Arten überprüft werden.

4.7.13. Protein 7.2b (Stomatin)

Mit der 31,4 kDa großen Bande C6 besitzen alle untersuchten Tilapienarten ein integrales Membranprotein, das die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit hat wie die Bande 7 der Humanerythrozyten. Bande 7 enthält ein 31 kDa schweres, integrales Phosphoprotein, das auch als "Stomatin" oder Protein 7.2b bezeichnet wird (SALZER et al., 1993). Die Funktion dieses Transmembranproteins ist noch nicht bekannt. Rote Blutkörperchen, denen Stomatin jedoch fehlt, zeigen eine hohe Permeabilität für Natrium- und Kaliumionen. Es wird deshalb vermutet, daß Protein 7.2b an der Aktivierung oder Regulation eines Ionenkanals beteiligt ist (GALLAGHER et al., 1995; SALZER et al., 1993). Neben der gesteigerten Durchlässigkeit für univalente Kationen haben Humanerythrozyten, die kein Stomatin besitzen, eine charakteristische mundförmige Gestalt, von der sich der Bandenname ableitet (GALLAGHER & FORGET, 1995).

Mittels eines monoklonalen Anti-Bande-7.2b-Antikörpers ist das Polypeptid auch in den roten Blutkörperchen aus Frosch und Huhn nachgewiesen worden (HIEBL-DIERSCHMIED et al., 1991). MICHEL & RUDLOF (1989) finden in der SDS-elektrophoretischen Auftrennung der Erythrozytenmembranen von Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri*) ein 29 kDa großes Protein, das ihrer Meinung nach der humanen Bande 7 entsprechen könnte. Aufgrund der Übereinstimmung in Molekulargewicht, Anordnung in der Plasmamembran und dem mehrfach beschriebenen Vorkommen von Stomatin in kernhaltigen, roten Blutkörperchen ist es durchaus möglich, daß die Bande C6 der Tilapienerythrozyten Stomatin entspricht. Diese Vermutung müßte jedoch in weiteren Untersuchungen (z.B. Immunoblotanalysen) überprüft werden.

4.7.14. Membranständige Proteasen

Bei der Diskussion des Tilapienproteins B1 wurden schon die membranständigen Proteasen MCP und HMP der Humanerythrozyten angesprochen. Die multikatalytische Protease MCP setzt sich aus mehreren Untereinheit zwischen 23 und 32 kDa zusammen, während die *high molecular mass proteinase* HMP aus 18 – 20 identischen, 28 kDa kleinen Einheiten besteht (KHAN et al. 1994a). Der Vollständigkeit halber soll erwähnt werden, daß die untersuchten Tilapienerythrozyten mit den integralen Membranproteinen C6 (31,4 kDa), C7 (28,9 kDa), C8 (27,0 kDa) und D2 (21,9 kDa) Banden aufweisen, die das HMP-Monomer bzw. die verschiedenen MCP-Untereinheiten enthalten könnten. Aus der Literatur ist jedoch nicht bekannt, ob solche Enzyme überhaupt in der Membran kernhaltiger, roter Blutkörperchen vorkommen.

4.7.15. Protein 8

Die 21,9 kDa schwere Tilapienbande D2 enthält in geringem Maße auch einen nicht Triton X-100 löslichen Anteil. D2 liegt im SDS-Gradientengel auf gleicher Höhe wie das menschliche Protein 8. Außer der Lagegleichheit können keine weiteren Angaben gemacht werden, weil die Funktion dieses Polypeptids in der Humanerythrozytenmembran noch unbekannt ist (LUX & PALEK, 1995). Im Immunoblot bindet jedoch ein gegen die leichte Kette des Myosins gerichteter monoklonaler Antikörper unter anderem an die Bande D2.

4.7.16. Leichtkettenmyosin

Myosin ist ein weiteres peripheres Protein der Humanerythrozytenmembran. Es besteht aus zwei leichten Ketten mit einem Molekulargewicht von 19 und 25 kDa sowie einer schweren Kette von 200 kDa (WONG et al., 1985). Im Blot detektiert der myosinspezifische Antikörper mit 19,7 und 21, 9 kDa zwei Membranproteine aus roten Blutkörperchen des Menschen, die den genannten Literaturwerten weitgehend ähneln. Sie besitzen die gleiche elektrophoretische Mobilität wie die Banden D2 und D4 der untersuchten Tilapien. Während der monoklonale Antikörper nur bei *Oreochromis mossambicus* und *Sarotherodon galilaeus* an D2 bindet, kommt es mit Ausnahme von *Sarotherodon melanotheron* bei den übrigen vier Buntbarscharten ebenfalls zu einer Reaktion mit D4. Aufgrund des spezifischen Nachweises, der Lagegleichheit zu den beiden menschlichen Myosinen und der Tatsache, daß D2 und D4 auch periphere Membranproteine sind, kann gefolgert werden, daß beide Banden Leichtkettenmyosine enthalten.

Die stärkste Antikörperbindung erfolgt jedoch mit 16,4 kDa an der Bande E2. Je nach Auftrennung erscheint das Polypeptid E2 in der Coomassiefärbung als Einzel- oder Doppelbande. Dies spiegelt sich auch im Immunoblot nach Inkubation mit dem Anti-Myosin-Antikörper wieder. Bei *O. aureus* und *O. niloticus* ist eine Doppelbande zu erkennen, während bei den übrigen Arten nur eine kräftige Bande deutlich zu erkennen ist. Bei den menschlichen Erythrozytenmembranen hingegen fehlt in diesem Abschnitt ein Nachweis. Im Vergleich zu D2 und D4 ist die Affinität des monoklonalen Antikörpers zu E2 wesentlich stärker. Dies und die Tatsache, das es auch die einzige Bande ist, die bei allen untersuchten Tilapienarten angezeigt wird, verdeutlicht, daß E2 die Hauptfraktion der leichten Myosinketten enthält.

Die Interaktion des Antikörpers mit einem 14,9 kDa schweren Polypeptid, das von seiner Lage und dem Molekulargewicht der Bande E3 $(15,1 \pm 0,68 \text{ kDa})$ entspricht, ist bei den Tilapien verschieden stark. Während es bei *Sarotherodon melanotheron* zu keiner Reaktion kommt, steigt die Bindungsintensität von *Oreochromis aureus* zu *Sarotherodon galilaeus* hin an. Dies kann entweder auf eine unterschiedlich hohe Konzentration des nachgewiesenen Proteins beruhen, oder das erkannte Epitop differiert bei den jeweiligen Arten. E3 liegt im SDS-Gradientengel auf einer Höhe mit der Hämolysatbande. Der verwendete monoklonale

Antikörper reagiert aber im Immunoblot nicht mit Erythrozyteninhaltsstoffen. Demnach enthält E3 ein Membranprotein, das mit dem Anti-Mysosin-Antikörper kreuzreagiert. Ob es sich hierbei um eine spezifische Bindung handelt, kann nicht beantwortet werden. Denn anders als die Anti-Myosin-Antikörper binden die im Kontrollblot eingesetzten IgM-Moleküle an eine Komponente innerhalb der Hämolysatbande, die auf Höhe von E3 liegt. Weil nun nicht unterschieden werden kann, ob der Kontrollantikörper mit einem Bestandteil des Hämolysates oder einer leichten Myosinkette in Wechselwirkung tritt, läßt sich auch keine Aussage treffen, ob die Bindung des monoklonalen Antikörpers in diesem Bereich spezifisch ist. Es bedeutet aber auch, daß die Bande E3 mehrere Polypeptide enthält. Dieses Phänomen, daß eine Bande verschiedene Proteine mit der gleichen Wanderungsgeschwindigkeit enthält, ist von Humanerythrozyten bekannt. So liegen zum Beispiel Aktin und Tropomodulin auf einer Höhe. Auch das periphere Membranprotein p55 und der Glukosetransporter haben ein übereinstimmendes Molekulargewicht von 55 kDa (LUX & PALEK, 1995).

Auffällig ist die starke, unspezifische Bindung des murinen Immunglobulin M an die Membrankomponenten E1 und E3 von *Oreochromis mossambicus* sowie in abgeschwächter Form an E2. Bei gleicher Antikörperkonzentration und Inkubationszeit ist die unspezifische Wechselwirkung der Bande E2 mit der IgM-Kontrolle jedoch deutlich geringer als die Interaktion mit dem monoklonalen Antikörper. Die Bindung des Anti-Myosin (leichte Kette)-Antikörpers an das periphere Membranprotein E2 ist deshalb spezifisch. Dies gilt jedoch nicht für E1 und E3. Obwohl der Anti-Leichtkettenmyosin-Antikörper im Gegensatz zu den anderen Tilapienarten bei *Sarotherodon melanotheron* nur eine Bande anzeigt, ist er aufgrund der unspezifischen Wechselwirkungen im Immunoblot für die Artbestimmung nicht geeignet.

Aus der Literatur sind bisher keine Nachweise von leichten Myosinketten aus kernhaltigen Erythrozytenmembranen bekannt. Dagegen existieren mehrere Untersuchungen über Muskelmyosine bei Fischen. HURIAUX & FOCANT (1978) haben aus der weißen Muskulatur des Karpfens *Cyprinus carpio* drei verschiedene, leichte Myosinuntereinheiten mit einer Größe von 25 kDa, 17,5 kDa und 16,4 kDa isoliert. Diese Angaben decken sich mit den Befunden beim Aal *Anguilla anguilla*. Auch hier haben HURIAUX & FOCANT (1990) mit LC1 (26,3 \pm 0,25 kDa), LC2 (17,6 \pm 0,30 kDa) und LC3 (16,7 \pm 0,20 kDa) drei verschiedene leichte Ketten des Muskelmyosins gefunden. In beiden Fällen entspricht das Molekulargewicht der kleinsten Untereinheit dem Erythrozytenmembranprotein E2, an das der monoklonale Anti-Leichtkettenmyosin-Antikörper am stärksten gebunden hat. Die Antikörperreaktion, die Übereinstimmung im Molekulargewicht mit den Leichtkettenmyosinen des Karpfens bzw. des Aales und die Tatsache, daß E2 auch Bestandteile des Membranskelettes aufweist, deuten daraufhin, daß diese Bande leichte Myosinketten enthält.

Die physiologische Funktion von Myosin in roten Blutkörperchen ist noch nicht genau geklärt. Die Phosphorilierung des 19,5 kDa großen Leichkettenmyosins aus Humanerythrozyten induziert eine Aktin aktivierte ATPase. Myosin scheint daher an einer ATP abhängigen Veränderung der Zellform beteiligt zu sein (BENNETT, 1985). Nach CHASIS & SHOHET (1987) ist das Aktin/Myosin-Verhältnis in den Erythrozyten des Menschen vergleichbar dem anderer Nichtmuskelzellen und könnte daher einen kontraktilen Akto-Myosinkomplex ausbilden. Neonatale Retikulozyten haben gegenüber adulten, roten Blutkörperchen einen zweieinhalbmal höheren Myosingehalt und eine größere Beweglichkeit (LUX & PALEK, 1995).

4.7.17. Hämoglobin

Wie erwähnt, setzt sich die 15 kDa große Bande E3 aus mehreren Polypeptiden zusammen. Neben einem möglichen Leichtkettenmyosin scheinen Hämoglobinmonomere eine weitere Komponente zu sein. Die isolierten Membranen der Tilapienerythrozyten enthalten im Mittel 1% an zytoplasmatischen Verunreinigungen bezogen auf den Proteingehalt. In der SDS-PAGE liegen die Hämolysatprobe, das Humanhämoglobin und E3 auf einer Linie. FALK et al. (1998) geben die Größe von monomerem Tilapienhämoglobin mit 15 kDa an, was dem Molekulargewicht der Bande E3 entspricht. Die Solubilisierungsexperimente mit Triton X-100 zeigen, daß E3 vor allem auch eine lösliche Komponente enthält. Dies zusammengenommen spricht dafür, daß Hämoglobin ein Bestandteil der Bande E3 ist.

4.7.18. Ca²⁺-ATPase

Das letzte identifizierte Protein aus den Membranen der untersuchten Tilapienerythrozyten ist die Ca²⁺-ATPase. Anders als die bisher beschriebenen Membranproteine handelt es sich hierbei um ein Polypeptid, daß nicht durch Coomassie G-250 gefärbt wird. Der Nachweis erfolgt erst im Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper. Die Ca²⁺-ATPase ist ein 138 kDa schweres, membranintegrales Enzym, das die Kalziumionenkonzentration der roten Blutkörperchen reguliert (CARAFOLI & ZURINI, 1982). Der monoklonale Antikörper detektiert bei den Humanerythrozyten neben einer 138,7 kDa schweren Bande zudem Proteine mit einer Größe von 105 kDa, 168,6 kDa, 200,6kDa und 240 kDa. Nach Angaben des Antikörperherstellers sind diese Banden auf die Aggregation von Proteolysefragmenten mit Monomeren oder Dimeren des Enzyms zurückzuführen. CARAFOLI & ZURINI (1982) berichten, daß die Ca²⁺-ATPase in Abhängigkeit von der Membranpräparation Dimere mit einer Größe von etwa 200 kDa ausbildet, die nicht durch SDS gespalten werden.

Bei allen untersuchten Tilapien zeigt der monoklonale Antikörper eine kräftige Doppelbande an. Mit 175 und 150 kDa liegen diese zwei Polypeptide unterhalb der Membranproteine A4 bzw. B1. Die einzige Ausnahme hiervon bildet *Sarotherodon melanotheron*. Jede getestete Probe dieser Spezies ist negativ oder zeigt nur eine schwache Reaktion bei 120 kDa. Mit Hilfe des monoklonalen Anti-Ca²⁺-ATPase-Antikörpers (Klon 5F10) läßt sich also *Sarotherodon melanotheron* von den anderen vier analysierten Tilapienarten eindeutig im Immunoblot durch das Fehlen der typischen Doppelbande identifizieren. Der Antikörper bindet an ein Epitop im Bereich der Gelenkregion der humanen Ca²⁺-ATPase, das sich zwischen den Aminosäureresten 724 und 783 befindet. Diese "hinge region" des Enzyms ist demnach bei *Sarotherodon melanotheron* anders aufgebaut, als bei den übrigen untersuchten Tilapienspezies.

Obwohl der monoklonale Antikörper gegen ein Epitop der Ca^{2+} -ATPase aus Humanerythrozyten gerichtet ist, bindet er bei gleicher Probenkonzentration wesentlich stärker an die beiden Membranproteine der Tilapien. Entweder ist hier das Epitop sterisch leichter zugänglich oder das Enzym kommt in einer größeren Konzentration in den Erythrozytenmembranen der Tilapien vor. Bei Humanerythrozyten beträgt der Anteil der Ca²⁺-ATPase an den Membranproteinen maximal 0,1% (REUSCH et al., 1997).

Nach derzeitigem Stand der Literatur ist die immunbiologische Detektion einer Ca²⁺-ATPase in den Membranen der roten Blutkörperchen von Tilapien der zweite Nachweis dieses Enzyms in der Plasmamembran kernhaltiger Erythrozyten. Nur aus den roten Blutkörperchen von Hühner ist bisher eine Ca²⁺-ATPase isoliert und charakterisiert worden (ALVES-FERREIRA et al., 1999). Mit 150 kDa entspricht diese Kalziumpumpe im Molekulargewicht der unteren Tilapienbande, die durch den monoklonalen Anti-Ca²⁺-ATPase-Antikörper im Blot angezeigt wird. Eine dem 175 kDa Polypeptid analoge Variante der Ca2+-ATPase ist bisher noch nicht beschrieben worden. Inwieweit es sich hierbei um die Expression eines neuen, gegebenenfalls Teleosteer spezifischen Kalzium-ATPase-Genes oder aber um ein differentielles Spliceprodukt bzw. um eine posttranslationale Modifikation handelt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

4.7.19. Übersicht der analysierten Membranproteine

Faßt man die bisherigen Ergebnisse der Diskussion zusammen, so lassen sich folgende Erythrozytenmembranbanden der in dieser Arbeit analysierten Tilapienarten identifizieren: A1: α -Fodrin, A2: β -Spektrin, B1: α -Fodrin-Fragment, B3: Anionenaustauscher, B4: Na⁺/H⁺-Austauscher, B10: α -Tubulin, C1: Aktin, C4: Tropomyosin; E2: Myosin (leichte Kette), E3: Hämoglobin. Darüber hinaus enthalten die Banden D2 und bei einigen Arten D4 leichte Myosinketten. Das Vorkommen von Schwerkettenmyosin (A3), β -Tubulin (B12), Demantin (B13), Stomatin (D2) ist wahrscheinlich, muß jedoch noch durch Immunoblotanalysen abgesichert werden. Nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten Ankyrin und Protein 4.1. Goblin, eine Ankyrinvariante aus Vogelerythrozyten, Protein 4.2 und die Glyzerinaldehyd-3phosphatdehydrogenase wurden nicht gefunden.

Mit α -Fodrin, β -Spektrin, Aktin, Tubulin und dem Anionenaustauscher enthalten die Tilapienerythrozyten die grundlegenden Komponenten der kernhaltigen roten Blutkörperchen. Dies bedeutet, daß zentrale Erythrozytenmembranbestandteile, nämlich das Spektrin-Aktin-Membranskelett mit dem Anionenkanal als Verankerungspunkt in der Lipiddoppelschicht, schon zu Beginn der Craniotenentwicklung vorhanden waren. Der gesicherte Nachweis von Tropomyosin und Leichtkettenmyosin zeigt weitere Übereinstimmungen im Membranaufbau der roten Blutkörperchen der basalen Euvertebraten und der Mammalia.

