

**„Primär- und Genstruktur des Hämocyanins
der Schnecke *Haliotis tuberculata*“**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Benjamin Altenhein
geb. in Münster (Westfalen)

Mainz, August 2000

Dekan und

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Markl

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Erwin R. Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: . .2000

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jürgen Markl danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas, die gute wissenschaftliche und fachliche Betreuung und das Vertrauen in meine Arbeit.

Dr. Bernhard Lieb danke ich für die gute Betreuung im Labor und die erfolgreiche Zusammenarbeit mit vielen Diskussionen, Problemen und Lösungen.

Der Firma Biosyn danke ich für die finanzielle (und tierische) Unterstützung und Herrn Ortwin Kotwitz für die Hilfe bei der Vorbereitung unserer Arbeit in Kalifornien.

Dr. Robin Harris möchte ich herzlich für die fachlichen Diskussionen, Gespräche und Anregungen danken.

Dr. Ulrich Meißner und Dr. Frank Depoix danke ich sehr für die Hilfe und Unterstützung bei allen Fragen rund um Computer.

Dr. Thorsten Burmester danke ich für die Einführung und Hilfe bei den phylogenetischen Berechnungen.

Den von mir mitbetreuten Diplomanden Sigmar Stricker und Christian Awenius danke ich für die angenehme Zusammenarbeit.

Daniela Ertelt, Dr. Wolfgang Gebauer und vor allem Andrea danke ich für die Korrekturen.

Großer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe für ein angenehmes Arbeitsklima und viel Spaß.

Für Andrea

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	1
B.	MATERIAL UND METHODEN	15
1.	Versuchstiere	15
1.2.	<i>Haliotis tuberculata</i>	15
1.3.	<i>Megathura crenulata</i>	16
1.4.	Hälterung.....	17
2.	Chemikalien	17
3.	Allgemeine molekularbiologische Methoden	17
3.1.	Präzipitation von Nukleinsäuren.....	17
3.2.	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren.....	18
3.3.	Präparation von Plasmid-DNA.....	18
3.4.	Restriktionsverdau.....	19
3.5.	Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin.....	19
3.6.	Gelelektrophorese.....	20
3.7.	DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	22
4.	Allgemeine mikrobiologische Arbeiten	22
4.1.	Bakterien und Vektoren.....	22
4.2.	Nährmedien und Agarplatten.....	23
4.3.	Glycerinkulturen.....	24
4.4.	Plattenkulturen.....	24
4.5.	Flüssigkulturen.....	24
4.6.	Kompetente Bakterien.....	25
4.7.	Transformation kompetenter Bakterien.....	25
5.	Präparation von RNA	25
5.1.	Gesamt-RNA-Präparation.....	25
5.2.	Präparation von poly-A ⁺ -RNA.....	28
6.	Präparation von genomischer DNA	29
7.	Verwendete Primer	29
8.	Synthese von cDNA-Banken	30
8.1.	Erststrangsynthese.....	32
8.2.	Zweitstrangsynthese.....	32
8.3.	Blunting der cDNA-Enden und Ligation der cDNA an Adaptoren.....	32

8.4.	Phosphoryllierung der Adaptoren und Restriktionsverdau zur gerichteten Klonierung	33
8.5.	Größenfraktionierung und Quantifizierung der cDNA	33
8.6.	Ligation in die Vektorarme und Verpackung	34
8.7.	Amplifikation der cDNA-Bank	34
8.8.	Variationen (random-primed cDNA-Synthese)	34
8.9.	Tabellarische Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit erstellten cDNA-Banken	35
9.	Plauefilterhybridisierung („Screening“)	36
9.1.	Antikörperscreening	36
9.2.	Sondenscreening	38
10.	<i>In vivo</i>-Excision	40
11.	PCR-Techniken	41
11.1.	PCR allgemein	41
11.2.	PCR mit genomischer DNA	44
11.3.	PCR mit cDNA	46
11.4.	PCR mit RNA (RT-PCR)	47
11.5.	Klonierung von PCR-Fragmenten	51
12.	Blotting von Nukleinsäuren	52
12.1.	Southernblot	52
12.2.	Northernblot	53
13.	DNA-Sequenzierung	53
14.	Sequenzauswertung am Computer	53
14.1.	Verwendete Computerprogramme	53
14.2.	Alignments, Stammbäume und phylogenetische Berechnungen	54
C.	ERGEBNISSE	56
1.	Zur Strategie	56
2.	Sequenzierung von <i>Haliotis tuberculata</i> Hämocyanin (HtH1 und HtH2) ..	58
2.1.	Sequenz der HtH1 cDNA	58
2.2.	Sequenz der HtH2 cDNA	66
2.3.	Sequenzierung des HtH1-Gens	71
2.4.	Sequenzierung des HtH2-Gens	75
D.	DISKUSSION	80
1.	Die Sequenz des <i>Haliotis tuberculata</i> Hämocyanins	80
2.	Die Sequenz des <i>Megathura crenulata</i> Hämocyanins	94

3.	Die Genstruktur der Gastropoden-Hämocyanine	97
4.	Evolution der Mollusken-Hämocyanine	117
5.	Ausblick	126
E.	ZUSAMMENFASSUNG	127
F.	ANHANG	129
1.	Abkürzungen.....	129
2.	Abkürzungscodes der Aminosäuren	130
3.	IUPAC-Codes für degenerierte Nukleotide.....	130
4.	Verwendete Primer.....	131
G.	LITERATUR	133

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Die Hämocyane der verschiedenen Mollusken-Klassen	4
Abb. 2:	Die Röntgenstruktur der funktionellen Domäne OdH-g von <i>Octopus dofleini</i> Hämocyanin mit 2,3 Å Auflösung	6
Abb. 3:	Verwandtschaft der einzelnen funktionellen Domänen zweier Cephalopoden-Hämocyane.....	8
Abb. 4:	3D-Rekonstruktion des HtH1-Didekamers.....	13
Abb. 5:	<i>Haliotis tuberculata</i> (grünes Seeohr, Abalone).....	16
Abb. 6:	<i>Megathura crenulata</i> (Kalifornische Schlüsselochschnecke)	16
Abb. 7:	Schematischer Ablauf der cDNA-Bank-Synthese.....	31
Abb. 8:	Ablauf der PCR (Polymerase chain reaction).....	42
Abb. 9:	Ein typisches PCR-Temperaturprofil für die Amplifikation eines 1,5 kb-Fragments.....	43
Abb. 11:	Temperaturprofil einer Titan-RT-PCR	48
Abb. 12:	Ablauf der 5'-RACE (Rapid amplification of cDNA ends)	50
Abb. 13:	Aufbau eines Southernblot/Northernblot.....	52
Abb. 14:	Die degenerierten Primer ii, iii und iv	61
Abb. 15:	cDNA-Klone der HtH1 cDNA	63
Abb. 16:	Aminosäuresequenz des HtH1.....	65
Abb. 17:	cDNA-Klone der HtH2-cDNA	68
Abb. 18:	Aminosäure-Teilsequenz des HtH2.....	70
Abb. 19:	PCR-Klone zur Amplifikation des HtH1-Gens	72
Abb. 20:	Struktur des HtH1-Gens.....	74
Abb. 21:	PCR-Klone zur Amplifikation des HtH2-Gens	77
Abb. 22:	Aus dem Genom abgeleitete partielle Aminosäuresequenz der FUs HtH2-a und HtH2-b	78
Abb. 23:	Struktur des HtH2-Gens.....	79
Abb. 24:	Ein Sequenzalignment der FUs von HtH1 und OdH.....	83
Abb. 25:	Die potentiellen N-Glykosilierungsstellen der FUs vom HtH1 in der Tertiärstruktur von OdH-g.....	85
Abb. 26:	Ein Sequenzalignment der FUs von HtH2 und OdH.....	88
Abb. 27:	Die potentiellen N-Glykosilierungsstellen der FUs vom HtH2 in der Tertiärstruktur von OdH-g.....	90
Abb. 28:	Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von HtH1 und HtH2	92
Abb. 29:	Die potentiellen N-Glykosilierungsstellen bisher sequenzierter Mollusken-Hämocyane in der Tertiärstruktur von OdH-g	96

Abb. 30:	Vergleich der verschiedenen Exon-Intron-Organisationen der acht FUs im HtH1-Gen.....	98
Abb. 31:	Die „internen“ Introns des HtH1-Gens	100
Abb. 32:	Vergleich der Genstrukturen von HtH und KLH.....	103
Abb. 33:	Die Genorganisation von HtH1 und OdH.....	107
Abb. 34:	Die Entstehung der heutigen Genstruktur der Mollusken-Hämocyanine	110
Abb. 35:	Vergleich der Genstrukturen von Mollusken-Hämocyaninen, Tyrosinasen, Arthropoden-Hämocyanin und Hexamerinen	114
Abb. 36:	Radialer Stammbaum aller bislang sequenzierten FUs von Mollusken-Hämocyaninen.....	120
Abb. 37:	Phylogenetischer Baum der Mollusken-Hämocyanine.....	124

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1:	N-terminale Anfangssequenzen der einzelnen FUs des HtH und ihre in der SDS-PAGE bestimmten Molekülmassen	12
Tab. 2:	Kationenkonzentration zur Präzipitation von Nukleinsäuren	18
Tab. 3:	Alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten und gescreenten cDNA-Banken	36
Tab. 4:	Elongationszeiten der PCR in Abhängigkeit von der Größe des erwarteten Fragments	44
Tab. 5:	Verwendete Software und Programme	54
Tab. 6:	PCR-Klone des HtH1-Gens	71
Tab. 7:	PCR-Klone des HtH2-Gens	76
Tab. 8:	Vergleich der Exon- und Intron-Längen und Intron-Phasen der vier analysierten Hämocyanin-Gene.....	104
Tab. 9:	Konsensussequenzen im Bereich der Splice-Stellen aller bislang sequenzierten Introns	106
Tab. 10:	Alle Mollusken-Hämocyanine, von denen vollständig oder fast vollständig sequenzierte FUs zur Verfügung stehen.....	117
Tab. 11:	Identitäten-Vergleich der vollständig sequenzierten FUs verschiedener Mollusken-Hämocyanine.....	122
Tab. 12:	Bezeichnung und Sequenz aller verwendeten Primer.....	131

ABKÜRZUNGEN

Die folgenden Abkürzungen werden in der vorliegenden Arbeit für die Beschreibung der Mollusken-Hämocyanine verwendet:

HtH *Haliotis tuberculata* Hämocyanin

KLH *Megathura crenulata* Hämocyanin (**Keyhole Limpet Hemocyanin**)

HpH *Helix pomatia* Hämocyanin

RtH *Rapana thomasiana* Hämocyanin

OdH *Octopus dofleini* Hämocyanin

SoH *Sepia officinalis* Hämocyanin

FU Funktionelle Domäne (**F**unctional **U**nit, Funktionelle Einheit)

-a bis -h Bezeichnung der FUs

hth *Haliotis tuberculata* Hämocyanin cDNA bzw. genomische DNA

klh *Megathura crenulata* Hämocyanin genomische DNA

(a) bis (h) in Klammern geschriebene FUs sind nur partiell in den beschriebenen Klonen enthalten

A. Einleitung

➤ Über die Forschung am Mollusken-Hämocyanin: eine kurze Einführung

Hämocyanin ist ein extrazelluläres, frei in der Hämolymphe zirkulierendes, respiratorisches Protein vieler Arthropoden und Mollusken. Aufgrund ihrer gravierenden strukturellen Unterschiede werden Arthropoden- und Mollusken-Hämocyanin in zwei getrennte Proteinfamilien unterteilt. Das Mollusken-Hämocyanin ist ein Glykoprotein mit einer relativen Molekülmasse von vier bzw. acht Millionen Dalton. Elektronenmikroskopisch ist es in Form eines Hohlzylinders mit pentamerer Symmetrie sichtbar. Mit Maßen von etwa 35 nm Durchmesser und einer Höhe von 18 bzw. 36 nm hat es die Dimension eines mittelgroßen Viruspartikels und zählt zu den größten bekannten Proteinen in der Natur. Es kommt innerhalb der Mollusken in den Klassen der Cephalopoda, Polyplacophora, Bivalvia und Gastropoda vor und dient den Tieren zur Versorgung ihrer Gewebe und Organe mit Sauerstoff. Dabei wird Sauerstoff reversibel zwischen zwei Kupferatomen gebunden, wodurch das Hämocyanin und somit die Hämolymphe die charakteristische blaue Farbe erhält.

Aus historischen Gründen fällt dem Hämocyanin der kalifornischen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* eine besondere Bedeutung zu. Als erstes kommerziell erhältliches Hämocyanin wird das KLH (aus dem Englischen **Keyhole Limpet Hemocyanin**) schon seit über dreißig Jahren in der immunologischen Forschung eingesetzt. Wegen seiner enormen Größe sowie dem Kohlenhydratanteil, der bis zu 4 % betragen kann (Van Kuik et al., 1990), besitzt es eine Vielzahl von Epitopen, die in Säugetieren eine starke Immunantwort auslösen. Dabei richtet sich das Immunsystem der Säuger, denen es appliziert wird, nicht nur gegen die Epitope des KLH. Das gesamte Immunsystem wird aktiviert und das KLH wirkt als Immunstimulanz sowohl für die humorale als auch für die T-Zell-vermittelte Immunantwort (Denizot & Golstein, 1981; Markl, 1987; Ward, 1981). Neben dieser Wirkung des KLH als Immunstimulanz sind im Zuge der immunologischen Forschungen noch weitere Eigenschaften entdeckt worden, die sich die Medizin heute zunutze macht. So wird das KLH als Hapten-Carrier verwendet, um Antikörper gegen kleinere Antigene (Chemikalien, Lipide, Polysaccharide, Oligonukleotide u. a.) zu erzeugen, die an das KLH gekoppelt werden (Helling et al., 1994). In diesem Zusammenhang wächst das Interesse am KLH in der Tumorforschung als Träger von Tumorantigenen zur Immunisierung und als Vakzinkomponente bei der Impfung gegen bestimmte Krebsformen (*Vacmune*[®] der Firma Biosyn, Fellbach). Es wird darüber hinaus als Medikament (*Immucothel*[®] der Firma Biosyn,



Fellbach) zur Senkung der Rezidivrate beim oberflächlichen Harnblasenkarzinom eingesetzt (Jurincic et al., 1988; Jurincic-Winkler et al., 1995; Jurincic-Winkler et al., 1996). Durch eine Kreuzreaktion von Epitopen des KLH mit Oberflächenantigenen von *Schistosoma mansoni*, dem Erreger der Bilharziose, kann es schließlich auch zur Diagnose der Schistosomiasis eingesetzt werden (Dissous et al., 1986; Grzych et al., 1987; Markl et al., 1991a). Dies sind nur einige Beispiele für die medizinisch-immunologische Anwendung und Bedeutung des KLH. Einen detaillierteren Überblick über diese Thematik gibt der Artikel „Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH): a biomedical review“ von Harris und Markl (1999).

➤ **Allgemeiner Aufbau der Mollusken-Hämocyanine**

Die Grundeinheit des Mollusken-Hämocyanins ist ein Hohlzylinder bestehend aus zehn gleichen Untereinheiten (siehe Abbildung 1). Dieses Dekamer mit 18 nm Höhe und einem Durchmesser von 35 nm hat eine relative Molekülmasse von etwa vier Millionen Dalton. Die Bildung von Dekameren erfolgt über stabile Dimere aus zwei Untereinheiten. Fünf solcher Dimere lagern sich zum vollständigen Dekamer zusammen, wodurch die pentamere Symmetrie des Zylinders zustande kommt (Lambert et al., 1994a; Lamy et al., 1993; Miller et al., 1990; Siezen & van Bruggen, 1974; Wichertjes et al., 1986). Die genaue Form des Dekamers wurde erst kürzlich von unserer Arbeitsgruppe identifiziert (Meissner et al., 2000). Bei Tintenfischen und Käferschnecken bilden solche Dekamere die vorherrschende Form, während sich bei Muscheln und Schnecken zwei Dekamere zu einem Didekamer verbinden (Herskovits & Hamilton, 1991; Lambert et al., 1995b; Lambert et al., 1995c; Terwilliger et al., 1988; Van Holde et al., 1992). Höhere Aggregationsformen sind bei Vorderkiemer- und Hinterkiemerschnecken beschrieben, wo tubuläre Multidekamere oder sogenannte Cluster einzelner Didekamere auftreten können (Herskovitz & Hamilton, 1991; Markl et al., 1991b). Das zylindrische Dekamer als Grundeinheit der Mollusken-Hämocyanine besteht aus einer Zylinderwand und einem im Innern gelegenen Bereich. Dieser sogenannte Kragen kann wie bei Cephalopoden zentral im Innern des Zylinders liegen, wodurch eher symmetrische Hohlzylinder entstehen, deren beide Seiten sich in der Aufsicht nicht voneinander unterscheiden (Lambert et al., 1994a; Lambert et al., 1995a; Lamy et al., 1993; Mouche et al., 1999). Bei den Gastropoden liegt dieser Kragen peripher. Das Dekamer ist also asymmetrisch mit einer Kragenseite und einer offenen Seite (Harris et al., 1992; Meissner et al., 2000; Orlova et al., 1997).

Die einzelnen Untereinheiten bestehen aus einer durchgehenden Polypeptidkette mit 350 bis 450 kDa. Sie sind in sieben oder acht globuläre Substrukturen gefaltet, die man als „Funktionelle Einheiten“ oder „Funktionelle Domänen“ bezeichnet. Diese werden in der vorliegenden Arbeit mit FU (aus dem Englischen **F**unctional **U**nit) abgekürzt. Sie werden



vom N- zum C-Terminus mit *a* bis *h* bezeichnet. Die einzelnen FUs haben ein Molekulargewicht von 45000 bis 60000. Jede besitzt ein aktives Zentrum mit zwei Kupferatomen (bezeichnet mit Cu-A und Cu-B). Zwischen diesen kann ein Sauerstoffmolekül reversibel angelagert werden. Die beiden Kupferatome werden jeweils über drei hochkonservierte Histidinreste gebunden (Miller et al., 1998; Van Holde et al., 1992).

Als Glykoprotein besitzt das Mollusken-Hämocyanin bis zu 9 % Kohlenhydratseitenketten, die hauptsächlich N-glykosidisch mit der Polypeptidkette verknüpft sind (Drexel et al., 1986; Stoeva et al., 1999; Van Kuik et al., 1990; Vanhoergaerden et al., 1990; Wood & Chaplin, 1983).

Review-Artikel zur Struktur der Mollusken-Hämocyanine stammen unter anderem von Harris & Markl (1999), Herskovits (1988), Herskovits & Hamilton (1991), Markl (1996), Van Holde & Miller (1995) und Van Holde et al. (1992).

Abbildung 1 stellt schematisch die Unterschiede im Hämocyanin der einzelnen Mollusken-Klassen dar. Die Untereinheiten der Cephalopoden- und Gastropoden-Hämocyanine sind sowohl immunologisch als auch auf Ebene der Primärstruktur untersucht worden. Daher sind in Abbildung 1 die einzelnen FUs dieser Untereinheiten farbig markiert. Die beiden bei Cephalopoden beschriebenen Untereinheiten von *Octopus* und *Sepia* sind unterschiedlich lang, was näher erläutert wird. Bei Käferschnecken und Muscheln sind Hämocyanine beschrieben (Herskovits et al., 1989; Herskovits et al., 1986; Lambert et al., 1994b; Lambert et al., 1995c; Ryan et al., 1985), die bislang aber nicht näher untersucht wurden.



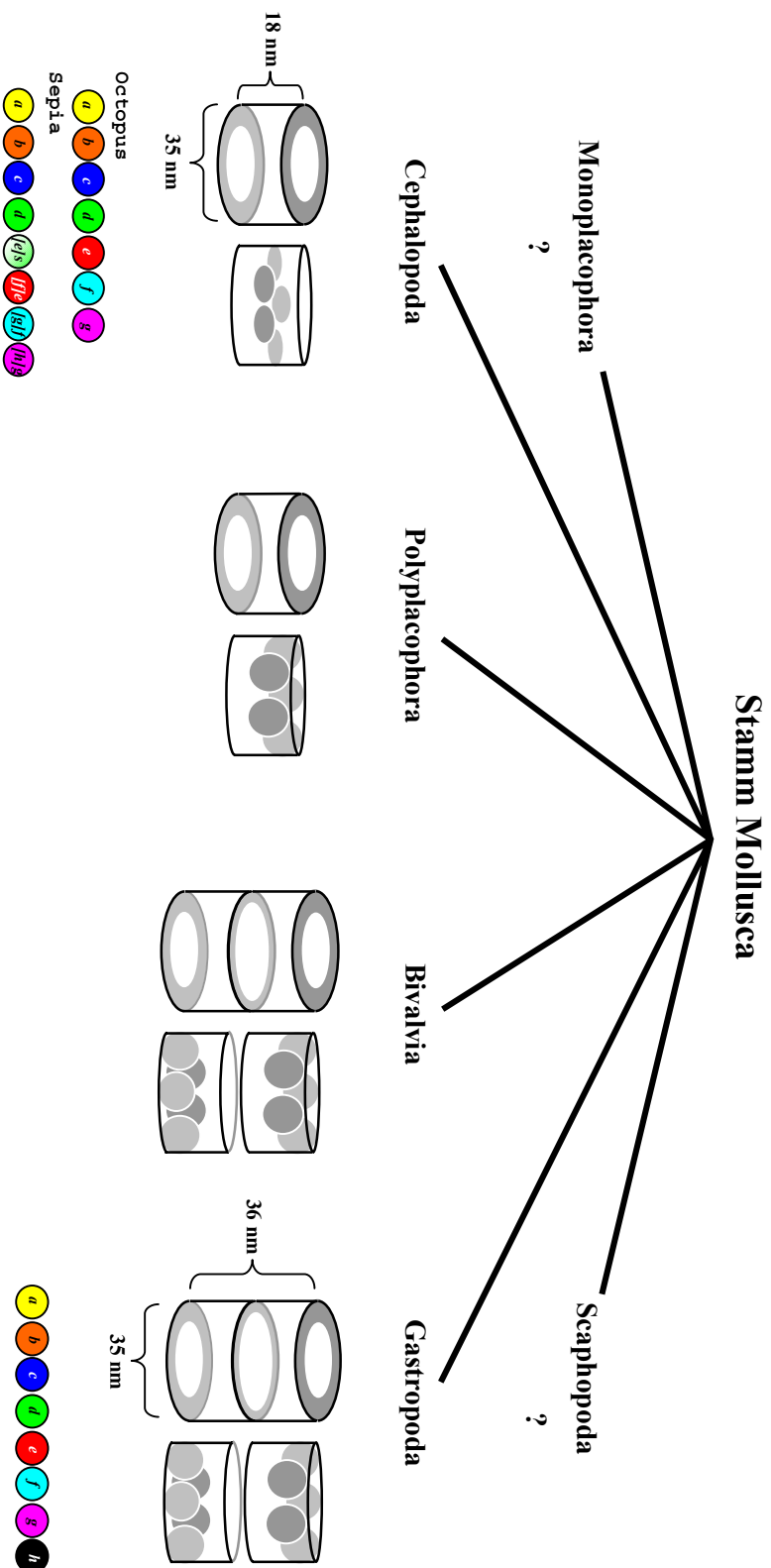


Abb. 1:

Die Hämocyane der verschiedenen Mollusken-Klassen.

Die in der Quartärstruktur als Hohlzylinder sichtbaren Mollusken-Hämocyane zeigen strukturell einige Unterschiede zwischen den einzelnen Klassen. Diese Unterschiede in der Quartärstruktur sind in Form von Zylinder-Modellen schematisch wiedergegeben. Auf Ebene der Untereinheit (Kugelmodelle) gibt es Unterschiede zwischen den Hämocyaninen von Cephalopoden und Gastropoden, die im Text näher beschrieben werden.



➤ **Cephalopoden-Hämocyanin**

Das Cephalopoden-Hämocyanin bildet in der Quartärstruktur symmetrische Dekamere aus zehn gleichen Untereinheiten. Es liegt in Form von Hohlzylindern vor, die aus der Zylinderwand und einer im Innern liegenden zentralen Struktur bestehen. Höhere Aggregationsformen sind nicht bekannt. Die Untereinheiten bestehen aus sieben bzw. acht funktionellen Domänen (FUs). Bei den Cephalopoden sind insbesondere die Hämocyanine von *Octopus dofleini* und *Sepia officinalis* detaillierter untersucht. Das Hämocyanin von *Octopus dofleini* (OdH) ist das erste vollständig sequenzierte Mollusken-Hämocyanin (Miller et al., 1998). Es enthält sieben FUs, *a* bis *g*, von denen jede ein aktives Zentrum mit den bereits erwähnten Histidinresten der Kupferbindungsstellen enthält. Bis auf die funktionelle Domäne OdH-*c* findet sich in der Sequenz jeder FU mindestens eine potentielle N-Glykosilierungsstelle. Die einzelnen FUs sind zwischen 394 und 420 Aminosäuren lang. Ein Sequenzvergleich dieser sieben FUs vom OdH miteinander zeigt, daß die Übereinstimmungen etwa bei 42 % Identität liegen.

Neben der vollständig sequenzierten Primärstruktur des OdH ist die Sekundär- und Tertiärstruktur der funktionellen Domäne OdH-*g* über Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Cuff et al., 1998). Diese Analyse mit 2,3 Å Auflösung zeigt, daß OdH-*g* aus zwei unterschiedlichen strukturellen Domänen aufgebaut ist (siehe Abbildung 2).



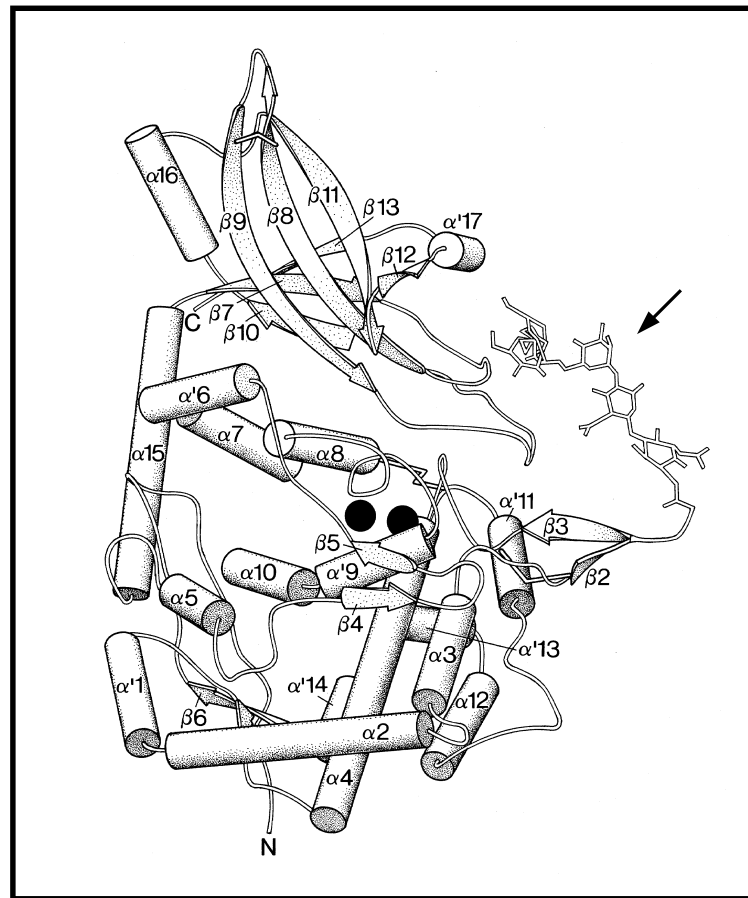


Abb. 2: Die Röntgenstruktur der funktionellen Domäne OdH-g von *Octopus dofleini* Hämocyanin mit 2,3 Å Auflösung (Cuff et al., 1998).

Die Säkundärstruktur-Elemente sind in Form von Röhren (α -Helix) oder flachen Pfeilen (β -Faltblatt) wiedergegeben. Die nachgewiesene Kohlenhydratseitenkette ist mit einem Pfeil markiert. Schwarze Kreise symbolisieren die beiden Kupferatome des aktiven Zentrums.

Zum einen gibt es die Kern-Domäne, in der das aktive Zentrum mit den beiden Kupferatomen liegt. Sie besteht zum größten Teil aus α -Helices, die durch unstrukturierte Sequenzabschnitte bzw. durch kurze β -Faltblätter voneinander getrennt sind. Sie beginnt mit dem N-Terminus der FU und wird durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert. Die zweite Domäne wird hauptsächlich durch antiparallel angeordnete β -Faltblattstränge gebildet, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Sie endet mit dem C-Terminus. Die „Verbindung“ zwischen der Kern- und der β -Faltblatt-Domäne bildet eine Zuckerseitenkette, die angeheftet an der Kern-Domäne einen offenen Bereich zwischen den beiden Domänen überspannt. In der Architektur des aktiven Zentrums zeigt sich deutlich, daß die jeweils drei Histidinreste der Kupferbindungsstellen Cu-A und Cu-B in räumlicher Nähe zueinander



liegen. Dabei wird das zweite Histidin der Bindungsstelle Cu-A durch eine Thioetherbrücke mit einem benachbarten Cysteinrest stabilisiert.

Das zweite gut untersuchte Cephalopoden-Hämocyanin ist das von *Sepia officinalis* (SoH). Die Strukturaufklärung erfolgte überwiegend über biochemische und elektronenmikroskopische Techniken (Lambert et al., 1995a; Lamy et al., 1998; Wichertjes et al., 1986). Auch hier bilden zehn Untereinheiten ein zylindrisches Dekamer mit zentraler Kragenregion. Anders als beim OdH besteht die Untereinheit des SoH allerdings aus acht funktionellen Domänen. Vom SoH liegen einige partielle Sequenzdaten vor (Declercq et al., 1990; Top et al., 1990; Vanderzande et al., 1990). Im Vergleich mit anderen Mollusken-Hämocyaninen taucht hier allerdings eine Besonderheit auf. Mit immunochemischen Methoden sowie multiplen Sequenzalignments der SoH-Sequenzen mit den einzelnen FUs des OdH sind die Verwandtschaftsverhältnisse der topografisch an gleicher Position innerhalb der Polypeptidketten liegenden FUs untersucht worden (Declercq et al., 1990; Loncke et al., 1990; Miller et al., 1998). Immunologisch stimmen die funktionellen Domänen SoH-*a*, SoH-*b*, SoH-*c* und SoH-*d* mit OdH-*a* bis OdH-*d* überein. Im Anschluß an SoH-*d* scheint sich eine weitere FU im SoH eingefügt zu haben, die wir mit SoH-*[e]*s für „sepia“ oder „speziell“ bezeichnen. Sie besitzt kein Pendant im OdH, ist aber immunologisch mit SoH-*d* verwandt ist (Loncke et al., 1990). Die folgenden funktionellen Domänen SoH-*[f]*e, SoH-*[g]*f und SoH-*[h]*g entsprechen immunologisch den funktionellen Domänen OdH-*e*, OdH-*f* und OdH-*g*. Diese Verhältnisse der drei C-terminalen FUs spiegeln sich auch in einem multiplen Sequenzalignment wieder. In der folgenden Abbildung ist der Unterschied zwischen OdH und SoH schematisch wiedergegeben. Die immunologische Verwandtschaft der FUs zwischen *Octopus* und *Sepia* ist durch die Verwendung gleicher Farben gezeigt.



