

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

Unter der Bezeichnung "Tilapien" werden die ursprünglich aus Afrika sowie dem Nahen Osten stammenden Buntbarsche (Fam. Cichlidae) der Gattungen *Tilapia*, *Oreochromis* und *Sarotherodon* zusammengefaßt. Sie sind aufgrund ihrer Überlebensfähigkeit selbst bei hohen Temperaturen und geringsten Sauerstoffgehalten, der Fähigkeit, hohe und schwankende Salzgehalte zu tolerieren und ihres großen Adaptationsvermögens an unterschiedliche Nahrung ideale Aquakulturfischarten der Tropen und Subtropen. Die Zucht dieser Cichliden ermöglicht eine einfache und kostengünstige Produktion hochwertiger Eiweiße und kann somit helfen, die Proteinversorgung der rasch wachsenden Bevölkerung in Entwicklungsländern zu gewährleisten.

Aufgrund der teilweise hohen morphologischen Übereinstimmung zwischen einzelnen Spezies sowie der Introgression fremder Tilapienarten und den damit verbundenen Hybridisierungsphänomenen ist eine sichere Artbestimmung anhand meristischer und morphologischer Merkmale nicht immer möglich. Daher wird seit längerem untersucht, inwieweit u.a. Blutkomponenten zur Artdifferenzierung bei Tilapien herangezogen werden können. Im Rahmen dieser Analysen wurden auf den Erythrozyten verschiedener Tilapienspezies sowohl mit Lektinen, das sind zuckerbindende Proteine, als auch mit Antiseren im Agglutinationstest artspezifische Oberflächenmoleküle und Blutgruppenmerkmale festgestellt. Die molekulare Organisation der Membran der roten Blutkörperchen hingegen ist bisher völlig unbekannt. Literaturrecherchen in verschiedenen Datenbanken haben ergeben, daß im Gegensatz zu Vögeln und Säugern bei Knochenfischen keine weitergehenden Untersuchungen über den Aufbau der Erythrozytenmembran und ihrer Proteine vorliegen.

Ziel der Arbeit ist es daher, die Membranen der roten Blutkörperchen aus den fünf Tilapien *Oreochromis aureus*, *O. niloticus*, *O. mossambicus*, *Sarotherodon galilaeus* sowie *S. melanotheron* zu isolieren und soweit möglich, einzelne Membranproteine zu identifizieren bzw. näher zu charakterisieren. Darüber hinaus soll überprüft werden, ob die Erythrozytenmembran noch weitere artspezifische Merkmale enthält, die einen zusätzlichen intra- respektive intergenerischen Vergleich zwischen den untersuchten Tilapienarten ermöglichen.

Es wird eine Methode vorgestellt, die es ermöglicht, Tilapienerythrozytenmembranen in hoher Reinheit zu gewinnen. Der Gehalt an zytoplasmatischen Verunreinigungen in den isolierten Membranen beträgt  $0,9\% \pm 0,63$  (n=75), während der Anteil von DNA bezogen auf den Proteingehalt im Mittel bei  $1,7\% \pm 0,42\%$  (n=10) liegt.

Die Untersuchung der isolierten Zellmembranen erfolgt anhand elektrophoretischer Methoden. Durch die selektive Solubilisierung der Plasmamembran mit dem nichtionischen Detergenz Triton X-100 werden integrale und periphere Membranproteine analysiert, während der Nachweis von Glykoproteinen durch PAS-Färbung und Lektinblots erfolgt. Polypeptide der Erythrozytenoberfläche hingegen werden über die Kopplung eines Biotinesters detektiert. Der Nachweis spezifischer Membranproteine erfolgt durch den Einsatz verschiedener mono- und polyklonaler Antikörper im Immunoblotverfahren. In die Untersuchungen werden auch Humanerythrozyten zum Vergleich mit einbezogen, weil bei ihnen die molekulare Organisation und Polypeptidzusammensetzung der Zellmembran genau bekannt ist (s. Abb.). Durch den direkten Vergleich lassen sich die Erythrozytenmembranproteine der Tilapien besser analysieren und charakterisieren.