Die Säugererythrozyten repräsentieren insofern einen abgeleiteten Zustand, als daß sie unter anderem regelhaft keinen Kern und kein marginales Mikrotubuliband mehr besitzen sowie anstelle von α -Fodrin α -Spektrin aufweisen. Entsprechend haben sie eine runde, diskoidalbikonkave Form im Gegensatz zur elliptischen Gestalt der kernhaltigen roten Blutkörperchen der Nonmammalia.

4.8. Analyse der Membranproteine unter nicht reduzierenden Bedingungen

Die vergleichende Auftrennung SDS und SDS/ME behandelter Erythrozytenmembranen zeigt nur minimale Unterschiede. Anders als bei den Eichproteinen treten in der nicht reduzierten Probe keine zusätzlichen Banden auf. Damit gibt es keine Hinweise auf Proteine im beschriebenen Bandenmuster, deren Quatärstruktur auf zwei oder mehr Polypeptidketten zurückzuführen ist, die über Disulfidbrücken untereinander verbunden sind. Über die zusätzlichen Banden innerhalb der Eichproteine können keine weiteren Aussagen getroffen werden.

Das veränderte Laufverhalten des Albumins in der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen ist auf eine unvollständigen Proteinentfaltung zurückzuführen. Intramolekulare Disulfidbrücken verhindern die vollständige Streckung der Polypeptidkette durch SDS und beeinflussen damit das Wanderungsverhalten des Moleküls in der Elektrophorese (WESTER-MEIER, 1990). Dies könnte sowohl eine Erklärung für das Fehlen der Bande B9 in nicht reduzierten Membranproben sein, als auch für die höhere Konzentration der Proteine B11 und C3. Für den Fall nämlich, daß B9 und andere Polypeptide bedingt durch nicht gespaltene Disulfidbrücken die gleiche elektrophoretische Mobilität aufweisen wie die B11 bzw. C3.

4.9. Membranintegrale Proteine

Die Ergebnisse der Solubilisierungsversuche mit Triton X-100 wurden schon weitestgehend bei der Diskussion der einzelnen Coomassiebanden erwähnt. Nachzutragen bleibt, daß interessanterweise die rund 370 \pm 30 kDa und 270 \pm 10 kDa großen Transmembranproteine erst nach dem Herauslösen mit TX-100 in der Coomassiefärbung deutlich als Banden zu sehen sind. Die Anwesenheit des nichtionischen Detergenz in der Membranprobe verbessert also die elektrophoretische Auftrennung dieser Proteine. Durch die Solubilisierung des Anionenkanals werden bei *S. melanotheron* die Banden A4, B1 und B2 sichtbar. Das scheinbare Fehlen dieser Proteine im Bandenmuster der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE läßt sich auf eine Überlagerung dieser Polypeptide durch die Bande B3 zurückführen. Dies unterstreichen auch die Ergebnisse des Immunoblots mit dem monoklonalen Anti-Humanspektrin-Antikörper. Hier werden B1 und B2 angezeigt. Die Ergebnisse der Löslichkeitsversuche zeigen weiterhin, daß mindestens 11 Coomassiebanden sowohl integrale, als auch periphere Membranproteine enthalten.

4.10. Biotinilierte Erythrozytenmembranproteine

Die Biotinilierung der Zelloberfläche intakter Tilapienerythrozyten dient dem Nachweis von Oberflächenproteinen. Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexonat, kurz Sulfobiotin-X-NHS, ist ein wasserlösliches Biotinderivat, das anders als die leicht hydrophoben Biotinsuccinimidester aufgrund seiner negativen Ladung nicht die Plasmamembran durchdringen kann und deshalb zur Markierung von Zelloberfächen geeignet ist (ALTIN & PAGLER, 1995; GODING, 1996). Im Gegensatz zur PAS-Färbung oder dem Lektinblot werden nicht Kohlenhydratreste nachgewiesen, sondern Proteine. Der Biotinester reagiert nach Herstellerangaben bevorzugt mit der Aminogruppe von Lysinresten. Dies ermöglicht auch den Nachweis nicht glykolisierter Obeflächenproteine. Da nach Inkubationsende der Kopplungspuffer, als auch der Puffer mit dem die Erythrozyten anschließend gewaschen wurden, dem Augenschein nach klar und farblos waren, gibt es keine sichtbaren Hinweise auf eine Hämolyse der Zellen während der Biotinilierung. Demzufolge sollten nur Oberflächenmoleküle markiert worden sein.

Alle biotinilierten Komponenten von *O. niloticus* und *S. melanotheron* werden auch in den Lektinblots angezeigt. Dies spricht dafür, daß es sich bei den markierten Banden um Glykoproteine handelt, die auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert werden. Bei den Banden B3, B4, B9, B10, C2, C3, C5-C8, D1 und E1 wird dies durch die Solubilisierungsexperimente mit Triton X-100 bestätigt. Danach enthalten die genannten Coomassiebanden TX-lösliche Transmembranproteine, die die Lipiddoppelschicht durchziehen und sowohl intra-, als auch extrazelluläre Domänen besitzen. Aufgrund der Übereinstimmung der Kopplungsreaktion mit der Lektinbindung und den Löslichkeitsversuchen ist es wahrscheinlich, daß es sich bei den nachgewiesenen Banden zumindest teilweise um die gleichen Proteine handelt.

Mit der rund 100 kDa großen, stark markierten Biotinbande besitzen die Erythrozyten von On und Sm ein Polypeptid, das direkt unterhalb des Anionenkanals liegt. Weil die Zuordnung der Coomassiebanden in diesem Abschnitt nicht eindeutig ist, wird die Bande nicht weiter untersucht. Die Biotinilierung und die Reaktion mit den Lektinen MAA II, SNA, GNA und LEA zeigt, daß es sich um ein regelhaft vorkommendes Glykoprotein bei beiden Arten handelt. Das 92 kDa schwere Polypeptid B4 wird sowohl bei On als auch bei Sm stark mit Biotin markiert. Dies stützt die Annahme, daß B4 dem Na⁺/H⁺-Austauscher entspricht. Der Na⁺/H⁺-Austauscher ist ein Oberflächenprotein, das MALAPERT et al. (1998) auch in den Erythrozytenmembran der Forelle *Oncorhynchus mykiss* nachgewiesen haben. Die Bande C8 reagiert ebenfalls bei beiden Tilapien in der Biotinkopplung intensiver und bindet alle positiv getesteten Lektin.

Im Unterschied zu *S. melanotheron* wird bei *O. niloticus* in einem Ansatz auch die Bande A1 markiert. Dieses Protein wurde anhand seines Molekulargewichtes, seiner Bandenausprägung und aufgrund der spezifischen Antikörperbindung als α -Fodrin identifiziert. α -Fodrin gehört

jedoch zur Familie der Spektrine und ist somit ein Zytoskelettprotein, das nicht auf der Zelloberfläche erscheint. Zudem ist es ein TX-unlösliches Polypeptid. Die differentielle Solubilisierung mit Triton X-100 und anschließende PAS-Färbung der gelösten Proteine von On enthüllt jedoch bei verdoppelter Membrankonzentration (100 μ g Protein) ein TX-lösliches, PAS- positives Polypeptid, das die gleiche elektrophoretische Mobilität hat wie das α -Fodrin. Die Bande A1 enthält also neben dem peripheren α -Fodrin noch ein integrales Membranprotein. Dieses glykosilierte Oberflächenmolekül wird durch die Biotinilierung und in den Lektinblots schon bei der Standardprobenmenge von 50 μ g Protein eindeutig nachgewiesen.

Auffällig ist die starke Biotinkopplung zwischen 60 und 90 kDa, die nur bei *O. niloticus* vorkommt. Sie stimmt fast deckungsgleich mit der kräftigen MAA II-Bindung im Bereich der Banden B4-B9 bei dieser Art überein. Auch bei den Lektinen SNA, HHA, GNA und TPA reagieren der Abschnitt zwischen den On-Banden B6/B7 bis B8 durchgehend stark gefärbt. Da die Lektin positiven Bereiche innerhalb der Biotinmarkierung variieren, scheint diese Region demnach mehrere Oberflächenpolypeptide zu enthalten. Mit E1 weist *O. niloticus* eine weitere kräftige Biotinbande auf, die Rezeptoren für MAA II, SNA, PWM, APA und TPA besitzt. Sie enthält demnach N-Acetylneuraminsäure, N-Acetylglukosamin, D-Galaktose und L-Fucose.

Im Unterschied zu *O. niloticus* werden bei *S. melanotheron* innerhalb der Bande B3 zwei 170 und 120 kDa große Proteine biotiniliert, die nicht näher charakterisiert werden können. Trotz durchgehender Färbung zeigt Sm keine verstärkte Kopplungsreaktion zwischen 60 und 90 kDa. Infolgedessen ist das Protein B9, das schon in der PAS-Färbung deutlich nachgewiesen wird, als distinkte Biotinbande sichtbar. Die ebenfalls intensiv markierte Bande C9 wird in den Lektinblots durch die mannosespezifischen Agglutinine HHA und GNA als mögliches Artmerkmal selektiv bei *Sarotherodon melanotheron* nachgewiesen.

4.11. PAS-positive Banden

Eine weitere Methode zur Charakterisierung der Erythrozytenmembran der untersuchten Tilapien ist die PAS-Färbung. Sie dient zum Nachweis von Glykoproteinen. Durch Perjodsäure werden die Hydroxylgruppen der Kohlenhydrate zu Aldehydgruppen oxidiert, welche dann mit dem Schiffs Reagenz eine fuchsinrote Verbindung eingehen. Der Vorteil dieser Methode ist, daß sie im Gegensatz zum Lektinblot unspezifisch alle Zuckerverbindungen nachweist. Der große Nachteil der PAS-Färbung liegt jedoch in ihrer geringen Empfindlichkeit. Nach REHM (1996) beträgt die Nachweisgrenze etwa 3 µg Kohlenhydrat pro Proteinbande. Die geringe Sensitivität der PAS-Färbung führt dazu, daß nur stark glykolisierte Komponenten detektiert werden. Wenn die Konzentration einzelner Glykoproteine schwankt bzw. der Zuckergehalt variiert, ist es möglich, daß die PAS-Reaktion zu schwach ist, um eine sichtbare Bande auszubilden. Darüber hinaus hängt der Nachweis entscheidend vom Alter der eingesetzten Perjodsäure und der Qualität des Schiffs Reagenz ab.

FAIRBANKS et al. (1971) haben in den Plasmamembranen von Humanerythrozyten zunächst drei PAS- Banden mit einer Größe von 83,5 kDa, 45,6 kDa und 25,5 kDa entdeckt. Entsprechend ihrer Abfolge im Gel wurden sie mit PAS-1 bis PAS-3 bezeichnet. Hierbei handelt es sich um Proteine, die sich aufgrund ihres hohen Kohlenhydratanteils nicht mit Coomassie färben lassen. Sie liegen an der Grenze zur Bande 3 (PAS-1), oberhalb des Aktins (PAS-2) und unterhalb der Bande 7. PAS-1 stellt die Hauptkomponente der PAS-Polypeptide dar und ist am intensivsten gefärbt. Ein weiteres PAS-Protein (PAS-2⁻) wird von MUELLER & MORRISON (1974) zwischen PAS-1 und PAS-2 beschrieben. Mit der Auftrennung im diskontinuierlichen Elektrophoresesystems nach LAEMMLI konnten MUELLER et al. (1976)

zeigen, daß PAS-2 aus drei Glykoproteinen mit einem Molekulargewicht von 47, 38 und 35 kDa besteht. Für die PAS-2´ geben die Autoren eine Größe von 68 kDa an. Zudem fanden sie mit 27 kDa noch ein zusätzliches PAS-positives Protein.

Vergleicht man diese Angaben mit den PAS-Färbungen der 5-15%-Gradientengele, so handelt es sich bei dem am stärksten reagierenden, 87,3 kDa großen Glykoprotein der Humanerythrozytenmembran um PAS-1. Die unmittelbar darauffolgende 82 kDa schwere Bande kann keinem der bisher beschriebenen PAS-Proteine zugeordnet werden. Möglicherweise ist es eine Variante oder ein proteolytisches Spaltprodukt von PAS-1. Die dritte, 61,2 kDa große PAS-Bande entspricht von ihrer Lage her dem Glykoprotein PAS-2' (68 kDa), während die letzten beiden Banden (42,1 und 38,3 kDa) im 5-15%-Gradientengels bzw. die drei Banden des Blots (41,7, 36,8 und 35 kDa) im Bereich von PAS-2 liegen. Gegenüber der Färbung im Polyacrylamidgel werden nach dem Blotten auf der PVDF-Folie noch zwei weitere Glykoproteine nachgewiesen. Mit 24,6 und 21,2 kDa entsprechen sie PAS-3 (25,5 kDa) und einem bisher noch nicht erwähnten Glykoprotein. Die teilweise starke PAS-Reaktion unterhalb der Lauffront ist auf Glykolipide zurückzuführen (FAIRBANKS et al., 1971; TANNER & BOXER, 1972).

Die Untersuchungen von MUELLER et al. (1976) zeigen, daß die PAS-Banden der Humanerythrozytenmembran heterogen sind und zum Teil aus verschiedenen Glykoproteinen bestehen. DAHR et al. (1976) wiesen nach, daß PAS-1 und PAS-2 verschiedene Formen desselben Moleküls sind. Nach SCHENKEL-BRUNNER (1995) ist PAS-1 das Dimer des Glykophorin A. Das Monomer (37 kDa) bildet Bande die Bande PAS-2. PAS-3 hingegen besteht aus dem Glykophorin B Monomer, während Glykophorin C in seiner monomeren Form PAS-2' darstellt. Die Glykophorine bilden sowohl Homo-, als auch Heteromere untereinander aus, die in der konventionellen SDS-PAGE nicht gespalten werden können und aufgrund ihres hohen Kohlenhydratanteils ein abnormales Laufverhalten zeigen (LUX & PALEK, 1995). Dies erklärt auch die teilweise stark abweichenden Molekulargewichtsangaben in Abhängigkeit vom Elektrophoresesystem oder der Acrylamidkonzentration des Gels.

Für die roten Blutkörperchen des Menschen haben die Glykophorine eine entscheidende Bedeutung. Neben der Bande 3 stellt die Interaktion zwischen Glykophorin C und Protein 4.1 den zweiten Verankerungspunkt des Membranskelettes in der Lipiddoppelschicht dar und trägt damit wesentlich zur Stabilität der Erythrozytenmembran bei. Desweiteren sind 65% der N-Acetylneuraminsäure eines menschlichen, roten Blutkörperchens an Glykophorin A gebunden (SCHENKEL-BRUNNER, 1995). Aufgrund des hohen Sialinsäuregehaltes trägt Glykophorin A wesentlich zur negativen Nettoladung der Erythrozytenoberfläche bei und reduziert damit die Aggregation der roten Blutkörperchen untereinander, als auch mit anderen Zellen (CHASIS & MOHANDAS, 1992). Darüber hinaus sind auf den Glykophorinen A und B die Sacchariddeterminanten des MNS-Blutgruppensystems lokalisiert, während Glykophorin C das Gerbich-Blutgruppenantigen trägt (SCHENKEL-BRUNNER, 1995).

Im Gegensatz zu den Glykophorinen der Humanerythrozyten ist das dominierende PAS-Protein der Zellmembran der roten Blutkörperchen von Tilapien die Bande B3, der Anionenkanal. Die zweite regelmäßig im Gradientengel anzutreffende Komponente befindet sich auf Höhe der Bande B9. Trotz der gleichen Wanderungsgeschwindigkeit in der SDS-PAGE handelt es sich dem PAS-Protein und B9 um zwei verschiedene Polypeptide. Dies wird in der vergleichenden Auftrennung reduzierter und nicht reduzierter Membranproben deutlich. Während das Protein B9 im nicht reduzierten Zustand im Coomassiebandenmuster fehlt, bleibt das PAS-Bandenmuster unverändert. Demnach enthält die Bande B9 mindestens zwei Membranproteine, was auch durch die Solubilisierungsversuche bestätigt wird. B9 ist sowohl Bestandteil der Triton X-100 löslichen, als auch der unlöslichen Fraktion. Aus der Analyse der nicht reduzierten Proben kann weiterhin geschlossen werden, daß die beiden PAS-Banden weder intramolekulare Disulfidbrücken besitzen, die das Laufverhalten der Proteine nachweislich verändern, noch Untereinheiten, die über spaltbare, intermolekulare Disulfidbrücken gebunden sind.

Schon YU et al. (1972) haben bei menschlichen roten Blutkörperchen festgestellt, daß alle PAS gefärbten Polypeptide sich durch nichtionische Detergenzien aus der Plasmamembran der Erythrozyten isolieren lassen. Wie aus den Löslichkeitsversuchen mit Triton X-100 hervorgeht, sind auch die PAS-Banden der untersuchten Tilapien erwartungsgemäß integrale Membranproteine. Nach bisheriger Kenntnis sind Glykoproteine fast ausnahmslos so in der Zellmembran orientiert, daß die Sacchariddeterminanten stets auf der exoplasmatischen Seite, also der Zelloberfläche angeordnet sind (LODISH et al. 1996, STRYER, 1988). Dort spielen sie eine entscheidende Rolle in der Ausbildung von Oberflächenantigen für die Zellerkennung und Zell-Zell-Interaktion.