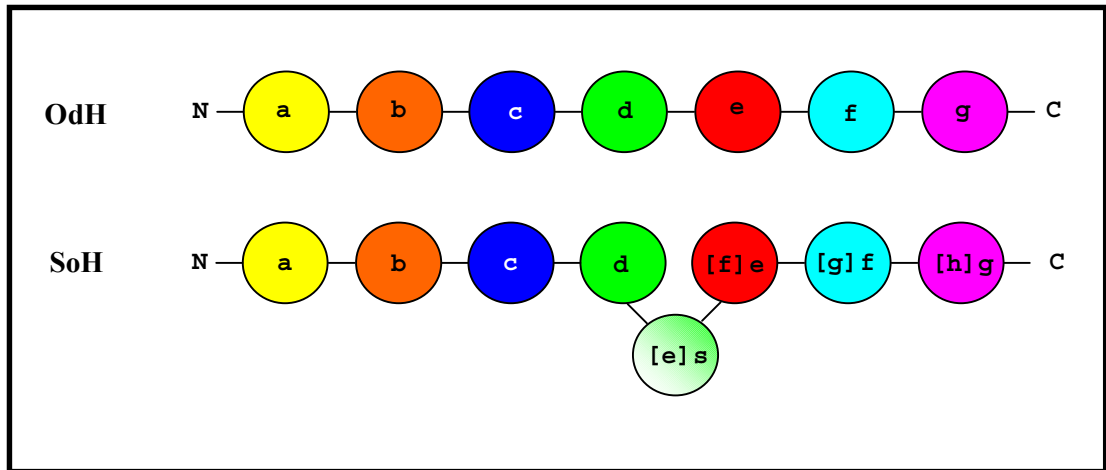


Abb. 3: Verwandtschaft der einzelnen funktionellen Domänen zweier Cephalopoden-Hämocyanine. Die Hämocyanine von *Octopus dofleini* (OdH) und *Sepia officinalis* (SoH) bestehen aus sieben bzw. acht funktionellen Domänen (FUs), die hier als farbige Kugeln dargestellt sind. Immunbiochemische Vergleiche der einzelnen FUs von OdH und SoH sowie Sequenzvergleiche haben gezeigt, daß die N-terminalen funktionellen Domänen OdH-a bis OdH-d und SoH-a bis SoH-d einander entsprechen. Die C-terminalen funktionellen Domänen SoH-[f]e, SoH-[g]f und SoH-[h]g zeigen allerdings mehr Verwandtschaft zu OdH-e, OdH-f und OdH-g. Daher wurde in unserer Arbeitsgruppe für diese FUs eine doppelte Bezeichnung eingeführt. In eckigen Klammern steht die aus chronologischer Abfolge der einzelnen FUs vom N- zum C-Terminus resultierende Bezeichnung. Hinter der eckigen Klammer folgt die Bezeichnung, die nach den Verwandtschaftsverhältnissen zwischen den FUs von OdH und SoH ermittelt wurde. Entsprechend sind die verwandten FUs in der gleichen Farbe dargestellt. Die zusätzliche funktionelle Domäne bei *Sepia* wird mit SoH-[e]s für „sepia“ oder „spezial“ bezeichnet. Sie ist immunologisch mit SoH-d verwandt.

➤ **Gastropoden-Hämocyanin**

Das Gastropoden-Hämocyanin bildet in der Quartärstruktur ein Didekamer mit einem Molekulargewicht von etwa acht Millionen (siehe Abbildung 1). Neben den in der Hämolymphe von Schnecken vorherrschenden Didekameren finden sich bei manchen Gastropoden außerdem höhere Aggregationsformen. Dabei tauchen vor allem tubuläre Multidekamere auf. An ein zentrales Didekamer werden weitere Dekamere von beiden Seiten angelagert und bilden so längere Ketten (Harris & Markl, 1992; Herskovits & Hamilton, 1991; Markl et al., 1990). Ein weiterer Unterschied zum Cephalopoden-Hämocyanin besteht in einer deutlichen Heterogenität der Untereinheiten. Für mehrere Gastropoden sind zwei verschiedene Isoformen beschrieben, die sich immunologisch deutlich voneinander unterscheiden. So zum Beispiel für *Megathura crenulata* (Gebauer et al., 1994; Senozan & Briggs, 1989; Senozan et al., 1981; Swerdlow et al., 1996), *Haliotis*



tuberculata (Keller, 1994; Keller et al., 1999), *Murex fulvescens* (Brouwer et al., 1978), *Buccinum undatum* (Lips et al., 1981) oder *Rapana thomasiana* (Boteva et al., 1991; Gebauer et al., 1999b). Bei *Helix pomatia* und *Helix aspersa* sind sogar drei verschiedene Untereinheiten (α_D -, α_N - und β_C -Form) bekannt, die jeweils noch weitere Heterogenität aufweisen (Gielens et al., 1987; Gielens et al., 1990; Van Breemen et al., 1977). Während die Untereinheiten von *Megathura* und *Haliotis* ausschließlich Homo-Oligomere bilden, lagern sich bei *Murex* und *Buccinum* beide Untereinheiten offenbar zunächst zum Dimer zusammen und bilden somit Hetero-Didekamere. Dies ist allerdings noch nicht verifiziert worden. Von den Gastropoden-Hämocyaninen war zu Beginn meiner Arbeit auf Ebene der Primärstruktur wenig bekannt. Vom Hämocyanin der Weinbergschnecke *Helix pomatia* (HpH) waren von der Isoform β_C die funktionellen Domänen HpH β_C -d und HpH β_C -g sowie ein C-terminales Peptid von HpH β_C -h sequenziert (Drexel et al., 1986; Drexel et al., 1987; Finotto et al., 1990; Xin et al., 1990). Von *Rapana thomasiana* (RtH) lag die Primärstruktur von RtH2-a aus direkter Proteinsequenzierung vor (Stoeva et al., 1997). Biochemisch und elektronenmikroskopisch waren zu Beginn meiner Arbeit neben dem Hämocyanin der Weinbergschnecke *Helix pomatia* (HpH) besonders die beiden Hämocyanine von *Megathura crenulata* (KLH) eingehend untersucht (Gebauer et al., 1999a; Gebauer et al., 1994; Harris et al., 1993; Malley et al., 1965; Markl et al., 1991b; Senozan et al., 1981; Söhngen et al., 1997).

➤ ***Megathura crenulata* Hämocyanin (KLH)**

Das Hämocyanin der Kalifornischen Schlüssellochschnecke *Megathura crenulata* besteht aus zwei verschiedenen Untereinheiten, die mit KLH1 und KLH2 bezeichnet werden (Gebauer et al., 1994; Markl et al., 1991b). Diese beiden Isoformen unterscheiden sich physiologisch, biochemisch und immunologisch voneinander. Das KLH1 hat eine Molekülmasse von 390 kDa und ist in acht funktionelle Domänen (FUs) gefaltet. Es bildet in der Quartärstruktur Didekamere von 35 nm Durchmesser und einer Höhe von 36 nm. Höhere Aggregationsformen sind als Cluster mehrerer Didekamere beschrieben (Gebauer et al., 1994; Harris et al., 1993). KLH2 besteht ebenfalls aus acht FUs, besitzt aber eine Molekülmasse von nur 350 kDa (Gebauer et al., 1999a; Söhngen et al., 1997). Hier bilden sich neben der didekameren Form auch tubuläre Multidekamere. Dabei werden an ein zentrales Didekamer einzelne Dekamere an beiden Seiten angelagert. Physiologisch treten beide Isoformen parallel in der Hämolymphe auf und dienen primär dem Sauerstofftransport. Bei gehälterten Schnecken verschwindet nach einigen Monaten das KLH1 aus der Hämolymphe und es bleibt lediglich das KLH2 zurück (Gebauer et al., 1994). Hier scheint also ein physiologischer Unterschied zwischen den beiden Isoformen zu bestehen, der zu einem selektiven Abbau des KLH1 bzw. zu differentieller Expression der beiden potentiellen



KLH-Gene führt. Auch die Stabilität der beiden Isoformen in der Quartärstruktur ist unterschiedlich. So läßt sich beispielsweise durch selektive Dissoziation des KLH2 aus dem Gemisch das KLH1 als intaktes Molekül isolieren (Harris et al., 1997a; Harris et al., 1995; Harris et al., 1997b). Immunologisch sind die acht FUs beider Isoformen unterscheidbar. Proteolytische Spaltung der beiden Untereinheiten führt zu einem Gemisch von 16 FUs, die in der 2D-Immunelektrophorese einzelne Immunpräzipitate bilden (Gebauer et al., 1994; Söhngen et al., 1997). Die Zuordnung der proteolytischen Spaltprodukte zu den entsprechenden FUs der beiden Isoformen wurde von unserer Arbeitsgruppe aufgeklärt (Gebauer et al., 1999a; Gebauer et al., 1994; Söhngen et al., 1997). Diese Zuordnung wurde unter anderem dadurch erreicht, daß die proteolytisch erhaltenen Peptidfragmente von ihrem N-Terminus her ansequenziert wurden. So sind mittlerweile die N-terminalen Anfangssequenzen fast aller FUs vom KLH1 und KLH2 bekannt (Gebauer et al., 1994; Söhngen et al., 1997). Die Primärstruktur von KLH2-c wurde über direkte Proteinsequenzierung vollständig ermittelt (Stoeva et al., 1999).

Neben der biochemischen Analyse der beiden KLH-Formen wurde die Quartärstruktur mit elektronenmikroskopischen Techniken untersucht (Dube et al., 1995; Harris et al., 1992; Orlova et al., 1997) und es gibt mittlerweile zahlreiche Daten über das Dissoziations-Reassoziationsverhalten (Gebauer & Harris, 1999; Harris et al., 1998; Harris et al., 1997a; Harris et al., 1995; Harris et al., 1997b).

➤ **Biosyntheseort des Gastropoden-Hämocyanins**

Neben den biochemischen und elektronenmikroskopischen Arbeiten am Protein wurden in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen zum Biosyntheseort des Hämocyanins bei Prosobranchiern durchgeführt (Albrecht, 1996). Das Hämocyanin wird hier in Zellen synthetisiert, die aufgrund ihrer Oberflächenstruktur als Porenzellen bezeichnet werden. Diese Porenzellen liegen vermehrt im Bindegewebe des Mantels und der Mitteldarmdrüse. Während dieser Untersuchungen an *Megathura crenulata* ergaben sich allerdings einige Schwierigkeiten bei der Detektion von Hämocyanin-mRNA in den Schlüssellockschnecken. Dies mag zum Teil darauf zurückzuführen sein, daß - wie bereits erwähnt - bei gehälterten Schnecken innerhalb kurzer Zeit das KLH1 aus der Hämolymphe vollständig verschwindet und lediglich KLH2 weiter vorhanden ist. Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe das Hämocyanin der nahe verwandten Art *Haliotis tuberculata* (HtH) untersucht. Es zeigte sich, daß bei *Haliotis tuberculata* diese zunächst immunhistochemischen Untersuchungen zum Biosyntheseort zu klareren Ergebnissen führten. Bei *Haliotis tuberculata* konnte ultrastrukturell der Biosyntheseort des Hämocyanins lokalisiert werden. Hier enthielten die bereits erwähnten Porenzellen in



Vesikeln des Golgi-Apparates parakristalline Strukturen, die im Elektronenmikroskop eindeutig als Hämocyanin identifiziert werden konnten. Diese Schnecken, die auch als Seeohr oder Abalone bezeichnet werden, lassen sich problemlos im Aquarium halten und zeigen keine Veränderung der Hämocyanin-Konzentration in Gefangenschaft. Außerdem zeigt das HtH ähnliche physiologische, immunologische und biochemische Eigenschaften wie das KLH. Parallel zu den immunhistochemischen Untersuchungen zum Biosyntheseort wurde deshalb das HtH in unserer Arbeitsgruppe auch biochemisch und molekularbiologisch untersucht.

➤ ***Haliotis tuberculata* Hämocyanin (HtH)**

Das Hämocyanin von *Haliotis tuberculata* enthält wie auch das KLH zwei verschiedene Untereinheiten, HtH1 und HtH2, die jeweils aus acht immunologisch verschiedenen FUs bestehen. In der SDS-PAGE zeigen beide Untereinheiten eine Größe von etwa 400 kDa (Keller et al., 1999; Lieb et al., 1999). Auch hier läßt sich das HtH1 wie das KLH1 durch selektive Dissoziation des HtH2 aus dem Gemisch beider Isoformen als intaktes Molekül isolieren (Keller et al., 1999). Die FUs beider Isoformen lassen sich proteolytisch voneinander abspalten und zeigen in der 2D-Immunelektrophorese einzelne Präzipitate. Die Spaltprodukte konnten ihren Positionen innerhalb der Polypeptidkette zugeordnet werden (Keller et al., 1999; Lieb et al., 1999). Dabei wurden die erhaltenen Spaltprodukte N-terminal ansequenziert. So liegen von den meisten FUs vom HtH die N-terminalen Anfangssequenzen vor. Tabelle 1 zeigt die N-terminalen Anfangssequenzen der einzelnen FUs von HtH1 und HtH2 zusammen mit den über SDS-PAGE bestimmten Molekülmassen der proteolytisch erhaltenen Fragmente.



Tab. 1: N-terminale Anfangssequenzen der einzelnen FUs des HtH und ihre in der SDS-PAGE bestimmten Molekülmassen (Keller et al., 1999; Lieb et al., 1999).

FU	N-terminale Anfangssequenz	Molekülmasse [kDa]
HtH1- <i>a</i>	DNVVRKDVSHLTDDEVQ	53
HtH1- <i>b</i>	?	48
HtH1- <i>c</i>	FEDEKHSRLRIRKNVDSLTPPEETNELR	46
HtH1- <i>d</i>	VEEVTGASHIRKNLNDLNTGEM	40
HtH1- <i>e</i>	ILDHDHEEEIILVRKNIIDLSP	49
HtH1- <i>f</i>	KLNSRKHTPNRVRHELSSLSSRDIASLKA	50
HtH1- <i>g</i>	DHQSGSIAGSGVRKDVNTLTKAETDNLRE	45
HtH1- <i>h</i>	DEHHDDRLADVLIIRKEVDFLSLQEANAIKD	60
HtH2- <i>a</i>	SVDTVIXKNVDNLxD	?
HtH2- <i>d</i>	DEVVTAASHI	50
HtH2- <i>e</i>	PDGHSDDI	53
HtH2- <i>g</i>	ANIAGSGV	43
HtH2- <i>h</i>	VTRQXTDGNA	59

Der Biosyntheseort des Hämocyanins bei *Haliotis tuberculata* liegt in den sogenannten Porenzellen. Da die Porenzellen bei *Haliotis* vermehrt im Bindegewebe des Mantels zu finden sind, wurde in unserer Arbeitsgruppe RNA aus dem Mantelgewebe von über dreißig Individuen präpariert und damit eine cDNA-Bank erstellt. Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich aus dieser cDNA-Bank über Antikörperscreening einen cDNA-Klon isolieren, der Teile der für HtH1 kodierenden cDNA enthält. Dieser Klon, *hth1-(g)h*, kodierte für etwa 60 Aminosäuren des C-terminalen Endes der funktionellen Domäne HtH1-*g* und für die vollständige HtH1-*h*. Einen ähnlichen Klon isolierte und sequenzierte Henning Keller in unserem Labor (Keller et al., 1999). Henning Keller konnte im Rahmen seiner Doktorarbeit aus diesem cDNA-Klon eine Sonde herstellen, mit der er *in situ*-Hybridisierungen an Geweben von *Haliotis tuberculata* durchgeführt hat. So konnte er die Hämocyanin-mRNA in Porenzellen nachweisen und somit den Biosyntheseort eindeutig identifizieren (Albrecht et al., Publikation in Vorbereitung).

Neben der in dieser Arbeit beschriebenen Analyse der Primär- und Genstruktur der beiden HtH-Isoformen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen zum Dissoziations-Reassoziationsverhalten (Harris et al., 2000) wurde in unserer Arbeitsgruppe auch die Quartärstruktur des HtH1 eingehend untersucht. Ausgehend von kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen der HtH1-Didekamere konnte die 3D-Struktur



über Computerrekonstruktionen bis zu einer Auflösung von 12 Å aufgeklärt werden (Meissner et al., 2000). Es zeigt sich hier erstmalig der Verlauf eines Untereinheiten-Dimers innerhalb des Zylinders. Eine solche Computerrekonstruktion des HtH1 ist in Abbildung 4 dargestellt. Dabei ist das Untereinheiten-Dimer farbig hervorgehoben. In einem Schnittbild durch das Dekamer sind die Strukturen zu sehen, die den inneren Kragenkomplex bilden.

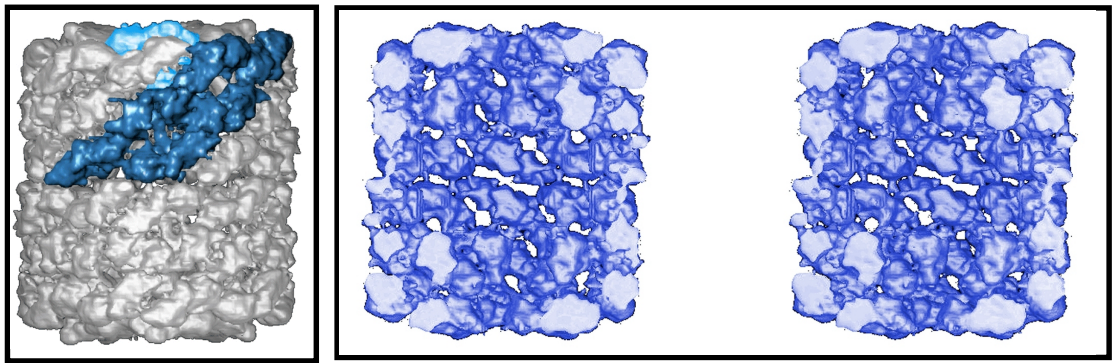


Abb. 4: 3D-Rekonstruktion des HtH1-Didekamers.

Links ist die Computerrekonstruktion des HtH1-Didekamers mit einer Auflösung von 12 Å zu sehen. Das Untereinheiten-Dimer ist farbig hervorgehoben. Rechts ist ein Computer-generiertes Schnitt durch das Didekamer als Stereo-Bild dargestellt (Meissner et al., 2000). Diese Bilder wurden mir freundlicherweise von Ulrich Meißner zur Verfügung gestellt.



➤ **Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die vollständige Primär- und Genstruktur des HtH1 zu ermitteln. Da das Hämocyanin von *Haliotis tuberculata* aus zwei Isoformen besteht, sollte parallel zur Analyse des HtH1 damit begonnen werden, die Primärstruktur des HtH2 zu sequenzieren. Die erhaltenen Daten sollten zusammen mit denen von *Octopus dofleini* (Billiald et al., 1990; Cuff et al., 1998; Lamy et al., 1993; Lamy et al., 1986; Lamy et al., 1987; Miller et al., 1998) ein umfassenderes und detaillierteres Bild über die Struktur, die Verwandtschaft und die Evolution der Mollusken-Hämocyanine geben.

Da alle bisherigen Versuche, die Hämocyanin-cDNA der nahe verwandten Art *Megathura crenulata* zu isolieren und zu sequenzieren ohne Erfolg geblieben waren, sollte wenn möglich neben den Untersuchungen am HtH noch ein Weg gefunden werden, die Primärstruktur des KLH zu ermitteln. Das besondere Interesse bei der Analyse des KLH liegt im Wesentlichen in seiner medizinischen und immunologischen Bedeutung, die eingangs erläutert wurde. Dieser Teil der Arbeit wurde finanziell von der Firma Biosyn (Fellbach) unterstützt, die das KLH in zwei Formen kommerziell vertreibt (*Vacmune*[®] und *Immucothel*[®]).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten wurden in enger Zusammenarbeit zwischen mir und meinem betreuenden Assistenten Bernhard Lieb erstellt. Da wir im Verlauf der Arbeit in ständigem Austausch sowohl in Bezug auf die Labortätigkeit als auch bei methodischen und strategischen Fragen gestanden haben, ist es nicht möglich, die Einzelergebnisse voneinander zu trennen. Wenn ich im Folgenden im Plural spreche, so meine ich damit die von Bernhard Lieb und mir durchgeführten Arbeiten und die erhaltenen Daten. Desweiteren wurden Teile der hier dargestellten Ergebnisse von den von Bernhard Lieb und mir mitbetreuten Diplomanden Sigmar Stricker und Christian Awenius erarbeitet. Diese Teilergebnisse sind gekennzeichnet.



B. Material und Methoden

1. Versuchstiere

1.1. Systematische Stellung der Versuchstiere

Die beiden untersuchten Mollusken-Arten gehören innerhalb der Klasse der Gastropoda zur Unterklasse der Streptoneuren oder Prosobranchia. *Haliotis tuberculata* und *Megathura crenulata* gehören zur Ordnung der Diotocardia oder Archaeogastropoda. Die Diotocardia trennen sich unter anderem in die Überfamilie der Pleurotomariacea (Paarkiemer), zu denen die Familie der Haliotidae gehört, deren einzige Gattung *Haliotis* darstellt. Eine weitere Überfamilie ist die der Fissurellacea (Lochschnellen), in der die Gattung *Megathura* innerhalb der Familie der Fissurellidae (Schlüssellochschnellen) steht.

1.2. *Haliotis tuberculata*

Haliotis tuberculata lebt benthisch im Sublithoral und in der Flachwasserzone felsiger Küstenabschnitte und bevorzugt eine Tiefe zwischen 9 und 12 Metern. Sie ist die für den Ärmelkanal typische Art und an allen felsigen Küsten Großbritanniens, der Kanalinseln und Frankreichs zu finden. Vereinzelt tritt *Haliotis tuberculata* auch im Mittelmeer auf, wo *Haliotis lamellosa* allerdings die vorherrschende Art ist. Als nachtaktiver Weidegänger verstecken sie sich tagsüber in engen Spalten und auf der Unterseite von Steinen oder Felsen. Nachts sind die Tiere sehr aktiv und weiden mit ihrer Radula Makroalgen von Felsoberflächen ab. In Gefangenschaft lassen sie sich problemlos mit Seetang füttern, den sie mit ihrem starken Fußmuskel festhalten.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere der Art *Haliotis tuberculata*, die mir freundlicherweise von der Firma Biosyn (Fellbach) zur Verfügung gestellt wurden, stammten entweder aus Wildfängen von der französischen Atlantikküste oder aus einer Nachzucht vom S. M. E. L. (Syndicat Mixte d'Équipement du Littoral, Blainville sur Mer, Frankreich).

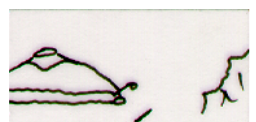




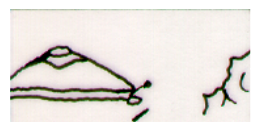
Abb. 5: *Haliotis tuberculata* (grünes Seeohr, Abalone).

1.3. *Megathura crenulata*

Die Art *Megathura crenulata* lebt an der Pazifikküste Südkaliforniens und Mexikos unmittelbar unter der Brandungszone zwischen 3 und 12 Metern Tiefe. Sie ist ausschließlich auf felsigem Grund zu finden und bevorzugt Zonen mit permanenter Wasserbewegung. Mit ihrem starken Fußmuskel heften die Tiere sich an ihrem Untergrund fest und weiden mit ihrer Radula Makroalgen und tierischen Bewuchs ab. Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden uns freundlicherweise von der Firma Biosyn (Fellbach) zur Verfügung gestellt. Die in Kalifornien präparierten Tiere stammten von George Kelly und Richard Rode (Marinus, Long Beach, USA).



Abb. 6: *Megathura crenulata* (Kalifornische Schlüssellochschncke).



1.4. Hälterung

Die marinen Schnecken wurden in 300 Liter-Aquarien mit Meerwasser (3,5 % Instant Ocean, Aquarium Systems, Sarrebourg, Frankreich) bei konstant 17°C gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus lag bei jeweils 12 Stunden. Die Arten *Haliotis tuberculata* und *Megathura crenulata* wurden mit Seetang (Haitai Deutschland GmbH, Nettal) einmal pro Woche gefüttert.

2. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität bezogen und stammen, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Biomol (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Gibco Life Technologies (Karlsruhe), ICN Biomedicals (Meckenheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg).

3. Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.1. Präzipitation von Nukleinsäuren

In Anwesenheit von niedrigen Konzentrationen einwertiger Kationen bilden Nukleinsäuren ein Präzipitat, das sich durch Zentrifugation gewinnen läßt. Die zu präzipitierende Nukleinsäureprobe wurde mit einer Lösung einwertiger Kationen (Konzentration siehe Tabelle 2) gemischt, mit 2,5 Volumen Ethanol (absolut) oder 0,7 Volumen Isopropanol (absolut) bei -70°C für 60 Minuten oder bei -20°C über Nacht gefällt und anschließend bei 12000 x g für eine Stunde zentrifugiert.

Das Präzipitat wurde in 70% Ethanol gewaschen (Zentrifugation für 5 Minuten) und bei Raumtemperatur getrocknet.

Für anschließende Reaktionen wurden die Nukleinsäuren in entsprechenden Puffern oder in H₂O aufgenommen.



Tab. 2: Kationenkonzentration zur Präzipitation von Nukleinsäuren.

	Stammlösung [M]	Endkonzentration [M]
Ammoniumacetat	10	2,0 bis 2,5
Lithiumchlorid	8,0	0,8
Natriumchlorid	2	0,2
Natriumacetat	3,0 (pH 5,2)	0,3

3.2. Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Um Proteine und einzelne Nukleotide aus einer Nukleinsäurelösung zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurde die Nukleinsäureprobe mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (im Verhältnis 25 : 24 : 1) für 20 Sekunden gemischt (Vortexen) und zur Phasentrennung für 2 Minuten zentrifugiert. Die gefällten Proteine befanden sich danach in der Interphase zwischen organischer und wässriger Lösung. Die Nukleinsäuren blieben in wässriger Phase und wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde dieser Vorgang zweimal mit Chloroform-Isoamylalkohol (im Verhältnis 24 : 1) wiederholt, um restliches Phenol aus der Lösung zu entfernen.

3.3. Präparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979) und anschließender Präzipitation der bakteriellen Proteine mit zwei verschiedenen Systemen nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

- QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen (Hilden)
- Concert™ Rapid Plasmid Purification System der Firma Gibco Life Technologies (Karlsruhe)

Ausgehend von 1,5 ml Flüssigkultur betrug die Ausbeute bei beiden Kits etwa 10 µg reiner Plasmid-DNA.

- Plasmidpräparation nach He et al. (1989)

Geringere Mengen unreiner Plasmid-DNA wurden durch Lyse der Bakterienzellen mit Telt-Puffer und anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe B.3.2, Phenol/Chloroform-



Extraktion von Nukleinsäuren) gewonnen. Da diese Plasmid-DNA stark mit bakterieller RNA und DNA verunreinigt war, eignete sich diese Präparationsmethode lediglich zur Verifizierung rekombinanter Bakterienklone mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese.

Telt-Puffer 2,5 M Lithiumchlorid
 50 mM Tris/HCl
 4% (v/v) Triton X-100
 62,5 mM EDTA

3.4. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen des Typs II sind Enzyme, die Phosphodiesterbindungen von DNA-Molekülen an für sie sequenzspezifischen Stellen zerschneiden. Diese Schnittstellen sind palindromische Sequenzen von typischerweise 4 bis 8 Basenpaaren Länge. Mittlerweile stehen über 150 solcher Restriktionsenzyme kommerziell zur Verfügung, die sich in ihrer Schnittstelle unterscheiden. Es wurden fast ausschließlich Restriktionsendonukleasen der Firma Stratagene (Heidelberg) zum Verdau von DNA verwendet. Die Puffer und deren Konzentrationen wurden für die verschiedenen Restriktionsenzyme nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Der Standard-Restriktionsansatz zum Verdau von Plasmid-DNA war ein 20 µl-Ansatz mit:

200 ng bis 1 µg Plasmid-DNA
1 bis 5 Einheiten (Units) Enzym
(1 Unit schneidet 1µg DNA pro Stunde unter optimalen Bedingungen)
Reaktionspuffer
mit H₂O auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt

Der Erfolg der Restriktion wurde anschließend in einem Agarosegel getestet.

3.5. Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin

Um DNA-Fragmente als Sonden für das Screening von cDNA-Banken sowie für Southern-/Northernblots zu verwenden, mussten die entsprechenden Fragmente mit Digoxigenin (Dig)



markiert werden. Hierfür wurde das Dig High Prime Kit der Firma Boehringer (Mannheim) verwendet.

Das Prinzip dieser Markierungsmethode beruht auf der Anlagerung von hexameren random-Oligonukleotiden an die zu markierenden DNA-Fragmente. Diese Oligonukleotide dienen dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I als Primer zur Synthese des komplementären Stranges. Der verwendete Nukleotidmix enthält neben den vier Nukleosidtriphosphaten (dTTP, dATP, dCTP und dGTP) das mit Digoxigenin modifizierte Nukleosidtriphosphat Dig-dUTP. Das Verhältnis zwischen dTTP und Dig-dUTP ist so eingestellt, daß statistisch jedes 20. bis 25. Nukleotid des neu synthetisierten Stranges mit Digoxigenin markiert ist.

Die zu markierenden DNA-Fragmente stammten zum einen aus Klonen, die aus den cDNA-Banken isoliert wurden. Über Restriktionsverdau wurden die gewünschten cDNA-Fragmente aus den Plasmidvektoren herausgeschnitten. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel konnten die entsprechenden Stücke aus dem Gel ausgeschnitten, extrahiert und direkt für die Markierungsreaktion eingesetzt werden. Zum anderen wurden die zu markierenden DNA-Fragmente über PCR gewonnen. Mittels spezifischer und degenerierter Primer wurden so Stücke aus cDNA-Klonen und aus genomischer DNA amplifiziert. Diese konnten dann nach erfolgter Gelelektrophorese und Gelextraktion zur Markierung eingesetzt werden.

Es wurden pro Markierungsreaktion bis zu 1 µg DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge eingesetzt, nach Angaben des Herstellers mit Digoxigenin markiert, aufgereinigt und die Ausbeute der Reaktion im Vergleich zu einer Standardlösung mit bekannter Dig-Markierung überprüft.

