

MOLECULAIRE DYNAMIEK VAN DE OPNAME, ACCUMULATIE EN ELIMINATIE VAN
METALEN BIJ MARIENE ORGANISMEN UIT DE NOORDZEE

partim

DETECTIE EN IDENTIFICATIE VAN METAAL-BINDENDE EIWITTEN DOOR TWEE
DIMENSIONELE ELECTROFORESE EN MICROSEQUENTIE ANALYSE

Contract nr MS/06/012

Onderzoeksgroep Eiwitchemie, Departement Biochemie,
L. Moens

EINDVERSLAG

Juli 1997

1. INLEIDING

Een aantal van de transitie metalen zijn essentieel voor de functie van biologische systemen. De meeste van deze metalen zijn enkel noodzakelijk in nano- tot micromolaire hoeveelheden (o.a. Co, Cu, Zn).

Het concentratievenster waarin zij noodzakelijk zijn en waarin zij toxisch worden is voor de meeste van deze elementen smal. Biologische evolutie heeft voor de meeste andere elementen geen rol gegenereerd omdat elke fysiologische functie die ze zouden kunnen vervullen ook door een ander meer beschikbaar element kan vervuld worden. Cadmium, Pb en Hg behoren tot deze tweede groep van elementen waarvan geen biologische rol bekend is maar die zeer schadelijke effecten hebben op biologische systemen.

Ondanks de relatief lage concentratie van deze metalen in de omgeving, nemen mariene organismen hen op en accumuleren hen tot concentraties meerdere grote ordens boven die van de omgeving. In veel aquatische omgevingen verkeert leven op de rand van de schadelijke metaal concentraties (estuaria en kust areas).

Intracellulair kunnen metaalatomen door een diversiteit van eiwitten gebonden worden. De best gedocumenteerde hierin zijn zonder twijfel de metallothioneïns, laag molecuul gewicht, cysteine rijke eiwitten die quasi universeel voorkomen (Kay et al 1993). Naast de metallothioneïns komen in de cel nog tal van andere eiwitten voor die in staat zijn, op een min of meer specifieke wijze, metaalatomen te binden. Zo zijn in menselijk plasma o.a. transferrine en albumine aanwijsbaar als metaalbindende eiwitten.

Bij mariene invertebraten zoals gastropoden, crustaceën en anneliden is duidelijk aangetoond dat zij zware metaalatomen accumuleren. Buiten de metallothioneïns zijn er nog slechts weinig metaalbindende eiwitten geïdentificeerd ondanks het feit dat zij voorkomen in een varieteit van molecuul gewichten.

Extracellulaire hemoglobines van anneliden, zoals die van *Nereis diversicolor* en *Glycera dibranchiata*, zouden een rol kunnen spelen in de metaalbinding (Demuyne et al 1993, Standley et al 1988). Inderdaad in deze complexe moleculen komen, naast haem bevattende en dus zuurstof bindende globine ketens, ook linker ketens voor die niet meer in staat zijn tot haem binding maar hun vermogen tot metaalbinding via histidine residues behouden hebben (Vinogradov et al 1993).

In dit project hebben we getracht om de metaalbindende eiwitten van de mossel, *Mytilus edulis*, te identificeren bij middel van twee dimensionele electroforese gekoppeld aan microsequentie analyse en databank onderzoek. Voor deze benadering dienden alle technieken op punt gesteld, aangepast of verbeterd te worden niet in het minst voor weefsels van de mossel (mariene omgeving). Tevens hebben wij de primaire structuur bepaald van een globine keten van de annelid, *Aphrodite aculeata*.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1. Biologisch Materiaal

Als weefselbron werd hoofdzakelijk kieuw-, spier en hepatopancreas weefsel van de gewone mossel, *Mytilus edulis*, gebruikt. *Aphrodite aculeata* (zeemuis) werden verzameld gedurende meerdere campagnes van de Belgica en levend naar het laboratorium getransporteerd waar ze gebruikt werden voor de isolatie van het zenuwglobine.

2.2. Methoden

2.2.1. Weefselbehandeling

- Na dissectie werden de weefsels zorgvuldig gewassen in fysiologische oplossing (PBS) waarna gehomogeniseerd in een Potter homogenisator in 5 volumes 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2,6 mM PMSF; 1 mM EDTA; 2 mM 2-mercaptoethanol. Een S100 cytosol fractie werd bereid door centrifugatie respectievelijk bij 30.000 (10 min) en 100.000 g (45 min). Frakties werden ingevroren bij -80°C . Als alternatief werden weefsels geëxtraheerd met aceton (3X) en gedroogd waarna het bekomen droogpoeder verpulverd werd en verdeeld in aliquots voor electroforese.