Infolge der höheren Proteinkonzentration, die bei den Solubilisierungsversuchen eingesetzt wurde, werden nach der PAS-Reaktion weitere TX-lösliche Banden sichtbar. Das 284 kDa große Glykoprotein oberhalb des α-Fodrins (A1) war zum Teil auch in den Gelfärbungen schwach zu erkennen. Von seiner Lage entspricht es dem $273,7 \pm 11,2$ kDa großem Polypeptid, das als neue, integrale Komponente in den Löslichkeitsuntersuchungen auftaucht. Das zweite PAS Protein hat die gleiche Laufgeschwindigkeit wie die A1. Damit besteht diese Bande ebenfalls wie B9 aus mindestens zwei Polypeptiden. Denn A1 enthält mit dem α -Fodrin eine Hauptkomponente des Membranskelettes der Tilapienerythrozyten, während die jetzt nachgewiesene PAS-Bande ein integrales Membranprotein ist. Auffallend ist die starke PAS-Färbung vom Beginn des Trenngels bis etwa 365 kDa, die in der Coomassiefärbung keine Entsprechung hat. Möglicherweise handelt es sich um eine Gruppe hochmolekularer Glykoproteine, die ähnlich der Bande 3 unterschiedlich stark glykolisiert sind und deshalb eine durchgehende, diffuse PAS-Reaktion bedingen. Zumindest ein mannosehaltiges Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 380 bzw. 385 kDa wird in diesem Abschnitt durch die Lektine HHA und GNA spezifisch nachgewiesen. Das N-Acetylglukosamin spezifische Tomatenlektin LEA bindet mit Ausnahme der Spektrine bei On von der Trenngelkante bis zur Bande B1. Es ähnelt damit in seiner Reaktion der PAS-Färbung.

In mehreren Arbeiten zur Plasmamembran kernhaltiger Erythrozyten werden PAS-Färbungen durchgeführt. Im Vergleich zu den Glykophorinen der menschlichen roten Blutkörperchen ist die PAS-Reaktion der Glykoproteine aus den Erythrozytenmembranen von Amphibien und Vögeln negativ oder sehr schwach. OKAZAKI et al. (1984) finden bei Kaulquappen und Adulttieren des Ochsenfrosches (*Rana catesbeiana*) keine PAS-positiven Membranproteine in den roten Blutkörperchen. WATTS & WHEELER (1978) können bei Taubenerythrozyten erst ab einer Membrankonzentration von 350-400 µg Protein (das 7 bis 8-fache der normalen Probenmenge von 50 µg) zwei sehr schwache PAS-Banden bei 70 und 20 kDa nachweisen. Bezogen auf den in dieser Arbeit verwendeten Proteingehalt von 50 bzw. 100 µg lassen sich daher auch in den roten Blutkörperchen aus Tauben keine Glykoproteine mit der PAS-Reaktion detektieren.

Die PAS-Färbung der Erythrozytenmembranproteine von Truthähnen zeigt drei Glykoproteine mit einer Größe von 90, 41 und 26 kDa an (CALDWELL, 1976). JACKSON, (1975) beschreibt bei Hühnern 6 PAS-Banden. Die Hauptkomponenten liegen bei 190 (PAS-1), 99

(PAS-2) und 53 kDa (PAS-3c). Darüber hinaus werden noch kleiner Banden bei 70, 60 und 36 kDa nachgewiesen. WEISE & INGRAM (1976) dagegen führen nur fünf Glykoproteine auf. Die ersten beiden entsprechen den Polypeptiden PAS-1 und 2 von JACKSON (1975). Die übrigen Banden haben ein Molekulargewicht von etwa 60, 50 und 42 kDa. Bei der 90 bis 100 kDa schweren PAS-Bande aus Truthahn- und Hühnerythrozyten handelt es sich um ein Glykoprotein, das die gleichen Laufeigenschaften hat wie der Anionenkanal.

Vergleicht man diese Befunde mit den Ergebnisse bei Tilapien so fallen einige Gemeinsamkeiten auf. In allen bisher untersuchten Plasmamembranen kernhaltiger Erythrozyten fehlt ein dem humanen Glykophorin A entsprechendes Protein. Anders als bei den roten Blutkörperchen des Menschen bildet bei den untersuchten Tilapien, bei Hühnern und Truthähnen der Anionenkanal eine PAS- Bande aus. Sowohl bei den Tilapien als auch bei Hühnern läßt sich ein 60 kDa PAS-Protein nachweisen. Nach DUK et al. (2000) soll es sich bei dem Glykoprotein der Hühnererythrozytenmembran um ein Glykophorin handelt. Ob dies auch für die untersuchten Tilapien gilt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten. In der vergleichenden Auftrennung der TX-löslichen Proteine von *Oreochromis niloticus* und Humanerythrozytenmembranen hat die PAS-Bande B9 zumindest die gleiche elektrophoretische Mobilität wie Glykophorin C.

4.12. Nachweis spezifischer Sacchariddeterminanten einzelner Glykoproteine

Eine weitere Methode zum Nachweis von Glykoproteinen ist der Lektinblot. Lektine sind zuckerbindende Proteine oder Glykoproteine nicht immunogenen Ursprungs, die selektiv mit spezifischen Kohlenhydratdeterminanten interagieren. Sie sind deshalb in der Lage, Zellen zu agglutinieren bzw. Glykokonjugate zu präzipitieren (GOLDSTEIN et al., 1980). Die Spezifität eines Lektins ist abhängig von seiner Bindungsstelle und wird durch Mono- oder einfache Oligosaccharide angegeben, die die Interaktion zwischen Lektin und Kohlenhydratrest am besten inhibieren. Diese physikalische Bindungsreaktion nach dem "Schlüssel-Schloß-Prinzip" hat gegenüber der chemischen Reaktion der PAS-Färbung einige Vorteile. So ist die Nachweisempfindlichkeit im Vergleich zur PAS-Reaktion wesentlich höher. Lektine können weniger als 10 ng Glykoprotein pro Bande detektieren (REHM, 1996). Die Bindungsspezifität der Lektine läßt außerdem Rückschlüsse auf die terminalen und subterminalen Zuckerverbindungen des detektierten Glykoproteins zu. Das bedeutet aber zugleich, daß nur dann ein Nachweis möglich ist, wenn diese entsprechenden Sacchariddeterminanten auf dem Glykoprotein vorhanden sind. Am Beispiel des Anionenkanals der untersuchten Tilapienerythrozyten läßt sich dies veranschaulichen. Das Bande 3 Protein reagiert in der unspezifischen PAS-Färbung sehr stark. Obwohl es also hoch glykolisiert ist, wird dieses Polypeptid im Blot von den meisten der eingesetzten Lektine nicht erkannt, weil entweder die spezifischen Zuckerverbindungen fehlen oder diese für die Lektine nicht frei zugänglich sind.

Von den 14 ausgetesteten Lektinen werden vier (MAA II, HHA, GNA und AIA) erstmalig zur Charakterisierung der roten Blutkörperchen von Tilapien verwendet. Fünf der eingesetzten Agglutinine binden nicht an die geblotteten Erythrozytenmembranproteine der untersuchten Tilapienarten. Es handelt sich hierbei um die N-Acetylgalaktosamin spezifischen Lektine HPA, SBA und VVA sowie um das N-Acetylglukosamin spezifische Lektin STA. Im Agglutinationstest jedoch können einzelne Tilapienarten anhand der Reaktion dieser Lektine mit unbehandelten und enzymbehandelten roten Blutkörperchen unterschieden werden. So läßt sich *Oreochromis aureus* von *O. niloticus* und *Sarotherodon galilaeus* nach Abspaltung der Sialinsäure von der Erythrozytenoberfläche durch die Reaktion mit dem Weinbergschneckenlektin HPA abgrenzen (OBERST et al., 1988). Das Agglutinin SBA aus der Sojabohne bindet nur an die unbehandelten roten Blutkörperchen von *Tilapia zillii*, während die nativen

Erythrozyten aus O. aureus, O. niloticus, S. galilaeus, S. melanotheron, T. dageti und T. guineensis nicht agglutiniert werden (FALK et al., 1996). Desweiteren kann nach FALK et al. (1996) S. melanotheron von O. aureus, O. niloticus, S. galilaeus dadurch unterschieden werden, daß die Erythrozyten dieser Art als einzige nicht durch STA, dem Lektin der Kartoffel, agglutiniert werden.

Das unterschiedliche Bindungsverhalten der vier Lektine im Agglutinationstest und im Blot ist abhängig von den Glykokonjugaten, mit denen sie reagieren. Bei der Agglutination können die Lektine sowohl an Glykoproteine als auch an Glykolipide der roten Blutkörperchen binden. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Zellmembranbestandteilen ist nicht möglich. Bei der Untersuchung der Erythrozytenmembranen im Lektinblot dagegen lassen sich nur Glykoproteine nachweisen. In der vorausgehenden SDS-Gelelektrophorese werden nämlich lediglich Membranproteine als Banden aufgetrennt. Wenn also die Lektine HPA, SBA, VVA und STA in der Lage sind Tilapienerythrozyten zu agglutinieren, aber im Lektinblot keine Banden anzeigen, so ist dies darauf zurückzuführen, daß die auf der Zelloberfläche erkannten Sacchariddeterminanten Kohlenhydratketten von Glykolipiden sind.

Die Lektine, die im Blot positiv reagieren, zeigen trotz gleicher Monosaccharidspezifität zum Teil recht unterschiedliche Bandenmuster an. Sehr deutlich wird das am Beispiel der N-Acetylglukosamin spezifischen Lektine LEA und PWM. Verantwortlich hierfür ist die Subspezifität der Lektine, die sich aus der Struktur und Größe ihrer Bindungsstelle ergibt. Die Zahl der nachgewiesenen Glykoproteine ist sehr unterschiedlich. Während mit LEA nur wenige Banden detektiert werden, sind es bei SNA über 30. Der Übersichtlichkeit halber werden neben der Lektinsubspezifität zunächst charakteristische Banden und artdifferenzierende Glykoproteine erörtert. Im Vordergrund stehen dabei eindeutige Unterschiede, also das Auftreten oder Fehlen lektinbindender Polypeptide. Unterschiede in der Bandenintensität bei einzelnen Arten bleiben bis auf wenige Ausnahmen unberücksichtigt. Auch in den Erythrozytenagglutinationstests mit Lektinen (OBERST et al., 1988) oder artspezifischen Antiseren (PRELLE, 1999) treten oft Titerschwankungen um ein bis zwei Stufen auf, die zeigen, daß die Konzentration einzelner Oberflächendeterminanten von Tier zu Tier variieren kann.

4.12.1. N-Acetylneuraminsäure-haltige Kohlenhydratdeterminanten

Die Lektine MAA II und SNA binden an N-Acetylneuraminsäure (NANA), die auch als Sialinsäure bezeichnet wird. Sialinsäure hat für die Erythrozyten mindestens zwei wichtige Funktionen. Unter physiologischen Bedingungen liegt NANA als Anion, dem N-Acetylneuraminat vor und trägt so entscheidend zur negativen Nettoladung der Zelloberfläche bei. Auf diese Weise wird sowohl die Aggregation der roten Blutkörperchen untereinander unterbunden als auch die unspezifische Anlagerung an die Endothelzellen der Blutgefäße (CHASIS & MOHANDAS, 1992).

Als endständiger Saccharidrest maskiert Sialinsäure subterminale Kohlenhydratrezeptoren und verhindert deren Erkennung. Nach Abspaltung der Neuraminsäure werden die Rezeptoren dann freigelegt. Über die Regulation des Sialinsäuregehaltes lassen sich somit Zellinteraktionen steuern. Bei gealterten Säugererythrozyten gibt die NANA-Abspaltung auf den Glykophorinen einen Galaktoserest frei, der von einem β -Galaktolektin auf der Oberfläche der Gewebsmakrophagen in Leber, Milz und Knochenmark erkannt wird. In Abhängigkeit von der Anzahl der β -Galaktosylreste auf den roten Blutkörperchen kommt es zur Bindung an die Makrophagen und anschließender Phagozytose (MÜLLER et al., 1981, AMINOFF, 1988, BRATOSIN et al., 1997). Neben der Opsonierung durch IgM-Autoantikörper, die an veränderte Oberflächenmoleküle binden, und der Erkennung über Phosphatidylserin, ist dies ein Eliminationsmechanismus gealterter Erythrozyten (BRATOSIN et al., 1997) und veranschaulicht die Bedeutung der Neuraminsäure.

MAA II ist ein 130 kDa großes tetrameres Hämagglutinin aus den Samen der Leguminose *Maackia amurensis*. Es besitzt eine hohe Affinität für Ser/Thr gebundene Kohlenhydratketten mit terminaler N-Acetylneuraminsäure (KAWAGUCHI et al., 1974). Nach KONAMI et al. (1994) hat MAA II eine sehr starke Spezifität für Kohlenhydratketten vom Typ Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc-R-Ser/Thr. Diese entspricht einer N-terminalen Seitenkette des humanen Glykophorin A. Essentiell ist dabei die α 2-3 glykosidische Bindung der Sialinsäure an einen subterminalen Galaktoserest: Neu5Ac α 2-3Gal-R (KONAMI et al., 1994). Nach Angaben der Autoren reagiert MAA II als einziges der bekannten Leguminosenlektine ausschließlich mit N-Acetylneuraminsäure haltigen Zuckerdeterminanten.

Auffallend im Lektinblot ist die sehr starke, für jede Art charakteristische Reaktion von MAA II zwischen den Proteinen B5 und B9. Sie entspricht in ihrer Intensität der Bindung des Lektin an die humane Bande PAS-1, dem Glykophorin-Dimer, das im unteren Abschnitt des Anionenkanals liegt. Die Lektininteraktion bei Oreochromis niloticus ist deckungsgleich mit der kräftigen Biotinilierung der Erythrozytenmembranproteine von On im Bereich von 60 bis 90 kDa. Bei Sarotherodon melanotheron stimmt die starke Biotinkopplung auf Höhe von B9 mit der ebenfalls hohen Affinität des Lektins zu einem Glykoprotein bei B9 überein. Bei den mit Biotin markierten Polypeptiden handelt es sich demnach um stark sialinisierte Glykoproteine, die in ihren Zuckerdeterminanten dem Glykophorin A der Humanerythrozyten gleichen. Der Kohlenhydratanteil ist jedoch zu gering, um in der PAS-Färbung eine deutliche Bande auszubilden. Der Bereich zwischen 65 und 90 kDa, in dem MAA II bei Sm bindet, reagiert in der PAS-Färbung nur schwach diffus. Das Lektin interagiert bei Oreochromis mossambicus und Sarotherodon galilaeus nicht Bande auf Höhe von B9. Bei diesen Tilapien enthält die PAS-Bande auf Höhe von B9 demnach keine α 2-3 glykosidisch gebundene N-Acetylneuraminsäure. Eine Gemeinsamkeit der drei Oreochromis-Arten ist das Vorhandensein von MAA II Liganden auf dem Membranprotein B2. Bei S. galilaeus und S. melanotheron bleibt eine Reaktion aus. Inwieweit es sich hierbei um ein gattungsspezifisches Merkmal handelt, bleibt zu überprüfen.

Das von BROEKAERT et al. (1984) aus der Rinde des Schwarzen Holunders isolierte SNA ist mit 140 kDa ein ähnlich großes Lektin wie MAA II und besitzt ebenfalls eine tetramere Struktur. Die Monosaccharidspezifität wurde zunächst mit Laktose und N-Acetylgalaktosamin angegeben (BROEKAERT et al., 1984). Die Untersuchungen von SHIBUYA et al. (1987) hingegen zeigen, daß verschiedene Oligosaccharide mit endständigem Neu5Ac α 2-6Gal eine 1600 bis 10000fach bessere Hemmwirkung haben. Da das Holunderlektin gleichzeitig hochsialinisierte Glykoproteine mit der terminalen Kohlenhydratkomponente Neu5Ac α 2-6GalNAc-R präzipitiert, postulieren SHIBUYA et al. (1987) für SNA eine Neu5Ac α 2-6Gal/GalNAc-R Bindungsstelle. Während MAA II nur mit Sialinsäure reagiert, die α 2-3 gly-kosidisch an einen Galaktoserest gebunden ist (Neu5Ac α 2-3Gal-R), interagiert SNA mit NANA, die α 2-6 glykosidisch an einen Galaktose- oder N-Acetylgalaktosaminrest geknüpft ist.

Die unterschiedliche Bindungsspezifität findet auch im Bandenmuster ihren Ausdruck. SNA reagiert wesentlich schwächer im Bereich zwischen B5 und B9. Im Gegensatz zu MAA II ist die Bande B9 jedoch durchgehend positiv. Besonders auffällig im Vergleich zum MAA II-Blot ist die gleichmäßig starke Reaktion im niedermolekularen Bereich unterhalb von 36 kDa.

Alle untersuchten Tilapienarten besitzen hier ein identisches Muster von 13 distinkten Banden. Das Holunderlektin zeigt aber auch Unterschiede zwischen den Arten auf. Mit Ausnahme von *Sarotherodon melanotheron* bindet SNA auf Höhe des Polypeptides B1. Bei dieser Tilapie wird bis auf ein Glykoprotein mit der gleichen elektrophoretischen Mobilität wie B2 keine Bande zwischen A1 und B3 nachgewiesen. Dadurch läßt sich die Art von den übrigen abgrenzen. SNA bindet nicht an die Bande B3, reagiert aber innerhalb dieses Polypeptides mit einem 118 kDa großes Glykoprotein, das im MAA II-Blot nicht angezeigt wird und in der Coomassiefärbung aufgrund der Überlagerung durch den Anionenkanal nicht zu erkennen ist.