3.6. Gelelektrophorese

➤ DNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,5 bis 2 %-igen horizontalen Agarosegelen versetzt mit 0,01 % Ethidiumbromid-Stammlösung bei einer Spannung von 6V/cm Elektrodenabstand. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TBE verwendet.

Ethidiumbromid ist ein fluoreszierendes, interkalierendes Molekül, das sich in die große Furche der DNA-Doppelhelix einlagert und so die Sichtbarmachung der DNA im UV-Licht



(UV-Transilluminatoren der Wellenlängen 366 und 254 nm, Fa. Bachofer, Reutlingen) ermöglicht.

Als Molekulargewichtsstandard wurde mit Eco RI und Hind III geschnittene λ -Phagen-DNA aufgetragen.

10 x TBE	0,9 M Tris/HCl
	0,9 M Borsäure
	20 mM EDTA
	pH 8,3

Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml
----------------------------	----------

➤ RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in 1 %-igen Agarosegelen, die mit Formaldehyd und MOPS-Puffer gegossen wurden. Die Spannung betrug 6V/cm Elektrodenabstand. Für ein Minigel wurde 0,4 g Agarose mit 4 ml 10 x MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz) und 30 ml H₂O aufgeköcht, auf ca. 50°C abgekühlt, mit 6,8 ml Formaldehyd versetzt und gegossen. Das Formaldehyd verhinderte die Aktivität von RNasen während der Elektrophorese. Als Elektrophoresepuffer diente 1 x MOPS-Puffer.

Die RNA-Proben wurden in einem Volumen von 4,5 μ l mit 10 μ l Formamid, 2 μ l 10 x MOPS-Puffer und 3,5 μ l Formaldehyd bei 70°C für 5 Minuten denaturiert und mit 0,1 Volumen 10 x Beladungspuffer versetzt aufgetragen. Zur Sichtbarmachung der RNA wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese entweder in eine Ethidiumbromid-Lösung (1 x MOPS-Puffer, 0,01% Ethidiumbromid-Stammlösung) gelegt und unter UV-Licht analysiert oder mit Toluidinblau irreversibel gefärbt.

10 x MOPS-Puffer	0,2 M MOPS, pH 7
	50 mM Natriumacetat, pH 7
	10 mM EDTA, pH 8

10 x Beladungspuffer	50 % Glycerin
	0,4 % Bromphenolblau
	0,4 % Xylencyanol
	10 x TBE



3.7. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen beruht bei allen drei verwendeten Methoden auf der selektiven Bindung von DNA an eine Matrix aus Silicagel unter hohen Salzkonzentrationen bei pH-Werten unterhalb von pH 7,5. Im leicht alkalischen Milieu bei pH-Werten größer pH 8 und niedrigeren Salzkonzentrationen lassen sich die gebundenen DNA-Stücke nach Aufreinigung dann wieder ablösen. Bei allen drei Präparationsmethoden können Fragmente von 40 bp bis zu 10 kb extrahiert werden.

- Agarose Gel DNA Extraction Kit der Firma Boehringer (Mannheim)
- QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden)
- Concert™ Gel Extraction Systems der Firma Gibco Life Technologies (Karlsruhe)

Die Extraktion erfolgte nach Angaben des jeweiligen Herstellers. Variationen bestanden lediglich im Volumen des Elutionspuffers, mit dem die extrahierten und gereinigten DNA-Fragmente von der Matrix abgelöst wurden. Dieses Volumen richtete sich nach Verwendungszweck und weiterer Bearbeitung der extrahierten Fragmente und schwankte zwischen 10 und 50 µl.

4. Allgemeine mikrobiologische Arbeiten

4.1. Bakterien und Vektoren

➤ Bakterienstämme

Es wurden folgende Bakterienstämme der Art *Escherichia coli* verwendet:

- *E. coli* XL 1 Blue MRF' (Stratagene, Heidelberg)
- *E. coli* XL0LR (Stratagene, Heidelberg)
- *E. coli* M15 (pREP4) (Qiagen, Hilden)

➤ Phagen

Zur Synthese aller cDNA-Banken wurde der ZAP Express Vektor (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Für die in Abschnitt B.10 beschriebene *in vivo*-Excision wurde der ExAssist™ Helfer-Phage (Stratagene, Heidelberg) verwendet.



➤ Plasmidvektoren

Als Plasmidvektoren wurden die folgenden Plasmide benutzt:

- | | |
|---|-------------------------------|
| • pBK-CMV (Stratagene, Heidelberg) | ZAP Express™ cDNA-Banken |
| • pQE 30, 31 und 32 (Qiagen, Hilden) | Proteinexpression |
| • pGEM-T Easy (Promega, Mannheim) | Klonierung von PCR-Fragmenten |
| • pGEM-T (Promega, Mannheim) | Klonierung von PCR-Fragmenten |
| • pBluescript® II SK +/- (Stratagene, Heidelberg) | Subklonierung |

4.2. Nährmedien und Agarplatten

LB-Medium (pro Liter)	10 g NaCl 10 g Tryptone 5 g Hefeextrakt pH 7,0
LB-Agar	20 g Agar-Agar auf 1 Liter LB-Medium
LB-Topagar	0,7 % (w/v) Agarose in LB-Medium
NZY-Medium (pro Liter)	5 g NaCl 2 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 5 g Hefeextrakt 10 g NZ-Amine (Casein-Hydrolysat) pH 7,5
NZY-Agar	15 g Agar-Agar auf 1 Liter NZY-Medium
NZY-Topagar	0,7 % (w/v) Agarose in NZY-Medium

Alle Medien wurden direkt nach ihrer Herstellung bei 121°C (1,0 bar Druck) für 30 Minuten autoklaviert. Agar wurde auf 55°C abgekühlt und etwa 5 mm hoch in Petrischalen gegossen.

Um ein selektives Wachstum von bestimmten Bakterien zu ermöglichen, wurden Medien und Agarplatten nach dem Autoklavieren auf 55°C abgekühlt und mit Antibiotika versetzt. Folgende Konzentrationen an Antibiotika wurden eingesetzt:



Ampicillin	100 mg pro Liter
Kanamycin	12,5 mg pro Liter
Tetracyclin	50 mg pro Liter

Sollten Bakterien mittels Blau-Weiß-Selektion, der so genannten α -Komplementation (Langley et al., 1975), selektiert werden, wurde LB-Agar mit IPTG (Isopropyl- β -D-Galactosid) und X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid) versetzt, autoklaviert und mit einem entsprechenden Antibiotikum in Petrischalen gefüllt.

4.3. Glycerinkulturen

Zur Aufbewahrung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angesetzt und bei -80°C eingefroren. Aus frischen Flüssigkulturen der zu konservierenden Bakterien wurden $500\ \mu\text{l}$ entnommen und mit dem gleichen Volumen Glycerin vermischt. Solche Glycerinkulturen waren für mehrere Monate bei -80°C haltbar.

4.4. Plattenkulturen

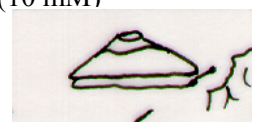
Aus Glycerinkulturen der Bakterien wurden Ausstriche auf Agarplatten hergestellt, die mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt waren. Dazu wurden die Bakterien mit einer sterilen Platinöse auf dem Agar verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend konnten diese Platten über mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

4.5. Flüssigkulturen

Für Flüssigkulturen wurden Einzelkolonien von Agarplatten mit einem sterilen Zahnstocher oder einer Impföse in LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Menge an Medium und Zusatz von Antibiotika sowie anderen Substanzen richtete sich nach Art der Bakterien und dem Verwendungszweck der Kultur.

Flüssigkulturen für Plasmidpräparationen wurden in 3 bis 5 ml LB-Medium angesetzt und mit einem Antibiotikum versetzt.

Für die cDNA-Banken wurden Bakterien in 30 ml LB-Medium mit $300\ \mu\text{l}$ Maltose (20 % w/v) und $300\ \mu\text{l}$ MgSO_4 (1 M) versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Bakterien bei $500 \times g$, 4°C , sedimentiert und in einer sterilen MgSO_4 -Lösung (10 mM)



resuspendiert. Für das Ausplattieren der Banken wurde die Dichte der Bakterien auf eine $OD_{600} \sim 0,5$ eingestellt, für die *in vivo*-Excision wurden Bakterien mit einer Dichte von $OD_{600} \sim 1,0$ verwendet.

4.6. Kompetente Bakterien

Um Plasmide klonieren zu können, mussten sie in Bakterien transformiert werden. Die Bakterien wurden nach einer modifizierten $CaCl_2$ -Methode (Cohen et al., 1972) kompetent gemacht. Dazu wurden Bakterien einer Flüssigkultur (siehe B.4.5) im Verhältnis 1 : 100 in frischem Medium bei $37^\circ C$ inkubiert, bis sie eine $OD_{600} \sim 0,2$ erreicht hatten. Die sich nun in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Bakterien wurden pelletiert (5 Minuten bei $500 \times g$, $4^\circ C$), in 10 ml eiskaltem $MgCl_2$ (0,1 M) resuspendiert, erneut sedimentiert und anschließend in 2 ml eiskaltem $CaCl_2$ (0,1 M) resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden nun für mindestens 30 Minuten auf Eis gehalten und konnten anschließend für die Transformation verwendet werden.

4.7. Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden $100 \mu l$ kompetente Bakterien mit den zu transformierenden Plasmiden (etwa 10 bis 100 ng zirkuläre Plasmid-DNA) gemischt und für mindestens 45 Minuten auf Eis gehalten. Nach kurzem Hitzeschock (1 Minute bei $45^\circ C$) wurde dem Ansatz $900 \mu l$ LB-Medium zugesetzt und die Bakterien bei $37^\circ C$ zur Erholung für 30 Minuten inkubiert. Danach konnten die transformierten Bakterien auf LB-Platten ausplattiert werden, die mit geeigneten Antibiotika zur Selektion rekombinanter Klone versetzt waren.

5. Präparation von RNA

5.1. Gesamt-RNA-Präparation

Die Versuchstiere wurden aus dem Aquarium genommen und in Beuteln auf Eis für etwa 90 Minuten bis zum Tode gekühlt. Danach wurde mit sterilem Präparationsbesteck die Schale entfernt und Gewebe entnommen.



Bei *Haliotis tuberculata* wurde das bindegewebsreiche Mantelgewebe sowie Teile der Kiemen, Bindegewebe der Mitteldarmdrüse und Pericard herauspräpariert und sofort auf Trockeneis gelagert. Je nach Größe der Tiere konnten 100 mg bis zu 1,5 g Gewebe pro Tier präpariert werden.

Die Präparation von *Megathura crenulata* erfolgte auf gleiche Weise, allerdings wurde hier bei großen Individuen hauptsächlich Bindegewebe aus dem Bereich der Mitteldarmdrüse entnommen. Bei mittelgroßen und kleinen Tieren wurde lediglich die Schale entfernt und, sofern möglich, der Eingeweidesack vom Fußmuskel getrennt.

Um die zu präparierende RNA vor Degradation durch RNasen zu schützen, mußten folgende Vorsichtsmaßnahmen getroffen werden:

- Zur Präparation der Gewebe wurden sterile Skalpellklingen sowie autoklaviertes Präparationsbesteck verwendet.
- Das Gewebe wurde auf Trockeneis präpariert und gelagert.
- Die Zerkleinerung und Homogenisation der Gewebestücke wurde in mit DEPC-H₂O (Diethylpyrocarbonat) behandelten und autoklavierten Glasgeräten oder in sterilen Plastikfalkons durchgeführt.
- Alle Puffer und Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt und anschließend autoklaviert, um das DEPC zu entfernen.

Die Ausbeute der RNA-Präparation wurde photometrisch bestimmt. Dabei gilt :

$$1 \text{ OD}_{260} \approx 40 \text{ } \mu\text{g RNA / ml}$$

Der Quotient aus $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ gibt näherungsweise den Grad der Verunreinigung der RNA mit Proteinen. Hier gilt :

$$\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} = 1,8 \text{ bis } 2 \approx \text{saubere RNA}$$

$$\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} < 1,8 \approx \text{mit Proteinen verunreinigte RNA}$$

Um die Qualität der präparierten gesamt-RNA zu testen wurde eine Formaldehyd-RNA-Gelelektrophorese durchgeführt. Siehe hierzu Abschnitt B.3.6, RNA-Gelelektrophorese.

Die gesamt-RNA wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden präpariert.

➤ **RNeasy Maxiprep Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden)**

Bei dieser Präparationsmethode wurde das Gewebe in einem denaturierenden Puffer mit GTC (Guanidinthiocyanat) und β -Merkaptoethanol homogenisiert und lysiert, um die



Aktivität von RNasen während der Präparation zu unterbinden. Hierzu wurde ein autoklavierter, RNase-freier Glas-Douncer verwendet. Die Aufreinigung der RNA erfolgte über eine Säule, deren Silicagel-Matrix unter den gegebenen Bedingungen spezifisch RNA band. Es konnten bis zu 1 g Gewebe eingesetzt werden. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 2 M NaCl und 0,7 Volumen Isopropanol (absolut) über Nacht bei -20°C gefällt.

➤ **Phenol-/Chloroform-Methode** nach Scheller & Karlson (1977)

Zunächst wurde das Gewebe mit einem Ultra-Turrax der Firma Jahnke & Kunkel (Staufen im Breisgau) in TEN-Puffer gründlich zerkleinert und homogenisiert. Es wurden 2 g Gewebe in 20 ml TEN-Puffer homogenisiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Puffer (PCI-Puffer) unter Schütteln bei 4°C für 10 Minuten. Die Lösung wurde in 50 ml Falkons mit Phase-Lock-Gel der Firma Eppendorf (Hamburg) überführt. Das Phase-Lock-Gel (PLG), das zur besseren Phasentrennung von organischer und wässriger Phase diente, wurde vorher für 2 Minuten bei $1500 \times g$ sedimentiert. Die RNA-Lösung wurde für 5 Minuten bei $1500 \times g$ zentrifugiert, die wässrige Phase als Überstand in frische PLG-Falkons überführt und erneut mit 1 Volumen PCI-Puffer extrahiert und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar und somit frei von Proteinen war. Der die RNA enthaltende Überstand wurde in frische Falkons überführt und die RNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 2 M NaCl und 0,7 Volumen Isopropanol (absolut) bei -20°C über Nacht gefällt.

TEN-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,6 10 mM EDTA 0,1 M NaCl 1% Lauroylsarcosinate autoklavieren 200 μg / ml Heparin
CIA-Puffer	Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 24 : 1 mit TEN-Puffer ausschütteln
PCI-Puffer	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Puffer 24 g Phenol 6 ml TEN-Puffer 30 ml CIA-Puffer



5.2. Präparation von poly-A⁺-RNA

Es kamen zwei verschiedene Methoden zur Gewinnung von poly-A⁺-RNA zur Anwendung. Beiden Präparationsmethoden liegt zugrunde, daß die meisten eukaryontischen mRNA-Moleküle im Gegensatz zu anderen RNA-Molekülen (z.B. tRNA, rRNA, snRNA) an ihrem 3'-Ende polyadenyliert sind, also 20 bis zu 250 Adenosin-Nukleotide an ihrem Ende tragen. Mit Hilfe dieses angehängten poly-A⁺-Schwanzes lassen sich mRNA-Moleküle, deren Anteil an der gesamt-RNA in der Regel nur etwa 5 % oder weniger beträgt, spezifisch von allen anderen RNA-Klassen trennen. Die eingesetzte Menge an gesamt-RNA richtete sich nach Präparationsmethode und benötigter poly-A⁺-RNA.

➤ **OligotexTM mRNA Mini-, Midi- und Maxi-Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden)**

Das Verfahren dieser Methode basiert auf der kovalenten Bindung von Oligonukleotiden der Form dC₁₀-T₃₀ (also 10 Cytosinnukleotide und 30 Thyminnukleotide) an Polystyren-Latex-Partikel als Trägermatrix. Diese Oligonukleotid-Polystyren-Latex-Partikel (Oligotex) hybridisieren unter hohen Salzkonzentrationen mit dem poly-A⁺-Schwanz der mRNA-Moleküle. Nach erfolgter Trennung und Aufreinigung dieser Hybride von anderen RNA-Molekülen lassen sich diese ionischen Bindungen durch Erniedrigung der Salzkonzentration lösen und somit die poly-A⁺-RNA wieder von den Oligotex-Partikeln ablösen. Oligotex als Trägermatrix liegt in Form von Zentrifugations-Säulchen vor; die Präparation der poly-A⁺-RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

➤ **PolyAtract[®] mRNA Isolation Systems I (large scale) und IV (small scale) der Firma Promega (Mannheim)**

Diese Präparationsmethode verwendet ein oligo(dT) Oligonukleotid, das an seinem 5'-Ende biotinyliert vorliegt. Dieses Biotin-oligo(dT) Oligonukleotid hybridisiert ebenfalls spezifisch mit dem poly-A⁺-Schwanz der mRNA-Moleküle. Durch Zugabe von Streptavidin, das an magnetische Partikel gebunden ist (Streptavidin-PMP, **paramagnetic particles**), lassen sich die poly-A⁺-RNA-Biotin-oligo(dT)-Hybride in einem magnetischen Feld von anderen RNA-Molekülen trennen und aufreinigen, da Streptavidin sehr effizient an Biotin bindet. Anschließend kann die Bindung durch Erniedrigung der Salzkonzentration gelöst und die poly-A⁺-RNA in RNase-freiem Wasser eluiert werden. Die poly-A⁺-RNA wurde nach Angaben des Herstellers präpariert.



6. Präparation von genomischer DNA

Die Präparation von genomischer DNA erfolgte mit dem DNA Extraction-Kit der Firma Stratagene (Heidelberg). Bei dieser Methode wurden bis zu 500 mg Gewebe homogenisiert. Mit einem speziellen Proteinasegemisch wurden die Zellen und Zellkerne lysiert und die Proteine und Zelltrümmer anschließend gefällt. Es zeigte sich, daß die Ausbeute an genomischer DNA deutlich gesteigert werden konnte, wenn das Gewebe nur wenig mechanisch homogenisiert wurde. Bei großen Zell- und Gewebefragmenten in der Lösung konnte die erforderliche Lyse der Zellen mit Verlängerung der Inkubationszeit erreicht werden. Nach Degradation der RNA durch Zugabe von RNase wurde die genomische DNA mit Ethanol (absolut) gefällt und als „Knäuel“ mit einem Glasstab aufgewickelt und aus der Lösung gezogen. Die Präparation erfolgte weiter nach Angaben des Herstellers. Die vom Hersteller angegebene Menge an zu homogenisierendem Gewebe ließ sich problemlos um ein Mehrfaches erweitern und so die Ausbeute an genomischer DNA pro Präparation erhöhen. Hierbei trat keinerlei Verunreinigung durch Proteine oder RNA auf. Die Ausbeute an genomischer DNA lag bei bis zu 5 mg pro Ansatz. Die DNA wurde in TE-Puffer in einer Konzentration von etwa 350 µg / ml resuspendiert.

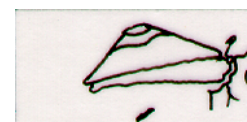
TE-Puffer 10 mM Tris/HCl, pH 7,5
 1 mM EDTA, pH 8,0

7. Verwendete Primer

Alle verwendeten Primer wurden bei den Firmen Gibco Life Technologies (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe), GENAXIS Biotechnology GmbH (Spechbach) und bei GenTech Mainz (Prof. Dr. Hennig, Physiologische Chemie, Universität Mainz) bezogen. Die Auswahl der Oligonukleotide erfolgte mit dem Computerprogramm „Oligo“ sowie diversen im Internet frei zugänglichen Primerkalkulationsprogrammen (siehe B.14, Sequenzauswertung am Computer).

Die in der Regel lyophilisierten Primer wurden in TE-Puffer in einer Konzentration von 100 pmol/µl resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

Eine Tabelle, in der alle verwendeten Primer, mit denen die Sequenzdaten dieser Arbeit gewonnen wurden, aufgelistet sind, ist im Anhang unter F.4 zu finden. Sie sind unterteilt in HtH1-spezifische Primer (numeriert), HtH2-spezifische Primer (mit Buchstaben bezeichnet) und degenerierte Primer (mit kleinen römischen Zahlen numeriert). Die Sequenz der



degenerierten Primer enthält IUPAC-Codes für degenerierte Nukleotide und ist in Abbildung 14, S. 61 näher erläutert.

8. Synthese von cDNA-Banken

Als Ausgangsmaterial stand eine λ -cDNA-Bank zur Verfügung, die mit poly-A⁺-RNA aus dem Mantelgewebe von 30 Individuen der Art *Haliotis tuberculata* hergestellt worden war. Diese von Dagmar Gebauer und Henning Keller hergestellte cDNA-Bank wurde bereits im Rahmen der Doktorarbeit von Henning Keller und meiner Diplomarbeit mit einem Antikörper gegen das Hämocyanin von *Haliotis* erfolgreich gescreent.

Alle cDNA-Banken wurden mit dem cDNA-Synthese-Kit ZAP ExpressTM der Firma Stratagene (Heidelberg) hergestellt und mit dem Gigapack[®] III Gold Verpackungskit der gleichen Firma verpackt.

Die Synthese erfolgte, soweit nicht unter Variationen (siehe B.8.8) vermerkt, nach Angaben des Herstellers. Lediglich die vom Hersteller beschriebenen Kontrollen mit radioaktiv markierten Nukleotiden wurden weggelassen und gegebenenfalls das Reaktionsvolumen und die Pufferkonzentrationen angeglichen.

Die mit dem ZAP ExpressTM cDNA Synthese-Kit erstellten cDNA-Banken sind Expressionsbanken, bei denen die cDNA gerichtet in die Vektorarme kloniert und über den Induktor IPTG die Expression des in der cDNA kodierten Proteins induziert werden kann. Es besteht also die Möglichkeit, die rekombinanten λ -Phagenklone sowohl mit spezifischen, gegen das Zielprotein gerichteten Antikörpern als auch mit spezifischen Nukleinsäure-Sonden zu screenen. Des weiteren bietet das ZAP ExpressTM-System einen einfachen Weg, cDNA-Sequenzen aus den rekombinanten λ -Phagen in wenigen Schritten in ein Plasmid zu überführen. Dieser Schritt wird im Abschnitt *in vivo*-Excision (siehe B.10) genauer erläutert. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Synthese kurz beschrieben; die durchgeführten Variationen des Standardprotokolls sind im Anschluß daran erläutert. Am Ende dieses Abschnitts steht eine tabellarische Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit erstellten cDNA-Banken mit Angaben zu Organismus, Gewebe der RNA-Präparation, Variationen vom Standardprotokoll sowie der verwendeten Primer.



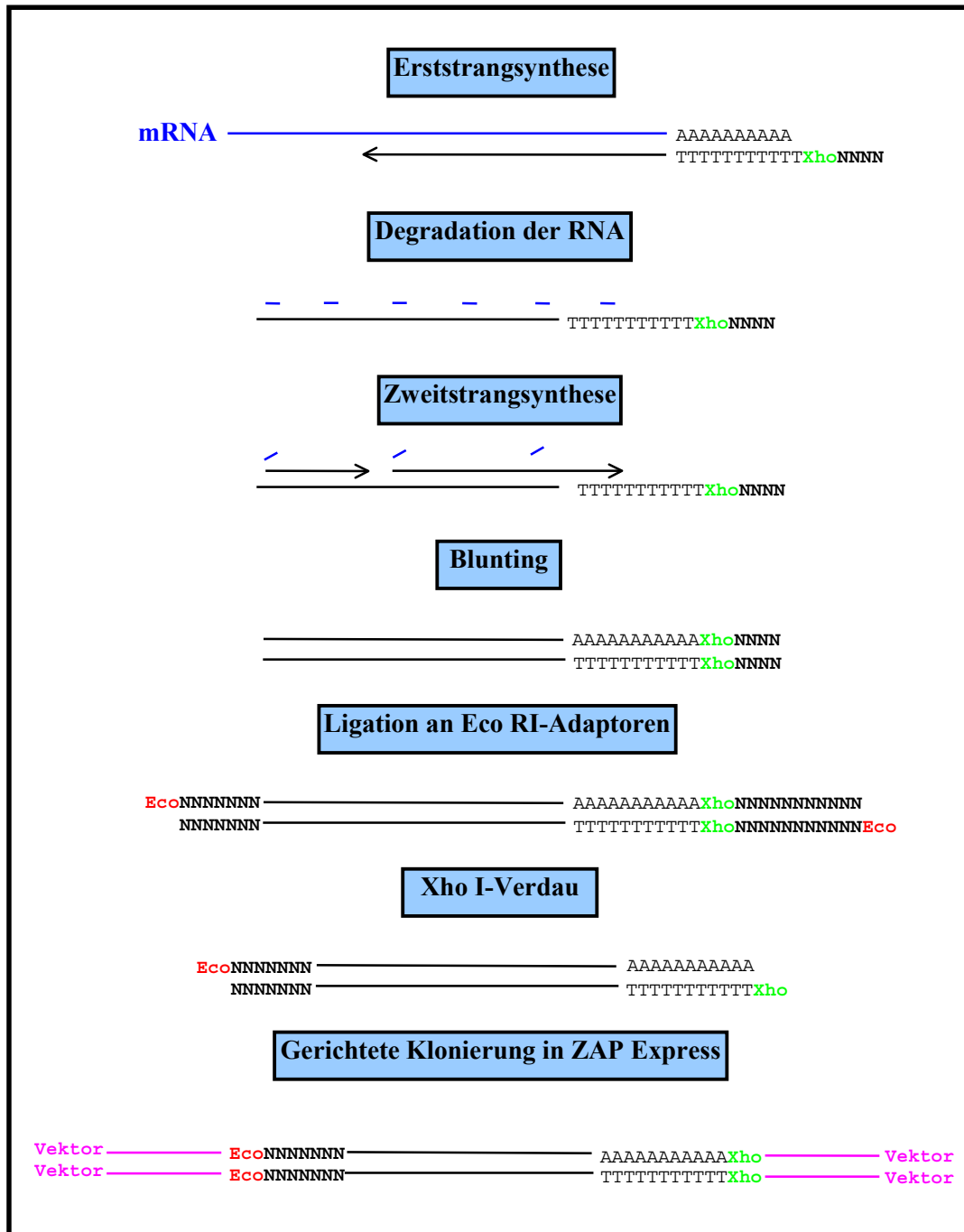
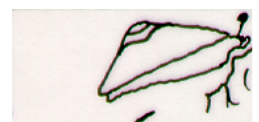


Abb. 7: Schematischer Ablauf der cDNA-Bank-Synthese.

Ausgehend von einem oligo-dT-Primer wird die mRNA von ihrem poly-A⁺-Schwanz mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA überschrieben (Erststrangsynthese). Nach Degradation der mRNA wird die cDNA doppelsträngig gemacht (Zweitstrangsynthese). Dabei dienen Reste der abgebauten mRNA als Primer. Vorhandene Lücken werden geschlossen (Blunting) und anschließend werden an die glatten Enden der cDNA Adaptoren ligiert. Mit Hilfe der im oligo-dT-Primer enthaltenen **Xho I**-Schnittstelle und der aus dem Adapter stammenden **Eco RI**-Schnittstelle kann die cDNA nun gerichtet in die Vektorarme ligiert werden.



8.1. Erststrangsynthese

Es konnten bis zu 5 µg polyA⁺-RNA für die reverse Transkription eingesetzt werden. Um Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören, wurde die Probe für 5 Minuten bei 70°C denaturiert und auf Eis gehalten. Bei allen Arbeiten mit RNA war auf RNase freie Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen zu achten. Nach Protokoll wurden 2,4 µg eines Linkerprimers eingesetzt, der neben der zum poly-A⁺-Schwanz der mRNA komplementären oligo(dT)-Sequenz an seinem 5'-Ende die Schnittsequenz für das Restriktionsenzym Xho I enthielt. Diese ermöglichte nach Restriktionsverdau der doppelsträngigen cDNA die gerichtete Klonierung in die ZAP Express-Vektorarme (siehe Abbildung 7). Des Weiteren wurden für die Erststrangsynthese methylierte Nukleotide verwendet, damit eventuell in der cDNA befindliche Schnittstellen für Xho I bei der zur Klonierung nötigen Restriktion nicht vom Enzym geschnitten wurden. Als Reverse Transkriptase wurde die MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase) verwendet.

8.2. Zweitstrangsynthese

Durch reverse Transkription der RNA ausgehend vom oligo(dT)-Primer sind RNA-DNA-Hybride entstanden, die mehr oder weniger weit vom poly-A⁺-Schwanz am 3'-Ende in die mRNA hinein reichten. Durch Zugabe von RNase H wurde die RNA aus dem Hybrid abgebaut und blieb nur in Fragmenten am neu synthetisierten cDNA-Strang haften. Die Zweitstrangsynthese erfolgte durch das Enzym DNA Polymerase I. Dieses Enzym benötigte für die Reaktion Primer, an denen der zweite Strang dann komplementär zum ersten cDNA-Strang synthetisiert werden konnte. Diese Primer wurden von den RNA-Resten gebildet, die nach Behandlung mit RNase H erhalten geblieben waren. DNA-Polymerase I als Holoenzym beseitigte diese „RNA-Primer“ anschließend durch seine RNase H-Aktivität, wodurch doppelsträngige cDNA-Moleküle entstanden, die an ihren Enden und auch intern durch den Abbau der „RNA-Primer“ noch einzelsträngige Bereiche enthielten. Die Zweitstrangsynthese sowie das anschließende Auffüllen (Blunting) der cDNA-Moleküle erfolgte mit nicht-methylierten Nukleotiden, damit die am 5'-Ende des Linkerprimers gelegene und ebenfalls zum Doppelstrang synthetisierte Schnittstelle für das Restriktionsenzym Xho I erhalten blieb.

8.3. Blunting der cDNA-Enden und Ligation der cDNA an Adaptoren

Durch Zugabe von *Pfu* DNA Polymerase wurden diese Lücken aufgefüllt und es entstanden doppelsträngige cDNA-Moleküle unterschiedlicher Länge mit „glatten“ (blunt ends) Enden. Die Ansätze wurden Phenol/Chloroform-extrahiert und anschließend mit Natriumacetat gefällt. Es folgte die Ligation der gefällten cDNA-Doppelstränge an Eco RI-Adaptoren.



Diese bestanden aus einem 13-mer und einem 9-mer Oligonukleotid die komplementär zueinander waren und ein cohäsives Eco RI-Ende besaßen. Da nur das 9-mer Oligonukleotid phosphorylliert vorlag, nicht aber das 13-mer, konnten diese Adaptoren gerichtet mit ihrer glatten Seite an die cDNA, nicht aber aneinander ligieren.