- De zenuwstreng van *Aphrodite*, die het hemoglobine bevat werd, na dissectie, zacht gehomogeniseerd in een minimaal volume 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2,6 mM PMSF; 1 mM EDTA; en een hemoglobine bevattende fractie bereid (S100).

2.2.2. Twee dimensionele electroforese

2.2.2.1. Twee dimensionele electroforese onder niet-denaturerende voorwaarden

Voor de scheiding van eiwitten onder niet-denaturerende voorwaarden werd de techniek van Manabe et al 1979 uitgewerkt. Focusering in de eerste dimensie werd uitgevoerd in cilindrische gels (3 mm X 16 cm) in een pH gradient 3-10 bekomen bij middel van 2% carrier ampholines (Pharmacia). Scheiding in tweede dimensie gebeurde in een 4-21% polyacrylamide gel (2 mm X 16 cm X 20 cm; Hoeffer apparaat) in 75 mM Tris-Glycine pH 8,3. Als merker-eiwitten werd de laag Mr standaard van Pharmacia gebruikt. Kleuring gebeurde routinematig met Coomassie brilliant blue R250 (Manabe et al 1979).

2.2.2.2. Twee dimensionele electroforese onder denaturerende voorwaarden

2DE onder denaturerende voorwaarden werd hoofdzakelijk uitgevoerd naar Görg et al 1988, 1994; Righetti 1990 en werd aangeleerd tijdens een werkbezoek aan het Lab van Prof. A.Görg te Munchen en bij Prof. D. Hochstrasser te Genève.

* Staalvoorbereiding:

Eiwitstalen werden opgenomen in 6% SDS; 1,5% DTT en verwarmd bij 100°C gedurende 5 min. Na afkoelen worden de stalen onmiddellijk verdund (1/30) in 8M ureum; 2% CHAPS; 40 mM Tris; 65 mM DTT en 45 µg geladen voor eerste dimensie.

* Isoelectrofocusering (eerste dimensie):

IEF werd uitgevoerd in 3,5x180 mm IPG (immobilized pH gradient) strips met een pH gradient 4-9. IPG strips werden zelf vervaardigd naar Görg et al 1988, 1994 volgens het volgende schema:

Immobilines:	zuur	pK	basis
	637 µl	3,6	- µl
	-	4,6	63
	263	6,2	28
	51	7,0	269
	193	8,5	87
	-	9,3	197
Bidest:	4,382 ml		6,53 ml
Acrylamide	1,07		1,07
Glycerol	2,069		-
Temed	6 µl		6 µl
APS (40%)	10 ml		10 ml

Rehydratatie werd uitgevoerd in 8M ureum, 2% CHAPS, 1% DTT en 0,2% carrier ampholines pH 3-10. Focusering gebeurt in een Multiphor II apparaat (Pharmacia) bij een voltage van 2 uur 300V (sample entry) en 16 uur 5000 V bij 15°C.

* SDS-PAGE (tweede dimensie)

SDS-PAGE werd uitgevoerd in een Hoeffer apparaat (1,5 mm x 18 cm x 20 cm) naar Laemmli et al 1970 maar zonder SDS in de gelbuffer en zonder concentratiegel (Hochstrasser et al 1988). Alle aanbevelingen voor het vermijden van geblokkeerde aminotermini werden in acht genomen (Hunkapiller et al 1983). Zilverkleuring werd uitgevoerd naar Blum et al 1987.

2.2.2.3. Beeldverwerking

Na kleuring werden de eiwitpatronen gedigitaliseerd met een "Molecular Dynamics Personal Densitometer". De beelden werden opgeslagen in een Sun Sparc Werkstation (Unix) voorzien van de BioImage software.

Na automatische spotdetectie werden de gels manueel bijgewerkt (spot editing) voor spots die niet automatisch gedetecteerd werden. Gezien de spotdetectie methode van het BioImage software pakket niet optimaal functioneerde werd een eigen spotdetectie systeem ontwikkeld in samenwerking met Prof. D. Van Dyck (Visie-Lab UA).

Voor elk weefsel werden "Master Gels" geconstrueerd op basis van 24 onafhankelijke gels om alle individuele variaties uit te schakelen.

2.2.2.4. Beeldvergelijking

De eigen bekomen eiwitpatronen werden vergeleken met de eiwitpatronen beschikbaar in de Swiss 2D database via het internet gebruik makend van de moleculaire biologie server Expsy. Getracht werd spot identificatie uit te voeren op basis van de vergelijking van de parameters (pI en Mr).