4.12.2. D-Mannose-haltige Kohlenhydratdeterminanten

Das Amaryllislektin HHA und das Schneeglöckchenlektin GNA haben eine D-Mannose-Spezifität. Im Gegensatz zu anderen bekannten D-Mannose bindenden Agglutininen wie Con A, LCA oder PSA reagieren HHA und GNA nicht mit D-Glukose (SHIBUYA et al., 1988; KAKU et al., 1990). Während das Lektin aus Schneeglöckchenknollen nur mit terminalen D-Mannosylresten interagiert (SHIBUYA et al., 1988), erkennt das Amaryllislektin auch interne α -D-Mannosylreste (KAKU et al., 1990).

Als einzige der eingesetzten Agglutinine binden HHA und GNA an ein ca. 380 kDa schweres mannosehaltiges Glykoprotein, das nur in den Erythrozytenmembranen von O. niloticus, O. mossambicus und S. galilaeus nachgewiesen wird, nicht aber bei O. aureus und S. melanotheron. Anhand dieses Polypeptides lassen sich mit HHA und GNA die morphologisch sehr ähnlichen Oreochromis-Arten aureus und niloticus im Lektinblot unterscheiden. Durch die Reaktion auf Höhe der Banden B1 und C9 kann S. melanotheron abgegrenzt werden. Während HHA bei den übrigen in dieser Arbeit untersuchten Tilapien in der unteren Hälfte von B1 an ein 147 kDa großes Protein bindet, fehlt die Bande bei S. melanotheron. Statt dessen interagiert hier das Amaryllislektin innerhalb des Anionenkanals bei 144 kDa im Bereich der Bande B2, die wiederum bei den übrigen Tilapien nicht angezeigt wird. Die Reaktion von HHA in diesem Abschnitt bei Sarotherodon melanotheron gleicht der von SNA. Auch dort ist $B1_{Sm}$ negativ und $B2_{Sm}$ positiv. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich bei C9. Nur Sm besitzt hier eine 25 kDa große Bande mit hoher Affinität zu HHA und GNA. Auffallend sind auch die sehr intensiv gefärbten Proteine E1 und E3 von Oreochromis mossambicus. Es handelt sich hierbei jedoch nur um einen quantitativen Unterschied. Bei dieser Buntbarschart sind die Banden E1 bis E3 auch in der Coomassiefärbung in einigen Auftrennungen stärker ausgeprägt (s. Abb. 13: Spur 4). Das Bindungsmuster der beiden Mannose spezifischen Lektine ist weitgehend gleich. Allerdings bindet GNA im Gegensatz zu HHA an den Anionenkanal der Tilapien.

4.12.3. N-Acetylglukosamin-haltige Kohlenhydratdeterminanten

Die Reaktion der Agglutinine STA, LEA und PWM unterscheidet sich sehr voneinander. Alle drei haben eine Spezifität für N-Acetylglukosamin. Das 100 kDa große *Solanum tuberosum* Lektin hat nach MATSUMOTO et al. (1982) eine besonders hohe Bindungskonstante für Tetra-N-Acetylchitotetraose (GlcNAc β 1-4)₄ und Tri-N-Acetylchitotriose (GlcNAc β 1-4)₃. STA ist als eines der wenigen Lektine in der Lage, unbehandelte Erythrozyten von *O. aureus*, *O. niloticus* und *S. galilaeus* zu agglutinieren (OBERST et al., 1988), nicht aber die aus *S. melanotheron* (FALK et al., 1996). Entgegen dieser Befunde bindet das Kartoffellektin nicht an die geblotteten Membranproteine aller fünf untersuchten Tilapienarten. Durch die SDS/ME-Behandlung der Erythrozytenmembranen für die elektrophoretische Auftrennung werden zwar die Polypeptidketten weitestgehend linearisiert, die Konformation der Kohlenhydratketten bleibt davon jedoch unbeeinflußt, weil SDS und ME nicht mit Sacchariden reagieren. Da also davon ausgegangen werden kann, daß die Zuckerketten in ihrer Struktur unverändert sind, spricht das Ausbleiben der Lektinbindung im Blot dafür, daß der STA-Rezeptor nicht ein Glykoprotein, sondern ein Glykolipid ist. Lipide werden nämlich in der Elektrophorese nicht aufgetrennt.

Das 200 kDa schwere Tomatenlektin LEA interagiert ebenfalls bevorzugt mit Tetra-N-Acetylchitotetraose (GlcNAc β 1-4)₄ (KILPATRICK, 1980) und ist auch in der Lage, native Tilapienerythrozyten zu agglutinieren (OBERST et al., 1988; FALK et al., 1996). Im Gegensatz zum Kartoffellektin bindet LEA auch im Lektinblot und zwar auf charakteristische Weise. Mit Ausnahme der Spektrine bindet LEA bei O. niloticus durchgehend in hoher Intensität vom Beginn des Trenngels bis zum Anfang des Anionenkanals. Alle übrigen Proben weisen nur eine schwache Reaktion auf. Obwohl in diesem Bereich keine distinkten Banden ausgebildet werden, läßt sich Oreochromis niloticus eindeutig von den anderen vier Tilapienarten anhand der starken Lektininteraktion identifizieren. Sie entspricht der kräftigen PAS-Färbung TX-löslicher Komponenten von On im Bereich zwischen der Trenngelkante und dem Protein A1 (Abb. 17: Spur 4). Bei entsprechender Verdünnung der LEA-Konzentration dürfte das Lektin im Blot nur noch mit Membranproben von O. niloticus Erythrozyten reagieren und könnte dann zur eindeutigen Artdifferenzierung verwendet werden. Das Ergebnis des Lektinblots deckt sich mit den Agglutinationsversuchen von OBERST et al. (1988). Auch dort reagierten die unbehandelten roten Blutkörperchen von O. niloticus am stärksten mit dem Lycopersicon esculentum Lektin (Titer 5), während die Erythrozyten aus O. aureus und S. galilaeus nur einen Titer von 2-3 bzw. 1-2 erzielten.

PWM stellt ein Gemisch aus 5 Lektinen dar, die ein Molekulargewicht von 19-31 kDa haben (WAXDAL, 1974). Hexa-N-chitohexose (GlcNAc β 1-4)₆ hat eine zehnfach höhere Hemmwirkung als Chitobiose (GlcNAc)₂. Die Bindungsstelle des Kermesbeerenlektin muß entsprechend groß sein, da auch der inhibitorische Effekt mit der Länge der GlcNAc β 1-4-Oligomere zunimmt (YOKOYAMA et al., 1978). PWM hat noch zwei weitere Kohlenhydratspezifitäten: einerseits bindet es an verzweigte Glykokonjugate mit der sich wiederholenden Disaccharidsequenz (Gal β 1-4GlcNAc)_n, andererseits reagiert das Lektin mit mannosereichen Glykopeptiden (WU et al., 1988). Dies mag eine Erklärung sein, warum PWM ein komplett anderes Bindungsverhalten hat als LEA. PWM interagiert nämlich nur mit einer Bande auf Höhe von A1 intensiver. Auch in der PAS-Färbung TX-löslicher Membranproteine wird bei allen untersuchten Arten an gleicher Stelle ein Glykoprotein nachgewiesen. Nach OBERST et al. (1988) ist der PWM-Rezeptor auf den Erythrozyten von *O. aureus*, *O. niloticus* und *S. galilaeus* nicht frei zugänglich.

4.12.4. D-Galaktose-haltige Kohlenhydratdeterminanten

AIA, APA, und RCA₆₀ zählen zu den Lektinen mit einer Spezifität für D-Galaktose. Das 40 kDa große *Artocarpus integrifolia* Agglutinin aus der Jackfrucht hat eine hohe Bindungskonstante für das Disaccharid Gal β 1-3GalNac (SASTRY et al., 1996). Das Lektin reagiert fast ausschließlich mit O-glykosidisch gebundenen Kohlenhydraten, wobei terminale NANA-Reste die Affinität reduzieren, aber die Bindung nicht verhindern (HORTIN & TRIMPE, 1990). AIA erkennt auf Humanerythrozyten spezifisch das Thomsen-Friedenreichoder T-Antigen (SASTRY et al., 1996). Hierbei handelt es sich um die O-glykosidisch an Glykophorin gebundene Dissacharidseitenkette Gal β 1-3GalNac-O-Ser/Thr (AGRE & BEARDSLEY, 1995). Das Lektin zeigt im Blot keine artdifferenzierenden Glykoproteine an, bindet aber stark an die Banden B4 und B5, die damit möglicherweise das T-Antigen oder eine ähnliche Determinante enthalten. Diese Vermutung wird durch die Reaktion des ebenfalls T-spezifischen APA (WU et al., 1997) gestützt.

Die Samen von *Abrus precatorius* enthalten das 60,1 kDa große Abrin A sowie das 63,8 kDa schwere Abrin C, die beide eine Spezifität für Galaktose haben (OLSNES et al., 1974). Nach WU et al. (1997) zeigt das Agglutinin wie AIA die höchste Affinität zur Zuckerdeterminante Galβ1-3GalNAc-R des T-Antigens. Entsprechend groß ist auch die Übereinstimmung der Bandenmuster, die beide Lektine im Blot anzeigen. Ein wesentlicher Unterschied besteht allerdings in der Reaktion mit der Bande B3. Trotz ähnlicher Bindungsspezifität interagiert nur APA mit dem Anionenkanal, nicht aber AIA. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß die Bande 3 von *Sarotherodon galilaeus* am intensivsten APA bindet und auf diese Weise von den anderen vier Tilapienarten unterschieden werden kann. Eine zweite Auffälligkeit stellt die Negativbande auf Höhe der Proteins B1 dar. Sie hat bei den drei *Oreochromis*- Spezies und *Sarotherodon galilaeus* eine "Größe" von 141,6 kDa, bei *S. melanotheron* hingegen nur 135 kDa. Mittels APA lassen sich sowohl Sg, als auch Sm jeweils von den übrigen untersuchten Tilapien abgrenzen.

Diese beiden Unterscheidungsmerkmale finden sich auch im RCA₆₀-Blot. Wiederum zeigt die Membranprobe von *Sarotherodon galilaeus* die stärkste Bindungsreaktion mit dem galaktosespezifischen Lektin. Dies bedeutet, daß *S. galilaeus* entweder mehr Lektinrezeptoren für APA und RCA₆₀ besitzt als die restlichen vier Tilapienarten, oder aber die beiden Lektine haben eine höhere Affinität zu den galaktosetragenden Kohlenhydratdeterminanten von Sg. Falls die zweite Annahme zutrifft, unterscheidet sich *S. galilaeus* in diesen Zuckerketten von den übrigen untersuchten Tilapien. RCA₆₀ bindet als einziges Lektin deutlich an die Bande 3 aller fünf Buntbarschspezies. Als zweite, stark reagierende Bande wird im Gegensatz zu AIA und APA noch ein 285 kDa großes Glykoprotein direkt oberhalb des α -Fodrins nachgewiesen. Es entspricht der 284 kDa schweren PAS-Bande, die im Solubilisierungsexperiment detektiert wird.

RCA₆₀, das 60 kDa schwere Lektin des Rizinusstrauches, hat ebenfalls eine Spezifität für das T-Antigen, reagiert aber auch mit verzweigten Oligosaccharidketten, die terminal D-Galaktose β -glykosidisch 1-3 oder 1-4 an N-Acetylglukosamin gebunden haben. Deutlich schwächer ist hingegen die Affinität zu N-Acetylgalaktosamin (BAENZINGER & FIETE, 1979). Die Bindungsstellen für APA und RCA₆₀ sind auf der Oberfläche der Erythrozyten von *O. aureus*, *O. niloticus* und zum Teil von *S. galilaeus* nicht zugänglich, sondern werden erst nach Abspaltung von N-Acetylneuraminsäure freigelegt (OBERST et al., 1988). Das bedeutet, daß entweder die Rezeptoren durch NANA maskiert werden oder Sialinsäurereste benachbarter Zuckerketten die Lektinbindung sterisch behindern. Die RCA₆₀-Liganden lassen sich durch die unspezifische Protease Pronase von der Erythrozytenoberfläche abspalten. Nach dieser Enzymbehandlung der roten Blutkörperchen kommt es zu keiner Agglutination durch RCA₆₀ (OBERST et al., 1988). Das Lektin bindet demnach an Glykoproteine. Die Blotanalysen zeigen, daß es sich hierbei in erster Linie um die Bande B3, den Anionenkanal, handelt sowie um ein 285 kDa großes, PAS-positives Polypeptid.

Nach OBERST et al. (1988) zeigt *S. galilaeus* im Vergleich zu Oa und On individuelle Unterschiede gegenüber RCA_{60} auf. Bei drei von sieben getesteten Tieren kam es zu keiner Agglutination nativer oder pronasebehandelter Erythrozyten mit dem Lektin. Die roten Blutkörperchen von vier Individuen dagegen reagierten sowohl unbehandelt als auch nach Pronaseinkubation positiv mit dem Lektin. Solche individuellen Unterschiede, die Hinweise auf die Existenz von Blutgruppen darstellen, sind bei der Diskussion im Lektinblot festgestellter Artunterschiede zu berücksichtigen. RCA_{60} und APA reagieren mit dem Anionenkanal von *S. galilaeus* am stärksten. Ob dies jedoch für alle untersuchten Sarotherodon galilaeus gilt, bleibt zu überprüfen, da im Blot keine Einzeltiere, sondern nur Sammelproben getestet wurden.

4.12.5. N-Acetylgalaktosamin-haltige Kohlenhydratdeterminanten

Auffällig ist, daß mit HPA, SBA und VVA kein N-Acetylgalaktosamin-spezifisches Lektin an die Erythrozytenmembranproteine bindet. HPA ist ein 100 kDa großes Agglutinin aus der Eiweißdrüse von *Helix pomatia* (HAMMARSTRÖM & KABAT, 1969). Die größte Affinität hat HPA gegenüber GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc (Forssmann-Determinante) und ähnlich aufgebauten Zuckern (BAKER et al., 1983). Das Lektin interagiert aber auch mit GalNAc α 1-3Gal-R, β -GalNAc-R und GlcNAc (HAMMARSTRÖM et al., 1977). OBERST et al. (1988) konnten im Agglutinationstest *Oreochromis aureus* von *O. niloticus* und *S. galilaeus* unterscheiden. Während die Erythrozyten der beiden letztgenannten Arten überhaupt keine Reaktion mit HPA zeigten, wurden die roten Blutkörperchen von *O. aureus* nach Abspaltung der Sialinsäure agglutiniert. Nach Pronasebehandlung kam es dagegen zu keiner Agglutination. Das deutet daraufhin, daß der HPA-Rezeptor auf einer durch Pronase spaltbaren Polypeptidkette sitzt. Dann jedoch wäre ein Nachweis im Blot zu erwarten gewesen. Vermutlich stellt der Ligand ein Glykolipid dar, das von N-Acetylneuraminsäure maskiert wird.

Das Sojabohnenlektin SBA bindet an GalNAc α 1-R oder GalNAc β 1-R Verbindungen, wobei eine hohe Affinität zur Blutgruppen-A-Determinante GalNAc α 1-3Gal-R vorhanden ist (WU et al. 1988). Im Agglutinationstest reagiert es mit keiner der in dieser Arbeit untersuchten Tilapienarten, wohl aber mit *Tilapia zillii* (FALK et al., 1996; OBERST et al., 1996). Das Agglutinin aus der Zottelwicke (VVA) besteht aus drei verschiedenen Isolektinen, von den zwei eine Spezifität für GalNAc α 1-3Gal-R haben und das letzte mit dem Tn-Antigen 3GalNAc α 1-O-Ser/Thr reagiert (TOLLEFSEN & KORNFELD, 1983 a+b). Die Erythrozyten von *S. galilaeus* zeichnen sich dadurch aus, daß sie sowohl unbehandelt als auch nach Enzymbehandlung nicht von VVA agglutiniert werden (OBERST et al., 1988).

Trotz der unterschiedlichen Subspezifitäten gegenüber N-Acetylgalaktosamin-Verbindungen reagieren die drei Agglutinine HPA, SBA und VVA nicht im Blot. Ob die Membranproteine der untersuchten Tilapien überhaupt endständig gebundenes D-GalNAc enthalten, müßte mit weiteren N-Acetylgalaktosamin spezifischen Lektinen z. B. aus *Wistaria floribunda*, *Griffonia simplicifolia* oder *Phaseolus lunatus* überprüft werden.

4.12.6. L-Fucose-haltige Kohlenhydratdeterminanten

Das Lektin aus der Spargelerbse *Tetragonolobus purpurea* besitzt eine Fucosespezifität und bindet mit hoher Affinität an das terminale Disaccharid Fuc α 1-2Gal β 1-4-R (PEREIRA & KABAT, 1974). TPA zeigt zwischen den Banden A2 und B3 ein gattungsspezifisches Bindungsverhalten. Das Agglutinin reagiert nur bei den beiden *Sarotherodon*-Arten mit dem Anionenkanal und im Abschnitt darüber. Dagegen besitzt das Bande 3 Protein der drei *Oreochromis*-Arten keinen Rezeptor für TPA. Den Erythrozyten von *Sarotherodon melanotheron* fehlt mit 147,5 kDa im Vergleich mit den anderen Arten eine Bande im Bereich von B1. Ansonsten werden bei den untersuchten Tilapien die gleichen Banden angezeigt.