8.4. Phosphoryllierung der Adaptoren und Restriktionsverdau zur gerichteten Klonierung

Um nun gerichtete Klonierung der mit Eco RI-Adaptoren besetzten cDNA in die Vektorarme zu ermöglichen, musste das jeweilige 13-mer Oligonukleotid mittels der T4 Polynukleotid-Kinase phosphorylliert werden. Nach Restriktionsverdau mit dem Enzym Xho I, welches im Linkerprimer schneidet, nicht aber innerhalb der hemimethylierten cDNA, besaßen die cDNA-Moleküle an beiden Seiten cohäsive Enden; auf der 5'-Seite den Eco RI-Überhang der Adaptoren und auf der 3'-Seite das Xho I-Ende des Linkerprimers.

8.5. Größenfraktionierung und Quantifizierung der cDNA

Durch den Restriktionsverdau der cDNA mit Xho I wurde an einem Ende der Eco RI Adapter und der Rest des Linkerprimers entfernt. Die dabei entstandenen kleinen Fragmente mussten entfernt werden, da diese wie auch die zu klonierende cDNA an beiden Seiten cohäsive Eco RI/Xho I-Enden besaßen und somit ebenfalls in die Vektorarme ligiert worden wären. Des weiteren wurde eine Größenfraktionierung durchgeführt, um die cDNA-Moleküle der Größe nach zu selektionieren. Zu diesem Zweck wurden vom Hersteller zwei verschiedene Methoden der Größenfraktionierung angeboten. Bei der Methode mit Sephacryl S-500 wurde die cDNA auf Säulen mit einer Matrix aus Sephacryl aufgebracht und zentrifugiert. Große cDNA-Fragmente liefen dabei schneller durch die Matrix als kleinere Fragmente. Bei der zweiten Methode fungierte Sepharose CL-2B Gel als Matrix. Es wurde eine Säule aus Sepharose CL-2B Gel hergestellt, die cDNA oben aufgetragen und durchlaufen lassen. Auch hier liefen große Fragmente schneller durch die Matrix als kleine. In beiden Methoden wurden einzelne Fraktionen gesammelt, Phenol/Chloroform-extrahiert und mit Natriumchlorid gefällt.

Die Präzipitate der einzelnen Fraktionen wurden dann in einem geringen Volumen H₂O aufgenommen und die Konzentration der darin enthaltenen cDNA bestimmt. War die Ausbeute der einzelnen Fraktionen gering, wurden jeweils die Fraktionen gepoolt, die potentiell die größten Fragmente enthielten.



8.6. Ligation in die Vektorarme und Verpackung

In einem 10 µl Ligationsansatz wurden bis zu 500 ng cDNA in 1 µg Vektorarme ligiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Für die Verpackung wurden 1 bis 4 µl dieser Ligationsansätze mit dem Verpackungskit Gigapack III Gold (Stratagene, Heidelberg) für etwa zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

Die Ausbeute an rekombinanten Phagen der so entstandenen cDNA-Bank, die so genannte „primäre cDNA-Bank“, wurde in einer Verdünnungsreihe bestimmt. Dazu wurden die Phagenpartikel in SM-Puffer verdünnt und mit Bakterien des *E.coli*-Stammes XL-1 Blue MRF' bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Die Bakterien waren zuvor über Nacht in LB-Medium versetzt mit Maltose (0,2% w/v) und Magnesiumsulfat (10 mM) angezogen und in einer Magnesiumsulfatlösung (10 mM) zu einer $OD_{600} \sim 0,5$ verdünnt worden. Nach Inkubation der Phagen mit den Bakterien wurden sie mit NZY-Topagar versetzt und auf NZY-Agarplatten ausplattiert. Nach 6 bis 8 Stunden bei 37°C waren die Phagenklone als Plaques im Bakterienrasen der Topagarose sichtbar und konnten ausgezählt werden.

SM-Puffer	0,1 M NaCl
	10 mM $MgCl_2 \times 7 H_2O$
	50 mM Tris/HCl
	0,01 % (w/v) Gelatine
	pH 7,5

8.7. Amplifikation der cDNA-Bank

Die primäre cDNA-Bank wurde vollständig auf NZY-Agarplatten mit ca. 20000 pfu (plaque forming units) pro Platte ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und die Phagen auf den Platten mit SM-Puffer eluiert. Die Titer der auf diese Weise amplifizierten cDNA-Banken wurden ebenfalls durch eine Verdünnungsreihe der Phagen bestimmt.

8.8. Variationen (random-primed cDNA-Synthese)

Die bis hier beschriebene Synthese von cDNA-Banken wurde im Wesentlichen bei allen angefertigten cDNA-Banken durchgeführt. Als Variation dieser Methode wurde bei einigen cDNA-Bank-Synthesen nicht der vom Hersteller mitgelieferte oligo-dT-Primer für die Erststrangsynthese verwendet sondern ein Gemisch aus random-Hexanukleotid-Primern und spezifischen Hämocyanin-Primern. Auf diese Weise wurde die mRNA nicht zwangsläufig



vom poly-A⁺-Schwanz, also ihrem 3'-Ende her, in cDNA überschrieben. Die random-Primer lagerten sich bei der Erststrangsynthese an zufälligen Stellen der mRNA an und initiierten hier die reverse Transkription. Die spezifischen Hämocyanin-Primer dienten der reversen Transkription von Hämocyanin-mRNA und sollten somit den Anteil an Hämocyanin-spezifischer cDNA erhöhen. Für die cDNA-Banken **B** und **E** wurden random- und spezifische Primer synthetisiert, die eine Xho I-Schnittstelle enthielten. Die damit synthetisierte cDNA wurde gerichtet in Xho I/Eco RI-vorverdaute Vektorarme ligiert. Die random- und spezifischen Primer, die für die Synthese der cDNA-Bank **Y** verwendet wurden, enthielten keine Xho I-Schnittstelle. Die mit diesen Primern hergestellte cDNA konnte nicht gerichtet in die Vektorarme kloniert werden. Es wurden an die Enden der aufgefüllten, doppelsträngigen cDNA-Stücke Adaptoren ligiert, die ein cohäsives, zur Restriktionsschnittstelle Eco RI kompatibles Ende enthielten. Diese konnten dann in mit Eco RI vorverdaute Vektorarme ligiert werden. Diese cDNA-Banken wurden ausschließlich mit DNA-Sonden gescreent.

8.9. Tabellarische Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit erstellten cDNA-Banken

Die folgende Tabelle listet alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten cDNA-Banken der verschiedenen Organismen auf. Unter dem Punkt „Variationen“ der Tabelle sind die Oligonukleotid-Primer vermerkt, die zur Herstellung der jeweiligen random-geprimten cDNA-Bank verwendet wurden. Die genaue Sequenz dieser Primer findet sich unter F.4 in Tabelle 12, S. 131. Das für die RNA-Präparation herangezogene Gewebe ist ebenfalls aufgeführt. Lediglich die cDNA-Bank **G** ist nicht im Rahmen dieser Arbeit entstanden, sondern lag zu Beginn bereits vor. Sie wurde von D. Gebauer und H. Keller hergestellt.



Tab. 3: Alle im Rahmen dieser Arbeit erstellten und gescreenten cDNA-Banken.

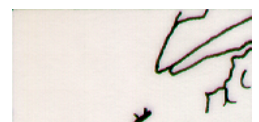
Es sind die Individuenzahlen, aus denen das angegebene Gewebe präpariert wurde, für die jeweiligen Banken angegeben. Desweiteren sind bei den random-geprägten Banken die verwendeten Primer notiert. Die genaue Primersequenz findet sich unter F.4 in Tabelle 12, S. 131. Da bei den cDNA-Banken **A**, **B**, **C**, **D** und **E** auf die Größe der präparierten Schnecken geachtet wurde, sind hier die ungefähren Schalenlängen angegeben. Die cDNA-Bank **G** wurde von D. Gebauer und H. Keller hergestellt und in dieser Arbeit lediglich gescreent.

Bank	Organismus	Gewebe	Variation
A	<i>Megathura crenulata</i> (8 Individuen)	vollständige kleine Tiere (18 bis 32 mm Schalenlänge)	
B	<i>Megathura crenulata</i> (8 Individuen)	vollständige kleine Tiere (18 bis 32 mm Schalenlänge)	random-Xho-Primer, Primer 21 bis 24
C	<i>Megathura crenulata</i> (2 Individuen)	Mitteldarmdrüse und Mantel	
D	<i>Megathura crenulata</i> (2 Individuen)	Mitteldarmdrüse, Mantel, Kieme und Pericard	
E	<i>Megathura crenulata</i> (2 Individuen)	Mitteldarmdrüse, Mantel, Kieme und Pericard	random-Xho-Primer, Primer 21 bis 24
G	<i>Haliotis tuberculata</i> (30 Individuen)	Mantel	
Y	<i>Haliotis tuberculata</i> (? Individuen)	Mantel, Mitteldarmdrüse	random-Hexanukleotide, Primer 8, 9 und 12
Z	<i>Megathura crenulata</i> (2 Individuen)	Mitteldarmdrüse, Mantelgewebe	

9. Plauefilterhybridisierung („Screening“)

9.1. Antikörperscreening

Das cDNA-Synthese-Kit ZAP ExpressTM ermöglicht die Expression der in die Vektorarme ligierten cDNA. Die Expression kann durch Zugabe eines β -Galaktosids induziert werden, da vor der Klonierungsstelle der *lacZ*-Promotor liegt. Da das Enzym Reverse Transkriptase verschieden lange Transkripte synthetisiert und diese nicht in jedem Fall die vollständige mRNA repräsentieren, liegen die entstehenden cDNA-Moleküle nicht immer im richtigen



Leseraster. Die Translation der auf der Fremd-DNA kodierten Proteine erfolgt statistisch nur bei jedem dritten cDNA-Klon. Die restlichen zwei Drittel der cDNA-Klone liegen nicht im richtigen Leseraster. Über Induktion der Expression und folgendes Antikörperscreening können statistisch also nur ein Drittel der cDNA-Klone, die kodierende Teile des gesuchten Proteins enthalten, detektiert und isoliert werden.

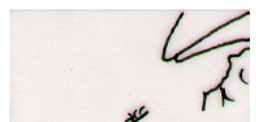
Es standen zwei verschiedene Antiseren gegen das Hämocyanin von *Haliothis tuberculata* und 15 Antiseren und monoklonale Antikörper gegen das Hämocyanin von *Megathura crenulata* zur Verfügung.

Das Antikörperscreening stellt eine Abwandlung der Immunoscreening-Methode nach Sambrook et al. (1989) dar. Es wurden etwa 20000 pfu der cDNA-Banken auf NZY-Agarplatten ausplattiert und für etwa 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit tauchten die ersten Phagenklone als Plaques im Bakterienrasen auf. Nitrozellulosefilter wurden aufgelegt, die zuvor in 10 mM IPTG getränkt worden waren. IPTG fungierte hier als Induktor der Proteinexpression der in die Phagen klonierten Fremd-DNA. Durch weitere Inkubation der Platten bei 37°C für 6 bis 8 Stunden konnten die Fremdproteine auf die Nitrozellulose transferiert werden.

Die Filter wurden von den Platten gezogen, zweimal für 5 Minuten in 1 x TBS gewaschen und mit Magermilchpulver (10 % w/v in TBS) für eine Stunde abgesättigt. Danach erfolgte die Inkubation der Filter mit den anti-Hämocyanin-Antikörpern bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Die Antikörper wurden je nach ihrer Sensitivität gegen ihr Zielprotein in Verdünnungen von 1:1 bis 1:30000 eingesetzt.

Die Filter wurden erneut in TBS gewaschen und mit einem sekundären anti-Ig-Antikörper inkubiert. Da die anti-Hämocyanin-Antikörper aus unterschiedlichen Organismen stammten (Maus, Kaninchen, Meerschweinchen), wurden auch entsprechend verschiedene sekundäre Antikörper verwendet, die spezifisch gegen Immunglobuline eines Tieres gerichtet waren. Diese anti-Ig-Antikörper lagen gekoppelt mit dem Enzym Alkalische Phosphatase vor und wurden in einer 1:7500-fachen Verdünnung eingesetzt.

Nach gründlichem Waschen in TBS wurden die Filter zur Detektion Hämocyanin-spezifischer Klone einer Farbreaktion unterzogen. Dazu wurden sie in AP-Puffer inkubiert, der mit NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) und BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat) versetzt wurde. Es wurden 66 µl NBT-Stammlösung und 33 µl BCIP-Stammlösung für 10 ml AP-Puffer verwendet. Die Farbreaktion des Enzyms Alkalische Phosphatase erfolgte



durch Umsetzung des Substrates BCIP zu einem unlöslichen, blauen Farbstoff unter Anwesenheit des Katalysators NBT. Die Filter wurden so lange inkubiert, bis eine deutliche Blaufärbung eintrat und anschließend in Wasser gespült, um die Reaktion zu stoppen.

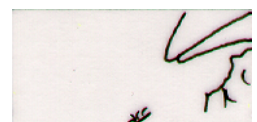
Die auf diese Weise als positiv identifizierten Phagenklone wurden aus dem Agar ausgestochen und in SM-Puffer bei 4°C unter Schütteln eluiert. In weiteren „Runden“ wurden diese positiven Phagenklone so lange vereinzelt bis Einzelplaques gestochen werden konnten.

10 x TBS	100 mM Tris/HCl 1,5 M NaCl pH 7,5
AP-Puffer	100 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl pH 9,5
NBT-Stammlösung	50 mg/ml NBT in 70 % Dimethylformamid
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid

9.2. Sondenscreening

Das Screening mit DNA-Sonden hat gegenüber dem Antikörperscreening den großen Vorteil, daß hier auch solche cDNA-Klone detektiert werden können, die nicht im richtigen Leseraster ins Phagen-Genom kloniert wurden. Allerdings ist für die Herstellung von DNA-Sonden Sequenzinformation der gesuchten cDNA notwendig. Da diese aber in der Regel zu Beginn des Screenings nicht vorhanden ist, eignet sich das Sondenscreening besonders für die Detektion von cDNA-Klonen, nachdem bereits über andere Wege (etwa Antikörper-Screening oder PCR) Teile der gesuchten Sequenz isoliert wurden.

Für das Sondenscreening wurden die cDNA-Banken wie oben beschrieben auf NZY-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden für 30 Minuten gekühlt und die in den Plaques enthaltene Phagen-DNA durch Auflegen von Nylonmembranen transferiert. Die Nylonfilter wurden mit der Plaquesseite nach oben zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA für 10 Minuten auf Whatmanpapier gelegt, das



mit Denaturierungslösung getränkt war. Auf gleiche Weise wurden die Filter mit Neutralisierungslösung neutralisiert und mit 2 x SSC equilibriert. Nach kurzem Antrocknen an der Luft wurden die Filter für 30 Minuten bei 80°C „gebacken“, um die DNA zu immobilisieren.

Die so behandelten Filter wurden in Hybridisierungslösung für eine Stunde bei 68°C geschüttelt, um alle freien Bindungsstellen der Nylonmembran abzusättigen. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit denaturierter Digoxigenin-markierter DNA-Sonde über Nacht bei 68°C in Hybridisierungslösung unter leichtem Schütteln. Dabei wurden etwa 50 ng Dig-Sonde auf 30 ml Hybridisierungslösung eingesetzt.

Nach Hybridisierung wurden die Filter erst bei Raumtemperatur mit 2 x Waschpuffer (2 x 15 Minuten) und dann für eine Stunde bei 68°C in 0,5 x Waschpuffer gewaschen.

Nach weiterer Inkubation der Membranen in Blockierungspuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden sie mit anti-Digoxigenin-FAB-Fragmenten inkubiert. Diese lagen wie die sekundären anti-Ig-Antikörper des Antikörperscreenings als Konjugat gekoppelt mit dem Enzym Alkalische Phosphatase vor. Nach Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden die Filter mit Tween-Puffer gewaschen. Die Farbreaktion und Isolierung positiver Phagenklone erfolgte wie oben beschrieben.

Denaturierungslösung 0,5 N NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung 1 M Tris/HCl
1,5 M NaCl
pH 7,5

2 x SSC 300 mM NaCl
30 mM NaCitrat
pH 7,0

Hybridisierungspuffer 0,1 % Sodium-N-Lauroylsarcosinat
1 % Blockingreagenz (Boehringer, Mannheim)
0,02 % SDS
lösen in 5-fach SSC



2 x Waschpuffer	0,1 % SDS lösen in 2-fach SSC
Blockierungspuffer	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 % Blockingreagenz (Boehringer, Mannheim) pH 7,5
Tween-Puffer	100 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 0,3 % Tween 100 pH 7,5

10. *In vivo*-Excision

Um die in die λ -Phagen klonierte Fremd-DNA aus dem Phagengenom in ein Plasmid zu überführen, bietet das ZAP ExpressTM cDNA Synthese-Kit die so genannte *in vivo*-Excision. F1-Bakteriophagen-Proteine erkennen in den f1-Phagen normalerweise den Replikationsursprung („origin of replication“) für die sense-Strang-Synthese der genomischen DNA. Dieser Replikationsursprung wird unterteilt in eine Initiations- und eine Terminationsstelle. Bei dem für die Herstellung der cDNA-Bank verwendeten ZAP ExpressTM-Vektor (λ -Vektor) wurden Initiations- und Terminationsstelle separat einkloniert und dazwischen befindet sich die Sequenz des Phagemids pBK-CMV, das eine Kanamycinresistenz trägt und das gewünschte cDNA-Insert flankiert.

Für eine *in vivo*-Excision werden *E. coli* XL1-Blue MRF[']-Zellen mit dem Helferphagen ExAssist (f1 Bakteriophage) und dem λ -Vektor ZAP ExpressTM koinfiziert. Innerhalb des Bakteriums erkennen die Proteine des Helferphagen dann die Initiationsstelle in der DNA des λ -Vektors und verursachen dort einen „Nick“ (Kerbe). Ausgehend von diesem „Nick“ beginnt nun die DNA-Einzelstrangsynthese „downstream“ bis zur Terminationsstelle. Der so entstandene lineare DNA-Einzelstrang enthält folglich die Sequenz des pBK-CMV mit dem klonierten Fremd-DNA-Insert.

Mit dem Gen II-Produkt des Helferphagen wird der DNA-Einzelstrang dann zirkularisiert. Durch das Verpackungssignal, das sich innerhalb der Terminationsstelle befindet, wird das so entstandene Phagemid danach in eine Phagenhülle verpackt und sezerniert. Anschließend werden die Bakterien abgetötet.



Um doppelsträngige DNA zu erhalten, infiziert man *E.coli* XL0LR-Zellen mit dem verpackten, sezernierten Phagemid und plattiert diese auf LB-Platten, die Kanamycin enthalten, aus. Jetzt wachsende Kolonien müssen das doppelsträngige Phagemid mit dem cDNA-Insert besitzen. Helfer-Phagen können nicht wachsen, da sie nicht in der Lage sind, sich in Su⁻-Stämmen wie XL0LR zu replizieren.

Die *in vivo*-Excision erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden die im Screening positiven Phagenklone amplifiziert, die Titer bestimmt und 1×10^6 pfu für die *in vivo*-Excision eingesetzt

11. PCR-Techniken

11.1. PCR allgemein

Das folgende Schema soll das allgemeine Prinzip der PCR (**p**olymerase **c**hain **r**eaction) verdeutlichen. Bei jedem Zyklus wird im ersten Schritt die doppelsträngige Template-(Matritzen-) DNA bei 94°C denaturiert. Die Anlagerung (Annealing) der spezifischen Primer an ihre komplementären Sequenzen erfolgt bei einer Temperatur, die abhängig von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer ist. Als Näherung wird die Annealingtemperatur 5°C unter der errechneten Schmelztemperatur der Primer gewählt. Die Synthese der komplementären Stränge ausgehend von den Primern erfolgt bei einer Temperatur von 68 bis 72°C. Anschließend beginnt ein weiterer Zyklus mit der Denaturierung der entstandenen Doppelsestränge. Es folgen 30 bis 40 weitere Zyklen. Auf diese Weise wird die Template-DNA zwischen den spezifischen Primern exponentiell vervielfältigt.



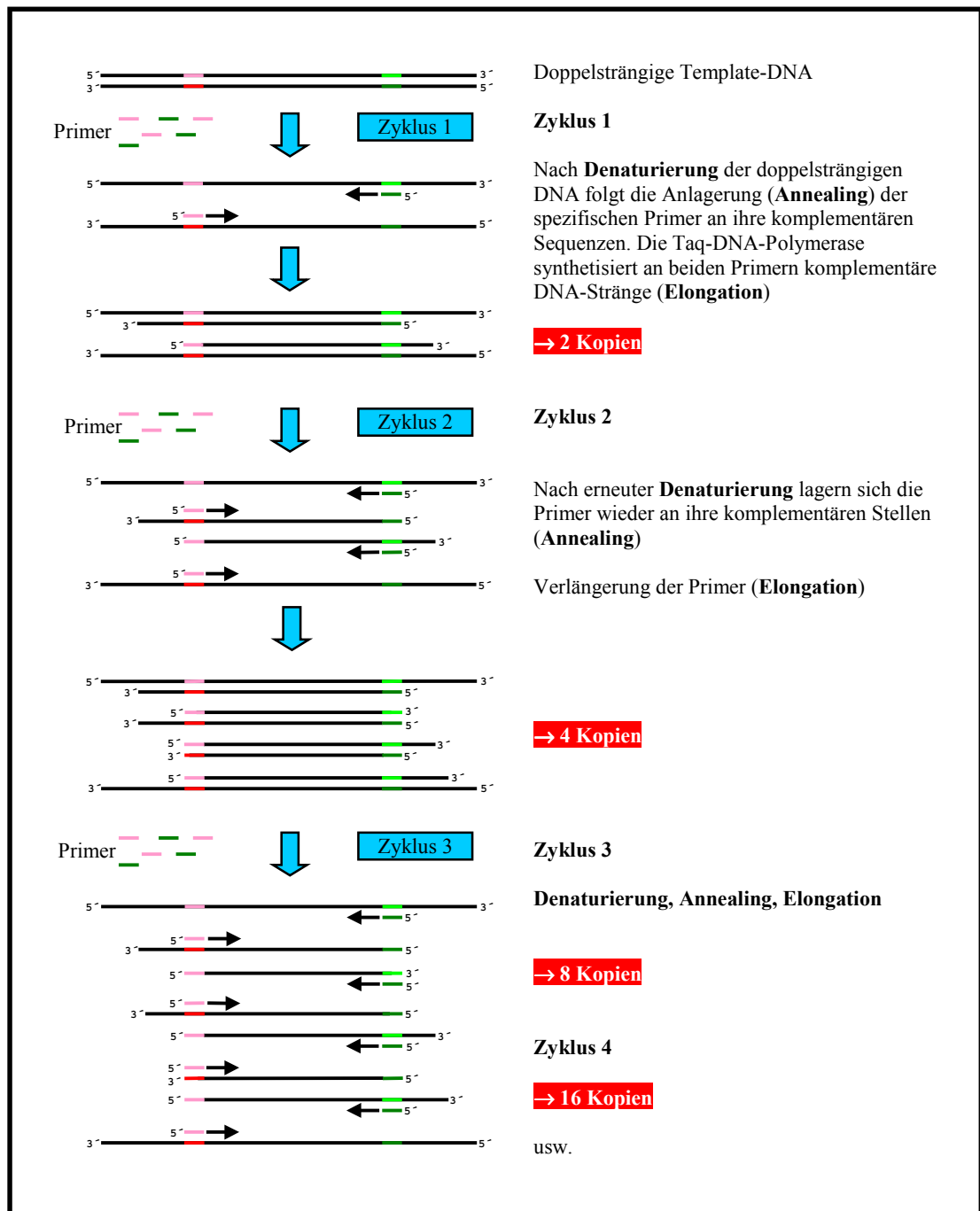


Abb. 8: Ablauf der PCR (Polymerase chain reaction).
 Legende befindet sich neben der Graphik!



Das Temperaturprofil einer typischen PCR-Reaktion ist in Abbildung 9 dargestellt.

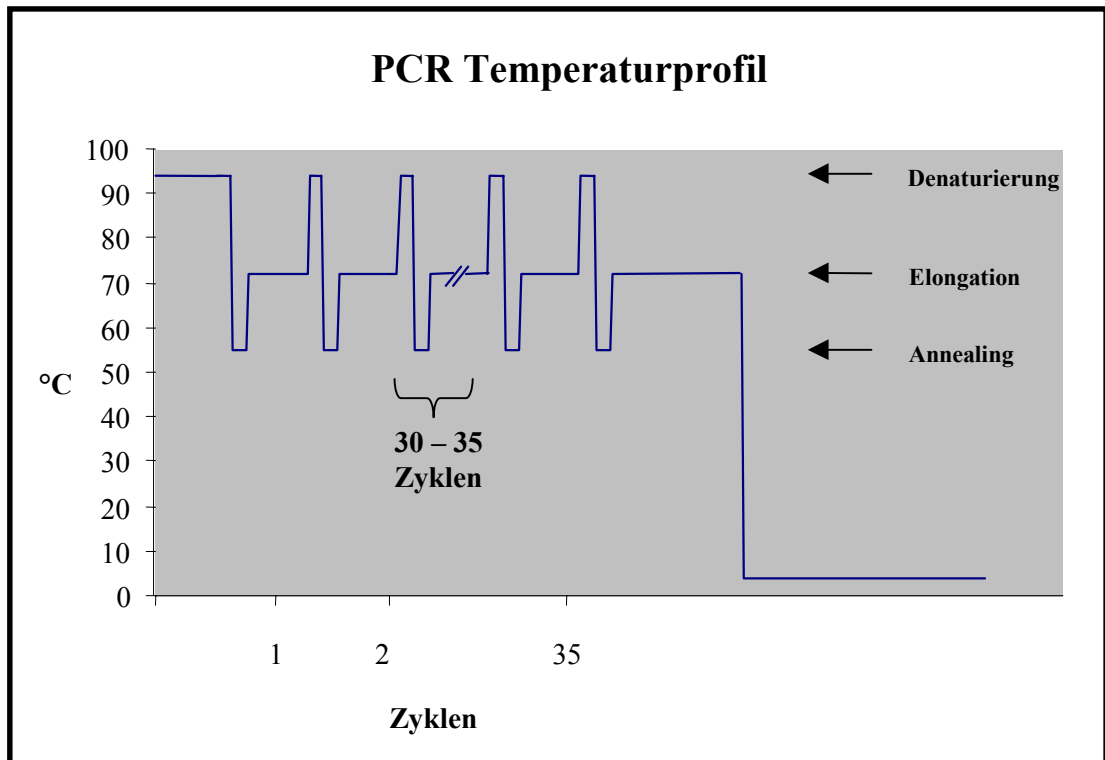


Abb. 9: Ein typisches PCR-Temperaturprofil für die Amplifikation eines 1,5 kb-Fragments.

Die X-Achse stellt hier den zeitlichen Ablauf (in Zyklen) der PCR dar, auf der Y-Achse ist die Temperaturskala angegeben. Jeder Zyklus besteht aus der Denaturierung der doppelsträngigen Template-DNA (30 sec. bei 94°C), gefolgt von der Anlagerung der Primer (Annealing, 30 sec. bei 45-65°C) und der anschließenden Elongation (2 min. bei 72°C). Darauf beginnt ein neuer Zyklus. Gegen Ende wird die PCR auf 4°C gehalten, um unspezifische Reaktionen zu unterbinden.

Die Benennung der Primer erfolgte nach allgemeinem Standard:

- Upstream-Primer (US) initiieren die Synthese eines „sense“-Stranges
- Downstream-Primer (DS) initiieren die Synthese eines „antisense“-Stranges

Die Zyklusbedingungen richteten sich nach der jeweiligen Anwendung und den gegebenen Bedingungen. In der Regel reichten 35 Zyklen zur Amplifikation des gewünschten Fragmentes aus. Da die Aktivität der Taq-DNA-Polymerase mit fortwährenden Zyklen nachließ, wurden die Elongationszeiten ab dem zehnten Zyklus verlängert. Am Ende des letzten Zyklus einer PCR-Reaktion wurde eine weitere Elongationszeit von 2 bis 60 Minuten zugegeben, damit das Enzym alle amplifizierten Stränge vervollständigen konnte. Es ist zu bemerken, daß das Enzym Taq-DNA-Polymerase ans 3'-Ende jedes synthetisierten Stranges



ein einzelnes, überhängendes Adenosinnukleosidtriphosphat anhängt. Die über die PCR mit Taq entstehenden Fragmente sind also nicht mit glatten Enden, sondern an beiden Seiten mit einem 3'-Überhang versehen. Die letzte Elongationszeit wurde auch zur Komplettierung dieses Überhangs verwendet. Besonders bei langen PCR-Produkten (>5 kb) verbesserte eine verlängerte Elongationszeit am Ende der PCR (bis zu 60 Minuten) die Klonierungsfähigkeit der Fragmente.

In der folgenden Tabelle sind die in Abhängigkeit von der Größe des erwarteten PCR-Produktes gewählten Elongationszeiten aufgelistet.

Tab. 4: Elongationszeiten der PCR in Abhängigkeit von der Größe des erwarteten Fragments.
Die Verlängerung des letzten Elongationsschritts um bis zu 60 Minuten erhöht die Klonierungsfähigkeit der entstehenden Fragmente.

Größe des PCR-Fragments (kb)	0,1-2	2-4	4-8	8-12	>12
Elongationszeit (Minuten)	2	4	6	8	10
letzte Elongation am Ende (Minuten)	5	10	20	45	60

Alle PCR-Ansätze wurden in Thermocyclern der Firmen Biometra® (TGradient), Eppendorf (Mastercycler® gradient), MJ Research (Minicycler™) und Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) gecycelt.

11.2. PCR mit genomischer DNA

Die Analyse der Hämocyanin-Gene erfolgte im Wesentlichen über PCR mit genomischer DNA. Dabei wurde folgender Standardansatz verwendet:

- 1 µg genomische DNA
- 100 pmol US-Primer
- 100 pmol DS-Primer
- 2 µl dNTP-Mix (10 mM)
- PCR-Puffer (10-fach konzentriert)
- 1,5-2 mM MgCl₂
- 2,5 Units Taq-DNA-Polymerase



Das Temperaturprofil richtete sich nach der erwarteten Größe des zu amplifizierenden Fragmentes sowie der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Ein typisches Temperaturprofil zur Amplifikation eines Fragmentes von etwa 1,5 kb Größe ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Annealingtemperatur wurde abhängig von den verwendeten Primern gewählt. Sie lag in der Regel 3-5°C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der beiden Primer. Da der Erfolg der PCR-Reaktion auch von anderen Faktoren, wie beispielsweise der $MgCl_2$ -Konzentration oder dem Verhältnis der verwendeten Primer zueinander abhing, sind diese Angaben nur eine grobe Wiedergabe einer Standard-Reaktion. Für einzelne PCR-Ansätze mussten diese Faktoren gegebenenfalls optimiert werden.

Es hat sich gezeigt, daß eine Verlängerung der Elongationszeit am Ende des letzten Zyklus einer PCR die Klonierungsfähigkeit der erhaltenen Fragmente deutlich verbesserte. Besonders bei Fragmenten von über 5 kb Länge wurde der letzte Schritt auf bis zu 60 Minuten ausgeweitet. Diese Verlängerung der Elongationszeit ermöglicht es der Taq-DNA-Polymerase, an jedes entstandene Fragment den oben beschriebenen 3'-Adenosintriphosphat-Überhang zu synthetisieren.