2.2.3. Detectie van metaalbindende eiwitten

Na electroforese werden de gels gereduceerd gedurende 1 uur bij 37°C in 5% 2-mercaptoethanol, 25 mM Tris, 192 mM Glycine en 0,2% SDS waarna overgeblot op een nitrocellulose of PVDF membraan. Na blotten werden de membranen geëquilibreerd gedurende 1 uur in 10 mM Tris-HCl pH 7,4.

Radioactieve merking werd uitgevoerd in 10 mM Tris-HCl pH 7,4 1 mCi/ml $^{109}\text{CdCl}_2$, 0,1 mM ZnAc, 0,1 M.

Na wegwassen van de niet gebonden radioactiviteit werden de metaalbindende eiwitspots op het membraan gedetecteerd door autoradiografie KCl (Aoki & Suzuki 1991).

2.2.4. Microsequentie analyse en primaire structuur bepaling

Identificatie van eiwitspots werd uitgevoerd door microsequentie analyse.

Interne fragmenten werden gegenereerd door trypsine vertering of partiële zure hydrolyse in gel naar Rosenberg et al 1992 en Vanfleteren et al 1993.

Scheiding van de bekomen peptide mengsels gebeurde door "narrow bore" RP-HPLC op een Vydac C4 kolom in twee buffer systemen nml

onder zure (0,1% TFA/0,1% TFA in acetonitrile) en neutrale voorwaarden (100 mM ammoniumbicarbonaat pH 7,4).

Peptiden werden eerst gescheiden onder neutrale voorwaarden waarna de zuiverheid van elk peptide getest werd onder zure chromatografie voorwaarden.

Microsequentie analyse gebeurde met behulp van een ABI 471-B protein sequencer werkend onder de "pulsed liquid mode".

Per peptide werden maximaal 20 residues bepaald.

Databank onderzoek gebeurde via de faciliteiten van de Expsy Molecular Biology Server aangeboden via Netscape.

Voor primaire structuurbeplating werd het globine van *Aphrodite aculeata*, na zuivering en modificatie van de Lys residues met maleinezuur-anhydride, afgebroken met trypsine en protease Asp-N. De peptiden werden gescheiden en gesequeneerd zoals boven beschreven. De primaire structuur werd gereconstrueerd uit de bekomen overlappende fragmenten.

3. RESULTATEN

3.1. Twee dimensionele electroforese van kieuw en spierweefsel van de mossel, *Metylis edulis*.

3.1.1. Uitwerking van de 2DE technologie

De techniek van 2DE werd uitgewerkt voor de scheiding van de eiwitten van het proeforganisme *Metylis*. Twee benaderingen werden gevolgd:

1. Scheiding van de geëxtraheerde eiwitten onder niet-denaturerende voorwaarden naar Manabe et al 1979.

De bedoeling van deze benadering was om de eiwitten zoveel als mogelijk in hun natieve configuratie en dus met hun maximaal metaalbindend vermogen, te houden. Hiertoe werden zowel bij de extraxtie als bij de electroforese geen detergenten (Triton X100, CHAPS, Nonidet P40, octylglucoside, SDS etc) gebruikt. Focusering in de eerste dimensie werd uitgevoerd in IPG strips met een pH gradient 4-10. Scheiding kon gerealiseerd worden op basis van moleculaire grootte door pore limit electroforese in een acrylamide gradient (4-21%) voor standaard eiwitten en biologische vloeistoffen (o.a. serum). Weefselextracten (kieuw, spier, hepatopaneas) van de mossel konden onder deze voorwaarden niet gescheiden worden wegens: (i) het optreden van zeer zware "streaking", in beide dimensies, als gevolg van oplosbaarheidsproblemen en (ii) het optreden van proteolytische afbraak tijdens de run (hepatopaneas, kieuw). Deze problemen konden, ondanks het invoeren van allerlei wijzigingen aan de oorspronkelijke methode, niet verholpen worden en werd daarom verlaten.

2. Scheiding van de geëxtraheerde eiwitten onder denaturerende voorwaarden naar Görg et al 1988, 1994.

De overschakeling op denaturerende voorwaarden tijdens de scheiding had als voordeel dat deze technologie veel beter gedocumenteerd is (Görg et al 1988, 1994) en dient beschouwd te worden als de analytische techniek met het hoogste resolutie vermogen (Garrels & Franza 1989). Het heeft echter als nadeel dat door de denaturatie de eiwitten hun natieve configuratie en dus ook hun metaalbindend vermogen verliezen. Bij de overblotting naar een membraan hervouwen de meeste eiwitten zich maar een controle over het volledig hernemen van hun natieve kenmerken heeft men niet.