Den Agglutinationstests von OBERST et al. (1988) zur Folge liegen die TPA-Bindungsstellen nicht frei auf der Oberfläche der roten Blutkörperchen von *O. aureus*, *O. niloticus* und *S. galilaeus* vor. Sie werden durch Neuraminsäure und Polypeptidketten abgeschirmt. Von den jeweils sieben untersuchten Individuen pro Art agglutiniert TPA bei Oa und On die mit NANAase behandelten Erythrozyten aus fünf bzw. drei Tieren nicht. Bei Sg hingegen
reagieren alle Individuen positiv mit dem Lektin (OBERST et al., 1988). Das Ausbleiben der Agglutination bei den *Oreochromis*-Arten entspricht dem Fehlen der TPA-Rezeptoren auf der Bande 3. Dies ist im Lektinblot der einzige Unterschied zwischen den drei Arten. Da die roten Blutkörperchen von zwei bzw. vier Tieren agglutiniert werden, könnte das ein Hinweis für eine blutgruppenähnliche Determinante auf dem Anionenkanal sein, vorausgesetzt, daß die Lektinbindung im Agglutinationstest nicht an Zuckerketten von Glykolipiden erfolgt.

4.13. Charakterisierung einzelner Glykoproteine

Neben einer möglichen Artcharakterisierung erlauben die Lektinblotergebnisse auch die nähere Charakterisierung einzelner Glykoproteine. Die PAS-Bande auf Höhe des α -Fodrins enthält aufgrund der Reaktion mit MAA II, SNA, HHA, GNA, PWM und TPA folgende terminale Saccharidverbindungen: NeuNAc α 2-3Gal-R, D-Mannose, D-GlcNAc und L-Fucose. Die Bande B3, der Anionenkanal, besitzt dagegen überwiegend D-Galaktose (APA, RCA₆₀) und in geringen Maße NeuNAc α 2-3Gal-R (MAA II), D-Mannose (GNA), D-GlcNAc (LEA) sowie bei Sg und Sm L-Fucose (TPA). Bei allen Arten fällt in vielen Blots eine charakteristische Doppelbande unterhalb des Anionenkanals auf Höhe der Banden B4 und B5 auf. Das Polypeptid B4 entspricht sehr wahrscheinlich dem N⁺/H⁺-Austauscher, einem stark glykosilierten Transmembranprotein. Die Bande reagiert entsprechend bis auf RCA₆₀ mit allen Lektinen. Abgesehen von SNA, LEA (außer On) und RCA₆₀ binden ebenfalls alle getesteten Agglutinine an B5.

Die Reaktion von HHA, GNA und TPA verdeutlicht, daß innerhalb von B1 noch ein Glykoprotein liegt. Auch B10, das als α -Tubulin identifiziert wurde, reagiert mit vielen Lektinen und weist auf das Vorkommen eines weiteren Proteins in dieser Coomassiebande hin. Die Humanerythrozytenmembranen besitzen in diesem Bereich mit dem Glukose-Transporter ein glykosiliertes Transmembranprotein (ALLARD & LIENHARD, 1985; SILVERMAN, 1991). Ob dieses Polypeptid auch in Fischerythrozyten vorkommt, ist unbekannt. Daß verschiedene Membranproteine die gleiche elektrophoretische Mobilität besitzen, darauf deuten auch die Ergebnisse der Solubilisierungsversuche. Sie zeigen, daß einzelne Coomassiebanden sowohl lösliche, also integrale und damit potentiell glykolisierte Membrankomponenten enthalten, als auch unlösliche Polypeptide, die dem Zytoskelett angehören. Ein Beispiel hierfür ist das nicht solubilisierbare α -Fordrin und die auf gleicher Höhe liegende TX-lösliche PAS-Bande. Unter den Membranproteinen der menschlichen roten Blutkörperchen haben Aktin und Tropomodulin die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit in der SDS-PAGE (LUX & PALEK, 1995).

Zu den wenigen Banden an denen keine Lektinbindung stattfindet, gehören A2 (β -Spektrin) und C1 (Aktin). Beide Proteine sind Komponenten des Membranskelettes.

4.14. Unterschiede zwischen Tilapienarten im Lektinbindungsmuster

Bis auf PWM und AIA liefern die übrigen acht Lektine, die im Blot positiv reagieren, Hinweise auf Unterschiede zwischen den untersuchten Tilapienarten und -gattungen. Von diesen acht Lektinen grenzen fünf (SNA, HHA, GNA, APA und RCA₆₀) *Sarotherodon melanotheron* anhand ihrer Reaktion auf Höhe der Banden B1 und B2 von den anderen Tilapienarten ab. Darüber hinaus weist die Bande C9 von *S. melanotheron* ein mannosehaltiges Glykoprotein auf, daß bei den übrigen vier Spezies fehlt. Bei den Lektinblotanalysen differiert keine andere Tilapie in so vielen Merkmalen wie Sm.

LEA reagiert in charakteristischer Weise mit Membrankomponenten von *Oreochromis niloticus.* Bei entsprechender Verdünnung kann dieses Lektin innerhalb der untersuchten

Arten im Blot als monospezifisch für On betrachtet werden. Anhand des 380 kDa großen Glykoproteins, das Rezeptoren für HHA und GNA aufweist, läßt sich *O. niloticus* von *O. aureus* unterscheiden. Charakteristisch für *Sarotherodon galilaeus* ist die starke Reaktion mit den galaktosespezifischen Lektinen APA und RCA₆₀. MAA II interagiert bei allen Arten in typischer Weise zwischen den Banden B4 und B9. Das Lektin bindet nur bei den drei *Oreochromis*-Spezies auf Höhe der Bande B1. TPA-Bindungsstellen auf dem Anionenkanal hingegen werden nur bei den beiden *Sarotherodon*-Arten nachgewiesen.

Diese Ergebnisse liefern allerdings nur Indizien auf möglicherweise art- oder gattungsspezifische Unterschiede. Zur Absicherung müssen wesentlich mehr Einzeltiere und Populationen einer Art untersucht werden, um auszuschließen, daß es sich hierbei um Variationen innerhalb der Kohlenhydratzusammensetzung einzelner Glykoproteine oder Blutgruppensubstanzen handelt.

4.15. Blutgruppen bei Fischen

Wie erwähnt, finden OBERST et al. (1988) in Lektinagglutinationstests mit Erythrozyten aus *O. aureus*, *O. niloticus* und *S. galilaeus* schon bei sieben getesteten Tieren einer Art individuelle Unterschiede in der Reaktion mit RCA₆₀ und TPA (Agglutination oder keine Agglutination). In den Lektinblotanalysen werden jedoch nicht die Membranen von Einzeltiere untersucht, sondern Sammelproben, die sich aus den Erythrozytenmembranen verschiedener Individuen einer Art zusammensetzen. Dies muß bei der Diskussion der Blotergebnisse berücksichtigt werden. Angenommen, bei der Hälfte dieser Individuen ist der Lektinrezeptor auf einem Glykoprotein vorhanden, bei der anderen Hälfte jedoch nicht. Diese unterschiedliche Verteilung wird im Lektinblot nicht erkannt, denn das Lektin bindet im Blot an die zu 50% in der Bande vorhandenen Liganden. Allenfalls die Bandenintensität ist herabgesetzt. Im ungünstigsten Falle könnten bei allen beprobten Individuen die angenommene Determinante fehlen bzw. vorhanden sein. Die im Lektinblot detektierten, scheinbaren Unterschiede wären dann nicht artspezifisch, sondern nur zufällig oder ein Hinweis auf Blutgruppensubstanzen.

Blutgruppenantigene sind KLEIN et al. (1997) zur Folge durch drei Eigenschaften definiert. Erstens, sie kommen auf Blutzellen, vornehmlich Erythrozyten, oder gelöst im Blutplasma vor und können zweitens, eine Immunantwort auszulösen. Drittens sind die kodierenden Gene solcher Blutgruppensubstanzen polymorph, so daß einige Individuen einer Art das Antigen besitzen, andere jedoch nicht. Biochemisch betrachtet handelt es sich bei den Determinanten um Kohlenhydrate (beispielsweise AB0-, H- oder Lewis- Antigene des Mensch) oder Proteine wie die humanen MNS, Rh, Duffy und Kell Antigene (KLEIN et al., 1997).

Das Vorkommen von Blutgruppen ist bei einer Vielzahl von Fischen bestätigt worden. Schon innerhalb der Knorpelganoiden finden SAKHAROV et al. (1997) beim Sibirischen Stör (*Acipenser baeri*) ein Erythrozytenisoantigen (Ab^a). Während dies bislang der einzige Bericht über Blutgruppen bei den Chondrostei ist, gibt es für die Teleostei wesentlich mehr Nachweise, von denen hier nur einige aufgezählt werden. SAKHAROV & VIKHMAN (1995) haben auf den Erythrozyten des Karpfen (*Cyprinus carpio*) vier verschiedene Isoantigene (SV^a, b, c und d) identifiziert. Die Silberkarausche (*Carassius auratus* var.) besitzt ein dem menschlichen AB0-System ähnliches Blutgruppensystem. Es besteht aus den beiden kodominanten Antigenen S1 und S2 sowie der rezessiven Determinante S0. Die drei unterschiedlichen Allele bilden vier verschiedene Phänotypen aus: S1, S1S2, S2 und S0 (TONG & WU, 1993). Beim Goldfisch (*Carassius auratus*) hingegen findet HILDEMANN (1956) nur zwei Antigene: A1 und A2. Auch auf den Erythrozyten der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) und der Europäischen Forelle (*Salmo trutta*) werden zwei bzw. drei Blutgruppenallele expremiert (SANDERS & WRIGHT, 1962). Der Gewöhnliche Katzenwels (*Ictalurus n. nebulosus*) besitzt zwei Isoantikörpertypen (Anti-1 und Anti-2) und zwei kodominante Isoantigene (1 und 2), die vier Phänotypen (1, 1+2, 2 und 0) ausbilden (CUSHING & DURALL, 1957). Komplexere Blutgruppensysteme besitzen beispielsweise der Kabeljau (*Gadus morhua*) mit 6 Antigenen (MÖLLER, 1967) oder der Thunfisch (*Katsuwonus pelamis*) mit 15 Phänotypen, die in drei Hauptblutgruppen eingeteilt werden können (FUJINO & KAZAMA, 1968). Weitere Angaben zu Blutgruppen bei Fischen finden sich bei CUSHINGS (1964) und DE LIGNY (1969).

OBERST & VILLWOCK (1993) haben die Existenz von Blutgruppenantigenen auf den roten Blutkörperchen von Tilapien bestätigt. Durch intraspezifische Immunisierung mit allogenen Erythrozyten konnten sie bei O. aureus fünf und bei O. niloticus sieben verschiedene Isoantigene nachgewiesen. Die aureus-Antigene B und C werden auch auf den roten Blutkörperchen von O. niloticus vorgefunden (OBERST & VILLWOCK, 1993). PRELLE (1999) findet bei S. melanotheron ebenfalls Hinweise auf die Existenz eines Blutgruppenantigens. Außerdem wurden durch Kreuzimmunisierung mit Erythrozyten jeweils drei bis fünf gemeinsame Antigene zwischen den einzelnen Arten (Oa, On, Om, Sg und Sm) gefunden, die zumindest bei O. aureus und O. niloticus in Analogie zu den Befunden von VILLWOCK OBERST & (1993)auf das Vorkommen eines gemeinsamen Blutgruppensystems schließen lassen (PRELLE, 1999).

Wenn die im Lektinblot angetroffenen Unterschiede auf Blutgruppendeterminanten zurückzuführen sind, so besteht aufgrund der geringen Zahl der untersuchten Tiere die Möglichkeit, daß die "artspezifischen" Merkmale nur individuen- oder populationsspezifische Antigene darstellen. SPRAGUE (1961) hat die Erythrozyten von 642 Thunfischen der Art Katsuwonus pelamis in Lektinagglutinationstest untersucht und dabei neben individuellen auch populationsspezifische Unterschiede festgestellt. Mit den Lektinen aus Vigilia capensis und Caragana arborescens wurden drei verschiedene Phänotypen entdeckt, die in signifikanter Beziehung zur geographischen Herkunft stehen (SPRAGUE, 1961). Auch beim sich regionale Populationen Kabeljau lassen anhand der Allelenfrequenz der Blutgruppenantigene abgrenzen (MÖLLER, 1967). Aus diesem Grunde können die in den Lektinblots gefundenen "Artunterschiede" nur Hinweise auf mögliche artdifferenzierende Merkmale sein, die in weiteren Untersuchungen an verschiedenen Individuen und Population auf ihre Validität hin überprüft werden müssen. Dies gilt gerade für O. aureus und S. galilaeus. Die untersuchten Tiere stammen aus langjährigen Zuchtlinien, in denen sich durch Inzucht einzelne Blutgruppenallele manifestiert haben können, die für die jeweilige Population, nicht aber für andere geographische Varianten typisch sind. Trotz dieser Einschränkungen kann festgehalten werden, daß sich Sarotherodon melanotheron aufgrund der zahlreich festgestellten Unterschiede von den übrigen vier untersuchten Tilapienarten deutlich abgrenzen läßt.

4.16. Phylogenetische Betrachtung

Betrachtet man die erzielten Ergebnisse, so fällt auf, daß sich die Erythrozytenmembran von *Sarotherodon melanotheron* in vielen Merkmalen von den anderen untersuchten Spezies unterscheidet, während diese untereinander weitestgehend einheitlich reagieren. Deutlich sind bei *S. melanotheron* die Differenzen im Bereich des Anionenkanals, der Ca²⁺-ATPase sowie der Banden B1 und B2 in den Lektinblots. Von den acht positiv getesteten Lektinen grenzen

fünf (SNA, HHA, GNA, APA und RCA₆₀) Sarotherodon melanotheron anhand ihrer Reaktion auf Höhe der Banden B1 und B2 von den anderen Tilapienarten ab. Die mannosespezifischen Agglutinine HHA und GNA bindet darüber hinaus nur bei *S.* melanotheron an die Bande C9. Aufgrund dieser zahlreichen Unterschiede kann man *S.* melanotheron sowohl von den drei Oreochromis-Arten, als auch von Sarotherodon galilaeus abgrenzen.

Dies deckt sich mit den Befunden von POUYAUD & AGNÈSE (1995). Die Autoren haben 24 Enzymloci von insgesamt 21 verschiedenen Tilapienarten der Gattungen Tilapia (11 Spezies), Oreochromis (5 Spezies) und Sarotherodon (5 Spezies) untersucht. Mit einer Ausnahme, nämlich Sarotherodon melanotheron, bestätigen die aus den Allozymdaten generierten Stammbäume die von TREWAVAS (1983) vorgeschlagenen drei Genera Tilapia, Oreochromis und Sarotherodon sowie die Annahme, daß die maulbrütenden Formen gemeinsam aus der substratlaichenden Gattung Tilapia entstanden sind und sich später in die beiden Genera Oreochromis und Sarotherodon aufgespalten haben (POUYAUD & AGNÈSE, 1995). S. melanotheron jedoch ist nach Angaben der Autoren genetisch eher mit der Gattung Oreochromis verwandt als mit dem Genus Sarotherodon. Dennoch unterscheidet sich S. melanotheron auch von der ihr am nächsten stehenden Art Oreochromis macrochir in 16 der 24 Merkmale. Innerhalb der genannten Tilapien nimmt S. melanotheron also eine mehr isolierte Stellung ein. Dies wird ebenfalls durch die Multivarianzanalysen von B-RAO & MAJUMDAR (1998) bestätigt. Auch SEYOUM (1989, zit. n. POUYAUD & AGNÈSE, 1995) stellt fest, daß sich S. melanotheron von allen anderen untersuchten Tilapien unterscheidet und am ehesten in die Nähe der Oreochromis-Gruppe gehört. Dies und die Tatsache, daß S. melanotheron der einzige paternale Maulbrüter ist, sind der Grund für den Vorschlag, ein eigenen Subgenus für Sarotherodon melanotheron, wie zuvor bereits von TREWAVAS (1983) angeregt, einzuführen (SEYOUM, 1989 zit. n. POUYAUD & AGNÈSE, 1995). Nach POUYAUD & AGNÈSE (1995) läßt sich S. melanotheron von den anderen Sarotherodon-Arten noch morphologisch durch Unterschiede auf dem ersten Kiemenbogen und ökologisch durch das Vorkommen in Brackwasser oder hypersalinen Gewässern abgrenzen.

Eine Gemeinsamkeit der drei in dieser Arbeit untersuchten *Oreochromis*-Arten ist die Bindung des NANA-spezifischen Lektins MAA II auf Höhe des Membranproteins B2, die bei *S. galilaeus* und *S. melanotheron* unterbleibt. Im Gegensatz dazu reagiert nur die Bande B3 dieser zwei *Sarotherodon*-Spezies mit dem Fukose nachweisenden Lektin TPA, während die drei *Oreochromis*-Arten hier keine Reaktion zeigen. Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um gattungsspezifische Merkmale handelt, müssen jedoch mehr Individuen und Arten dieser Genera untersucht werden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

- Es wird eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, Tilapienerythrozytenmembranen in hoher Reinheit zu gewinnen. Der Gehalt an zytoplasmatischen Verunreinigungen beträgt 1.0% ± 0,63 (n=75). Der Anteil von DNA in den isolierten Membranen liegt im Mittel bei 1,7% ± 0,42% (n=10) bezogen auf den Proteingehalt. Dieser beträgt 52,3 %
- 2. Die Auftrennung der Membranproteine in der sauren Harnstoffgelelektrophorese ergibt 14 Banden. Das Bandenmuster von *Oreochromis mossambicus* zeigt artspezifische Merkmale.