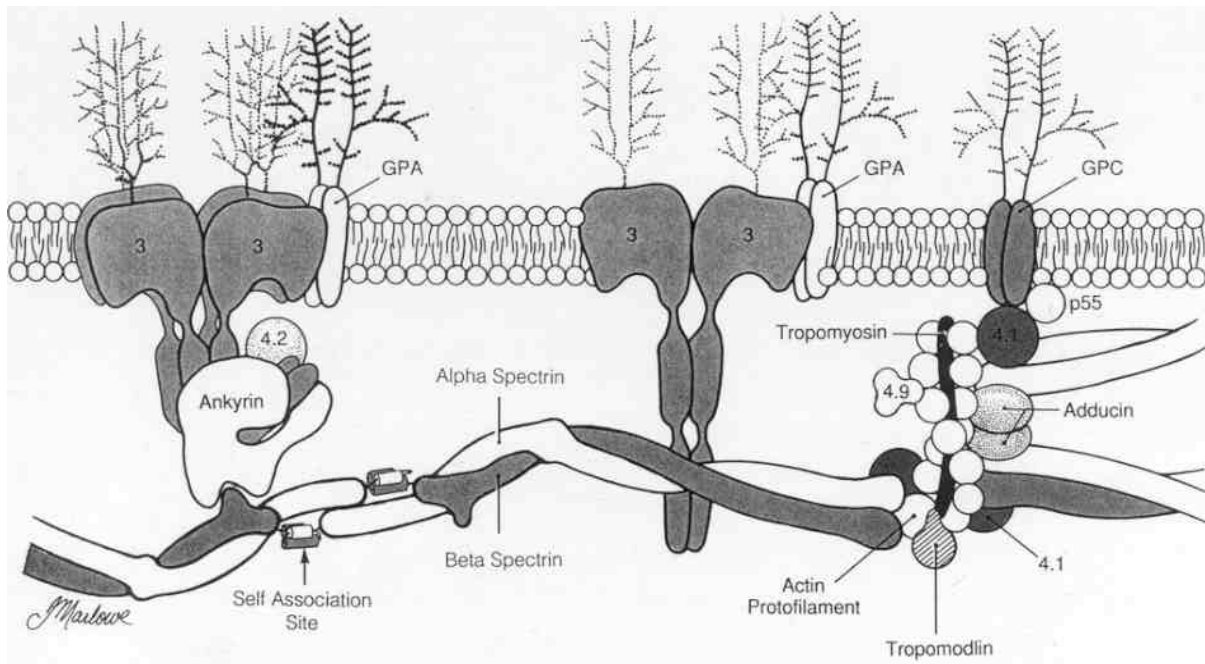


Abb. : Schematisches Modell der Humanerythrozytenplasmamembran nach LUX & PALEK (1995).

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 Spekttrin- 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.

Mit  $\beta$ -Spekttrin, Aktin, Tropomyosin und Myosin (leichte Kette) enthalten die roten Blutkörperchen der Tilapien periphere Membranproteine, die auch bei den Säugererythrozyten wesentliche Komponenten des Membranskelettes darstellen. Typische Membranbestandteile kernhaltiger Erythrozyten sind dagegen  $\alpha$ -Fodrin und  $\alpha$ -Tubulin, die in den roten Blutkörperchen der Mammalia fehlen. An membranintegralen Polypeptiden konnten der Anionenaustauscher (Bande 3), der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher und eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nachgewiesen werden.

Außer der Identifizierung bzw. Charakterisierung der Erythrozytenmembran aus Tilapien ist das Auffinden weiterer artdiagnostischer Merkmale ein Ziel dieser Arbeit. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen weisen einige der detektierten Membranproteine artspezifische Unterschiede auf. *Oreochromis mossambicus* kann im Immunoblot mittels eines monoklonalen Anti-Tropomyosin-Antikörpers eindeutig bestimmt werden, während *Sarotherodon melanotheron* sich im Anionenkanals und der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase von den anderen vier Tilapienarten unterscheidet.

Weitere Unterschiede in der Erythrozytenmembran der analysierten Tilapien werden in den Lektinblots sichtbar. Mit Hilfe von Lektinen lassen sich spezifische Kohlenhydratverbindungen von Glykokonjugaten nachweisen, die zur Artbestimmung herangezogen werden können. So reagiert das N-Acetylglukosamin-spezifische Lektin LEA selektiv mit Membrankomponenten *Oreochromis niloticus*. Von den acht positiv getesteten Lektinen grenzen fünf (SNA, HHA, GNA, APA und  $\text{RCA}_{60}$ ) anhand ihrer Reaktion mit 153, 144 und 26 kDa großen Membranproteinen *Sarotherodon melanotheron* von den anderen Tilapienarten ab. Außer diesen artspezifischen Merkmalen liefern die Lektine MAA II und TPA auch Hinweise auf mögliche intergenerische Unterschiede zwischen den Tilapienerythrozytenmembranen.