De volledige technologie van 2DE gebruik makend van eigen gemaakte IPG strips werd uitgewerkt hoofdzakelijk via een

studieverblijf in het laboratorium van Prof. A. Görg te München en Prof. D. Hochstrasser te Genève (Materiaal en Methoden). Op deze manier beschikken wij over een unieke methodologie die ons toelaat een zeer complex eiwitmengsel (totaal cellysaat) te scheiden in +/- 1500-2000 individuele spots.

Toepassing van de 2DE technologie op kieuw en spier extracten van de mossel leverde zeer goede en reproduceerbare scheidingen op. Van hepatopancreasweefsel daarentegen zijn we, ondanks alle voorzorgen tegen proteolyse, er niet in geslaagd om reproduceerbare patronen te bekomen. Daarom hebben we het analyseren van dit weefseltype dan ook verlaten.

3.1.2. Analyse van de 2DE eiwitpatronen door beeldverwerking

Om de honderden spots op de 2DE patronen te catalogeren en te analyseren is een beeldverwerkingssysteem noodzakelijk. Als infrastructuur voor de verwerking van 2DE beelden beschikken we over de BioImage software (BioImage Comp. NY). In dit verwerkingsprogramma is een spotanalyse functie voorzien. Deze analyse omvat:

1. De segmentatie van spots tegenover de achtergrond met als doel zoveel mogelijk relevante spots in het gel te identificeren.
2. De kwantificatie van de geëxtraheerde spots. Dit omvat het bepalen van het centrum, de intensiteit, de grootte en de vorm van elke spot.
3. Calibratie van elke spot naar (i) pI en Mr t.o.v. externe standaarden; (ii) eiwitconcentratie (afhankelijk van de lading en van de wijze van kleuring).
4. Patroon herkenning op basis van pI, Mr en I (integrated intensity).

Bij het gebruik van het BioImage software programma op onze 2DE beelden werd vastgesteld dat een groot aantal spots, vooral zwakkere spots, niet gedetecteerd werden en als zodanig voor verdere analyse verloren waren. Daarom hebben we, in samenwerking met het Visie-Lab UA, gezocht naar een betere spotdetectie methodologie (1 & 2).

De op punt gestelde techniek omvat een volledig automatische methode voor de segmentatie van beelden in verschillende spot regio's gebaseerd op het "watershed algorithm". Dit algoritme vindt de spot regio's op een zodanige manier dat voor elke regio de desbetreffende spot nauwkeuriger kan gemodelleerd worden.

De voordelen van dit algoritme zijn: (i) dat het robuust is in de zin dat het niet beïnvloed wordt door lokale achtergrondvariaties; (ii) dat het de volledige spot regio omschrijft inclusief elke lokale achtergrond variatie zonder supplementaire berekeningen; (iii) dat het een modelering geeft van gedeeltelijk gescheiden spots zodat de resolutie verhoogt.

Voor een meer uitgebreide beschrijving van dit algoritme en zijn voordelen verwijzen we naar Bettens et al 1997.

Dit nieuw algoritme werd geïmplementeerd in de BioImage software zodanig dat een veel efficiëntere spotdetectie mogelijk wordt en het zeer arbeidsintensieve "editing" werk voor niet gedetecteerde spots kon vermeden worden.

3.1.3. Identificatie van eiwitten door microsequentie analyse

Door 2DE kunnen de eiwitten van kieuw en spierweefsel van de mossel zeer goed gescheiden worden. Op basis van 24 individuele gels werd, gebruik makend van beeldverwerking, voor elk weefsel een "master gel" opgebouwd (Garrels & Franza 1989). In het kieuw en spierweefsel van de mossel werden respectievelijk 641 en 720 reproduceerbare spots teruggevonden

Een aantal eiwitten uit beide patronen werden geïdentificeerd op basis van partiële sequentieanalyse gekoppeld aan databank onderzoek (Materiaal & Methoden).

De resultaten hiervan worden weergegeven in Tabel 1 & 3 en Fig 1 & 2.

Het is duidelijk dat de geïdentificeerde eiwitten als niet onverwachts kunnen beschouwd worden gezien het vooral "house keeping proteins" en cytoskelet eiwitten zijn en dit in beide patronen.

Een belangrijke moeilijkheid hierbij was dat geen sequentie gegevens over eiwitten van de mossel bekend zijn en dat daardoor een aantal eiwitten slechts tot op de grote familie konden geïdentificeerd worden.