- 3. Die Auftrennung der Membranproteine von Oreochromis aureus, O. niloticus, O. mossambicus, Sarotherodon galilaeus und S. melanotheron in der 5-15%-SDS-Gradienten-PAGE ergibt ein reproduzierbares Bandenmuster, für das eine eigene Nomenklatur eingeführt wird. Diese erlaubt erstmalig eine weitergehende Identifizierung und Charakterisierung der Erythrozytenmembran von Knochenfischen.
- 4. Die Membranproteine werden durch Solubilisierungsversuche mit Triton X-100, Biotinkopplung, PAS-Färbung sowie Immuno-und Lektinblots näher charakterisiert.
- Folgende Proteinbanden können identifiziert werden: A1: α-Fodrin, A2: β-Spektrin, B1: α-Fodrin-Fragment, B3: Anionenaustauscher, B4: Na+/H+-Austauscher, B10: α-Tubulin, C1: Aktin, C4: Tropomyosin; E2: Myosin (leichte Kette), E3: Hämoglobin. Darüber hinaus wird im Immunoblot eine Ca²⁺-ATPase nachgewiesen.
- Das Vorkommen von Schwerkettenmyosin (A3), β-Tubulin (B12), Demantin (B13), Stomatin (D2) ist wahrscheinlich, muß jedoch noch durch Immunoblotanalysen abgesichert werden. Nicht eindeutig nachgewiesen werden konnten Ankyrin und Protein 4.1. Goblin, eine Ankyrinvariante aus Vogelerythrozyten, Protein 4.2 und die Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase wurden nicht gefunden.
- Sarotherodon melanotheron läßt sich anhand des Anionenkanals sowie der Ca²⁺-ATPase unterscheiden. Von den acht positiv getesteten Lektinen grenzen fünf (SNA, HHA, GNA, APA und RCA₆₀) Sarotherodon melanotheron anhand ihrer Reaktion auf Höhe der Banden B1 und B2 von den anderen Tilapienarten ab. Die mannosespezifischen Agglutinine HHA und GNA binden darüber hinaus nur bei *S. melanotheron* an die Bande C9.
- 8. *O. mossambicus* kann im Immunoblot mittels eines monoklonalen Anti-Tropomyosin-Antikörpers und *O. niloticus* durch das N-Acetylglukosamin-spezifische Lektin LEA eindeutig bestimmt werden.
- 9. Die Lektine MAA II und TPA geben Hinweise auf mögliche gattungsspezifische Unterschiede zwischen den Erythrozytenmembranen.

VI. LITERATUR

AGNÈSE, J.P. (1998): Genetic impacts of some fish species introduction in african freshwaters. – In: AGNÈSE, J.P. (ed.): Genetics and aquaculture in africa. – Paris (Orstom édition), 125-133.

AGRE, P. & BEARDSLEY, D. (1995): Blood cell antigens and alloimmune disorders. In: HANDIN, R.I., LUX, S.E. & STOSSEL, T. (eds.): Blood: principles and practice of hematology. – Philadelphia (J.B. Lippincott Comp.), 1847-1875

ALLARD, W.J. & LIENHARD, G.E. (1985): Monoclonal antibodies to the glucose transporter from human erythrocytes. – J. Biol. Chem. 260: 8668-8675.

ALPER, S.L., PALFREY, H.C., DERIEMER, S.A. & GREENGARD, P. (19880): Hormonal control of protein phosphorylation in turkey erythrocyte. – J. Biol. Chem. 255: 11029-11039.

ALTIN, J.G. & PAGLER, E.B. (1995): A one-step procedure for biotinylation and chemical cross-linking of lymphocyte surface and intracellular membrane-associated molecules. – Anal. Biochem. 224: 382-389.

ALVES-FERREIRA, M., SCOFANO, H.M. & FERREIRA-PEREIRA, A. (1999): Ca^{2+} -ATPase from chicken (*Gallus domesticus*) erythrocyte plasma membrane: effects of calmodulin and taurine on the Ca²⁺-dependent ATPase activity and Ca²⁺ uptake. – Comp. Biochem. Physiol. Part B 122: 269-276.

AMINOFF, D. (1988): The role of sialoglycoconjugates in the ageing and sequestration of red cells from circulation. – Blood Cells 14: 229-247.

ANDREWS, P.C. & KRIPINSKY, N.I. (1982): Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate. – Anal. Biochem. 127: 346-350.

AVTALION, R.R. & WOJDANI, A. (1971): Electrophoresis and immunelectrophoresis of sera from F_1 hybrids of *Tilapia*. – Bamidgeh 23: 117-124.

BAENZINGER, J.U. & FIETE, D. (1979): Structural determinants of *Ricinus communis* agglutinin and toxin. Specificity for oligosaccharides. – J Biol. Chem. 254: 9795-9799.

BAKER, D.A., SUGII, S., KABAT, E.A., RATCLIFFE, R.M., HERMENTIN, P., & LEMIEUX, R.U. (1983): Immunological studies on the combining sites of Forssman hapten reactive hemagglutinins from *Dolichos biflorus*, *Helix pomatia*, and *Wisteria floribunda*. – Biochemistry 22: 2741-2750.

BAKERMAN, S. & WASEMILLER, G. (1967): Studies on structural units of human erythrocyte membrane. I. Separation, Isolation, and partial characterization. – Biochemistry 6: 1100-1113.

BALARIN, J.D. & HATTON, J.P. (1979): Tilapia – a guide to their biology and culture in Africa. – University Stirling, Scotland.

BARRET, L.A. & DAWSON, R.B. (1974): Avian erythrocyte development: microtubules and the formation of the disk shape. – Devl. Biol. 36: 72-81.

BARTELT, D.C., CARLIN, R. K., SCHEELE, G.A. & COHEN, W.D. (1982): The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes. II. Presence of a high molecular weight calmodulin-binding protein. – J. Cell Biol. 95: 278-284.

BARTELT, D.C., CARLIN, R. K., SCHEELE, G.A. & COHEN, W.D. (1984): Similarities between the M_r 245,000 calmodulin-binding protein of the dogfish erythrocyte cytoskeleton and α -fodrin. – Arch. Biochem. Biophys. 230: 13-20.

BEAM, K.G., ALPER, S.L., PALADE, G.E. & GREENGARD, P. (1979): Hormonally regulated phosphoprotein of turkey erythrocytes. – J. Cell Biol. 83: 1-15.

BEHNKE, O. (1970): A comparative study of microtubules of disc-shaped blood cells. – J. Ultrastructure Research 31: 61-75.

BENNETT, V. (1985): The membrane skeleton of human erythrocytes and its implication for more complex cells.. Ann. Rev. Biochem. 54: 273-304.

BENNETT, V. (1990): Spectrin: a structural mediator between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. – Curr. Opin. Cell Biol. 2: 51-56.

BENNETT, V. & GILLIGAN, D.M. (1993): The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. Annu. Rev. Cell Biol. 9: 27-66.

BENNETT, V. & STENBUCK, P.J. (1980): Human erythrocyte ankyrin. Purification and properties – J. Biol. Chem. 255: 2540-2548.

BEPPU, M., INOUE, M., ISHIKAWA, T. & KIKUGAWA, K. (1994): Presence of membrane-bound proteinases that preferentially degrade oxidatively damaged erythrocyte membrane proteins as secondary antioxidant defense. – Biochim. Biophys. Acta 1196: 81-87.

BLANCHET, J.P. (1974): Chicken erythrocyte membranes: comparison of nuclear and plasma membranes from adults and embryos. – Exptl. Cell Res. 85: 159-166.

BOS, E.S., VAN DER DOELEN, A.A., VAN ROOY, N. & SCHUURS, A.H.W.M. (1981): 3,3',5,5'-Tetramethylbezidine as an Ames test negative chromogen for horse-radish peroxidase in enzyme-immunoassay. – J. Immunoassay 2: 187-204.

BRANTON, D., COHEN, C.M. & TYLER, J. (1981): Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. – Cell 24: 24-32.

B-RAO, C. & MAJUMDAR, K.C. (1998): Multivariate map representation of phylogenetic relationships: application to tilapiine fish. – J. Fish Biol. 52: 1199-1217.

BRATOSIN, D., MAZURIER, J., TISSER, J.P. & SLOMIANNY, C. (1997): Molecular mechanism of erythrophagocytosis. Characterization of the senescent erythrocytes that are phagocytized by macrophages. – C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences. BROEKAERT, W.F., NSIMBA-LUBAKI, M. PETERS, B. & PEUMANS, J. (1984): A lectin from elder (*Sambucus nigra* L.) bark. – Biochem. J. 221: 163-169.

BURTON, K. (1968): Determination of DNA concentration with diphenylamine. – Methods in Enzymology XII (Part B) 163-166.

CALDWELL, A.B. (1976): Proteins of the turkey erythrocyte membrane. – Biochemistry 15: 2711-2718.

CARAFOLI, E. & ZURINI, M. (1982): The Ca²⁺-pumping ATPase of plasma membranes. Purification, reconstitution and properties. – Biochim. Biophys. Acta 683: 279-301.

CASSOLY, R., STETZKOWSKI-MARDEN, F. & SCHEURING, U. (1989): A mixing chamber to enucleate avian and fish erythrocytes: preparation of their plasma membrane. – Anal. Biochem. 182: 71-76.

CENTONZE, V.E., RUBEN, G.C. & SLOBODA, R.D. (1986): Structure and composition of the cytoskeleton of nucleated erythrocytes: III. Organization of the cytoskeleton of *Bufo marinus* erythrocytes as revealed by freeze-dried platinum-carbon replicas and immunofluorescence microscopy. – Cell Motil. Cytoskeleton 6: 376-388.

CHAIET, L. & WOLF, F.J. (1964): The properties of strepavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces.* – Arch. Biochem. Biophys. 106: 1-5.

CHAN, L.N.L. (1977): Changes in the composition of plasma membrane proteins during differentiation of embryonic chick erythroid cell. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 1062-1066.

CHASIS, J.A. & MOHANDAS, N. (1992): Red blood cell glycophorins. – Blood 80: 18698-1879.

CHASIS, J.A. & SHOHET, S.B. (1987): Red cell biochemical anatomy and membrane properties. – Ann. Rev. Physiol. 49: 237-248.

COHEN, W.D. (1978): Observations on the marginal band system of nucleated erythrocytes. – J. Cell Biol. 78:260-73

COHEN, W.D. (1991): The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes. – Int. Rev. Cytol. 130: 37-83.

COHEN, W.D., BARTELT, D., JAEGER, R., LANGFORD, G. & NEMHAUSER, I. (1982): The cytoskeleton system of nucleated erythrocytes. I. Composition and function of major elements. – J. Cell. Biol. 93: 828-838.

COHEN, W.D., COHEN, M.F., TYNDALE-BISCOE, C.H., VANDEBERG, J.L. & RALSTON, G.B. (1990): The cytoskeletal system of mammalian primitve erythrocytes: studies in developing marsupials. – Cell Motil. Cytoskeleton 16: 133-145.

CUSHING, J.E. (1964): The blood groups of marine animals. – Adv. mar. Biol. 2: 85-131.

CUSHING, J.E. & DURALL, G.L. (1957): Isoagglutination in fish. – The American Naturalist 91: 121-126.

DAHR, W., UHLENBRUCK, G., JANBEN, E. & SCHMALISCH, R. (1976): Heterogeneity of human red cell membrane sialoglycoproteins. – Blut 32: 171-184.

DE LIGNY, W. (1969): Serological and biochemical studies on fish populations. – Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev 7: 411-513.

DESSER, S.S. & WELLER, I. (1979): Ultrastructural observations on the erythrocytes and thrombocytes of the tuatara, *Sphenodon punctatus* (GRAY). – Tissue & Cell 11: 717-726.

DOCKHAM, P.A. & VIDAVER, G.A. (1987): Comparison of human and pigeon erythrocyte membrane proteins by one- and two-dimensional gel electrophoresis. – Comp. Biochem. Physiol 87B: 171-177.

DODGE, J.T., MITCHELL, C. & HANAHAN (1963): The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. – Arch. Biochem. Biophys. 100: 119-130.

DUFOUR, C., WEINBERGER, R.P. & GUNNING, P. (1998): Tropomyosin isoform diversity and neuronal morphogenesis. – Immunol. Cell Biol.: 76: 424-429.

DUK, M., KROTKIEWSKI, H., STASYK, T.V., LUTSIK-KORDOVXKY, M. SYPER, D. & LISOWSKA, E. (2000): Isolation and characterization of glycophorin from nucleated (chicken) erythrocytes. – Arch. Biochem. Biophys. 375: 111-118.

EDWARDS, P., LIN, C.K. & YAKUPITIYAGE, A. (2000): Semi-intensive pond aquaculture. – In: BEVERIDGE, M.C.M. & McANDREW, B.J. (eds.): Tilapias: Biology and exploitation. – Dordrecht (Kluwer Academic Publishers), 377-403.

ENGLE, C.R. (1997): Economics of tilapia aquaculture. In: COSTA-PIERCE, B.A. & RAKOCY, J.E. (eds.): Tilapia aquaculture in the americas. Vol. 1 World Aquaculture Society, Baton Rouge (Louisiana), 229-243.

ESPANOL, M.J. & SAIER, M. H. (1995): Topological and segmental phylogenetic analyses of the anion exchanger (band 3) family of transporters. – Molecular Membrane Biology 12: 193-200.

FAIRBANKS, G., DINO, J.E. & CARTER, D.P. (1988): Electrophoretic analysis of red cell membrane proteins. In SHOHET, S.B. & MOHANDAS, N. (eds.): Red cell membranes. – New York (Churchill Livingstone), 17-93.

FAIRBANKS, G., STECK, T.L. & WALLACH, D.F.H. (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. – Biochemistry 10: 2606-2617.

FALCIONI, G., GRELLONI, F., BONFIGLI, A.R. & BERTOLI, E. (1992): Biochemical characterization of density-separated trout erythrocytes. – Biochemistry International 28: 379-384.

FALK, T.M. (1994): Biochemische und immunbiologische Untersuchungen an Tilapien-Haemoglobinen (Teleostei, Cichlidae). Ein Versuch der Artendifferenzierung. – Universität Hamburg, Dissertation, 171 S.

FALK, T.M., ABBAN, E.K., OBERST, S., VILLWOCK, W., PULLIN, R.S.V. & RENWRANTZ, L. (1996): A biochemical laboratory manual for species characterization of some tilapine fishes. – ICLARM Educ. Ser. 17, 93pp.

FALK, T.M., ABBAN, E.K. & VILLWOCK, W. (1999): Population genetic analysis of the hemoglobins of the black-chinned tilapia. – J. Fish Biol. 55: 233-242.

FALK, T.M., ABBAN, E.K., VILLWOCK, W. & RENWRANTZ, L. (1998): Species-characteristic and subspecies-characteristic haemoglobins in some tilapiine fishes and a comparative study on their globin chain. – Aquaculture International 6: 133-145.

FALK, T.M., VILLWOCK, W. & RENWRANTZ, L. (1998): Heterogeneity and subunit composition of the haemoglobins of five tilapiine species (Teleostei, Cichlidae) of the genera *Oreochromis* and *Sarotherodon*. – J. Comp. Physiol. B 168: 9-16.

FAO (1997): Aquaculture production statistics 1986-1995. – FAO Fisheries Circular No. 815, Revision 9. FAO, Rome.

FAQUIN, W.C., HUSAIN, A.H. & BRANTON, J. (1990): Expression of demantin (protein 4.9) during avian erythropoiesis. – Eur. J. Cell Biol 53: 48-58.

FAWCETT, D.W. (1959): Electron microscopic observations on the marginal band of nucleated erythrocytes. – Anat. Rec. 133: 379.

FAWCETT, D.W. & WITEBSKY, F. (1964): Observations on the ultrastructure of nucleated erythrocytes and thrombocytes, with particular reference to the structural basis of their discoidal shape. – Z. Zellforsch. 62: 785-806.

FOWLER, V.M. & BENNETT, V. (1984): Erythrocyte membrane tropomyosin. Purification and properties. – J. Biol. Chem. 259: 5978-5989.

FUJINO, T., ISHIKAWA, I., INOUE, M., BEPPU, M. & KIKUGAWA, K. (1998): Characterization of membrane-bound serine protease related to degradation of oxidatively damaged erythrocyte membrane proteins. – Biochim. Biophys. Acta 1374: 47-55.

FUJINU, K. & KAZAMA, T.E. (1968): The Y-system of skipjack tuna blood groups. – Vox Sang. 14: 383-395.

GALLAGHER, P.G. & FORGET, B.G. (1995): Structure, organization, and expression of the human band 7.2b gene, a candidate gene for hereditary hydrocytosis. – J. Biol. Chem. 270: 26358-26363.

GALLAGHER, P.G., ROMANA, M., LIEMAN. J.H. & WARD, D.C. (1995): cDNA structure, tissue-specific expression, and chromosomal localization of the murine band 7.2b gene. – Blood 86: 359-365.

GLENNEY, J.R. & GLENNEY, P. (1983): Fodrin is the general spectrin-like protein found in most cells whereas spectrin and the TW protein have restricted distribution. – Cell 34: 503-512.

GLENNEY, J.R., GLENNEY, P. & WEBER, K. (1982): Erythroid spectrin, brain fodrin, and intestinal brush border proteins (TW 260/240) are related molecules containing a common calmodulin-binding subunit bound to a variant cell type specific subunit. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4002-4005.

GLOMSKI, C.A., TAMBURLIN, J. & CHAINANI, M. (1992): The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. III. Fish, the lower vertebrate experience. – Histol. Histopath. 7: 501-528.

GODING, J.W. (1996): Monoclonal antibodies: principles and practice. – London (Academic Press), 492 S.