Die PCR-Ansätze wurden in 0,5-2 %-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschten Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten. Nach Extraktion der DNA-Stücke aus dem Gel (siehe B.3.7, DNA-Isolierung aus Agarosegelen) konnten diese dann zur Klonierung bzw. direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden.

Eine Besonderheit der PCR mit genomischer DNA stellte die PCR mit dem Kit Expand™ Long Template PCR System der Firma Boehringer (Mannheim) dar. Dieses PCR-Kit enthielt ein Enzymgemisch aus Taq- und Pwo-DNA-Polymerase. Es diente zur Amplifikation von Fragmenten aus genomischer DNA bis zu einer Größe von 27 kb. Die Ansätze wurden nach Angaben des Herstellers mit 500 ng genomischer DNA und einer Primerkonzentration von 10 pmol pro Primer gecycelt. Es wurde das Puffersystem 1 (1,75 mM $MgCl_2$) des Kits verwendet und die Ansätze mit Mineralöl überschichtet. Ein typisches Temperaturprofil einer solchen Expand-PCR zeigt die folgende Abbildung.



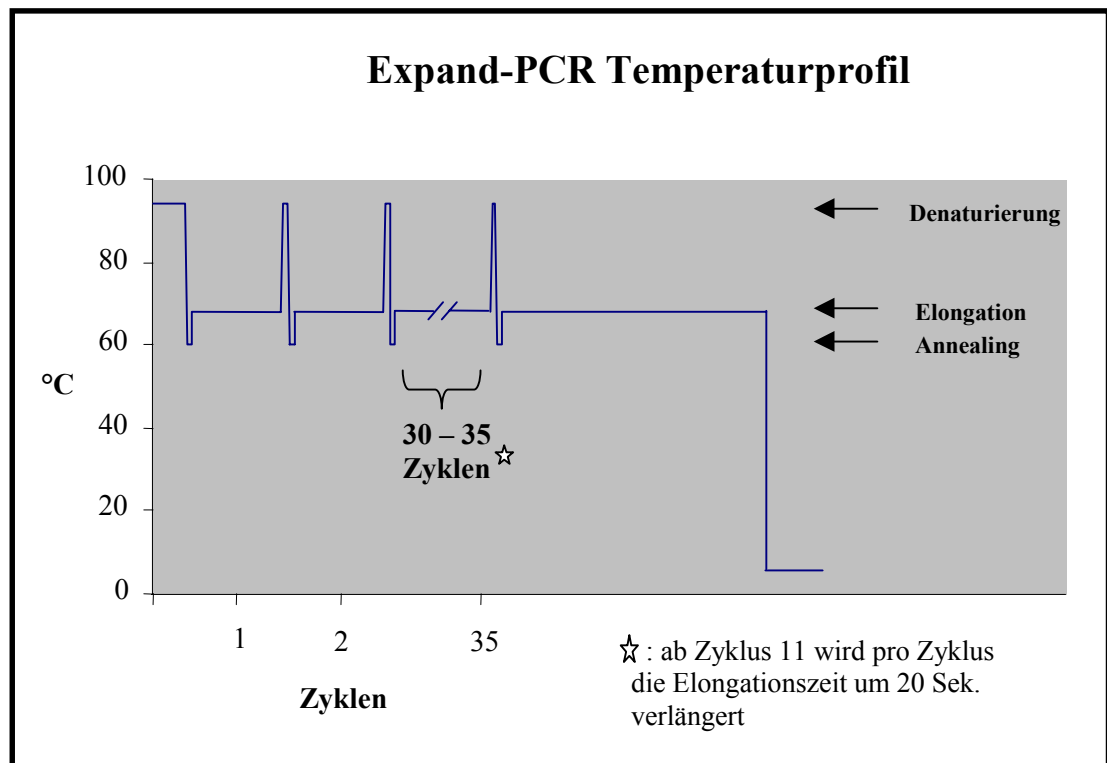


Abb. 10: Ein typisches Temperaturprofil einer Expand-PCR.

Auch bei diesem Temperaturprofil ist wieder der zeitliche Ablauf der PCR (X-Achse) mit der angesteuerten Temperatur (Y-Achse) dargestellt. Ein einzelner Zyklus besteht bei der Expand-PCR aus einer relativ kurzen Denaturierung der doppelsträngigen Template-DNA (10 sec. bei 94°C), gefolgt von der Anlagerung der Primer bei einer Temperatur von 55-65°C. Die Elongation verläuft hier deutlich länger als bei einer „normalen“ PCR, da über die Expand-PCR Fragmente bis zu 20 kb amplifiziert werden können. Das Temperaturoptimum der verwendeten Enzyme liegt bei 68°C. Die letzte Elongationszeit ist abhängig von der Größe des Amplikons und kann bis zu 60 min. betragen.

11.3. PCR mit cDNA

Aus Klonen der cDNA-Banken konnten über PCR bestimmte Sequenzabschnitte für Folgereaktionen amplifiziert werden. Dafür wurden zum Teil Phagenklone direkt verwendet, in der Regel allerdings die in den Plasmidvektor pBK-CMV umklonierte cDNA-Klone eingesetzt. Die auf diese Weise amplifizierten cDNA-Fragmente wurden für zwei unterschiedliche Anwendungen hergestellt. Diese werden im Folgenden genauer beschrieben.

PCR zur Sondenherstellung wurde mit etwa 20 ng Plasmid-DNA durchgeführt. Über spezifische Primer wurden die zur Dig-Markierung gewünschten Fragmente aus den entsprechenden Klonen amplifiziert, im Gel elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel



extrahiert. Die Fragmente konnten dann direkt für die Markierungsreaktion verwendet werden.

Fragmente zur Umklonierung in Expressionsvektoren wurden auf gleiche Weise aus cDNA-Klonen amplifiziert. Um eine Klonierung in die Expressionsvektoren pQE 30, 31 und 32 zu ermöglichen, wurden die spezifischen Primer so modifiziert, daß sie Schnittstellen für geeignete Restriktionsenzyme enthielten. Die Fragmente wurden zuerst in den PCR-Klonierungsvektor pGEM-T-easy ligiert und transformiert. Anschließend konnten die Fragmente mit den in die Primersequenz eingefügten Schnittstellen für Restriktionsenzyme aus dem Plasmid wieder herausgeschnitten werden. Zur Klonierung wurde der Expressionsvektor mit den gleichen Enzymen geschnitten und das gewünschte Fragment hineinligiert.

11.4. PCR mit RNA (RT-PCR)

➤ RT-PCR

Um RNA als Template für PCR-Reaktionen zu verwenden, musste sie anfänglich über das Enzym Reverse Transkriptase (RT) in cDNA überschrieben werden. Daher die Bezeichnung RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR). Anschließend konnte mit der einzelsträngigen cDNA eine PCR durchgeführt werden. Es wurden sowohl gesamt-RNA als auch poly-A⁺-RNA eingesetzt. Zu Beginn einer RT-PCR musste die RNA bei 70°C denaturiert werden, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Die reverse Transkription konnte sowohl mit spezifischen Primern als auch mit einem oligo-dT-Primer durchgeführt werden. Es standen mehrere Reverse Transkriptasen zur Verfügung. Die Reaktionstemperatur konnte mit den verschiedenen Enzymen variiert und auf diese Weise die Spezifität der reversen Transkription optimiert werden. So hatten die MMLV-RT (Stratagene, Heidelberg) und die SuperScriptTM II-RT (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) ein Temperaturoptimum bei 42°C, während das Enzym ThermoScriptTM (Gibco Life Technologies, Karlsruhe) eine reverse Transkription bei einer Temperatur von 50 – 65°C ermöglichte. Höhere Temperaturen bei der reversen Transkription konnten gegebenenfalls die unspezifische Anlagerung der Primer an RNA-Moleküle minimieren. Je nach Enzym wurden die Reaktionen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RT-Reaktionen wurden durch Inkubation bei 85°C abgestoppt und anschließend die RNA durch Zugabe von RNase H degradiert. Variable Mengen einzelsträngiger cDNA konnten in folgenden PCR-Reaktionen amplifiziert werden.



Neben den erwähnten Enzymen als Einzelkomponenten wurden zwei Kits für die RT-PCR verwendet.

➤ Titan One Tube RT-PCR

Das Titan One Tube RT-PCR System der Firma Boehringer (Mannheim) ermöglicht es, die reverse Transkription mit anschließender PCR in einer Reaktion anzusetzen. Das Kit enthält die AMV-RT zur reversen Transkription und die Enzyme Taq- und Pwo-DNA-Polymerase zur Amplifikation der entstehenden cDNA-Einzelstränge in der PCR. Der Reaktionspuffer wurde für alle Enzyme in einer Reaktion optimiert. Es wurden 1 µg gesamt-RNA eingesetzt und nach Angaben des Herstellers verfahren. Es wurden spezifische und degenerierte Primer verwendet. Das Temperaturprofil einer solchen Titan-RT-PCR zeigt die Abbildung 11. Die erhaltenen Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und kloniert.

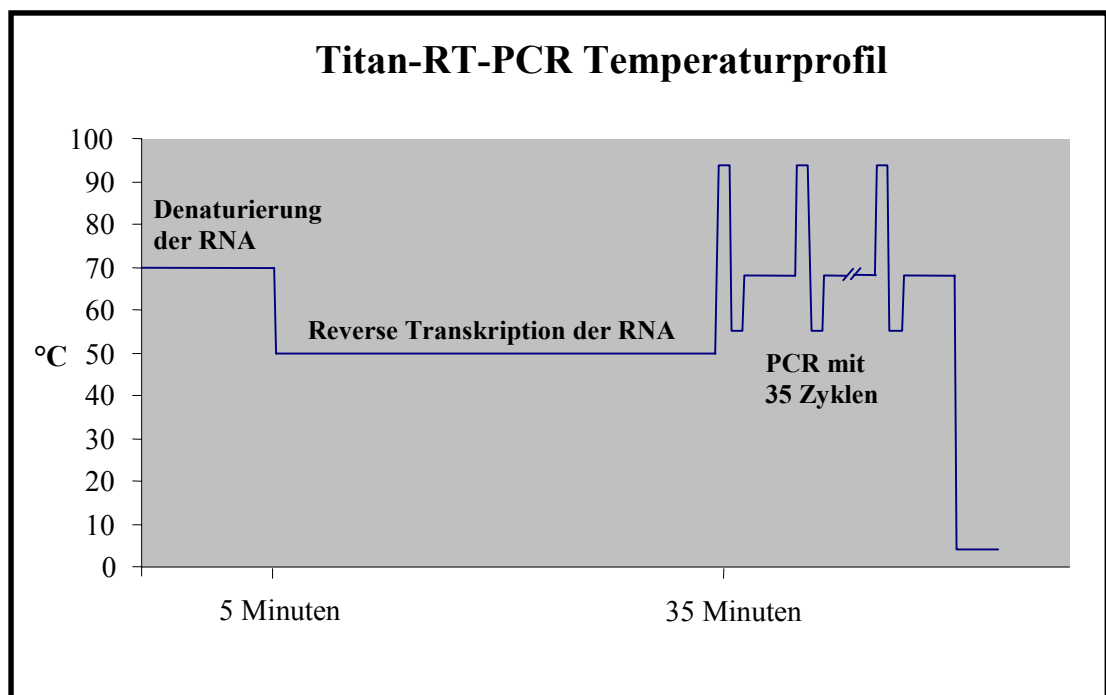


Abb. 11: Temperaturprofil einer Titan-RT-PCR.

Nach Auflösen der Sekundärstrukturen der RNA (Denaturierung bei 70°C für 5 min.) erfolgte die reverse Transkription für 30 min. bei 50°C. Im Anschluß daran folgte eine PCR mit 35 Zyklen zur Amplifikation der bei der reversen Transkription entstandenen cDNA.



➤ **5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)**

Das 5'-RACE-System der Firma Gibco Life Technologies (Karlsruhe) stellt eine Variation der RT-PCR dar. Es ermöglicht die Amplifikation von Fragmenten aus dem 5'-Bereich einer mRNA, dessen Sequenz unbekannt ist. Auch hier ist der erste Schritt die reverse Transkription der mRNA ausgehend von einem spezifischen Primer. In einem zweiten Schritt wird die entstandene einzelsträngige cDNA an ihrem 3'-Ende durch das Enzym Terminale Transferase mit einem poly-dC-Schwanz versehen (Tailing). Mit einem spezifischen DS-Primer und einem oligo-dG-US-Primer, der an den poly-dC-Schwanz bindet, kann über PCR das dazwischenliegende, unbekannte Fragment amplifiziert werden. Der Ablauf einer 5'-RACE ist in Abbildung 12 dargestellt.



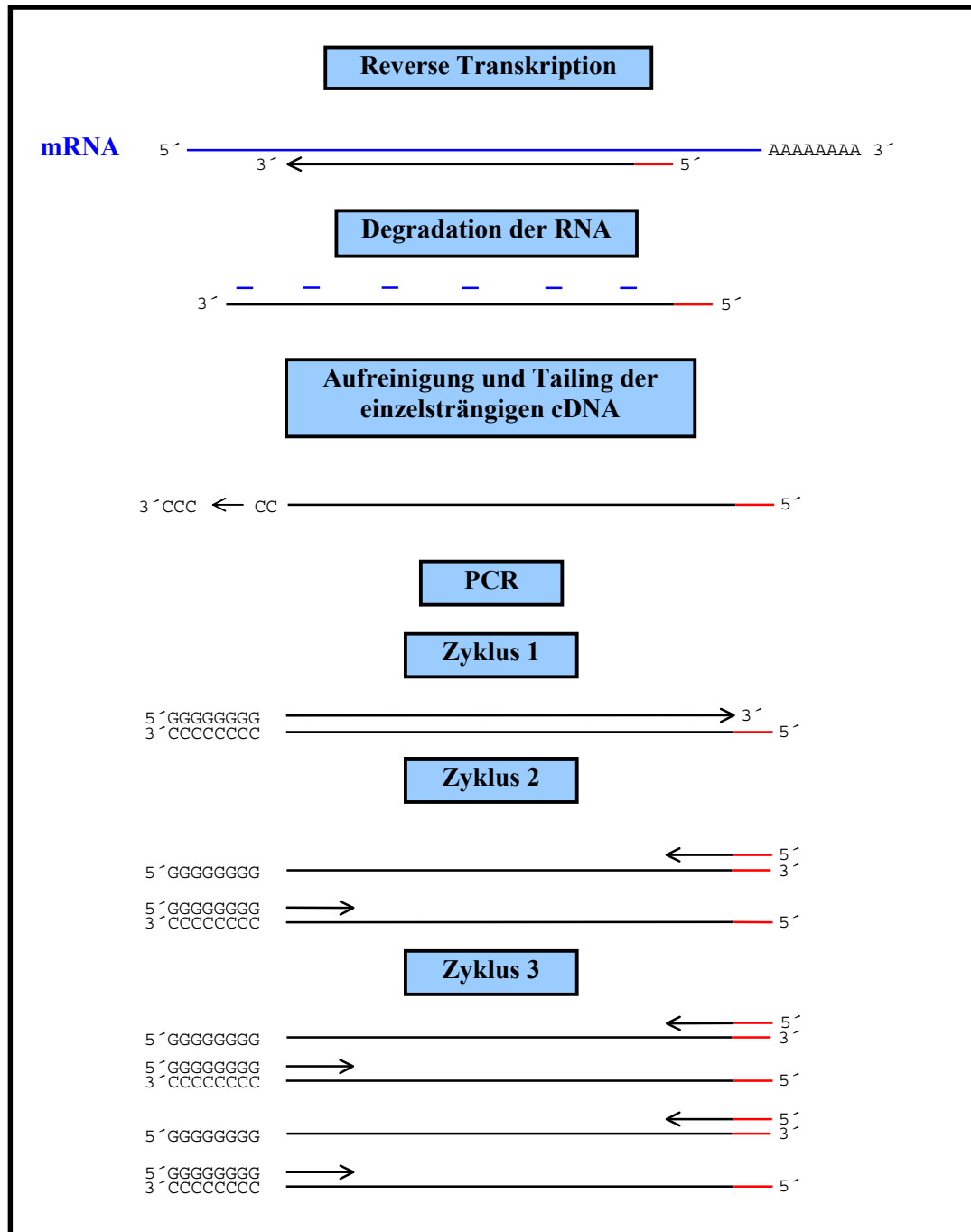


Abb. 12: Ablauf der 5'-RACE (Rapid amplification of cDNA ends).

Die mRNA wird ausgehend von einem spezifischen Primer (rot) in cDNA überschrieben (Reverse Transkription). Nach Verdau der RNA wird die einzelsträngige cDNA durch das Enzym Terminale Transferase mit einem oligo-dC-Schwanz versehen. Dieser dient in der folgenden PCR als komplementäre Anlagerungsstelle für den eingesetzten oligo-dG-US-Primer. Auf diese Weise kann der 5'-gelegene, unbekannte Teil einer mRNA amplifiziert werden.

Das Kit wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden 1 bis 5 µg gesamt-RNA für die reverse Transkription bei 42°C eingesetzt. Die Aufreinigung der einzelsträngigen



cDNA erfolgte mit den im Kit enthaltenen GlassMAX cDNA Isolations-Säulchen. Verschiedene Mengen von einzelsträngiger cDNA wurden den Angaben gemäß der Tailing-Reaktion unterzogen und anschließend für die PCR eingesetzt. Die erhaltenen Fragmente wurden in Agarosegelen analysiert und in PCR-Vektoren kloniert.

11.5. Klonierung von PCR-Fragmenten

Die gewünschten PCR-Fragmente konnten nach elektrophoretischer Auftrennung und anschließender Gelextraktion in Plasmidvektoren ligiert werden. Dafür wurde zuerst die Konzentration der extrahierten DNA bestimmt, um ein optimales Mengenverhältnis von Vektor : Insert von 1 : 3 einstellen zu können. Zur Klonierung von PCR-Fragmenten wurden folgende Vektoren verwendet:

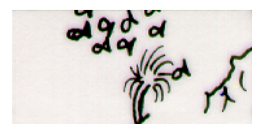
- pGEM-T Easy (Promega, Mannheim)
- pGEM-T (Promega, Mannheim)

Die Plasmidvektoren lagen linearisiert vor und trugen an beiden Enden ein 5'-überhängendes dTTP-Nukleosidtriphosphat. Damit waren sie kompatibel zur Klonierung von PCR-Produkten, die ein 3'-überhängendes Adenosintriphosphat an beiden Seiten trugen.

Reaktionsansatz (10 µl):

- 1 µl Vektor (50 ng / µl)
- X µl PCR-Fragment
- 5 µl 2 x Ligationspuffer bzw.
- 1 µl 10 x Ligationspuffer
- 1 µl T4-DNA-Ligase (3 U / µl)

Gegebenenfalls wurde mit H₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und die Ligation über Nacht bei 4°C inkubiert. Diese Ligationsansätze wurden vollständig in kompetente Bakterien des *E.coli* Stammes XL-1 Blue MRF' transformiert und auf IPTG / X-Gal-haltigen LB-Agarplatten mit Ampizillin ausplattiert. Über Blau-Weiß-Selektion konnten solche Bakterienklone identifiziert werden, die erfolgreich transformiert waren. Diese Bakterienkolonien wurden als Flüssigkulturen vermehrt, die Plasmide präpariert und über Restriktionsverdau und Gelelektrophorese der Erfolg der Ligation getestet. Siehe hierzu auch die entsprechenden Abschnitte Transformation kompetenter Bakterien, Flüssigkulturen, Präparation von Plasmid-DNA, Restriktionsverdau und DNA-Gelelektrophorese.



12. Blotting von Nukleinsäuren

12.1. Southernblot

Für die Detektion von DNA-Fragmenten auf Nylonmembranen erfolgte zunächst eine Gelelektrophorese. Um das Gel zu blotten, wurde es in Denaturierungslösung gelegt, anschließend neutralisiert und in 2 x SSC equilibriert. Der Aufbau eines Southernblot ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Gele wurden über Nacht geblottet und die DNA durch Inkubation bei 80°C für 30 Minuten auf der Nylonmembran fixiert. Der Transferpuffer war 20 x SSC. Die Hybridisierung und Detektion erfolgte wie in Abschnitt B.9.2, Sondenscreening, beschrieben.

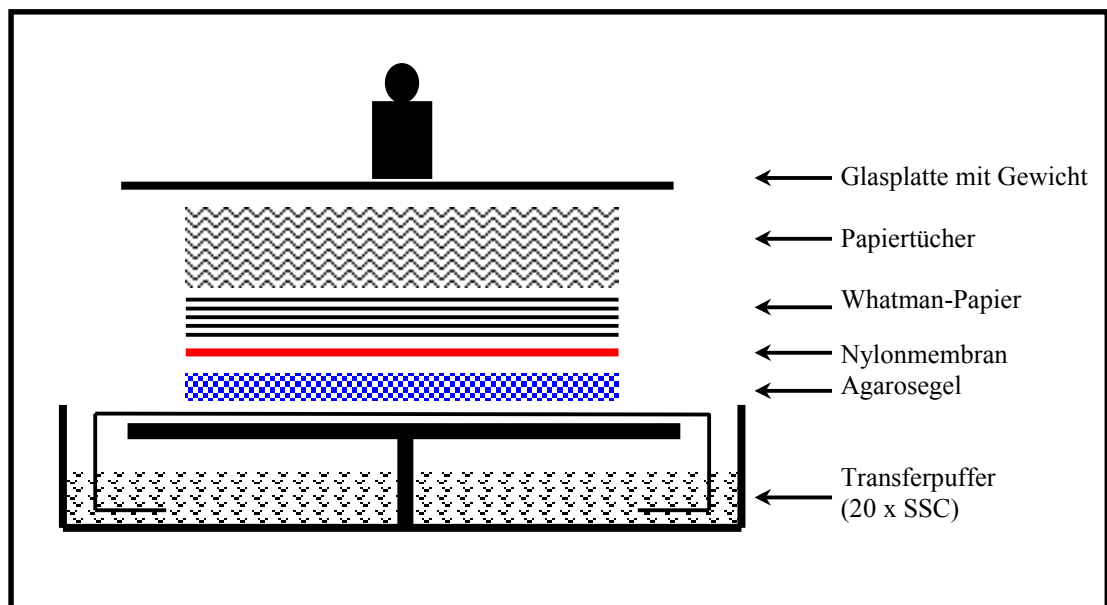


Abb. 13: Aufbau eines Southernblot/Northernblot.

Das zu blottende Gel wird auf ein Whatmanpapier gelegt, das in den Transferpuffer hineinreicht. Auf dem Gel wird die Nylonmembran plaziert und darüber folgen einige Schichten Whatmanpapier sowie ein Stapel einfacher Papiertücher. Zum Beschweren wird eine Glasplatte mit einem Gewicht aufgelegt. Der Transferpuffer (20 x SSC) wird durch Kapillarkräfte aus dem Reservoir durch das Gel und die Membran in die Papiertücher gezogen und transportiert dabei die DNA/RNA aus dem Gel auf die Membran.



12.2. Northernblot

Der Aufbau eines Northernblot ist in Abbildung 13 dargestellt. Als Transferpuffer diente wie beim Southernblot 20 x SSC. Bevor die RNA-Gele geblottet werden konnten, mussten sie in 2 x SSC äquilibriert werden, um das im Gel enthaltene Formaldehyd zu entfernen. Die Gele wurden anschließend über Nacht geblottet. Da die RNA durch die Bedingungen des Formaldehydgels bereits denaturiert war, konnte sie direkt nach dem Transfer bei 80°C immobilisiert werden. Die Hybridisierung und Detektion ist in Abschnitt B.9.2, Sondenscreening, erläutert.

13. DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von den Firmen SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH) und GENterprise (Mainz) nach dem „Taq Dye Terminator Cycle Sequencing“-Prinzip durchgeführt. Die Aufarbeitung der Sequenzchromatogramme erfolgte mit dem Computerprogramm Chromas.

14. Sequenzauswertung am Computer

14.1. Verwendete Computerprogramme

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe einer Vielzahl von Computerprogrammen bearbeitet und ausgewertet, die zum größten Teil als „Freeware“ im Internet zur Verfügung stehen. Es folgt eine tabellarische Auflistung der verwendeten Programme und der entsprechenden Internetadressen bzw. Angaben zum Softwarehersteller.



Tab. 5: Verwendete Software und Programme.

Computerprogramm	Herkunft
Align	http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi
Blast Japan	http://www.blast.genome.ap.jp/
Blast NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Chromas	http://www.technelysium.com.au/chromas.html
ClustalX	ftp://ftg-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/
DNASar Softwarepaket	Lasergene Biocomputing Software for Windows
Genedoc	http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml
Lalign	http://www2.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi
Oligo	http://web.mit.edu/toxms/www/pkz204g/
Primerauswahl	http://alces.med.umn.edu/webprimers.html
Translate	http://www.expasy.ch/tools/dna.html
Treeview	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
Phylip	http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html

14.2. Alignments, Stammbäume und phylogenetische Berechnungen

Für die Erstellung von Alignments wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen verwendet. Alignments wurden mit dem Computerprogramm ClustalX erstellt. Dabei wurde als Standardeinstellung eine Korrektur multipler Substitutionen vorgenommen, bei der mögliche Rückmutationen in die Berechnungen der Abstandsverhältnisse zwischen den verglichenen Sequenzen miteinbezogen werden. Die Standardeinstellungen und Parameter von ClustalX sind in der Beschreibung des Programms gegeben (Thompson et al., 1997).

Für die Erstellung von Stammbäumen wurde ebenfalls mit dem Programm Clustal aus einem Alignment ein „Bootstrap-Tree“ berechnet. Das bedeutet, daß das Programm eine variable Zahl von möglichen Stammbäumen berechnet. Der ausgegebene Stammbaum enthält Bootstrap-Werte, die angeben, wie oft eine gezeigte Verzweigung dabei berechnet wurde. Als Standardeinstellung hat Clustal 1000 mögliche Bäume pro Alignment berechnet. Für die Darstellung des Stammbaums wurde das Programm TreeView verwendet.

Phylogenetische Berechnungen erfolgten mit der Software Phylip. Basierend auf einem Clustal-Alignment wie oben beschrieben wurde in Phylip eine Distanzmatrix berechnet, die die Distanzen zwischen den verglichenen Sequenzen widerspiegelt. Diese Berechnung



erfolgte auf zwei unterschiedliche Weisen. Zum einen wurden die Distanzen unter Korrektur möglicher Rückmutationen nach Dayhoff (1983) an jeder Position separat berechnet. Zum anderen wurde nach Kimura (1993) die multiplen Substitutionen über das gesamte Alignment berechnet. Anhand der Distanzmatrices wurde unter Verwendung eines paleontologisch bestimmten Eichpunktes die phylogenetische Verwandtschaft der verglichenen Sequenzen in Millionen Jahren bestimmt.



C. Ergebnisse

1. Zur Strategie

Ursprüngliches Ziel der Arbeit war es, die Primärstruktur der beiden Hämocyanin-Isoformen KLH1 und KLH2 der Schlüssellochschncke *Megathura crenulata* zu ermitteln. Zu Beginn war neben der vollständig sequenzierten cDNA des Hämocyanins von *Octopus dofleini* (Miller et al., 1998) eine Teilsequenz HtH1-(g)h aus der cDNA des Hämocyanins von *Haliotis tuberculata*, einer zu *Megathura* nahe verwandten Art, bekannt, an der ich im Rahmen meiner Diplomarbeit mitgearbeitet hatte. Diese Teilsequenz stammte von einem durch Antikörperscreening aus einer cDNA-Bank (cDNA-Bank G, siehe Tabelle 3, Seite 36) isolierten Klon. Die Bank war mit RNA aus dem Mantelgewebe von *Haliotis* hergestellt worden (Keller et al., 1999). Dieselbe Methode sollte auch bei *Megathura* angewendet werden. Dazu wurde von gehälterten Schnecken RNA aus dem Bindegewebe der Mitteldarmdrüse präpariert, daraus eine cDNA-Bank erstellt (cDNA-Bank Z) und diese mit diversen in der Arbeitsgruppe vorhandenen Antikörpern gescreent. Es standen 15 verschiedene monoklonale und polyklonale Antikörper gegen KLH1 und KLH2 zur Verfügung, die alle in Westernblots bzw. in der 2-D-Immunelektrophorese spezifisch KLH erkannten. Mit keinem dieser Antikörper konnte allerdings ein für KLH kodierender cDNA-Klon aus der cDNA-Bank Z isoliert werden. Ein Sondenscreening mit einer artfremden DNA-Sonde aus dem Klon hth1-(g)h von *Haliotis tuberculata* blieb ebenfalls ohne Erfolg. Auch mit Northernblots aus gesamt- sowie mRNA des Mitteldarmdrüsengewebes von *Megathura crenulata* konnte mit Hilfe der hth1-(g)h-Teilsequenz als Sonde keine Hämocyanin-mRNA nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zusammen mit der Beobachtung, daß der Gehalt besonders des KLH1 in der Hämolymphe von gehälterten Schlüssellochschncken drastisch innerhalb weniger Wochen abnahm (Gebauer et al., 1994), legte die Vermutung nahe, daß die bei uns im Aquarium gehaltenen Schnecken keine Hämocyanin-Synthese mehr betrieben. Es schien also notwendig, Schnecken direkt nach dem Fang zu präparieren und RNA zu isolieren. Zu diesem Zweck sind Bernhard Lieb und ich nach San Diego, Kalifornien, geflogen und haben aus frisch gefangenen Individuen binnen einiger Stunden RNA präpariert. Um gegebenenfalls altersabhängige Transkription der Hämocyanin-Gene zu erfassen, wurden separate RNA-Präparationen von Tieren unterschiedlicher Größe durchgeführt. Zwar ließ sich das Alter nicht eindeutig anhand der Größe ermitteln, aber der Größenunterschied der präparierten Schnecken war sehr deutlich (kleine Tiere mit Schalenlängen von 18 bis 32 mm im Gegensatz zu großen Tieren mit einer



Schalengänge von etwa 90 mm). Aus der Literatur ist eine Altersbestimmung anhand der Schalengänge nicht für *Megathura* beschrieben, aber für die nahe verwandte Schlüssellochschnecke *Fissurella crassa* (Bretos, 1980; Ward, 1967). Bei dieser Schneckenart, die von ihrer Schalengänge her *Megathura* in etwa entspricht, besitzen ca. ein Jahr alte Tiere eine Schale von etwa 26 mm Länge. Mit etwa 6 Jahren ist die Schale dann 80 mm lang. Demnach waren die von uns präparierten Tiere zwischen einem halben und über 6 Jahren alt. Aus diesen RNA-Präparationen haben wir insgesamt fünf cDNA-Banken erstellt (cDNA-Banken A bis E, siehe Tabelle 3, S. 36). Zwei der fünf Banken (Banken B und E) wurden mit random- und spezifischen Primern hergestellt (siehe B.8.8, Variationen (random-primed cDNA-Synthese). Alle fünf Banken wurden mit dem gleichen Satz von anti-KLH-Antikörpern und der artfremden Sonde aus dem cDNA-Klon *hth1-(g)h* gescreent. Doch auch hier konnten keine Klone isoliert werden, die Teile der KLH-spezifischen cDNA enthielten.