Deze geïdentificeerde eiwitten zijn van nut als ankerpunten in de voorliggende 2DE patronen evnals bij de vergelijking bij inductie experimenten. Hun aantal zal nog verder uitgebreid worden.

Getracht werd eiwitspots te identificeren door vergelijking van de eigen patronen (pI en Mr) met deze beschikbaar in de databanken. Vrij snel echter werd duidelijk dat onder geen beding deze benadering, hoe sterk ook verdedigd in de literatuur, bruikbaar is (te grote verschillen in methodologie voor het lopen van de electroforese zelf).

3.1.4. Identificatie van metaalbindende eiwitten

De op punt gestelde methode van Aoki & Suzuki 1991 (Materiaal en Methoden) voor het binden van radioactief gemerkte metaalatomen ($^{109}\text{CdCl}_2$) aan eiwitten, gebonden aan een membraan (PVDF of nitrocellulose), voldoet volledig aan de behoeften en stelde ons in staat in beide weefsels een aantal metaalbindende eiwitten te identificeren. Het enige nadeel is dat deze methode kwalitatief is en niet kwantitatief.

Inderdaad, de eiwitten worden gescheiden in een denaturerende omgeving en het is daarom onmogelijk hun graad van metaalbinding te vergelijken met die onder niet-denaturerende voorwaarden.

De geïdentificeerde metaalbindende eiwitten worden samengevat in Tabel 2 & 4.

Hieruit blijkt dat in beide weefsels een vijftal metaalbindende eiwitten ondubbelzinnig kunnen weergevonden worden.

Metallothionein, transferrine en albumine in kieuwweefsel zijn niet onverwacht. Transferrine kon niet teruggevonden worden in spierweefsel als metaalbindend eiwit. Mogelijk is zijn concentratie hier te laag. De aanduiding dat ApoJ metaalbindend zou zijn dient nader onderzocht te worden.

De aandacht wordt vooral getrokken door een tweetal duidelijk metaalbindende eiwitten die op basis van partiële sequentie analyse niet konden geïdentificeerd worden.

Het lijkt ons daarom aangewezen in de toekomst te trachten deze eiwitten te identificeren door het bepalen van hun totale aminozuur sequentie door een gekombineerde benadering van eiwit- en DNA sequentie bepaling.

Experimenten werden uitgevoerd voor het aanrijken van de metaalbindende eiwitten van de mossel door IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) naar Jungblut et al 1993.

Deze pogingen zijn zonder resultaten gebleven wegens de slechte oplosbaarheid van de eiwitten van de mossel onder de ionaire voorwaarden nodig voor IMAC. Meer dan 60% van het eiwitmateriaal bleef onoplosbaar zodat de overblijvende fraktie niet meer representatief was.

3.2. Primaire structuurbeplating van het globine van *Aphrodite aculeata*.

Het globine van *Aphrodite* werd na extractie uit de zenuwstreng (Materiaal & Methoden) gezuiverd door ammoniumsulfaat praecipitatie (40% en 90%) en chromatografie over Sephadex G75 (1 x 125 cm) in 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl. De zuiverheid van het bekomen praeparaat werd getest door 2DE onder denaturerende voorwaarden.

Op basis van gelfiltratie kon een Mr van 31.600 +/- 2.000 bepaald worden. Gezien het Mr in SDS-PAGE 15.500 +/- 400 bedraagt kunnen we hieruit besluiten dat de natieve molecule voorkomt als een homodimeer.

Het gezuiverde globine werd gefragmenteerd met trypsine na modificatie van de lysine zijketens met maleinezuur-anhydride en met protease Asp-N.

De bekomen peptiden werden gescheiden door "narrow bore" RP-HPLC en de resulterende peptiden gesequeneerd (Materiaal & Methoden).

De volledige primaire structuur kon op deze wijze gerekonstrueerd worden.

De exactheid van deze primaire structuur werd, in samenwerking met enkele collega's, geverifieerd door de analyse van het globine cDNA enerzijds en de vergelijking van de totale massa van het globine experimenteel bepaald en berekend uit de aminozuur sequentie anderzijds (Dewilde et al 1996).

De globine keten bestaat uit 150 residues en heeft een Mr 15.644,5. Het verschil in experimenteel bepaald en berekend Mr (15.602,69) suggereerd dat de aminotermus geacetylerd is. Dit is in overeenstemming met het feit dat de intacte molecule niet toegankelijk is voor Edman degradatie. De molecule bevat geen cysteine en is bijgevolg niet in staat tot aggregatie zoals vele andere anneliden globines (Vinogradov et al 1993). Vergelijking van de primaire structuur van het zenuwglobine van *Aphrodite* met die van andere globine ketens toont aan het dient beschouwd te worden als een "normaal" globine en niet als een aparte klasse.