GOLDSTEIN, I.J., HUGHES, R.C., MONSIGNY, M., OSAWA, T. & SHARON, N. (1980): What should be called a lectin? – Nature 285: 66.

GOURÈNE, G. & TEUGELS, G.G. (1998): An overview of the biological diversity and culture of tilapias (Teleostei, Cichlidae).In: AGNÈSE, J.F. (ed.): Genetics and aquaculture in africa. – Orstom (Paris), 137-145.

GRAHAM, J.M. (1992): Subcellular fractionation. In: DEALTRY, G.B. & RICKWOOD, D. (eds.): Cell biology labfax. – Oxford (BIOS Scientific Publishers), 7-23.

GRANGER, B.L. & LAZARIDES, E. (1984): Membrane skeletal protein 4.1 of avian erythrocytes is composed of multiple variants that exhibit tissue-specific expression. – Cell 37: 595-607.

GRANGER, B.L. & LAZARIDES, E. (1985): Appearance of new variants of membrane skeletal protein 4.1 during terminal differentiation of avian erythroid and lenticular cells. – Nature 313: 238-241.

GRANGER, B.L., REPASKY, E.A. & LAZARIDES, E. (1982): Synemin and vimentin are components of intermediate filaments in avian erythocytes. – Nature 313: 238-241.

GROTH, V., RENWRANTZ, L. & VILLWOCK, W. (1984): Determination of different lectin-receptors on the surface of carp erythrocytes. – Europ. Maricult. Soc. Spec. Publ. 8: 169-175.

GUERRA-SHINOHARA, E.M. & DE O. BARETTO, O.C. (1999): The erythrocyte cytoskeleton protein 4.2 is not demonstrable in several mammalian species. – Braz. J. Med. Biol. Res. 32: 683-687.

GÜNTHER, A. (1889): On some fishes from the Kilima-njaro district. – Proc. zool. Soc. Lond. 1889: 70-72.

HÄGERSTRAND, H., DANIELUK, M., BOBROWSKA-HÄGERSTRAND, M., HOLM-STRÖM, T., KRALJ-IGLIC, V. LINDQUIST, C. & NIKINMAA, M. (1999): The lamprey (*Lampetra fluviatilis*) erythrocyte; morphology, ultrastructure, major plasma membrane proteins and phospholipids, and cytoskeletal organization. – Mol. Membr. Biol. 16: 195-204.

HAMMARSTRÖM, S.L. & KABAT, E.A. (1969): Purification and characterization of a blood group A reactive hemagglutinin from the snail *Helix pomatia* and a study of its combining sites. – Biochemistry 8: 2696-2679.

HAMMARSTRÖM, S.L., MURPHY, L.A., GOLDSTEIN, I.J. & ETZLER, M.E. (1977): Carbohydrate binding specificity of four N-actyl-D-galactosamine-"specific" lectins: *Helix pomatia* A hemagglutinin, soybean agglutinin, lima bean lectin and *Dolichos biflorus* lectin. – Biochemistry 16: 2750-2755.

HEAST, C.W.M. (1982): Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrocyte membrane. – Biochim. Biophys. Acta 694: 331-352.

HENNESSEY, J.P. & SCARBOROUGH, G.A. (1989): An optimal procedure for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of hydrophobic peptides from an integral membrane protein. – Anal. Biochem. 176: 284-289.

HESS, H.H., LEES, M.B. & DERR, J.E. (1978): A linear Lowry-Folin assay for both watersoluble an sodium dodecyl sulfate-solubilized protein. – Anal. Biochem 85: 295-300.

HIEBL-DIRSCHMIED, C.M., ADOLF, G.R. & PROHASKA, R. (1991): Isolation and partial characterization of the human erythrocyte band 7 integral membrane protein. – Biochim. Biophys. Acta 1065: 195-202.

HILDEMANN, W.H. (1956): Goldfish erythrocyte antigens and serology. – Science 124: 315-316.

HOLTZHAUER, M. (1996): Methoden der Proteinanalytik. – Berlin (Springer), 467 S.

HORTIN, G.L. & TRIMPE, B.L. (1990): Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: application of jackalin-agarose. – Anal. Biochem. 188: 271-277.

HÜBNER, S., MICHEL, F., RUDLOFF, V. & APPELHANS, H. (1992): Amino acid sequence of band-3 protein from rainbow trout erythrocytes derived cDNA. – Biochem. J. 285: 17-23.

HUET, M. (1972): Textbook of fish culture. Breeding and cultivation of fish. – Fishing News Books Ltd.

HURIAUX. F. & FOCANT, B. (1978): Effect on some factors on the molecular weight determination of a light chain (LC₃) of carp (*Cyprinus carpio* L.) skeletal muscle by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. – Comp. Biochem. Physiol. 61B: 195-198.

HURIAUX. F. & FOCANT, B. (1990): Light chains of eel myosin isolation an characterization. – Comp. Biochem. Physiol. 95B: 269-274. HUSAIN-CHISHTI, A., FAQUIN, W., WU, C.C. & BRANTON, D. (1989): Purification of erythrocyte demantin (protein 4.9) reveals an endogenous protein kinase that modulates actinbundling activity. – J. Biol. Chem. 264: 8985-8991.

JACKSON, R. C. (1975): The exterior surface of the chicken erythrocyte. – J. Biol. Chem. 250: 617-622.

JAY, D. & CANTLEY, L. (1986): Structural aspects of the red cell anion exchange protein. – Ann. Rev. Biochem. 55: 511-38.

JOSEPH-SILVERSTEIN, J. & COHEN, W.D. (1984): The cytoskeletal system of nucleated erythrocytes. Marginal band function in mature cells. – J. Cell Biol. 98: 2118-2125.

KAKU, H., VAN DAMME, E.J.M., PEUSMANS, W.J. & GOLDSTEIN, I.J. (1990): Carbohydrate-binding specificity of the daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) and amaryllis (*Hippeastrum hybr.*) bulb lectins. – Arch. Biochem. Biophys. 279: 298-304.

KAWAGUCHI, T., MATSUMOTO, I. & OSAWA, T. (1974) Studies on hemagglutinins from *Maackia amurensis* seed. – J. Biol. Chem. 249: 2786-2792.

KELLY, G.M. & REVERSADE, B. (1997): Characterization of a cDNA encoding a novel band 4.1-like protein in zebrafish. – Biochem. Cell Biol. 75: 623-632.

KELLY, G.M., ZELUS, B.D. & MOON, R.T. (1991): Identification of a calcium-dependent calmodulin-binding domain in *Xenopus* membrane skeleton protein 4.1. – J. Biol. Chem. 12469-12473.

KHAN, M.T., WANG, K.K.W., AULAND, M.E., KABLE, E.P.W. & ROUFOGALIS, B.D. (1994a): Membrane-bound high molecular mass proteinases from human erythrocytes. – Biochim. Biophys. Acta 1209: 215-221.

KHAN, M.T., WANG, K.K.W., VILLALOBO, A. & ROUFOGALIS, B.D. (1994b): Characterization of a novel high molecular mass protein with peptidase activity purified from human erythrocyte membrane by calmodulin affinity chromatography. – J. Biol. Chem. 269: 10016-10021.

KILPATRICK, D. C. (1980): Purification and some properties of lectin from the fruit juice of the tomato (*Lycopersicon esculentum*). – Biochem. J. 185:269-272.

KLEIN, J., O'HUIGIN, C. & BLANCHER, A. (1997): Evolution of blood group antigen polymorphism. In: BLANCHER, A., KLEIN, J., & SOCHA, W.W. (eds.): Molecular biology and evolution of blood group and MHC antigen in primates. – Berlin (Springer Verlag), 305-321.

KONAMI, Y., YAMAMOTO, K., OSAWA, T. & IRIMURA, T. (1994): Strong affinity of *Maackia amurensis* hemagglutinin (MAH) for sialic acid-containing Ser/Thr-linked carbohydrate chains of N-terminals octapeptides from human glycophorin A. – FEBS Letters 342: 334-338.

KOOLMAN, J. & RÖHM, K.-H. (1998): Taschenatlas Biochemie. – Stuttgart (Thieme Verlag), 459 S.

KOURY, S.T., REPASKY, E.A. & ECKERT, B.S. (1987): The cytoskeleton of isolated murine primitive erythrocytes. – Cell Tissue Res. 249: 69-77.

KREUTZMANN, H.-L. & JONAS, L. (1978): Elektronenmikroskopische und ultrahistochemische Untersuchungen der Erythrozyten vom Aal (*Anguilla anguilla*) und der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) unter besonderer Berücksichtigung des Segregationsapparates und des Marginalbandes. – Acta histochem. 62: 282-292.

LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. – Nature 227: 680-685.

LANE, H.C., WEAVER, J.W., BENSON, J.A. & NICHOLS, H.A. (1982): Some age related changes of adult rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich., peripheral erythrocytes separated by velocity sedimentation at unit gravity. – J. Fish Biol. 21: 1-13.

LAZARIDES, E. (1987): From genes to structural morphogenesis: the genesis and epigenesis of a red blood cell. – Cell 51: 345-356.

LEVINE, J. & WILLARD, M. (1981): Fodrin: axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells. – J. Cell Biol. 90: 631-643.

LIEM , H.H., CARDENAS, F., TAVASSOLI, M., POH-FITZPATRICK, M.B. & MÜLLER-EBERHARD, U (1979): Quantitative determination of hemoglobin and cytochemical staining for peroxidase using 3,3['],5,5[']-tetramethlybenzidine dihydrochloride, a safe substitute for ben-zidine. – Anal. Biochem. 98: 388-393.

LIU, S.C. & DERICK, L.H. (1992): Molecular anatomy of the red cell membrane skeleton: structure-function relationships. – Sem. Hematol. 29: 231-243.

LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P. & DARNELL, J. (1996): Molekulare Zellbiologie. – Berlin (Walter de Gruyter), 1448 S.

LOWE-McCONNELL, R.H. (1991): Ecology of cichlid fishes in South America and Africa waters, excluding the great African Lakes. In: KEENLEYSIDE, M.H.A. (ed.): Cichlid fishes. Behavior, ecology and evolution. – London (Chapman and Hall), 60-85.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. – J. Biol. Chem. 193: 265-275.

LUX, S.E. & PALEK, J. (1995): Disorders of the Red Cell membrane. In HANDIN, R.I., LUX, S.E. & STOSSEL, T.P. (eds.): Blood: Principles and Practice of Hematology. – Philadelphia (J.B. Lippincott Company), 1701-1818.

MACLEAN, J.L. (1994): Tilapia – the aquatic chicken. – ICLARM Newsletter 7 (1): 17.

MALAPERT, M., PELLISSIER, B. & BORGESE, F. (1998): Asn49 is the unique glycosylation site of the trout red blood cell Na^+/H^+ exchanger. – Eur. J. Biochem. 257: 228-235.

MARCHESI, V.T. (1979): Functional Proteins of the human red blood cell membrane. – Sem. Hematol. 16: 3-20.

MARCHESI, V.T. (1985): Stabilizing infrastructures of cell membranes. – Ann. Rev. Cell Biol. 1: 531-561.

MARKWELL, M.A.K., HAAS, S., BIEBER, L.L. & TOLBERT, N.E. (1978): A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. – Anal. Biochem. 87: 206-210.

MARTIN, S.J., O'BRIAN, G.A., NISHIOKA, W.K., McGAHON, A.J., MAHBOUBI, A., SAIDO, T. C. & GREEN, D. R. (1995): Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. – J. Biol. Chem. 270: 6425-6428.

MASER, M.D. & PHILPOTT, Ch.W. (1964): Marginal band in nucleated erythrocytes. – Anat. Rec. 150: 365-382.

MATSUMOTO, I., JIMBO, A., MIZUNO, Y.M., SENO, N. & JEANLOZ, R.W. (1982): Purification and characterization of potato lectin. – J. Biol. Chem. 252: 4739-4742.

MATTISON, A.G.M. & FÄNGE, R. (1977): Light- and electronmicroscopic observations on the blood cells of the atlantic hag fish, *Myxine glutinosa* (L.). – Acta Zoolgica 58: 205-221.

MAURER, H. R. (1968): Disk-Elektrophorese. – Berlin (W. de Gruyter)

McANDREW, B.J. (2000): Evolution, phylogenetic relationship and biography. In: BEVERIDGE, M.C.M. & McANDREW, B.J. (eds.): Tilapias: Biology and exploitation. – Dordrecht (Kluwer Academic Publishers), 1-32.

MICHEL, F. & RUDLOFF, V. (1989): Isolation and characterization of the rainbow trout erythrocyte band-3 protein. – Eur. J. Biochem. 181: 181-187.

MOHANDAS, N. & EVANS, E. (1994): Mechanical Properties of red cell membrane in relation to molecular structure and genetic defects. – Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 23: 787-818.

MOHANDAS, N. & GASCARD, P. (1999): What do mouse gene knockouts tell us about the structure and function of the red cell membrane. – Bailliere's Clinical Haematology 12: 605-620.

MÖLLER, D. (1967): Red blood cell antigens in cod. – Sarsia 29: 413-430.

MONACO, G., SALUSTRI, A. & BERTOLINI, B. (1982): Observations on the molecular components stabilizing the microtubular system of the marginal band in the newt erythrocyte. – J. Cell Sci. 58: 149-163.

MOON, R.T. & LAZARIDES, E. (1984): Biogenesis of the avian erythroid membrane skeleton: receptor-mediated assembly and stabilization of ankyrin (goblin) and spectrin. – J. Cell Biol. 98: 1899-1904. MOTAIS, R., FIEVET, B., BORGESE, F. & GARCIA-ROMEU, F. (1992): Some functional properties of band 3 protein in nucleated red cells. – Progress in Cell Research 2: 253-261.

MUELLER, T.J., DOW, A.W. & MORRISON, M. (1976): Heterogeneity of the sialoglycoproteins of the normal human erythrocyte membrane. – Biochem. Biophys. Res. Com. 72: 94-99

MUELLER, T.J. & MORRISON, M. (1974): The transmembrane proteins in the plasma membrane of normal human erythrocytes. – J. Biol. Chem. 249: 7568-7573.

MUIR, J., VAN RIJN, J. & HARGREAVES, J. (2000): Production in intensive and recycle systems. In: BEVERIDGE, M.C.M. & McANDREW, B.J. (eds.): Tilapias: Biology and exploitation. – Dordrecht (Kluwer Academic Publishers): 405-445.

MÜLLER, E., FRANCO, M.W. & SCHAUER, R. (1981): Involvement of membrane galactose in the in vivo and in vitro sequestration of desialylated erythrocytes. – Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362: 1615-1620.

MURPHY, D.B. & WALLIS, K.T. (1983): Brain and erythrocyte microtubles from chicken contain different β -tubulin polypeptides. – J. Biol. Chem. 258: 7870-7875.

NGAI, J., STACK, J.H., MOON, R.T. & LAZARIDES, E. (19887): Regulated expression of multiple chicken erythroid membrane skeletal protein 4.1 variants is governed by differential RNA processing and translational control. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4432-4436.

NIKINMAA, M. (1990): Vertebrate red blood cells. – Berlin (Springer), 262 S.

NIKINMAA, M. (1997): Oxygen and carbon dioxide transport in vertebrate erythrocytes: an evolutionary change in the role of membrane transport. – J. Exp. Biol. 200: 369-380.

OBERST, S.(1990): Differenzierung zwischen den *Tilapia*-Arten T. aurea (Steindacher 1864), *T. nilotica* (L. 1757) und *T. galilaea* (Artedi 1757) (Pisces, Perciformes) unter Anwendung immunbiologischer Methoden. – München (Kyrill & Method Verlag) 178 S. Zgl. Dissertation an der Universität Hamburg.

OBERST, S., ABBAN, E.K. & VILLWOCK, W. (1996): Biochemical and immunological markers for the discrimination of three *Tilapia* species: *T. zilli* Gervais *T. guineensis* Bleeker and *T. dageti* Thys v.d. Audenaerde (Pisces: Cichlidae) from West Africa. – Aquaculture Research 27: 235-244.

OBERST, S., ABBAN, E.K., VILLWOCK, W. & RENWRANTZ, L. (1992/1993): Tilapia plasmaproteins and muscle parvalbumins as markers for species identification. – Zeitschr. ang. Zool. 79: 487-501.

OBERST, S. & VILLWOCK, W. (1993): Intraspecific blood group properties in the tilapiine species *Oreochromis aureus* and *Oreochromis niloticus* and the occurrence of soluble blood-group substances. – J. Appl. Ichthyol. 9: 18-32.

OBERST, S., VILLWOCK, W. & RENWRANTZ, L. (1988): The use of lectins in erythrocyte agglutination testes to differentiate among *Tilapia* species. – J. Appl. Ichthyol. 4: 29-36.

OBERST, S., VILLWOCK, W. & RENWRANTZ, L. (1989): Antisera from *Tilapia* species to differentiate among erythrocytes from *T. aurea*, *T. galilaea* and *T. nilotica* by agglutination assays, and a comparative analysis of hemoglobins. – J. Appl. Ichthyol. 4: 29-36.

OBERST, S., VILLWOCK, W. & RENWRANTZ, L. (1992): WESTERN blot analysis of plasma components of the three tilapia species, *Oreochromis aureus*, *O. niloticus* and *Sarotherodon melanotheron*. – J. Appl. Ichthyol. 8: 278-292.

OKAZAKI, T., TAMAI, K. & SHUKUYA, R. (1984): Membrane proteins of the erythrocytes of bullfrog, *Rana catesbeiana*, and its tadpole. – Comp. Biochem. Physiol. 77B: 131-134.