Als mögliche Erklärung für diese Mißerfolge bot sich an, daß die Schlüssellochschnecken nur saisonal Hämocyanin synthetisieren. Damit ergaben sich zwei mögliche Lösungswege, um die Primärstruktur des KLH zu ermitteln:

- Zum einen die Suche nach der „richtigen“ Saison bei kalifornischen Freilandtieren, in der sie Hämocyanin synthetisieren. Diese Möglichkeit war für uns allerdings nicht durchführbar.
- Die zweite Möglichkeit bestand darin, einen „Umweg“ über das Hämocyanin von *Haliotis tuberculata* zu machen. Über die Sequenzierung der HtH-cDNA und die Analyse der HtH-Gene sollten wir in der Lage sein, die KLH-Gene aus dem Genom von *Megathura* zu amplifizieren.

Wir haben also zunächst die Hämocyanine der verwandten Art *Haliotis tuberculata* weiter untersucht, um einen größeren Sequenzabschnitt als HtH1-(g)h zu analysieren. Aus den gewonnenen Sequenzdaten bei *Haliotis* sollten wir dann in der Lage sein, degenerierte Primer aus konservierten Bereichen der DNA zu synthetisieren, um mit diesen über PCR die Gene von KLH1 und KLH2 zu amplifizieren und zu sequenzieren.

Zunächst nur als Hilfsobjekt gedacht, wurde HtH1 im weiteren Verlauf der Arbeit das erste komplett sequenzierte Gastropoden-Hämocyanin (Lieb et al., 2000) und durch parallele Arbeiten zum Dissoziations-Reassoziationsverhalten (Harris et al., 2000) sowie zur seiner Quartärstruktur (Meissner et al., 2000) ist es mittlerweile das neben *Octopus*-Hämocyanin



best untersuchte Mollusken-Hämocyanin überhaupt. Darüber hinaus ging gleichzeitig auch die Strategie bezüglich des KLH auf.

2. Sequenzierung von *Haliothis tuberculata* Hämocyanin (HtH1 und HtH2)

2.1. Sequenz der HtH1 cDNA

Um weitere Sequenzdaten vom *Haliothis*-Hämocyanin zu gewinnen, wurde die bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit erfolgreich mit Antikörpern gescreente cDNA-Bank **G** von *Haliothis* mit einer Sonde aus dem Klon *hth1-(g)h* erneut untersucht. Da jenes vorangegangene Antikörperscreening nur solche Klone überhaupt hatte erfassen können, deren klonierte cDNA sich im richtigen Leseraster befand (siehe B.9.1, Antikörperscreening), könnten durch Sondenscreening auch noch andere cDNA-Klone aus der gleichen Bank isoliert werden, deren klonierte cDNA sich nicht im richtigen Leseraster befand. Über dieses Screening wurden tatsächlich cDNA-Klone isoliert, die sich vom Ausgangsklon *hth1-(g)h* unterschieden.

Im Folgenden werden die cDNA-Klone chronologisch nach ihrer Isolierung aufgelistet und nach der cDNA-Bank, aus der sie stammen und nach der Sonde, mit der sie identifiziert wurden, beschrieben. Dabei sind nur solche Klone erwähnt, die für die vollständige cDNA-Sequenz des HtH1 herangezogen wurden bzw. aus denen DNA-Sonden für das weitere Screening hervorgegangen sind. Insgesamt wurden 18 cDNA-Klone aus den verschiedenen cDNA-Banken von *Haliothis* isoliert, die Teile der HtH1 cDNA enthielten. Fünf dieser Klone deckten mit Überlappungen die vollständige cDNA des HtH1 ab. Da aus drei weiteren cDNA-Klonen im Verlauf der Arbeit Sonden hergestellt wurden, sind hier insgesamt acht Klone näher erläutert. Die Lage der in dieser Arbeit beschriebenen cDNA-Klone vom HtH1 ist in Abbildung 15, S. 63 schematisch dargestellt.

Die einzelnen Klone wurden zunächst aus den in der Vektorsequenz enthaltenen Promotorbereichen T3 (upstream) und T7 (downstream) ansequenziert. Gegebenenfalls wurden die Sequenzen durch Primerwalking vervollständigt und mit Überlappungen zwischen den einzelnen Klonen von mindestens 300 bp zusammengehängt.



➤ **cDNA-Bank G (oligo-dT)**

Aus dem Klon *hth1-(g)h*, der durch Antikörperscreening im Rahmen meiner Diplomarbeit aus der cDNA-Bank **G** isoliert werden konnte, wurde durch Restriktionsverdau mit dem Enzym Kpn I ein Teil der cDNA von ca. 1200 bp herausgeschnitten. Dieser Teil wurde mit Digoxigenin markiert und als Sonde zum Screening der cDNA-Bank verwendet.

Alle aus der cDNA-Bank **G** isolierten Klone enthielten am 3'-Ende den poly-A⁺-Schwanz der mRNA und reichten mehr oder weniger weit in die mRNA hinein. Durch Screening mit der Sonde aus dem cDNA-Klon *hth1-(g)h* konnte ein weiterer Klon aus der oligo-dT-geprägten Bank **G** isoliert werden, der für HtH1 kodierte. Der Klon *hth1-(f)gh* war 3,8 kb groß und enthielt neben den vollständigen für die funktionellen Domänen HtH1-g und HtH1-h kodierenden Sequenz auch einen Teil der Sequenz des HtH1-f. Dieser Klon wurde von Sigmar Stricker im Rahmen seiner Diplomarbeit isoliert und charakterisiert. Aus diesem Klon wurde durch Restriktion mit dem Enzym Pst I eine Sonde aus dem 5'-gelegenen Teil der cDNA aus dem Bereich der funktionellen Domäne HtH1-f hergestellt und mit dieser Sonde die gleiche cDNA-Bank **G** erneut gescreent. Dies ergab einen weiteren Klon von 4,7 kb Länge, den Klon *hth1-(e)fgh*. Der Klon *hth1-(e)fgh* enthielt die vollständige kodierende Sequenz von HtH1-f bis HtH1-h sowie einen kurzen Teil von HtH1-e. Mit einer aus diesem Klon durch Restriktion mit den Enzymen Eco RI und Xho I hergestellten Sonde von etwa 800 bp konnte aus der cDNA-Bank **G** kein weiterer Klon isoliert werden, der für HtH1 kodierte. Aus diesem Grund wurde eine weitere cDNA-Bank erstellt.

➤ **cDNA-Bank Y (random)**

Diese cDNA-Bank **Y** wurde mit random-Primern und drei aus der Sequenz des Klons *hth1-(e)fgh* generierten HtH1-spezifischen Primern, den Primern 8, 9 und 12, erstellt. Die genaue Sequenz der Primer findet sich im Anhang unter F.4.

Gescreent wurde diese Bank mit der Eco/Xho-Sonde aus dem Klon *hth1-(e)fgh*. Es konnte der Klon *hth1-(d)e(f)* mit einer Länge von 2 kb und einem Überlappungsbereich mit dem Klon *hth1-(e)fgh* von 347 Nukleotiden isoliert werden. Aus dem 5'-Bereich dieses Klons wurde durch Restriktion mit Hind III erneut eine etwa 300 bp große Sonde hergestellt und mit dieser die Bank **Y** gescreent. Es konnte der 2,4 kb große Klon *hth1-(c)d(e)* isoliert werden. Dieser Klon enthielt an seinem 3'-Ende einen Bereich von etwa 570 bp, der im Klon *hth1-(d)e(f)* bereits enthalten und sequenziert worden war. Mit zwei verschiedenen Sonden aus diesem Klon wurde die Bank **Y** ohne Erfolg erneut durchsucht. Kein weiterer Klon konnte isoliert werden, der für Teile der funktionellen Domänen HtH1-a, HtH1-b oder HtH1-c kodierte.



Bei einer mit random-Primern synthetisierten cDNA-Bank müssen die enthaltenen Klone nicht notwendigerweise die vollständige mRNA mit Überlappungen zwischen den einzelnen cDNA-Klonen repräsentieren. Es konnten also auch noch cDNA-Klone der funktionellen Domänen HtH1-*a*, HtH1-*b* und HtH1-*c* in der Bank Y vorhanden sein, die nicht mit dem Klon hth1-(*c*)*d(e)* überlappten und somit auch nicht mit einer aus diesem Klon hergestellten Sonde isoliert werden konnten. Um auch diese Klone identifizieren und isolieren zu können, haben wir über PCR mit genomischer DNA von *Haliotis* ein Fragment von etwa 400 bp amplifiziert und zur Herstellung einer Sonde verwendet. Für diese PCR wurden zwei Primer verwendet (Primer iii US und iv DS), die wir anhand der bis dahin bekannten cDNA von HtH1 generieren konnten. Diese Primer lagen innerhalb des stark konservierten Bereiches der Kupferbindungsstellen Cu-A und Cu-B und wurden als degenerierte Primer synthetisiert. Die Lage und die Sequenz der beiden Primer ist in Abbildung 14 gezeigt. Da die Kupferbindungsstellen in allen FUs von Mollusken-Hämocyaninen zu finden sind, sollte das mit diesen Primern aus genomischer DNA von *Haliotis* amplifizierte Fragment ein Gemisch des entsprechenden Bereiches aus allen FUs des HtH1 sowie des HtH2 enthalten.



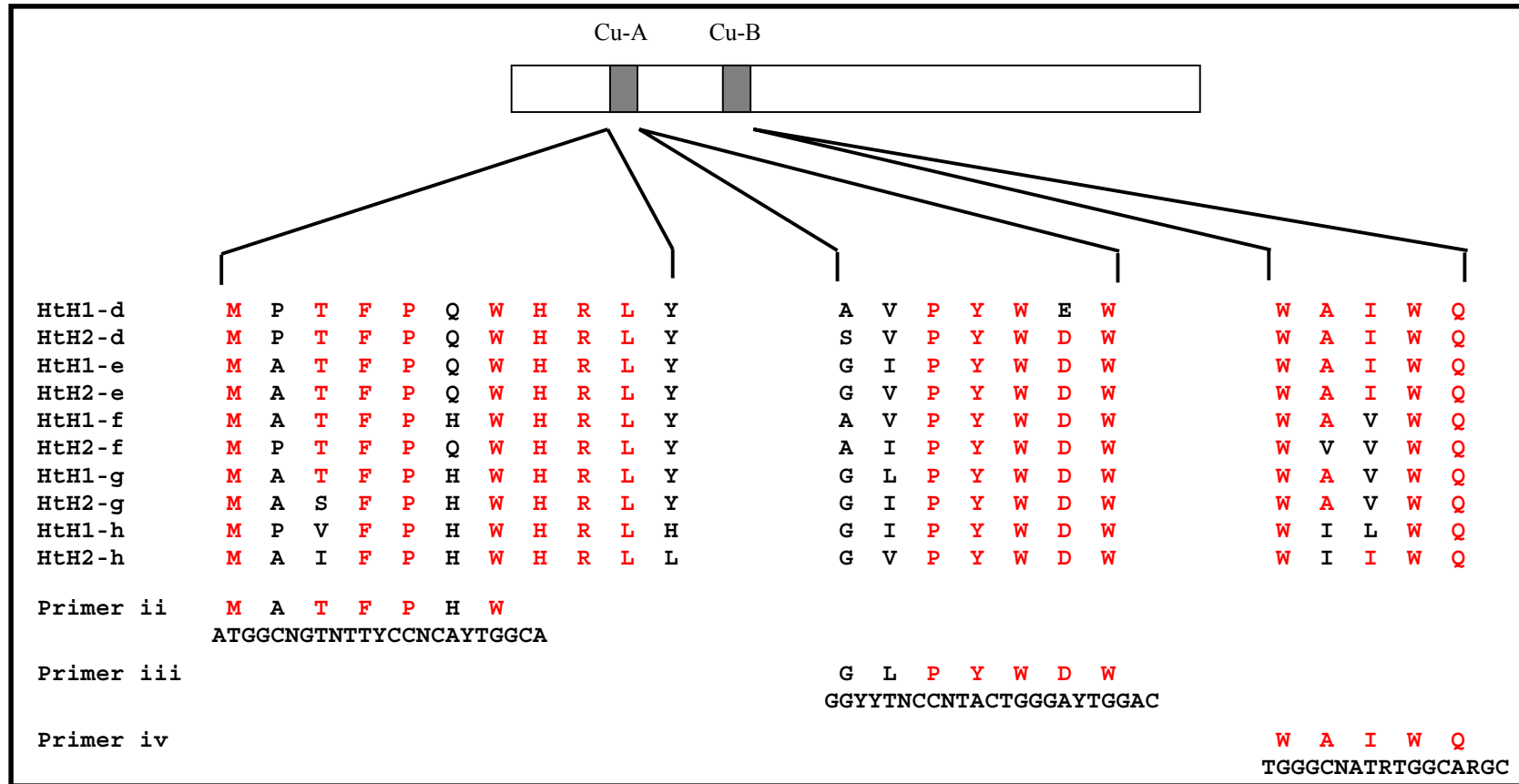


Abb. 14: Die degenerierten Primer ii, iii und iv.

Durch einen Sequenzvergleich der im Verlauf dieser Arbeit von uns sequenzierten FUs der beiden Isoformen des HtH konnten drei konservierte Bereiche zwischen den Kupferbindungsstellen Cu-A und Cu-B ermittelt werden. Aus diesen Bereichen wurden die degenerierten Primer ii, iii und iv synthetisiert. Rote Buchstaben zeigen konservierte Aminosäuren. Die Primersequenzen enthalten IUPAC-Codes für degenerierte Nukleotide.



Dieses PCR-Amplikon wurde mit Dioxigenin markiert und zum Screening der Bank Y verwendet. Es konnten damit mehrere Klone isoliert werden, von denen zwei bis dahin noch unbekannte Teile der HtH1-cDNA enthielten. Der 1,7 kb große Klon *hth1-(b)(c)* überlappte in einem Bereich von etwa 570 bp mit dem bereits vorhandenen Klon *hth1-(c)d(e)*. Der zweite isolierte Klon *hth1-(b)* enthielt einen weiter 5'-gelegenen Teil der für HtH1-*b* kodierenden cDNA mit einer Überlappung mit dem Klon *hth1-(b)(c)* von etwa 430 Nukleotiden. Aus diesem 750 bp großen Klon *hth1-(b)* wurde über PCR mit den spezifischen Primern 40 und 41 (siehe unter F.4 im Anhang) ein ca. 450 bp großes Fragment für die Herstellung einer weiteren Sonde amplifiziert und die Bank Y damit erneut durchsucht. Es konnte der Klon *hth1-(s)a(b)* isoliert werden. Dieser 1,8 kb große Klon enthielt an seinem 5'-Anfang ein Stück von 48 Nukleotiden, das ein Peptid von 15 Aminosäuren kodierte (bezeichnet mit 's' für Signalpeptid). Im Anschluß an dieses kurze Signalpeptid folgte die aus direkter Proteinsequenzierung bekannte Anfangssequenz des HtH1 (siehe Tabelle 1, S. 12) (Keller et al., 1999). Die vollständige Primärstruktur des in die Hämolymphe sezernierten HtH1 war hiermit als cDNA kloniert und sequenziert. Am Anfang des cDNA-Klons *hth1-(s)a(b)* war kein Startcodon enthalten, die komplette mRNA war demnach noch nicht vollständig kloniert. Aus dem Anfangsbereich des Klons wurden verschiedene Sonden hergestellt, mit denen allerdings keine weiteren Klone isoliert werden konnten, die den vorderen Teil der cDNA mit Startcodon enthielten.

In der folgenden Abbildung sind die cDNA-Klone des HtH1 schematisch zusammengestellt. Die Anordnung der einzelnen Klone von oben nach unten entspricht der Reihenfolge ihrer Isolierung aus den cDNA-Banken. Der von Sigmar Stricker im Rahmen seiner Diplomarbeit, die ich mit betreut habe, isolierte Klon ist mit ! gekennzeichnet. Die zum jeweiligen Screening verwendeten Sonden sind als schwarze Balken entsprechend ihrer Lage eingezeichnet und wurden sowohl mittels Restriktionsverdau (symbolisch mit Blitzen dargestellt) als auch über PCR mit spezifischen und degenerierten Primern (als Pfeile gezeigt) hergestellt. Das Signalpeptid und die einzelnen FUs sind farblich voneinander getrennt. Die Länge der einzelnen Fragmente entspricht nur ungefähr der relativen Länge.



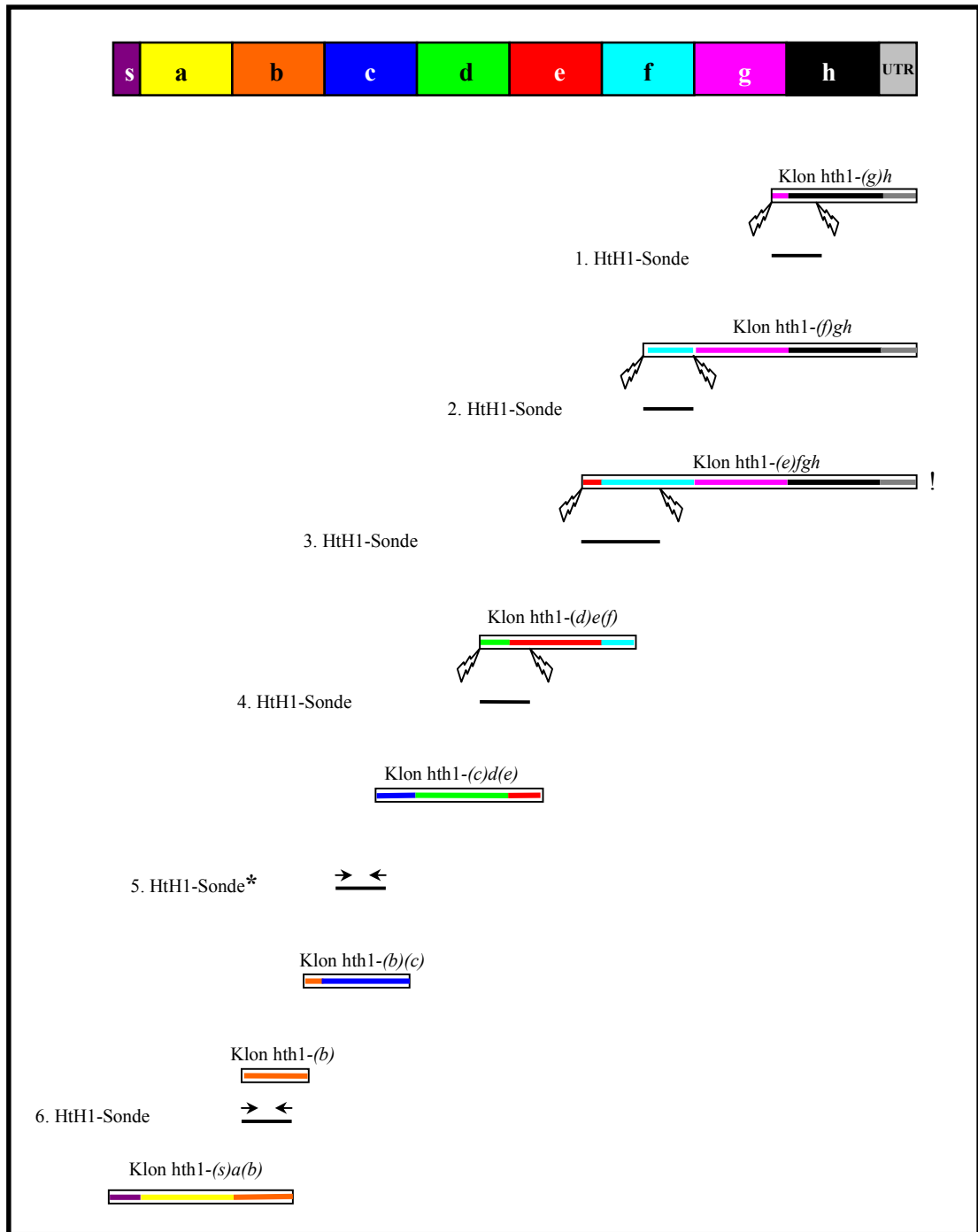


Abb. 15: cDNA-Klone der Hth1 cDNA.

Die Länge der hier dargestellten Klone entspricht nur ungefähr ihrer relativen Größe. Die für das Screening der cDNA-Banken verwendeten Sonden sind ebenfalls eingezeichnet. Der mit ! markierte Klon wurde von Sigmar Stricker im Rahmen seiner Diplomarbeit, die ich mit betreut habe, isoliert und bearbeitet. Blitze symbolisieren Restriktionsverdau, waagrechte Pfeile stellen Primer für PCR-Reaktionen zur Sondenherstellung dar. Die mit * gekennzeichnete Sonde wurde nicht aus einem cDNA-Klon sondern über PCR mit genomischer DNA hergestellt. In Klammern geschriebene FUs sind nur partiell in den jeweiligen Klonen enthalten. Die einzelnen FUs sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Der 5' vor Hth1-a gelegene Sequenzabschnitt ist mit 's' (Signalpeptid) gekennzeichnet.



Die vollständig zusammengehängte cDNA-Sequenz des HtH1 beträgt 10654 bp mit einem offenen Leseraster (ORF, open reading frame) von 10257 bp ab dem dritten Nukleotid bis zum ersten Stopcodon. An das Stopcodon schließt sich ein 3'-UTR (**un**translated **region**) von 395 Nukleotiden mit Polyadenylierungssignal und einem poly-A⁺-Schwanz von 20 bp an. Die im ORF kodierte Aminosäuresequenz von 3419 Aminosäuren trägt wie oben bereits erwähnt am Anfang ein Stück von 15 Aminosäuren, das vermutlich ein Stück eines Signalpeptids darstellt. Mit der Sequenz „**DNVVRKDVSHLTDDHVQ**“, die aus direkter Proteinsequenzierung ermittelt wurde (Keller et al., 1999), beginnt das in die Hämolymphe sezernierte Protein HtH1, bestehend aus 3404 Aminosäuren, mit einer errechneten relativen Molekülmasse von 392 kDa.

Die vollständige Aminosäuresequenz des HtH1 war damit kloniert und sequenziert. Die zusammengehängte cDNA-Sequenz ist in der EMBL-Datenbank unter der Accession-Nummer Y 13219 zu finden. In Abbildung 16 ist die aus der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz vom HtH1 dargestellt. Die einzelnen FUs sind in verschiedenen Farben gezeigt. Die aus direkter Proteinsequenzierung bekannten N-terminalen Anfangssequenzen einzelner FUs sind unterstrichen.



LVQFLLVALV^{X1}GAGADNVVRKDVSHLT^{X2}DEVQALHGALHDVTA^{X3}STGPLSFEDITSYHAAPASCDYKGRKIACCV
 HGMPSPFPWHRAYVQ^{X4}AERALLSKRKT^{X5}VGMPYWDWTQTLTHLPSLVTEPIYIDSKGGKAQ^{X6}TNYWYRGEIAFINKKT
 ARAVDDRLF^{X7}EKVEPGHYTHLMETVLDAL^{X8}EQDEFCKFEIQFELAHNAIHYLVGGKFEYSMSNLEYTSYDPIFFLHHS
 NVDRLF^{X9}AIWQRLQELRGKPNAMDC^{X10}AHELHQQLQPFNRDSNPVQLTKD^{X11}HSTPADLFDYKQLGYSYDSLNLNGMTP
 EQLKTELDERHSKERAFAS^{X12}FRLSGFGGSANVVVYACV^{X13}PD^{X14}DDPSDDYCEKAGDFFILGGQSEMPWR^{X15}FPYFDVT
 EAVHHLGVPLSGHYV^{X16}KTELF^{X17}SVNGTALSPDLLPQ^{X18}TVAYRPGK^{X19}GHLDPV^{X20}VHRRHDDDLIVRKNIDH^{X21}L^{X22}TREEEYEL
 RMALER^{X23}FQADTSVDGYQATVEYHGLPARC^{X24}PRPDAK^{X25}VRFACCMHG^{X26}MASFP^{X27}PHWHRLFVTQVEDALVRRGSPIGV^{X28}PYWD
 WTKPMT^{X29}HL^{X30}PD^{X31}LASNETYVD^{X32}PYGH^{X33}TH^{X34}NP^{X35}FF^{X36}NANISFEEGHHTSRMIDSKL^{X37}FAPVAFGEHSHLFDGILYAFEQEDF
 CDFEIQFELVHNSI^{X38}HAWIGGSE^{X39}DYSMATLHY^{X40}TAFDPIFY^{X41}LHHSNVDRLWAIWQALQIRRHKPYQAHCAQ^{X42}SV^{X43}EQLPM
 KPFAFPSP^{X44}LNNNEKTHSHSVPTDIYDYE^{X45}EVLHYSYDDLTF^{X46}GGMNLEEIEEAIHLRQ^{X47}QHERVFAG^{X48}FLLAGIT^{X49}SALV
 DIFINKPGTQPLKAGDIAILGGAKEMPWAF^{X50}DRLYKVEIT^{X51}DSLK^{X52}TLSLDVGDYEV^{X53}TFKI^{X54}HDMHG^{X55}NALD^{X56}TD^{X57}LIP^{X58}HAA
 VVSEPAHPTFEDEKHS^{X59}LRIRK^{X60}NVDSL^{X61}TPEETNELRKALELLENDHTVGGFNQLGAFHGEPK^{X62}WCPNPEAEHKVACCV
 HGMAVFP^{X63}PHWHRL^{X64}LALQAENALRKHGYS^{X65}GALPYWDWTR^{X66}PLSQLPDLVSHEQY^{X67}TDPSD^{X68}HV^{X69}KHN^{X70}PWFNGHID^{X71}T^{X72}V^{X73}NQDT
 TRSVREDLYQQPEFG^{X74}HFTDIAQ^{X75}QVLLALEQDDFC^{X76}SFEVQY^{X77}EISHNFIHALVGGTD^{X78}YGMASLRYTAYDPIFFLH
 SNTDR^{X79}IWAIWQSLQYR^{X80}GKPYNTANCAIESMRR^{X81}LQ^{X82}PFGLSSAINPD^{X83}RTREHAIP^{X84}FDVFN^{X85}YRDN^{X86}FHYV^{X87}YD^{X88}TFE^{X89}FN
 GLSISQLDRELEKIK^{X90}SHERVFAG^{X91}FLLSG^{X92}IKKSALV^{X93}KFEVCTPPDNCHKAGEFYLLGDENEMAWAYD^{X94}RLF^{X95}KYDIT^{X96}QV
 LEANHLHFYDHLFIRYEV^{X97}FDLKG^{X98}VSLG^{X99}TDLFHTANV^{X100}VHDSGTGTRDRDNVVEEVTGASHIRK^{X101}NLNDLNTGEMESLR
 AAFLHIQDDGTYESIAQYHGKPK^{X102}QCLNDH^{X103}NIACCVHGMPTFPQ^{X104}WHRLYV^{X105}VQVENALLNRGSGVAVPYWE^{X106}WTAPID
 HLPHFIDDATYFNSR^{X107}QRYDPN^{X108}PF^{X109}RGK^{X110}VTFENAV^{X111}TTRDPQAGLFNSDYMYENVLLALEQENYCD^{X112}FEIQFELVHNA
 LHSMLGGKGOYSMSL^{X113}DSAFDPV^{X114}FLHANT^{X115}DRLWAIWQELQRFREL^{X116}PYEANCAINLMHQ^{X117}PLK^{X118}PFSD^{X119}PHENHDN
 VTLKYSK^{X120}PDGDFYQNH^{X121}FGYK^{X122}YDNLEF^{X123}HLSIPSLD^{X124}ATLQRRH^{X125}DRV^{X126}FAG^{X127}FL^{X128}LNIG^{X129}T^{X130}SADIT^{X131}IYIC^{X132}LDGRRGN
 DCSHEAGTFYILGGETEMPFI^{X133}FR^{X134}LYKFEIT^{X135}KPLQ^{X136}QLVK^{X137}LHGGVFELELEIKAYNGSYLD^{X138}PHT^{X139}FDPTIIFEP^{X140}GT
 THILDHDEHEEILV^{X141}RKNI^{X142}IDLSP^{X143}RRVSL^{X144}KALQ^{X145}RMK^{X146}NDRSADGYQAIAS^{X147}FHALP^{X148}PLCPN^{X149}AAHRYACCVH^{X150}GMA
 TFPQ^{X151}WHRLYTVQDALRRHGS^{X152}LVGIPYWDWTK^{X153}VNELPELLSSATFYHP^{X154}IRNINI^{X155}SNP^{X156}FLGADIEFEG^{X157}RV^{X158}WTER
 HINTERL^{X159}FHSGDHDGYHNWFFET^{X160}VLFALEQEDYCD^{X161}FEIQF^{X162}EIAHNGIHTWIGGS^{X163}AVYGM^{X164}GLHYASYDPIFYI^{X165}HHS
 QTDRIWAIWQELQ^{X166}KYRGLSGSEANCAIEHMRT^{X167}PLK^{X168}PF^{X169}SGPPY^{X170}NLSHTQ^{X171}EYSK^{X172}PEDT^{X173}FDYK^{X174}KFGYR^{X175}YSLELEGR
 SISRIDELIQ^{X176}RQEKDR^{X177}T^{X178}FAG^{X179}FLK^{X180}GF^{X181}T^{X182}SASVSLQ^{X183}CRVDHTCKDAGYFTILGGS^{X184}AEMPWAF^{X185}DRLYKYDIT^{X186}KT^{X187}HL
 DMNLRHEDTFSIDVITISYNGTVLSGDLIQ^{X188}TPSII^{X189}FV^{X190}GRHKLNSRKH^{X191}TPN^{X192}VR^{X193}HELSSLS^{X194}SRDIASLKAAL^{X195}TSLQ
 HDNGTDGYQAI^{X196}AAFHG^{X197}VPAQC^{X198}HEPSGREIACCIHGMATFP^{X199}PHWHRLYTLQLEQALRRHGS^{X200}SVAVPYWDWTKPITELP
 HILTDGEYD^{X201}VWQNAVLANPFARGYVKIKDAFT^{X202}VRN^{X203}VQESL^{X204}FKMSSFGKHSLLFDQALLALEQTDYCD^{X205}FEVQF^{X206}EV
 HNTIHYLVG^{X207}RQTYAFSSLEYSSYDPIFFI^{X208}HHSFV^{X209}DKI^{X210}WAVWQELQ^{X211}SRRHLQ^{X212}FRTADCAVGLMGQAMR^{X213}PFNKDFN
 HNSFTKKH^{X214}AVN^{X215}TVFDYEDLGYNYDNLEISGLN^{X216}LNEIEALIAK^{X217}RKSHARV^{X218}FAG^{X219}FL^{X220}FGL^{X221}TSAD^{X222}I^{X223}HLEICT^{X224}SENC
 HDAGVIFILGGS^{X225}AEMHWAYNRLYKYDITEALQ^{X226}EFDIN^{X227}PE^{X228}V^{X229}FHADEPFLRLSVVAVNGTVIPPSHLHQPTIIEP
 GEDHDDHQSGSRAGS^{X230}GVRKDVNTLTKAETDNLREALRGMADHGPNGFQAI^{X231}AAFHGK^{X232}PAMCPMPDGH^{X233}NYSCCTHG
 MATFP^{X234}PHWHRLYTKQMEDAM^{X235}HGSHVGLPYWDWTA^{X236}AFTHLPTLVTD^{X237}DN^{X238}NP^{X239}FQ^{X240}HGHIDYLVN^{X241}VNT^{X242}TRSP^{X243}RD^{X244}ML^{X245}FND
 PEHGSSEFFYRQVLLALEQ^{X246}TD^{X247}CK^{X248}FEVQFEITHNAIHSWTGGHSPYGMSTLD^{X249}FTAYD^{X250}PLFWLHHSNT^{X251}DR^{X252}IWAVWQ
 LQ^{X253}EYRGLPYNHANCEIQAMK^{X254}PLR^{X255}PFSD^{X256}INHN^{X257}PVTKANAK^{X258}SDVFEYN^{X259}RLSFQYDNLI^{X260}FHGYSIP^{X261}EL^{X262}DRVLEERK
 EEDRIFA^{X263}AFALNSGIKRSADVVFDIC^{X264}QPGHECVFAGT^{X265}FAILGGELEMPWS^{X266}FDRLFRYDIT^{X267}KVMK^{X268}QLHLRHDS^{X269}DFR
 VKIVGTD^{X270}DH^{X271}ELPSDSVKAP^{X272}TIEFEPGVH^{X273}RGGKHEDEHDDRLAD^{X274}VLIRKEVDFLSLQ^{X275}EANA^{X276}IKDALYK^{X277}LQND^{X278}DSK
 GF^{X279}EAIAGYHGYPNMCPEKGTDKYPCCVHGM^{X280}PVFP^{X281}PHWHRLHTIQ^{X282}MERALKNHGSPMGIPYWDWTKKMSLSP^{X283}FFGDS
 SNNNPFYKYYIRGVQ^{X284}HETTRD^{X285}VN^{X286}QRLFNQTK^{X287}GFEDYLYLTLQVLEENS^{X288}YCDFE^{X289}VQYELHNAVH^{X290}SWLGGT^{X291}GKYS
 MSTLEHSAFDPV^{X292}FMIHSSLDRIWILWQ^{X293}LKQ^{X294}KIRMKPYALDCAGDRLMKD^{X295}PLHPFNYETVNEDEFTRINS^{X296}FP^{X297}SIL
 FDHYRFNYEYDNM^{X298}IRGQDIHELEEV^{X299}IQELRNKDRIFAG^{X300}FVLSGLRISATVKVF^{X301}IHTKDDT^{X302}SHEEYAGEFAVLGGE
 KEMPWAYERMLKLDISDAV^{X303}HKLHVRDEIRFRV^{X304}VV^{X305}TAYNGDVVTTKLSQ^{X306}PFIVHRPAHVAHDILV^{X307}IP^{X308}LGEGHDLPP
 KVVVKS^{X309}GT^{X310}KVEFTPIDSSV^{X311}NKAMVELGSYTAMAKCIV^{X312}PPFSYHGFELDKVYSVDHG^{X313}DY^{X314}IAAGTHALCEQ^{X315}NLRLHI
 HVEHE

Abb. 16: Aminosäuresequenz des HtH1.