Gezien deze molecule het eerste zenuwglobine is dat ooit gekarakteriseerd werd hebben we ook de genstructuur bepaald in samenwerking met Prof. M. Blaxter (UK). Hieruit blijkt dat het globine gen een unieke intron configuratie heeft met slechts één kort (2,5 kb) intron op de zeer geconserveerde plaats G7.0. Hieruit volgt dat de globine gen structuur van de invertebraten zeker niet mag veralgemeend worden (Lewin 1984) en dat hun evolutie niet kan beschouwd worden als een argument voor de "intron early" hypothese (Gilbert et al 1989)

Opladen van het gezuiverde hemoglobine met $^{109}\text{CdCl}_2$ toonde aan dat, in tegenstelling met de verwachtingen, er een niet significante metaalbinding optrad. Dit is in tegenstelling met de hemoglobines van andere anneliden waarvan aangetoond werd dat ze beduidende hoeveelheden metaalbinding vertonen (Standley et al 1988; Demuyne et al 1993). De afwezigheid in de molecule van Cysteine residues kan hierbij mogelijk een rol spelen.

Voor een verdere bespreking van deze resultaten verwijzen we naar Dewilde et al 1996.

REFERENTIES

=====

- Bettens, E., Scheunders, P., Van Dyck, D., Moens, L. & Van Osta, P. (1997)
Electrophoresis, **18**, 792-798.
- Blum, H., Beier, H., Gross; H.J. (1987)
Electrophoresis, **8**, 93-99.
- Demuyne, S. & Dhainaut-Courtois, N. (1993)
Comp. Biochem. Phys. **106C**, 467-472.
- Dewilde, S., Blaxter, M., Van Hauwaert, M.L., Vanfleteren, J., Esmans, E., Marden, M., Griffon, N. & Moens, L. (1996)
J. Biol. Chem. **271**, 19865-19870.
- Garrels, J.F. & Franza, B.R. (1989)
J. Biol. Chem. **264**, 5283-5298.
- Görg, A., Postel, W., Günther, S. (1988)
Electrophoresis, **9**, 531-546.
- Görg, A. (1994) in Celis, J.E. (Ed) "Cell Biology: a laboratory Handbook". Academic Press, NY.
- Hochstrasser, D., Harrington, M.G., Hochstrasser, A.C., Miller, M. & Merrill, C.R. (1988)
Anal. Biochem. **173**, 424-435.
- Hunkapiller, M.W., Lujan, E., Ostrander, F. & Hood, L.E. (1983)
Methods Enzymol. **94**, 227-236.
- Jungblut, P., Baumeister, H. & Kloze, J. (1993)
Electrophoresis, **14**, 638-643.
- Kay, J., Cryser, A., Darke, B.M., Kille, P., Lees, W., Norey, C., Stark, M. (1991)
Int. J. Biochem. **23**, 1-5.
- Lewin, R. (1984) *Science*, **226**, 328.
- Righetti, P.G. (1990) "Immobilized pH-Gradients: Theory and Methodology", Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J.C. & Ferrara, P. (1992)
Anal. Biochem. **203**, 173-179.
- Stanley, P.R., Mainwaring, M.G., Gotoh, T. & Vinogradov, S. (1988)
Biochem. J. **249**, 915-916.
- Vanfleteren, J., Raymackers, J., Van Bun, S. & Meheus, L. (1992)
Biotechniques, **12**, 550-557.
- Vinogradov, S., Walz, D., Pohajdak, B., Moens, L., Kapp, O., Suzuki, T. & Trotman, N.N.A. (1993)
Comp. Biochem. Phys. **106B**, 1-26.

Tabel 1: Overzicht van de geïdentificeerde spots van het 2DE patroon van de cytosol fraktie van kieuwweefsel van de mossel.