OLSNES, S., SALTVEDT, E. & PIHL, A. (1974): Isolation and comparison of galactosebinding lectins from *Abrus precatorius* and *Ricinus communis*. – J. Biol. Chem. 249: 803-810.

PEREIRA, M.E.A. & KABAT, E.A. (1974): Specificity of purified hemagglutinin (lectin) from *Lotus tetragonolobus*. – Biochemistry 13: 3184-3192.

PERRY, S.F., WOOD, C.M., WALSH, P.J. & THOMAS, S. (1996): Fish red blood cell carbon dioxide transport *in vitro*: a comparative study. – Comp. Biochem. Physiol. 113A: 121-130.

PETERS, L.L. & LUX, S.E. (1993): Ankyrins: structure and function in normal cells and hereditary spherocytes. – Sem Hematol. 30: 85-118.

PITTENGER, M.F., KAZZAZ, J.A. & HELFMAN, D. (1994): Functional properties of nonmuscles tropomyosin isoforms. – Curr. Opin. Cell Biol. 6: 96-104.

PONTREMOLI, S., SALAMINO, F., SPARATORE, B., MELLONI. E., MORELLI, A. BENATTI, U. & DE FLORA, A. (1979): Isolation and partial characterization of three proteinases in erythrocyte membrane. – Biochem. J. 181: 559-568.

POUYAUD, L. & AGNÈSE, J.F. (1995): Phylogenetic relationship between 21 species of three tilapiine genera *Tilapia*, *Sarotherodon* and *Oreochromis* using allozyme data. – J. Fish. Biol. 47: 26-38.

PRELLE, S. (1999): Ein immunologischer Schnelltest zur Artdifferenzierung bei Tilapien (Teleostei, Cichlidae): Polyklonale Antiseren aus Tilapien und Charakterisierung ihrer Immunglobuline. – Dissertation an der Universität Hamburg.

PULLIN, R.S.V. (1991): Cichlids in aquaculture. In: KEENLEYSIDE, M.H.A. (ed.): Cichlid fishes. Behavior, ecology and evolution. – London (Chapman and Hall), 280-354.

PULLIN, R.S.V., BIMBAO, M.A.P. & BIMBAO, G.B. (1994): World outlook for tilapia farming. In BALAYUT, E.A. (ed.): Paper contributed to the workshop on tilapia in capture and culture-enhanced fisheries in the indo-pacific fishery commission countries. 27.-29. June 1991, Bongor Indonesia. – FAO Fisheries Report No. 458, Supplement: 139-142.

REGAN, C.T. (1920): The classification of the fishes of the family Cichlidae. I. The Tanganyika genera. – Ann. Mag. nat. Hist. (9): 33-53.

REHM, H. (1996): Der Experimentator: Proteinbiochemie. – Stuttgart (Gustav Fischer Verlag), 224 S.

REITHMEIER, R.A.F. (1993): The erythrocyte anion transporter (band 3). – Curr. Opin. Struct. Biol. 3: 515-523.

RENWRANTZ, L., FALK, T.M., HALLAS, O. & VILLWOCK, W. (1997): On speciesspecific composition of molecules from muscle and blood specimens of the tilapia group. – ICLARM Conf. Proc. 52: 58.

REPASKY, E.A., GRANGER, B.L. & LAZARIDES, E. (1982): Widespread occurrence of avian spectrin in nonerythroid cells. – Cell 29: 821-833.

REUSCH, R.N., HUANG, R. & KOSK-KOSICKA, D. (1997): Novel components and enzymatic activities of the human erythrocyte plasma membrane calcium pump. – FEBS Letters 412: 592-596.

ROMANO, L. & PASSOW, H. (1984): Characterization of anion transport system in trout red blood cell. – Am. J. Physiol. 246 (Cell Physiol. 15): C330-C338.

ROMEIS, B. (1968): Mikroskopische Technik. – München (R. Oldenburg Verlag), 757 S.

ROMERO, M.G., GUIZOURAN, H., PELLISSIER, B. GARCIA-ROMEU, F. & MOTAIS, R. (1996): The erythrocyte Na+/H+ exchangers of eel (*Anguilla anguilla*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): a comparative study. – J. Exp. Biol. 199: 415-426.

ROSENBERG, S.A. & GUIDOTTI, G. (1968): The protein of human erythrocyte membranes. – J. Biol. Chem. 243: 1985-1992.

ROWLEY, A.F., HUNT, T.C., PAGE, M. & MAINWARING, G. (1988): Fish. – In ROWLEY, A.F. & RATCLIFFE, N.A. (eds.): Vertebrate blood cells. – Cambridge (Cambridge University Press), 444 S.

RÜPPEL, E. (1852): Verz. Mus. Senkenberg. naturforsch. Ges. aufges. Sammlungen IV. Fische. 40 S.

SAKHAROV, R.S. & VIKHMAN, A.A. (1995): Erythrocyte isoantigens of the carp *Cyprinus carpio* L. – Russian Journal of Genetics 31: 734-735.

SAKHAROV, R.S. & VIKHMAN, A.A., GENERALOVA, L.P. & KISELEV, A. Y. (1995): Erythrocyte isoantigen Ab^a of the siberian sturgeon *Acipenser baeri* Brandt. – Russian Journal of Genetics 33: 410-412.

SALZER, U., AHORN, H. & PROHASKA, R. (1993): Identification of the phosphorylation site on human erythrocyte band 7 integral membrane protein: implications for a monotopic protein structure. – Biochim. Biophys. Acta 1151: 149-152

SANCHEZ, I., TWERSKY, L.H. & COHEN, W.D. (1990): Detergent-based isolation of marginal bands of microtubles from nucleated erythrocytes. – Eur. J. Cell Biol. 52: 349-358.

SANCHEZ, J.J, FOLCO, E.J., BUSCONI, L., MARTONE, C.B., STUDDERT, C. & CASALONGUE, C.A. (1995): Multicatalytic proteinase in fish muscle. – Molecular Biology Reports 21: 63-69.

SANDERS, B.G. & WRIGHT, J. E. (1962): Immunogenetic studies in two trout species of the genus *Salmo*. – Ann. N.Y. Acad. Sci. 97: 116-130.

SASTRY, M.V.K., BANARJEE, P., PATANJALI, S.R., SWAMY, M.J., SWARNALATHA, G.V. & SUROLIA, A. (1986): Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (β -D-Gal (1-3)D-GalNAc). – J. Biol. Chem. 261: 11726-11733.

SCHÄGGER, H. (1994): Denaturing electrophoretic techniques. In: VON JAGOW, G. & SCHÄGGER, H. (eds.): A practical guide to membrane protein purification. – London (Academic Press), 59-79.

SCHENKEL-BRUNNER, H. (1995): Human blood groups. – Wien (Springer Verlag).

SEKHON, S.S. & BEAMS, H.W. (1969): Fine structure of developing trout erythrocytes and thrombocytes with special reference to the marginal band and the cytoplasmic organelles. – Am. J. Anat. 125: 353-374.

SEKHON, S.S. & MAXWELL, D.S. (1970): Fine structure of developing hagfish erythrocytes with particular reference to the cytoplasmatic organells. – J. Morphol. 131: 211-236.

SEYOUM, S. (1989): Stock identification and the evolutionary relationships of tilapiine fishes of the genera *Oreochromis, Sarotherodon* and *Tilapia* (Pisces: Cichlidae) using allozyme analysis and restriction endonuclease analysis. – Ph. D. Thesis of the University of Waterloo, Ontario, Canada.

SHELTON, K. R. (1973): Plasma membrane and nuclear proteins of the goose erythrocyte. – Can. J. Biochem. 51: 1442-1447.

SHIBUYA, N., GOLDSTEIN, J., BROEKAERT, F., NSIMBA-LUBAKI, M., PEETERS, B. & PEUMANS, W.J. (1987): The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(α2-6)Gal/GalNAc sequence. – J. Biol. Chem. 262: 1596-1601.

SHIBUYA, N., GOLDSTEIN, J., VAN DAMME, E.J.M. & PEUMANS, W.J. (1988): Binding Properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. – J. Biol. Chem. 263: 728-734.

SILVERMAN, M. (1991): Structure and function of hexose transporters. – Annu. Rev. Biochem. 60: 757-794.

SLOBODA, R.D. & DICKERSIN, K. (1980): Structure and composition of the cytoskeleton of nucleated erythrocytes. I. The pressence of microtuble-associated protein 2 in the marginal band. – J. Cell Biol. 87: 170-179.

SMITH, A. (1840): Illustrations of the zoology of South Africa 4°. Volume 4, Pisces.

SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H., PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSEN, B.J. & KLENK, D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchonic acid. – Anal. Biochem. 150: 76-85.

STRYER, L. (1990): Biochemie. – Heidelberg (Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft) 1127 S.

SOULIÉ, S., MØLLER, J. V., FALSON, P. & LE MAIRE, M. (1996): Urea reduces the aggregation of membrane proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. – Anal. Biochem. 236: 363-364.

SPRAGUE, L.M. (1961): Erythrocyte antigens of the oceanic skipjack (*Katsuwonus pelamis*) recognized by phytoagglutinins. – Genetics 46: 901.

STECK, T.L. (1972): Cross-linking the major proteins of the isolated erythrocyte membrane. – J. Mol. Biol. 66: 295-305.

STECK, T.L. (1974): The organization of proteins in the human red blood cell membrane. – J. Cell Biol. 62: 1-19.

STECK, T.L. & YU, J. (1972): Selective solubilization of proteins from red blood cell membranes by protein perturbants. – J. Supramol. Struct. 1: 220-232.

STIASSNY, M.L.J. (1991): Phylogenetic intrarelationships of the family Cichlidae: an overview. In: KEENLEYSIDE, M.H.A. (ed.): Cichlid fishes. Behavior, ecology and evolution. – London (Chapman and Hall), 1-35.

STOSCHECK, C.M. (1990): Quantitation of protein. – Methods in Enzymology 182: 50-68.

TAMAI, K. (1982): Proteins of nucleated erythrocytes. – Nihon ika daigaku zasshi 49: 215-224.

TANNER, M.J.A. & BOXER, D.H. (1972): Separation and some properties of the major proteins of the human erythrocyte membrane. – Biochem. J. 129: 333-347.

THOMAS, S. & PERRY, S. (1992): Control and consequences of adrenergic activation of red blood cell Na+/H+ exchange on blood oxygen and carbon dioxide transport in fish. – J. Exp. Zool. 263: 160-175.

THOMPSON, S. & MADDY, A.H. (1982): Gel electrophoresis of erythrocyte membrane proteins. In: ELLROY, J.C. & YOUNG, J.D. (eds.): Red cell membranes – a methodological approach. – London (Academic Press), 67-93.

THYS VAN DEN AUDENAERDE, D.F.E. (1968): An annotated bibliography of Tilapia. – Musee Royal de l'Afrique Central docum. zool. 14.

THYS VAN DEN AUDENAERDE, D.F.E. (1971): Some new data concerning the *Tilapia* species of the subgenus *Sarotherodon* (Pisces: Cichlidae). – Revue Zool. Bot. afr. 84: 203-216.

TOLLEFSEN, S.E. & KORNFELD, R. (1983a): Isolation and characterization of lectins from *Vicia villosa*. Two distinct carbohydrate binding activities are present in seed extracts. – J. Biol. Chem. 258: 5166-5171.

TOLLEFSEN, S.E. & KORNFELD, R. (1983b): The B4 lectin from *Vicia villosa* seeds interacts with N-acetylgalactosamin residues α -linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins. – J. Biol. Chem. 258: 5172-5176.

TONG, J. & WU, C. (1993): Study on the blood type factors in red crucian carp (*Carassius auratus* var.). – Aquaculture 111: 129-138.

TREWAVAS, E. (1966): Fishes of the genus Tilapia with four spines in Malawi, Rhodesia, Mozambique and Southern Tansania. – Rev. Zool. Botan. Africaines 74: 50-62.

TREWAVAS, E. (1973a): On the cichlid fishes of the genus *Pelmatochromis* with proposals of a new genus for *P. congicus*: on the relationship between *Pelmatochromis* and *Tilapia* and the recognition of *Sarotherodon* as a distinct genus. – Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.) 25: 1-26.

TREWAVAS, E. (1973b): A new species of cichlid fishes of rivers Quanzana and Bengo, Angola with a list of the known cichlidae in these rivers and a note on *Pseudocrenilabrus natalensis* Fowler. – Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.) 25: 27-37.

TREWAVAS, E. (1983): Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. – British Museum (Natural History) Publication 878.

TREWAVAS, E., GREEN, J. & CORBET, S.A. (1972): Ecological studies on crater lakes in West Cameroon. Fishes of Barombi Mbo. – J. Zool. London 167: 41-95.

VAN NORREN, K., GORISSEN, R., BORGESE, F., BORGGREVEN, J.M.P.M. & DE PONT, J.J.H.H.M. (1997): The Na⁺/H⁺ exchanger present in trout erythrocyte membranes is not responsible for the amyloride-insensitive Na⁺/Li⁺ exchange activity. – J. Membrane Biol. 160: 193-199.

VON JAGOW, G., LINK, T.A. & SCHÄGGER, H. (1994): Purification strategies for membrane proteins. In: VON JAGOW, G. & SCHÄGGER, H. (eds.): A practical guide to membrane protein purification. – London (Academic Press), 3-21.

WAN, L. & VAN HUYSTEE, R.B. (1993): Rapid determination of glycoproteins and glycopeptides by periodic acid Schiff reagent dot-blotting assay on nitrocellulose membrane. – J. Agric. Food Chem. 41: 896-898.

WARREN, L., BUCK, C.A., RABINOWITZ, J.L. & SHERMAN, I.W. (1979): Isolation and characterization of the erythrocyte surface membrane of the smooth dogfish, *Mustelus canis.* – Comp. Biochem. Physiol. 62B: 471-479.

WATTS, C. & WHEELER, K.P. (1978): Protein and lipid components of the pigeon erythrocyte membrane. – Biochem. J. 173: 899-907.

WAXDAL, M.J. (1974): Isolation, characterization, and biological activities of five mitogens from pokeweed. – Biochemistry 13: 3671-3677.

WEINREB, E.L. & WEINREB, S. (1965): Studies on the fine structure of teleost blood cells. II. Microtubular elements of erythrocyte marginal bands. – Z. Zellforsch. 68: 830-836.

WEISE, M.J & INGRAM, V.M. (1976): Proteins and Glykoproteins of membranes from developing chick red cells. – J. Biol. Chem.251: 6667-6673.

WESTERMEIER, R. (1990): Elektrophorese-Praktikum. – Weinheim (VCH).

WHITFIELD, C.F., MYLIN, L.M. & GOODMAN, S.R. (1983): Species-dependent variations in erythrocyte membrane skeletal proteins. – Blood 61: 500-506.

WINARDI, R., DISCHER, D., KELLEY, C., ZON, L., MAYS, K. MOHANDAS. N. & CONBOY, J.G. (1995): Evolutionary conserved alternative pre-m-RNA splicing regulates structure and function of the spectrin-actin binding domain of erythroid protein 4.1. – Blood 86: 4315-4322.

WINCKLER, B. & SOLOMON, F. (1991): A role for microtubule bundles in the morphogenesis of chicken erythrocytes. – Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 6033-6037.

WINKELMANN, J.C. & FORGET, B.G. (1993): Erythroid and nonerythroid spectrins. – Blood 81: 3173-3185.

WITTMANN, J. & KALK, M. (1992): Über den Energiestoffwechsel der Karpfen-Erythrozyten (*Cyprinus carpio*). – J. Appl. Ichthyol. 8: 271-277.

WONG, A.J., KIEHART, D.P. & POLLARD, T.D. (1985): Myosin from human erythrocytes. – J. Biol. Chem. 260: 46-49.

WOODS, C.M., LAZARIDES, Ph.D. & LAZARIDES, E. (1988): The erythroid membrane skeleton: expression and assembly during erythropoiesis. – Annu. Rev. Med. 39: 107-122.

WORKMAN, R.F. & LOW, P.S. (1998): Biochemical analysis of potential sites for protein 4.1-mediated anchoring of the spectrin-actin skeleton to the erythrocyte membrane. – Protein Expression Purif. 12: 100-104.

WU, A.M., SONG, S.C., SUGII, S. & HERP, A. (1997): Differential binding properties of GAL/GalNAc specific lectins available for characterization of glycoreceptors. – Indian J. Biochem. Biophys. 34: 61-71.

WU, A.M., SUGII, S. & HERP, A. (1988): A guide for carbohydrate specificities of lectins. In: WU, A.M. (Ed.): The molecular immunology of complex carbohydrates. – Plenum Publishing Corporation, 819-847.

YAMAMOTO, M. & IUCHI, I. (1976): Elektromicroscopic study of erythrocytes in developing rainbow trout, *Salmo gairdnerii irideus*, with particular reference to changes in the cell line. – J. exp. Zool. 191: 407-426).

YOKOYAMA, K.T., TERAO, T., OSAWA, T. (1978): Carbohydrate-binding specificity of pokeweed mitogens. – Biochem. Biophys. Acta 538: 384-396.

YU, J., FISCHMAN, D.A. & STECK, T.L. (1972): Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. – J. Supramol. Struct. 1: 233-248.

ZENTGRAF, H., DEUMLING, B., JARASCH, E.-D. & FRANKE, W.W. (1971): Nuclear membranes and plasma membranes from hen erythrocytes. I. Isolation, characterization, and composition. – J. Biol. Chem. 246: 2986-2995.

Versicherung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus der Literatur zitierten Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, daß ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Pinneberg, den 22.05.2002

Oliver Hallas