In dieser Abbildung ist die aus den zusammengesetzten cDNA-Klonen abgeleitete vollständige Proteinsequenz des HtH1 dargestellt. Zusätzlich zu den acht im nativen Protein enthaltenen FUs HtH1-a bis HtH1-h ist im N-terminalen Anfangsbereich noch ein Signalpeptid (lila) von 15 Aminosäuren kodiert. Die Sequenz der FUs HtH1-a bis HtH1-h besteht aus 3404 Aminosäuren und besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von 392×10^3 . Die aus direkter Proteinsequenzierung bekannten Anfangssequenzen des nativen Proteins sowie einzelner Spaltprodukte sind unterstrichen. Mit ^X markierte Positionen enthalten Aminosäuresubstitutionen, die im Text näher betrachtet werden.



In den Überlappungsbereichen der einzelnen cDNA-Klone tauchen 23 Basenaustausche auf, die auf Proteinebene zu 6 Aminosäuresubstitutionen führen. In der Proteinsequenz findet sich für die sechs variablen Aminosäuren ein **x**.

Folgende Aminosäuren sind an diesen Positionen kodiert:

- X¹ Alanin oder Valin
- X² Asparaginsäure oder Valin
- X³ Prolin oder Alanin
- X⁴ Alanin oder Serin
- X⁵ Glycin oder Arginin
- X⁶ Alanin oder Threonin

2.2. Sequenz der HtH2 cDNA

Durch Kreuzhybridisierung mit der aus dem Klon *hth1-(g)h* über Restriktion mit dem Enzym Kpn I hergestellten DNA-Sonde (1. HtH1-Sonde) konnte aus der cDNA-Bank **G** auch ein Klon isoliert werden, der zwar eindeutig für Hämocyanin kodierte, aber von der bis dahin bekannten Sequenz des HtH1 signifikant abwich. Wie sich anhand der N-terminalen Proteinsequenzen (Lieb et al., 1999) später herausstellte, handelte es sich bei diesem Klon um einen Teil der cDNA der Isoform HtH2. Insgesamt konnten acht cDNA-Klone isoliert werden, die Teile der für HtH2 kodierenden cDNA enthielten. Von diesen sind hier vier näher beschrieben, da sie zur Herstellung von Sonden und für die zusammengesetzte cDNA herangezogen wurden.

➤ cDNA-Bank G (oligo-dT)

Aus dem bereits erwähnten Klon *hth2-(g)h* von 2,3 kb konnte durch Restriktionsverdau mit dem Enzym Bam HI eine Sonde erstellt werden. Mit dieser HtH2-spezifischen Sonde wurde die cDNA-Bank **G** erneut gescreent. Es konnten mehrere HtH2-Klone isoliert werden, von denen der Klon *hth2-defgh* mit 6,7 kb am größten war. Er enthielt die vollständige kodierende Sequenz der FUs HtH2-*d*, bis HtH2-*h*. Aus diesem wurde durch Restriktion mit den Enzymen Bam HI, Eco RI und Pst I eine Sonde von 0,67 kb aus dem Bereich von HtH2-*d* erstellt, doch konnte mit dieser Sonde aus der cDNA-Bank **G** kein weiterer Klon isoliert werden.



➤ **cDNA-Bank Y (random)**

Ein Screening der cDNA-Bank Y mit der gleichen Sonde erbrachte einen weiteren Klon, der Teile der bis dahin noch unbekanntes cDNA vom HtH2 enthielt. Der Klon *hth2-(c)d(e)* enthielt mit einer Größe von etwa 2,5 kb drei-Viertel der Sequenzinformation für die funktionelle Domäne HtH2-*c*, die vollständige HtH2-*d* und einen Teil der HtH2-*e*. Der Überlappungsbereich zwischen diesem Klon und dem Klon *hth2-defgh* betrug gute 1,6 kb. Aus diesem Klon wurde über PCR mit den spezifischen Primern X und Ä (genaue Sequenz der Primer ist im Anhang unter F.4 gezeigt) ein Fragment von ca. 400 bp aus dem für HtH2-*c* kodierenden Bereich amplifiziert und zur Herstellung einer Sonde eingesetzt. Mit Hilfe dieser Sonde konnte aus der cDNA-Bank Y erneut ein HtH2-Klon isoliert werden. Der Klon *hth2-(b)(c)* enthielt mit einer Größe von 1 kb das hintere Viertel der für HtH2-*b* kodierenden Sequenz sowie knapp zwei Drittel von HtH2-*c* mit einer Überlappung zum Klon *hth2-(c)d(e)* von 370 Nukleotiden. Eine Sonde aus dem 5'-gelegenen Teil dieses Klons erbrachte keine weiteren für HtH2 kodierenden Klone. Es konnte aus der cDNA-Bank Y kein Klon mehr isoliert werden, der den vorderen Teil der cDNA von HtH2 enthielt.

Im Folgenden sind die vier oben beschriebenen HtH2 cDNA-Klone entsprechend der Reihenfolge ihrer Isolierung aus den cDNA-Banken schematisch dargestellt. Auch hier sind wie in Abbildung 15, S. 63 die zum Screening verwendeten Sonden mit Angaben zur Herstellungsweise als Balken eingezeichnet. Die farbige Unterteilung der FUs ist entsprechend den gewählten Farben der HtH1 cDNA. Die Größe der dargestellten Klone und Sonden entspricht nur ungefähr ihrer relativen Länge.



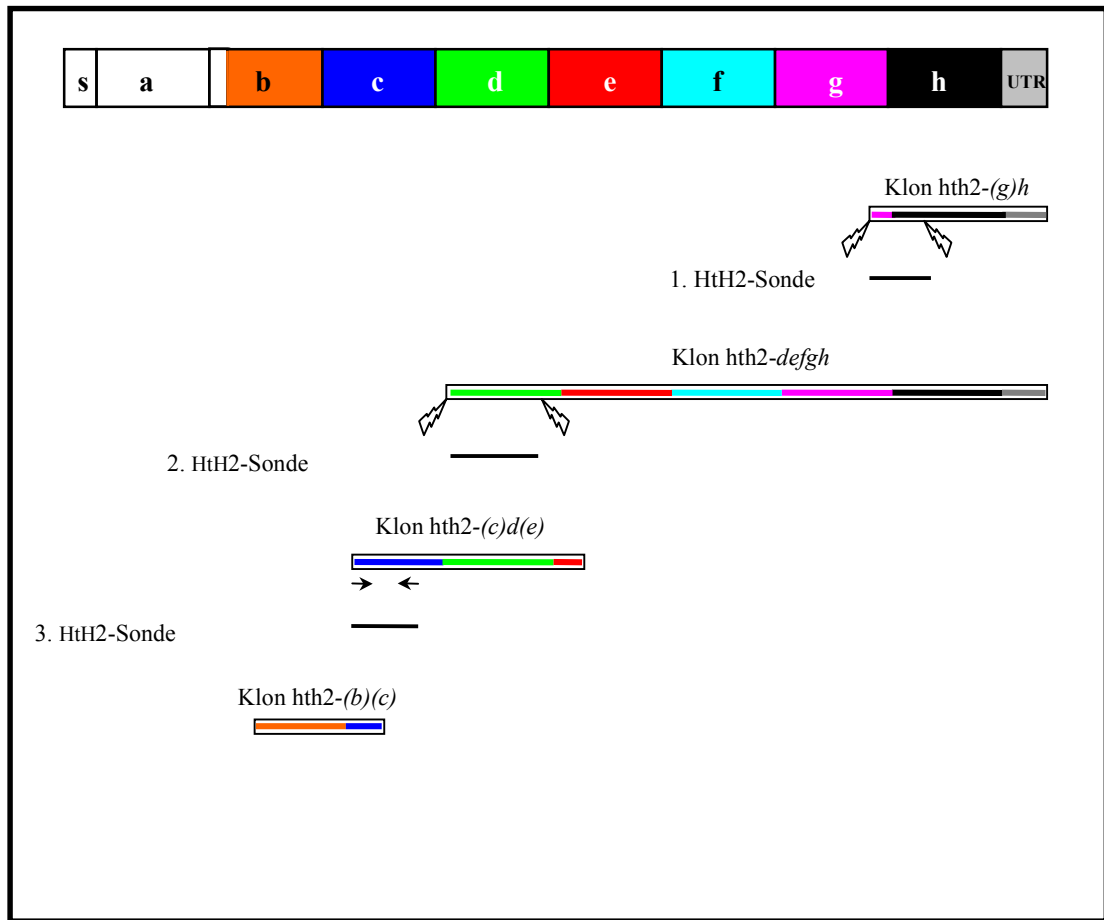


Abb. 17: cDNA-Klone der Hth2-cDNA.

Chronologische Abfolge der Isolierung und die Lage der cDNA-Klone von Hth2 innerhalb der vollständigen cDNA. Die Länge der hier dargestellten Klone entspricht nur ungefähr ihrer relativen Größe. Die für das Screening der cDNA-Banken verwendeten Sonden sowie ihre Herstellung sind ebenfalls eingezeichnet. Blitze symbolisieren Restriktionsverdau, waagrechte Pfeile stellen Primer für PCR-Reaktionen zur Sondenherstellung dar. In Klammern geschriebene FUs sind nur partiell in den jeweiligen Klonen enthalten. Die einzelnen FUs sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Weiße Bereiche sind bislang nicht über cDNA kloniert und sequenziert.

Die cDNA des Hth2 war demnach nicht vollständig kloniert und sequenziert. Es fehlte noch der 5'-gelegene Teil der mRNA mit der vollständigen kodierenden Sequenz von Hth2-a und den ersten drei Viertel von Hth2-b. Da aus den cDNA-Banken **G** und **Y** keine Klone isoliert werden konnten, die diesen Bereich enthielten, haben wir verschiedene andere Techniken versucht, mit denen der fehlende Teil der mRNA kloniert und sequenziert werden sollte. So wurden 5'-RACE und RT-PCR mit einer Vielzahl verschiedener Primer und unter Variation der Protokolle bislang erfolglos angewendet. Auch die Synthese einer weiteren cDNA-Bank mit random- und spezifischen Hth2-Primern erbrachte keine weiteren Hth2-Klone aus dem vorderen, fehlenden Abschnitt der mRNA. Wie jedoch im Abschnitt C.2.4, Sequenzierung



des HtH2-Gens, zu sehen sein wird, waren wir auch ohne die Klonierung der mRNA in der Lage, die kodierende Sequenz des vorderen Teils vom HtH2 zu ermitteln.

Die aus den cDNA-Klonen zusammenhängende cDNA-Sequenz von 8258 bp enthält einen ORF von 8018 bp ab dem dritten Nukleotid bis zum ersten Stopcodon und kodiert für 2672 Aminosäuren. Das errechnete Molekulargewicht dieser Sequenz beträgt 307×10^3 . Ab dem Stopcodon folgt ein 3'-UTR von 240 bp mit Polyadenylierungssignal und einem poly-A⁺-Schwanz von 18 Nukleotiden. Die cDNA-Sequenz findet sich in der EMBL-Datenbank unter der Accession-Nummer AJ 012048. Die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Abbildung 18 gezeigt. Die einzelnen FUs sind entsprechend dem HtH1 in verschiedenen Farben dargestellt. Aus proteolytischer Spaltung des HtH2 und direkter Proteinsequenzierung der erhaltenen Fragmente waren die N-terminalen Anfangssequenzen einiger FUs bekannt (Lieb et al., 1999). Diese Sequenzabschnitte sind in der aus der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz unterstrichen.



FFLSHIGTSANVEI I IDHGT LHTSVGTF AVLGGEKEMKWFDR L YKYEITDEL RQLNLRADDVFSISVKVTDVDGS
 ELSELIPSAAIIFERSH IDHQDPHHD TI IRKNVDNLTP EEINSLRRAMADLQSDKTAGGFQQIAAFHGEPKWCPS
 PDAEKKFSCCVHGMAVFPWHRL LTVQGENALRKHGCLGALPYWDWTRPLSHLPDLVSQQNYTDAISTVEARNPWY
 X¹GHIDTVGVD TTRS VRQELYEAPGF GHYTGVAQVLLALEQDDFCDFEVQFEIAHNF IHALVGGSEPYGMASLR Y
 TTYDPIFYLHHSNTDR LWAIWQALQKYRGKPYNSANCAIASMRKPLQPFGLTDEINPDDETRQHAVPFSVFDYKNN
 FNYEYDTLDFNGLSISQLDRELSRRKSHDRVFAGFLLHGIQQSALVKFFVCKSDDDCDHYAGEFYILGDEAEMPWG
 YDRLYKYEITEQLNALDLHIGDRFFIRYEAFDLHGTSLSGNI FPKPSVIHDEGAGHHQADEYDEVVTAASHIRKNL
 KDLSKGEVESLRS AFLQLQNDGVYENIAKFHGKPGLCDNGRK VACCVHGMP TFPQWHRLYVLQVENALLERGS AV
 SVPYWDWTETFTELPSLIAEATYFN SRQQTFFDNPFFRGKISFENAVTTRDPQPELYVNRYYYQNVMLAFEQDNYC
 DF EIQFEMVHNVLHAWLGGRATYSISSLDYSAFDPVFFLHHANTDR LWAIWQELQRYRKKPYNEADCAINLMRKPL
 HPFDNSDLNHD PVTFKYSKPTDGF DYQNNFGYKYNLEFNHFSIPRLEE IIRIRQRQDRVFAGFLLHNI GTSATVE
 IFVCVPTTSGEQNCENKAGTFAVLGGETEMAFHFDRLYRFDISETLRDLGIQLD SHDFDLSIKIQGVNGSYLDPHI
 LPEPSLIFVPGSSSFLR PDGHSDDILVRKEVNSLTTRETASLIHALKSMQEDHSPDGFQAIASFHALPPLCPSPSA
 AHRYACCVHGMA TFPQWHRLYTVQFDALRRHGATVGV PYWDWLRPQSHLP ELVTMETYHDIWSNRDFPNPFYQAN
 IEFEGENIT TEREVIADKLFVKGGHVF DNWFFKQA ILLALEQENYCDFEIQFEILHNGVHTVWVGGSR TYSIGHLHYA
 SYDPLFYLHHSQTDRIWAIWQELQEQRGLSGDEAHCALEQMREPLKPF SFGAPYNLNQLTQDFSRPEDTFDYRKFG
 YEYDNLEFLGMSVAELDQYIIEHQENDRVFAGFLLSGFGGSASVNFQVCRADSTCQDAGYFTVLGGS AEMAWAFDR
 LYKYDITETLEKMHRLYDDDF TISVSLTANNGTVLSSSLIPTPSVIFQRGHRDINTRSMSPNRVRRELSDL SARDL
 SSLKSALRDLQEDDGPNGYQALAAFHGLPAGCHDSRGNETACCIHGMP TFPQWHRLYTLQLEMALRRHGSSVAIPY
 WDWTKPISELPSLFTSPEYDPWHD AVVNNPFSKGFVKFANTYTVRDPQEMLFQLCEHGESILYEQTLLALEQTDY
 CDFEVQFEVLHNV IHYLVGGRQTYALSSLHYASYDPFFF IHHSFVDKMWWVWQALQKRRKLPYKRADCAVNLMTKP
 MRPFSDMNQNPFTKMHAVPNTLYDYETLYSYDNLEIGGRNLDQLQAEIDRSRSHDRVFAGFLLRGIGTSADVRF
 WICRNENDCHRGGIIFILGGAKEMPWSFDRNFKFDITHVLENAGISPEDVFAEPEFYIKVEIHAVNKTMI PSSVI
 PAPTIIYSPGEGRAADS AHSANIAGSGVRKDVTTLT VSETENLRQALQGVIDDTGPNGYQAIASFHGSPMCEMNG
 RKVACCAHGMA SFPHWRLYVKQMEDALADHGSHIGIPYWDWTTAFTELPALVTDSENNPFHEGRIDHLGVTT SRS
 PRDMLFNDPEQGSSEFFYRQVLLALEQTDYCFEVQFELTHNAIHSWTGGRSPYGMSTLEFTA YDPLFWLHHSNTD
 RIWAVWQALQKYRGLPYNEAHCEIQVLKQPLRPFNDINHNPI TKTNARPIDSFDYERFNYQYD TLSFHGKSIPEL
 NDLL EERKREERTFAAFLLRGIGCSADVVFDICRPN GDCVFA GTFAVLGGELEMPWSFDR LFRYDITRVMNQLHLQ
 YSDSFSFRVKLVATNGTELSDDLKSP TIEHELGAHRGPVEETEVTROHTD X²AHFHRKEVDSL SLD EANNLKNA
 LYKQLNDHSLTGYE AISGYHGYPNLCPEEGDDKYPCCVHGMAIFPYWHRL LTIQLERALEHNGALLGVPYWDWNKD
 LSSLPAFFSDSSNNNPYFKYHIAGVGHDTVREPTSLIYNQPQIHGYDYLYLALTTLEENNYCDFEVQY EILHNAV
 HSWLGGSQKYSMSTLEYSADFPMILHSGLDRLWIIWQELQKIRRKPYNFAKAYHMMEEPLAPFSYPSINQDEF
 TRANSKPSTVFD SHKFGYHYDNLNVRGHSIQELNTIINDLRNTDRIYAGFVLSGIGTSASVKIYLRTDDNDEEVGT
 FTVLGGEREMPWAYERVFKYDITEVADRLKLSYGDTFNFRLEITSYDGSVVKSLPNPFI IYR PANHDYDVLVIPV
 GRNLHIPKVVVVRGTRIEFHPVDDSVTRPVVDLGSY TALFN CVVPPFTYRGFELNHVYSVKPGDYVYVTGPTRDLC
 QNADVRIHIHVEDE

Abb. 18: Aminosäure-Teilsequenz des HtH2.

Die aus den zusammengesetzten cDNA-Klonen vom HtH2 abgeleitete Protein-Teilsequenz besteht aus 2672 Aminosäuren und enthält neben der nur partiell sequenzierten FU HtH2-b die vollständigen Sequenzen der FUs HtH2-c bis HtH2-h. Unterstrichene Bereiche waren aus direkter Proteinsequenzierung von Spaltprodukten des nativen Proteins bereits bekannt. Die mit X gekennzeichneten Aminosäuresubstitutionen rühren von Nukleotidaustauschen aus den Überlappungsbereichen der einzelnen cDNA-Klone her.

In den Überlappungsbereichen der verschiedenen cDNA-Klone sind 14 Basensubstitutionen zu finden, die in der Aminosäuresequenz zu zwei Austausch führen. Diese beiden Aminosäurepositionen sind in der Sequenz mit X markiert. Die alternativen Aminosäuren sind:

- X¹ Serin oder Asparagin
- X² Histidin oder Glutamin



2.3. Sequenzierung des HtH1-Gens

Zur Analyse der Genstruktur wurden aus den erhaltenen cDNA-Sequenzen spezifische Primer gewählt und mit diesen über PCR (siehe B.11.2, PCR mit genomischer DNA) die entsprechenden Teile des Gens amplifiziert. Die für die hier aufgeführten PCR-Klone wichtigsten Parameter der PCR sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Dabei wurden unter Umständen viele PCR-Reaktionen unter Variation der einzelnen Faktoren, besonders der Annealingtemperatur und der Primerkombination, durchgeführt, um eine optimale Reaktion und somit ein einziges, spezifisches Amplikon zu erhalten. Besonders der Bereich zwischen dem Signalpeptid und der FU HtH1-*b* war schwierig zu amplifizieren, da hier die Introns eine beachtliche Länge haben.

Tab. 6: PCR-Klone des HtH1-Gens.

In dieser Tabelle sind die für die Amplifikation des HtH1-Gens durchgeführten PCR-Reaktionen mit den wichtigsten Parametern aufgeführt. Die resultierenden Fragmente wurden kloniert und die Klone fortlaufend nummeriert. Die genaue Lage und Sequenz der verwendeten Primer findet sich in Tabelle 12, S. 131. Der PCR-Typ wird im entsprechenden Abschnitt des Material- und Methodenteils näher erläutert. Die Angaben zur Größe beziehen sich auf die aus der cDNA gegebene Größe des Fragmentes (nur kodierende Sequenz) und auf die Größe des über PCR aus dem Genom amplifizierten Fragments.

PCR- Nummer	US- Primer	DS- Primer	Annealing (°C)	MgCl ₂ [mM]	PCR-Typ	Größe (bp)	
						cDNA	PCR
PCR HtH1-1	18	15	53,0	2,0	Normal	1386	1861
PCR HtH1-2	25	20	53,0	2,0	Normal	1106	1688
PCR HtH1-3	10	30	58,0	1,75	Expand	2570	5354
PCR HtH1-4	35	80	60,9	2,0	Normal	191	1155
PCR HtH1-5	27	8	55,0	1,5	Normal	1681	2038
PCR HtH1-6	4	6	53,0	2,0	Normal	1367	1701
PCR HtH1-7	36	2	53,0	2,0	Normal	1160	1719
PCR HtH1-8	85	82	62,0	1,75	Expand	832	4030
PCR HtH1-9	83	84	62,0	1,75	Expand	952	10643
PCR HtH1-10	64	73	58,0	2,0	Normal	392	1955

Neben den aus der cDNA bekannten kodierenden Teilen (Exons) wurden auf diese Weise auch nichtkodierende Bereiche (Introns) des HtH1-Gens analysiert. Die spezifischen Primer



aus der Sequenz des HtH1 wurden durchlaufend nummeriert. Die Sequenz der verwendeten Primer ist in Tabelle 12, S. 131 zu sehen. Die resultierenden PCR-Klone sind in Abbildung 19 schematisch beschrieben. Die aus der cDNA bekannten kodierenden Bereiche des HtH1-Gens sind hier wieder farbige unterlegt. Die relative Größe der einzelnen farbigen Bereiche in dieser Abbildung entspricht nicht der Länge der jeweiligen Sequenzen.

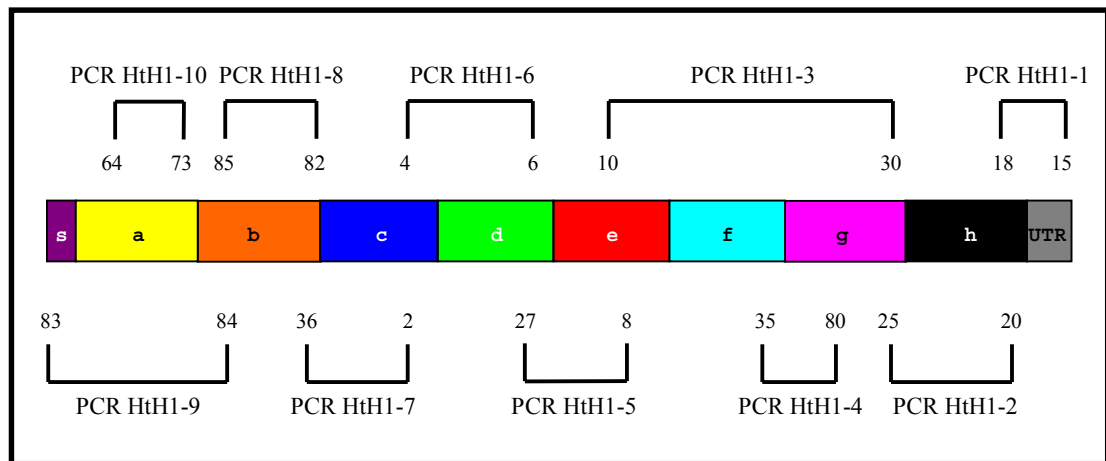


Abb. 19: PCR-Klone zur Amplifikation des HtH1-Gens.

Hier sind die in Tabelle 6 beschriebenen PCR-Klone mit ihrer ungefähren Lage innerhalb der cDNA sowie den verwendeten Primern angegeben. Die einzelnen FUs sind farbige voneinander unterschieden. Die Größe der farbigen Blöcke und Klone entspricht nicht der relativen Sequenzlänge. Die Sequenz der verwendeten Primer findet sich im Anhang unter F.4.

Alle PCR-Klone wurden von beiden Seiten mit den in der Sequenz des PCR-Klonierungsvektors liegenden Sequenzierprimern T7 und SP6 ansequenziert. Über Primerwalking wurden die Klone vollständig doppelsträngig sequenziert. Da bei der Sequenzierung von Introns häufig Probleme auftraten, wurden aus manchen klonierten PCR-Fragmenten Sub-PCR-Reaktionen durchgeführt und die entstandenen Fragmente erneut kloniert und sequenziert. Solche zur Vervollständigung der Sequenz durchgeführten PCR-Reaktionen sind hier nicht aufgeführt. Lediglich die Ansätze PCR HtH1-4 und PCR HtH1-10 sind in Abbildung 19 sowie in Tabelle 6 erwähnt, da diese aus genomischer DNA amplifiziert und unabhängig von den sie jeweils überlappenden anderen PCR-Klonen hergestellt wurden.

Das Gen von HtH1 ist 28614 bp groß und besteht aus 17 Exons und 16 Introns über dem gesamten Bereich ab dem Signalpeptid bis zum Polyadenylierungssignal im 3'-UTR. Es hat sich gezeigt, daß die kodierende Sequenz des HtH1 durch Introns in den Sequenzabschnitten zwischen den FUs (Linker) in einzelne Exons unterteilt ist. Diese sieben Linker-Introns



sowie das Intron zwischen der für das Signalpeptid kodierenden Sequenz und dem ersten Exon von HtH1-*a* liegen alle in Phase 1. Die kodierenden Bereiche des Signalpeptids sowie der FUs HtH1-*a*, HtH1-*f* und HtH1-*g* sind darüber hinaus durch „interne“ Introns in zwei bis vier kleinere Exons zerlegt. Ein weiteres Intron befindet sich sieben Nukleotide hinter dem Stop-Codon im 3'-UTR. Die bislang sequenzierten 48 kodierenden Nukleotide des Signalpeptids sind durch ein solches „internes“ Intron (Phase 0) in ein Exon von 32 und ein sehr kleines Exon von 16 Nukleotiden unterteilt. Die für HtH1-*a* kodierende Sequenz wird durch drei „interne“ Introns (Phase 0, 2 und 2) in vier einzelne Exons getrennt, in der für HtH1-*f* kodierenden Sequenz findet sich ein „internes“ Intron in Phase 0 und die für HtH1-*g* kodierende Sequenz besteht aus drei Exons mit zwei internen Introns (Phase 1 und 0). Die Positionen der „internen“ Introns liegt innerhalb der jeweiligen kodierenden Sequenz der drei FUs an verschiedenen Positionen, wodurch die einzelnen Exons dieser FUs auch eine unterschiedliche Größe erhalten. Die genaue Größe der Exons und Introns zusammen mit den Intron-Insertionsstellen, den Phasen, der Intron-Länge und der darin enthaltenen Sequenz wird in der Diskussion näher betrachtet.

Eine schematische Darstellung des Gens vom HtH1 ist in Abbildung 20 zu sehen. Dabei entsprechen die Größen der einzelnen Blöcke in etwa der relativen Länge der dargestellten Exons und Introns. Die Exons sind entsprechend den Farben der cDNA gewählt. Introns sind als grau gemusterte Bereiche zu sehen.