pI	Mr x 10 ³	Nr	Geïdentificeerde sequentie		Vermoedelijk eiwit	
			1	2		
			1234567890	1234567890		
7.0	28	1	APTYKWXVGGNFKEVNGXK		Triosefosfaat isomerase-like	
6.8	13	2	IFVKTLXGKTITLEVEP		Ubiquitine-like	
5.3	56	3	AKDVKFGADARALMLQ		HSP-60 like	
8.0	34	4	VKVGVNGFRIGRLVTRAAIX		GAP-DH - like	
-	59	5	VKPNSEAGTAFIQ		Pyruvaat kinase	
5.8	64	6	XAIPNLRENYGELADXXXK		Albumine like	
6.0	35	7	XPFGNXHNKFKLNYKP		Creatine kinase	
4.4	25	8	TGIKHELLXNNNY		?	
7.2	20	9	PGVFFDGGADEEPL		?	
6.4	48	10	PTVEVDLY		?	
7.4	47	11	GATNV-DEGGF		Enolase-like	
5.0	43	12	VAPEE		Actine	
4.8	58	13	EVDEQMLNV		Tubuline	
8.0	36	14	GEMMDLQHGSL		LDH	
4.6	32	15	YSEKEDKYEE-IK		Tropomyosine	
5.8	28	16	ADKDYHF-VDND		?	
7.3	24	17	IPXPEAVKPDXXEA		?	
4.9	50	18	LLEGEDAHL		Keratine-like	
5.5	42	19	LKNXQANYSL		Adenylate deaminase-like	
-	42	20	GFAFVTFESPASAK		?	
-	57	21	VLAGQTLDINM		?	

Tabel 2: Metaalbindende eiwitten detecteerbaar in kieuwweefsel van de mossel

pI	Mr x 10 ³	Nr	Geïdentificeerde sequentie		Vermoedelijk eiwit
			1	2	
			1234567890	1234567890	
7.2	20	22	E-AEGG-KTG		Metallothionein
?	84	23	ALVDXHYPEXEV		Transferrine
5.9	64	24	XAIPNLRENY		Albumine
7.5	49	25	VALDSETIR		?
5.6	45	26	XXDSALKTNL		ApoJ-like

Tabel 3: Overzicht van de geïdentificeerde spots van het 2DE patroon van de cytosol fraktie van spierweefsel van de mossel.

pI	Mr x 10 ³	Nr	Geïdentificeerde sequentie		Vermoedelijk eiwit
			1	2	
			1234567890	1234567890	
5.4	24	1	AKLITYVXPEDG		Myosine-like
6.2	68	2	VDERLSENQFT		Albumine-like
4.8	43	3	STLDFGVLHMQSEPG		Desmine-like
5.2	41	4	LVTKDXGASN		Actine-like
6.1	34	5	DVGLSATKVIFGREIF		LDH-like
5.4	56	6	KALQEELKHLARQHRER		Heat shock prot
7.0	28	7	GIPAAGYPAFVASA		TIM-like
8.1	34	8	KEMQSPTFKAH		GAP-DH -like
5.6	51	9	TGRRVAIGQAIQEL		?
8.1	30	10	DNFNPDAXRNXLLPLKSA		?
8.3	28	11	AAFDAQLAXLKSQ		?
7.4	47	12	TGLKAVYFDAMGKV		Enolase-like
7.2	20	13	GVLNTQLAXLASQ		Metallothionein
7.3	52	14	GAFDEIGEEIAELTAEV		?

Tabel 4: Metaalbindende eiwitten detecteerbaar in spierweefsel van de mossel

pI	Mr x 10 ³	Nr	Geïdentificeerde sequentie		Vermoedelijk eiwit
			1	2	
			12345678901234567890		
7.2	20	13	GVLNTQLAXLASQ		Metallothionein
6.2	68	2	VDERLSENQFT		Albumine
7.4	48	15	ADDEDXXSYEDR		?
7.6	60	16	TRQRLREFAEL		?
7.5	26	17	VPFNALLARLNS		?

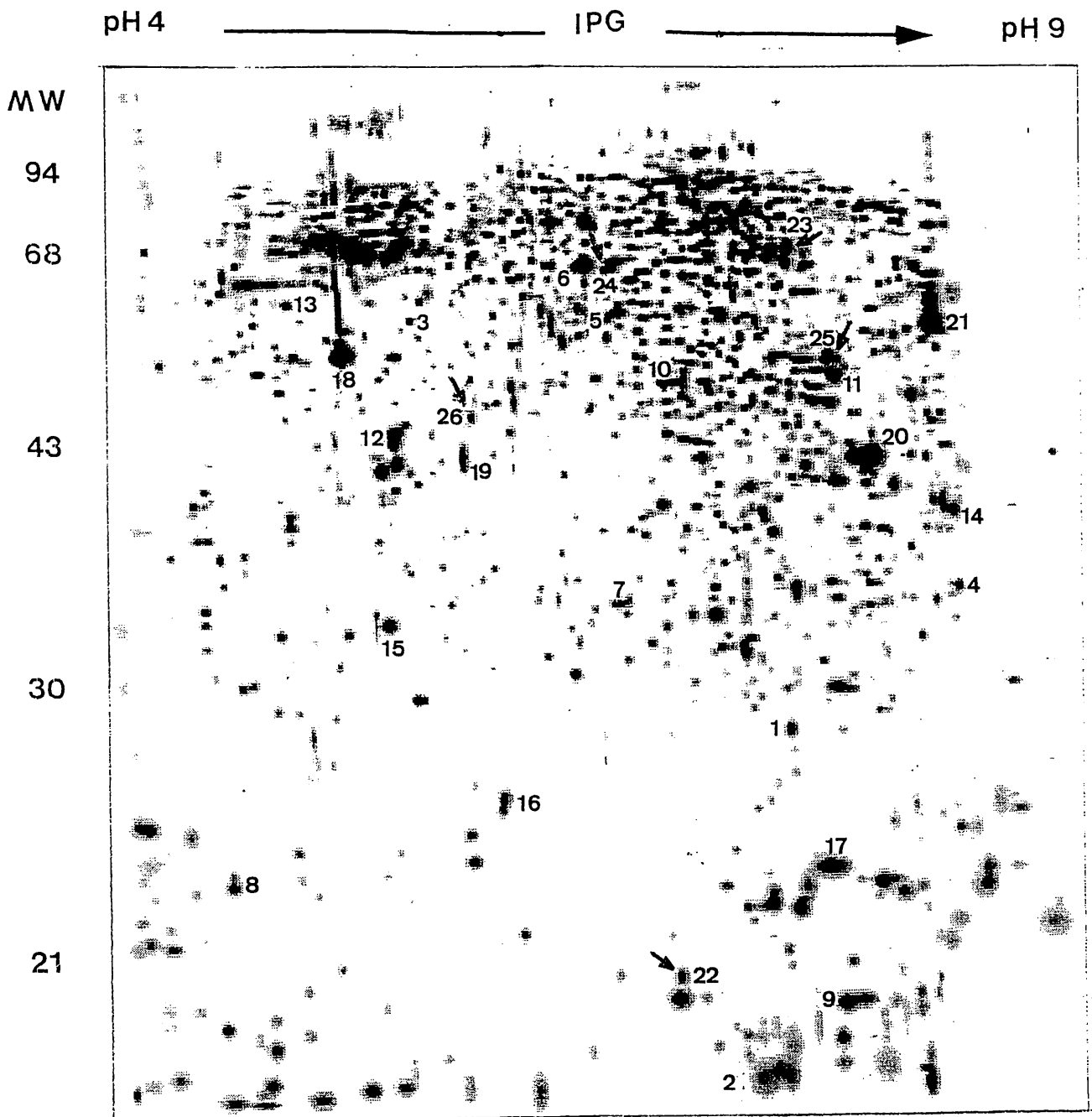


Fig.1: "Master gel" van kieuwweefsel van de mossel.
 Samenvatting van de eiwitten geïdentificeerd door micro-
 sequentie analyse (cfr Tabel 1) en van de metaalbindende
 eiwitten (cfr Tabel 2)

4. PERSONEELSBESTAND

=====

Ten laste van het project werden twee personeelsleden aangeworven nml/ Lic. S. Dewilde en tech. E. De Vriendt.

De UIA technicus, mevr. ML. Van Hauwaert heeft voor meer dan 25% aan het project meegewerkt (sequentiewerk).

5. VERVOLG VAN HET PROJECT

=====

De resultaten van het project zijn van die aard dat het onderzoek zal verder gezet worden ook na het beëindigen van het project alsdusdanig. Vooral de database opbouw van de eiwitten van beide weefselsoorten (kieuw en spier) zal afgewerkt worden tot de resultaten kunnen gepubliceerd worden. Bovendien zullen de opgestelde eiwitpatronen gebruikt worden in experimenten waarbij de mossel opgeladen wordt met radioactief gemerkte metaalaten en zal de mogelijke inductie/suppressie van welbepaalde spots nagegaan worden.

6. PUBLICATIES

=====

- Bettens, E., Scheunders, P., Van Dyck, D., Moens, L. & Van Osta, P. (1997)
Computer analysis of two-dimensional electrophoresis gels: A new segmentation and modeling algorithm.
Electrophoresis, **18**, 792-798.
- Dewilde, S., Blaxter, M., Van Hauwaert, ML., Vanfleteren, J., Esmans, E., Marden, M., Griffon, N. & Moens, L. (1996)
Globin and globin gene structure of the nerve myoglobin of *Aphrodite aculeata*.
J. Biol. Chem. **271**, 19865-19870.
- Van Hauwaert, ML., Dewilde, S. & Moens, L.
Partial database of the soluble proteins of gill and muscle tissue of *Metelis edulis* with special reference to metal-binding proteins.
Electrophoresis, in voorbereiding