Die vollständige Sequenz des HtH1-Gens ist bislang nicht veröffentlicht und in der EMBL-Datenbank unter der Accession-Nummer AJ 252741 erst nach Publikation zugänglich.



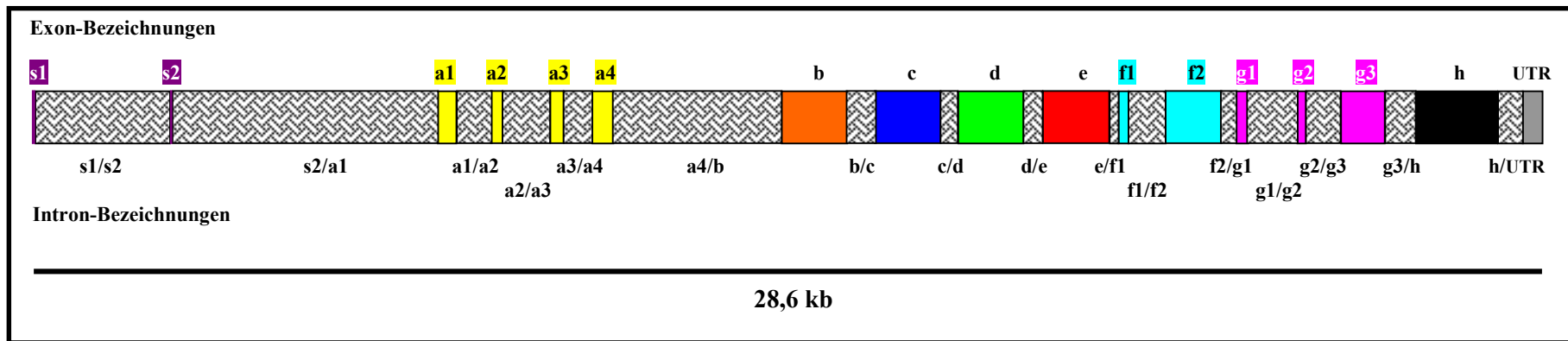


Abb. 20: Struktur des Hth1-Gens.

Das Hth1-Gen mit gut 28,6 kb Länge ist in 17 Exons (farbige Blöcke) unterteilt, die durch 16 Introns (grau gemusterte Blöcke) getrennt sind. Die unterschiedlichen Farben der einzelnen Exons entsprechen den Farben, wie sie bei der cDNA gewählt wurden. Am 3'-Ende des Gens schließt sich an Hth1-*h* ein untranslatierter Bereich (UTR, grau) an, der ein Polyadenylierungssignal beinhaltet. Die Größe der einzelnen farbigen Exons und der grau gemusterten Introns entspricht in etwa ihrer relativen Länge. Lediglich das Exon s2, das nur 16 Basenpaare umfaßt, ist vergrößert dargestellt.



Die kodierende Sequenz beträgt entsprechend der cDNA 10259 bp bis zum ersten Stopcodon. Die Intronsequenzen machen mit 17980 bp fast zwei Drittel des gesamten Gens aus. Auch in der genomischen Sequenz konnten in den Überlappungsbereichen der einzelnen PCR-Reaktionen Basensubstitutionen festgestellt werden. Vier von diesen Positionen liegen in Introns, die restlichen 19 liegen in Exons. Im Vergleich zwischen der aus den kodierenden Sequenzen des HtH1-Gens abgeleiteten Aminosäuresequenz und der aus der cDNA resultierenden Aminosäuresequenz treten 21 Substitutionen auf. Von diesen sind zehn isofunktionelle Austausche. Die restlichen elf Substitutionen liegen in variablen Bereichen der Primärstruktur, die keine nennenswerte Konservierung aufweisen.

2.4. Sequenzierung des HtH2-Gens

Auch für HtH2 wurden zur Analyse der Genstruktur aus den cDNA-Sequenzen spezifische Primer herausgesucht, mit denen die entsprechenden Teile des Gens über PCR amplifiziert wurden. Auch hier konnten neben den kodierenden Abschnitten (Exons) Bereiche in der Genstruktur identifiziert werden, die nicht in der mRNA zu finden waren (Introns). Die PCR-Reaktionen wurden wie in den jeweiligen Abschnitten im Kapitel "Material und Methoden" beschrieben durchgeführt, kloniert und sequenziert. Tabelle 7 zeigt die wichtigsten Parameter der PCR-Reaktionen und die Größe der daraus resultierenden Fragmente des HtH2-Gens. Zur Sequenzierung der so klonierten genomischen Fragmente wurden die Promotorsequenzen der PCR-Klonierungsvektoren pGEM-T und pGEM-T-easy, T7 und SP6, verwendet. Waren die Fragmente damit noch nicht vollständig sequenziert, wurden Folgesequenzierungen mit spezifischen Primern durchgeführt. Alle Primer für PCR-Reaktionen wie auch für Folgesequenzierungen wurden so gewählt, daß ausreichende Überlappungen zwischen den einzelnen Fragmenten entstanden. Auf diese Weise konnte die Genstruktur des HtH2-Gens im Bereich der bis zu diesem Zeitpunkt bekannten cDNA-Sequenz ermittelt werden.

Mit Hilfe der in Abbildung 14 dargestellten degenerierten Primer ii, iii und iv konnten allerdings auch Fragmente des HtH2-Gens aus genomischer DNA amplifiziert werden, die aus dem weiter 5'-gelegenen Teil stammten. Dieser Teil konnte noch nicht über cDNA kloniert und sequenziert werden. Über solche PCR-Reaktionen mit spezifischen HtH2-DS-Primern und den degenerierten US-Primern konnte der vollständige Genomabschnitt der funktionellen Domäne HtH2-*b* sowie ein großer Teil von HtH2-*a* amplifiziert und sequenziert werden. Dies waren die Klone „PCR HtH2-10“ und „PCR HtH2-11“. Die folgende Tabelle listet die wichtigsten Parameter der PCR-Reaktionen auf, die für das HtH2-Gen erfolgreich durchgeführt wurden. Die spezifischen HtH2-Primer sind fortlaufend mit Großbuchstaben bezeichnet und die PCR-Klone durchnummeriert.



Tab. 7: PCR-Klone des HtH2-Gens.

In dieser Tabelle sind die für die Amplifikation des HtH2-Gens durchgeführten PCR-Reaktionen mit den wichtigsten Parametern aufgeführt. Die resultierenden Fragmente wurden kloniert und die Klone fortlaufend nummeriert. Die genaue Lage und Sequenz der verwendeten Primer findet sich in Tabelle 12, S. 131. Der PCR-Typ wird im entsprechenden Abschnitt des Material und Methoden Teils näher erläutert. Die Angaben zur Größe beziehen sich auf die aus der cDNA gegebene Größe des Fragments (nur kodierende Sequenz) und auf die Größe des über PCR aus dem Genom amplifizierten Fragments. Lediglich für die Klone „PCR HtH2-10“ und „PCR HtH2-11“ ist keine cDNA-Länge angegeben, da hier keine cDNA aus dem amplifizierten genomischen Bereich vorhanden war.

PCR-Nummer	US-Primer	DS-Primer	Annealing (°C)	MgCl ₂ [mM]	PCR-Typ	Größe (bp)	
						cDNA	PCR
PCR HtH2-1	P	I	54,0	2,0	Normal	1247	1796
PCR HtH2-2	G	H	54,0	1,5	Normal	580	978
PCR HtH2-3	N	O	55,0	1,5	Normal	720	1098
PCR HtH2-4	D	F	54,0	2,0	Normal	462	2113
PCR HtH2-5	C	M	57,0	1,5	Normal	1214	2224
PCR HtH2-6	S	U	56,0	1,5	Normal	1390	1688
PCR HtH2-7	J	Q	60,0	1,5	Normal	1029	1029
PCR HtH2-8	Z	A	57,0	1,5	Normal	1208	1498
PCR HtH2-9	X	Ä	55,0	1,5	Normal	345	819
PCR HtH2-10	ii	Y	50,0 – 54,0	1,5	Normal		799
PCR HtH2-11	iii	II	60,1	1,75	Expand		4864

Die ungefähre Lage der gewählten Primer sowie die aus den PCR-Reaktionen resultierenden Fragmente sind in Abbildung 21 dargestellt. Die einzelnen FUs sind in der Abbildung entsprechend der cDNA mit ihren unterschiedlichen Farben markiert. Die Größe der einzelnen farbigen Abschnitte in dieser Abbildung stimmt nicht mit der relativen Länge der Sequenzen überein.



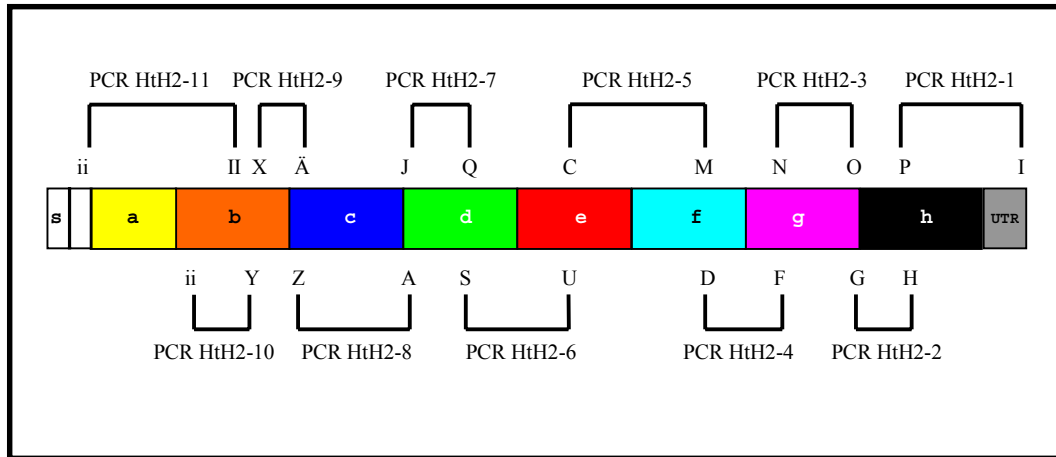


Abb. 21: PCR-Klone zur Amplifikation des HtH2-Gens.

Hier sind die in Tabelle 7 beschriebenen PCR-Klone mit ihrer ungefähren Lage innerhalb der cDNA sowie den verwendeten Primern angegeben. Die einzelnen FUs sind farbig voneinander unterschieden. Die Größe der einzelnen Klone und der farbigen Blöcke entspricht nicht der relativen Sequenzlänge. Die Sequenz der Primer ist im Anhang unter F.4 gezeigt.

Das bis zu diesem Zeitpunkt bekannte HtH2-Gen hat eine Größe von 18312 bp und reicht aus der FU HtH2-*a* bis zum Polyadenylierungssignal im 3'UTR. Es ist unterteilt in 15 Exons und 14 Introns. Auch hier finden sich neben Linker-Introns, die zwischen den kodierenden Abschnitten der einzelnen FUs liegen, noch „interne“ Introns. Wie auch beim HtH1-Gen werden die kodierenden Sequenzen der FUs HtH2-*a*, HtH2-*f* und HtH2-*g* in entsprechend vier, zwei und drei Exons zerlegt. Da der genomische Abschnitt von HtH2-*a* noch nicht vollständig sequenziert ist, kann noch nicht gesagt werden, ob hier nicht noch weitere „interne“ Introns im 5'-gelegenen Teil von HtH2-*a* zu finden sind. Auch kann noch nicht gesagt werden, ob vor HtH1-*a* ein Signalpeptid kodiert und wie dieses auf genomischer Ebene strukturiert ist. Die kodierende Sequenz beinhaltet neben den aus der cDNA bereits sequenzierten 8018 Basenpaaren der funktionellen Domänen HtH2-*(b)*, HtH2-*c* bis HtH2-*h* noch weitere 1904 Nukleotide. Darin sind die zuvor fehlenden 954 bp (318 Aminosäuren) von HtH2-*b* sowie 950 bp (316 Aminosäuren) aus dem 3'-gelegenen Teil von HtH2-*a* kodiert.

Demnach steht der nichtkodierende Anteil des bislang sequenzierten HtH2-Gens (8168 bp Intron) in etwa im gleichen Verhältnis zu den Exons (10172 bp). Die Linker-Introns liegen wie auch beim HtH1-Gen alle in Phase 1, während die „internen“ Introns in unterschiedlichen Phasen auftreten. Die drei „internen“ Introns in der für HtH2-*a* kodierenden Sequenz liegen in Phase 0, 2 und 2 (wie beim HtH1), das „interne“ Intron in HtH2-*f* liegt in Phase 0 und die beiden „internen“ Introns in der kodierenden Sequenz von



HtH2-g liegen in Phase 1 und 0. Die Phasen aller bislang sequenzierten Introns sowie ihre Insertionsstellen stimmen exakt mit denen des HtH1-Gens überein. Diese Übereinstimmung wird in der Diskussion detaillierter betrachtet.

In den Überlappungsbereichen der einzelnen PCR-Klone treten 11 Basensubstitutionen auf, von denen nur vier in Exons liegen. Diese führen auf Proteinebene zu drei Aminosäuresubstitutionen. Zwischen der aus der HtH2-cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz und der aus den genomischen Sequenzen erhaltenen Aminosäuresequenz tauchen darüber hinaus noch 16 Unterschiede auf. Davon sind sechs Substitutionen isofunktionelle Austausch. Die restlichen liegen nicht konservierten Bereichen innerhalb der Primärstruktur. In der folgenden Abbildung ist die über genomische PCR zusätzlich zur cDNA sequenzierte abgeleitete Aminosäuresequenz mit einer relativen Molekülmasse von 73 kDa der FUs HtH2-*a* und HtH2-*b* gezeigt.

```

QHLTQLPDLVSDPLFVDPEGGKAHDNAWYRGNKFKENKKTARAVDDRLFKEKVGPGENTRLFEGILDALDAQDEFKCNF
EIQFELAHNAIHLYLVGGRHTYSMSHLEYTSYDPLFFLHHSNTDRIFAIWQRLQVLRGKDPNTADCAHNLIHEPMEP
FRRDSNPLDLTRENSKPIDSFYAHLGYYDDLTNGMTPPEELNSYLHERSGKEGVFASFRLSGFGGSANVVVYAC
RPAHDEMAVDQCDKAGDFVVLGGPTTEMPWRFYRAFHFVDVTSIDNIDKDRHGHYYVKAELFSVNGSALPNDLLPQP
TISHRPARGHVDEAPAPSSDAHLAVRKDINHLTREEVYELRRAMERFQADTSVDGYQATVEYHGLPARCPFPEATN
RFACCIHGMAFPPHWRRLFVTQVEDALIRRGSPIGVPYWDWTQPMALPGLADNATYRDPISGDSRHNPFHDVEVA
FENGRTERHPDSRLEQPLFGKHTRLFDSIVYAFEQEDFCDFEVQFEMTHNNIHAWIGGGGKYSMSSLHYTAFDPI
SYLHHSNTDRLWAIWQALQIRRNKPYKAHCAWSEERQPLKPFASFSSPLNNEKTYENSVPNTVYDYEGLGYTYDD
LNFGGMDLQLEEYIQRQRDRTFAG
    
```

Abb. 22: Aus dem Genom abgeleitete partielle Aminosäuresequenz der FUs HtH2-*a* und HtH2-*b*.

Die hier abgebildete Aminosäuresequenz ist aus den PCR-Klonen „PCR HtH2-10“ und „PCR HtH2-11“ abgeleitet und lag nicht in Form von cDNA-Klonen vor. HtH2-*a* ist gelb und HtH2-*b* orange dargestellt. Von HtH2-*a* fehlen noch etwa 100 Aminosäuren aus dem N-terminalen Anfangsbereich.

In Abbildung 23 ist schematisch die partielle Genstruktur des HtH2-Gens gezeigt. Introns sind hier wieder als grau gemusterte Blöcke zwischen den farbigen Exons dargestellt. Die Größe der Exon- und Intron-Blöcke entspricht in etwa ihrer relativen Länge.



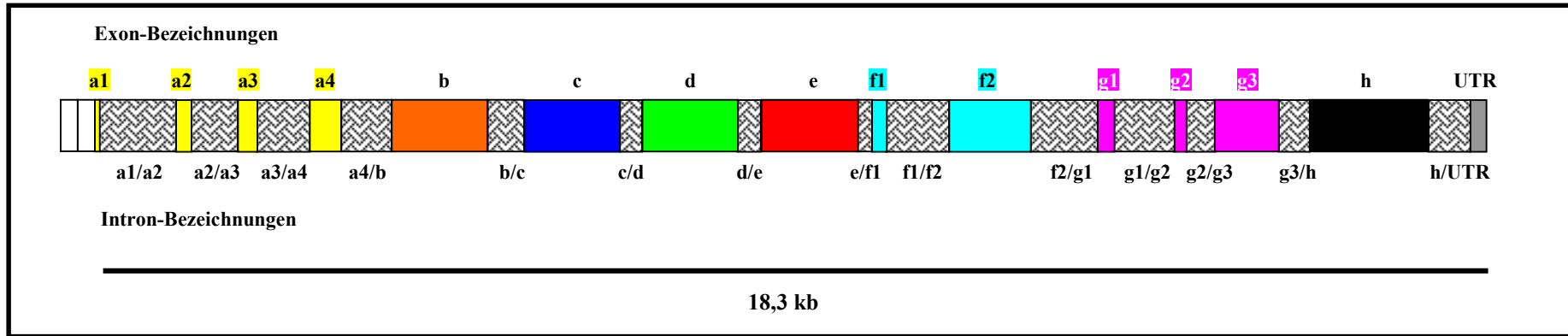


Abb. 23: Struktur des Hth2-Gens.

Das Hth2-Gen, soweit es bislang sequenziert wurde, ist mit gut 18 kb Länge in 15 Exons (farbige Blöcke) und 14 Introns (grau gemusterte Blöcke) unterteilt. Die Farben der einzelnen Exons entsprechen der Darstellung der cDNA. Die für Hth2-*a* kodierende Sequenz ist nur partiell kloniert und sequenziert. Am 3'-Ende des Gens schließt sich an die für Hth2-*h* kodierende Sequenz ein untranslatierter Bereich (3'-UTR, grau) an, der ein Polyadenylierungssignal beinhaltet. Die Größe der einzelnen farbigen Exons und der grau gemusterten Introns entspricht in etwa ihrer relativen Länge. Weiße Bereiche sind bislang noch nicht sequenziert.

Die bis hierher analysierte Sequenz des Hth2-Gens ist bislang unveröffentlicht und in der EMBL-Datenbank unter der Accession-Nummer AJ 297475 erst nach Publikation zugänglich.



D. Diskussion

Ziel meiner Doktorarbeit war es, die Primär- und Genstruktur der Isoform 1 des *Haliotis tuberculata*-Hämocyanins (HtH1) zu ermitteln. Parallel dazu sollte damit begonnen werden, die Isoform HtH2 zu sequenzieren. Da die Versuche in enger Zusammenarbeit mit meinem Betreuer Bernhard Lieb durchgeführt wurden, ist es nicht möglich, die Einzelergebnisse zu trennen. Die dargestellte Analyse der Primär- und Genstruktur beider Isoformen des HtH wurde anteilig zu etwa zwei Dritteln von mir angefertigt.

Als weiteres Ziel der Arbeit sollte ein Weg gefunden werden, die DNA-Sequenz der beiden Isoformen des Hämocyanins der Schlüssellochschncke *Megathura crenulata* zu entschlüsseln. Wie sich im Folgenden zeigen wird, sind wir über die Analyse der Genstrukturen des HtH und den daraus gewonnenen Erkenntnissen auch hierzu in der Lage gewesen. Diese Arbeiten wurden fast vollständig von Bernhard Lieb und dem von uns mitbetreuten Diplomanden Christian Awenius durchgeführt. Da mein Anteil an diesen Daten sehr gering ist, sind die Resultate der Untersuchung der beiden KLH-Isoformen nicht im Kapitel „Ergebnisse“ aufgeführt. Sie werden aber hier kurz mitdiskutiert.

1. Die Sequenz des *Haliotis tuberculata* Hämocyanins

Aus einer früher in unserer Arbeitsgruppe erstellten oligo-dT-geprimten cDNA-Bank sowie einer weiteren von Bernhard Lieb mit random-Primern synthetisierten cDNA-Bank konnten Klone isoliert werden, die für die vollständige Primärstruktur des HtH1 kodieren. Am Anfang der cDNA findet sich kein Start-Kodon, die mRNA ist demnach noch nicht vollständig kloniert und sequenziert. Der ORF kodiert für 3419 Aminosäuren. Die kodierte Sequenz beginnt mit einem Abschnitt aus 15 Aminosäuren, den wir als Signalpeptid (*s*) interpretieren. Dieser Abschnitt, der überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren besteht, wird offenbar posttranslational abgespalten. Die aus direkter Proteinsequenzierung des nativen HtH1 erhaltene N-terminale Anfangssequenz „**DNVVRKDVSHLTDDEVQ**“ (Keller et al., 1999) ist im Anschluß an die Signalsequenz kodiert. Die Primärstruktur des in die Hämolymphe sezernierten HtH1 ist also vollständig kloniert und sequenziert. Sie besteht aus 3404 Aminosäuren mit einer errechneten Molekülmasse von 391 kDa, was mit der anhand von SDS-Gelen bestimmten Masse des nativen Moleküls von etwa 400 kDa übereinstimmt (Keller et al., 1999). In den Überlappungsbereichen der einzelnen cDNA-Klone sind an 23 Positionen unterschiedliche Basen enthalten. Von diesen 23 Basenaustauschen führen lediglich sechs in der Primärstruktur zu Aminosäuresubstitutionen. Diese sechs variablen



Aminosäuren sind im Ergebnisteil beschrieben. Wir gehen davon aus, daß es sich hierbei um Sequenzabweichungen aufgrund verschiedener Allele des HtH1-Gens handelt. Es ist nicht verwunderlich, daß hier mehrere verschiedene Allele in den einzelnen cDNA-Klonen repräsentiert sind, da für die beiden cDNA-Banken RNA von mehr als dreißig Individuen präpariert wurde. Darüber hinaus treten 26 Unterschiede zwischen den aus der cDNA und den aus genomischen Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen auf.

Ein Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des HtH1 mit der Sequenz des Hämocyanins von *Octopus dofleini* (Miller et al., 1998) ist in Abbildung 24 dargestellt. Dabei sind die aus der Röntgenstrukturanalyse von OdH-g ermittelten Sekundärstrukturen, die Disulfid- sowie Thioetherbrücken und die potentiellen N-Glykosilierungsstellen in den FUs beider Hämocyanine mit eingezeichnet. Es zeigt sich deutlich, daß neben den in allen FUs konservierten Aminosäuren (grün unterlegt) für einige topografisch an gleicher Position innerhalb der Polypeptidkette beider Hämocyanine liegende FUs konservierte Sequenzeinschübe bzw. -lücken auftreten. Diese FU-typischen Abweichungen sind gelb unterlegt. Die Verlängerung der HtH1-h von etwa 95 Aminosäuren kommt sonst in keiner anderen funktionellen Domäne vor. Die im aktiven Zentrum für die Bindung der beiden Kupferatome benötigten sechs Histidinreste sind rot markiert. Die schwarz markierten Aminosäuren kennzeichnen die Positionen, an denen durch verschiedene Allele des HtH1-Gens unterschiedliche Aminosäuren kodiert sind. Es wird deutlich, daß diese möglichen allelen Unterschiede alle in Sequenzabschnitten liegen, die nicht konserviert sind.

Auffällig ist die Lage der potentiellen N-Glykosilierungsstellen in zwei Bereichen, die mit hellem Blau (in OdH) und dunklem blau (in HtH1) gekennzeichnet sind. Im HtH1 finden sich zwölf solcher Sequenzmotive (**NXT** bzw. **NXS**) und zwar in allen FUs außer in HtH1-c. Die funktionellen Domänen HtH1-b bis HtH1-g besitzen jeweils zwei solche Motive. Neben der etwas verstreuten Anordnung dieser potentiellen N-Glykosilierungsstellen im vorderen Teil zwischen den α -Helices $\alpha 2$ und $\alpha 7$ innerhalb der Kern-Domäne ist die konservierteste Position zwischen den β -Faltblattsträngen $\beta 11$ und $\beta 12$, wo in acht der fünfzehn in Abbildung 24 gezeigten FUs eine solche potentielle N-Glykosilierungsstelle liegt.

Die Lage der in OdH-g nachgewiesenen Disulfid- und Thioetherbrücken sind mit eingezeichnet. Die Disulfidbrücke zwischen den β -Faltblättern $\beta 2$ und $\beta 3$ sowie die direkt folgende Thioetherbrücke scheinen für die korrekte Faltung des aktiven Zentrums eine wichtige Rolle zu spielen, da die dafür benötigten Cystein- und Histidinreste in allen funktionellen Domänen konserviert sind. Das gleiche gilt für die Disulfidbrücke zwischen α -8 und α -11, die die Kupferbindungsstelle Cu-B des aktiven Zentrums umspannt. Die in OdH-



g nachgewiesene Disulfidbrücke zwischen $\beta 8$ und $\beta 9$ scheint dagegen nicht für alle funktionellen Domänen notwendig zu sein. In den funktionellen Domänen HtH1-*b*, OdH-*b*, OdH-*c* und HtH1-*h* fehlen die Cysteinreste, die diese Disulfidbrücke bilden.



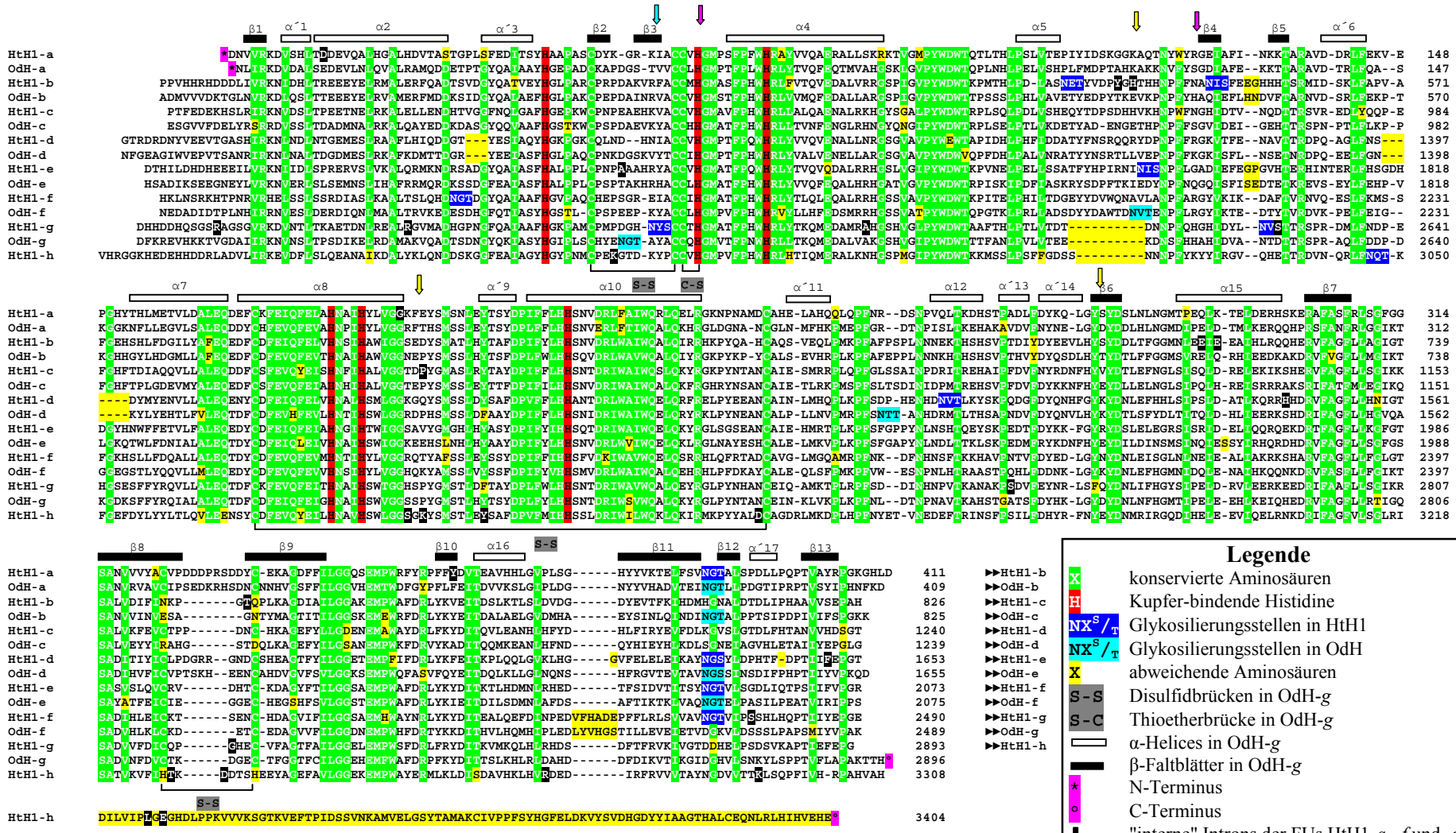


Abb. 24: Ein Sequenzalignment der FUs von HttH1 und OdH. Details sind im Text besprochen.

DISCUSSION

Die Lage der potentiellen N-Glykosilierungsstellen im HtH1 sind in Abbildung 25 in die Tertiärstruktur von OdH-g (Cuff et al., 1998) eingezeichnet. Die in OdH-g zwischen $\beta 2$ und $\beta 3$ nachgewiesene Zuckerseitenkette ist mit einem Pfeil markiert. Die potentiellen N-Glykosilierungsstellen der einzelnen FUs des HtH1 sind entsprechend den bislang verwendeten Farben als Kreise in die Tertiärstruktur eingefügt. In der räumlichen Anordnung läßt sich erahnen, daß solche Kohlenhydratketten, die an der konservierten N-Glykosilierungsstelle zwischen $\beta 11$ und $\beta 12$ angeheftet sind, den gleichen Raum ausfüllen könnten wie die von OdH-g. Allerdings liegen diese konservierten potentiellen N-Glykosilierungsstellen in der β -Faltblatt-Domäne, die Zucker würden also von der anderen Seite her kommen. Eine ähnliche Positionierung der Zuckerseitenkette von der Kern-Domäne aus wäre auch für HtH1-g (in $\beta 3$) zu vermuten. Eine solche konstante Anordnung einer potentiellen Kohlenhydratkette mag eine funktionelle Rolle spielen. Ob diese Positionen allerdings tatsächlich glykosiliert sind, kann nur durch eine Analyse der Kohlenhydratseitenketten am nativen Molekül geklärt werden. Beim KLH wurden allerdings für eine Reihe von funktionellen Domänen N-Glykosilierungen nachgewiesen (Stoeva et al., 1999). Darauf wird später in diesem Kapitel noch genauer eingegangen.



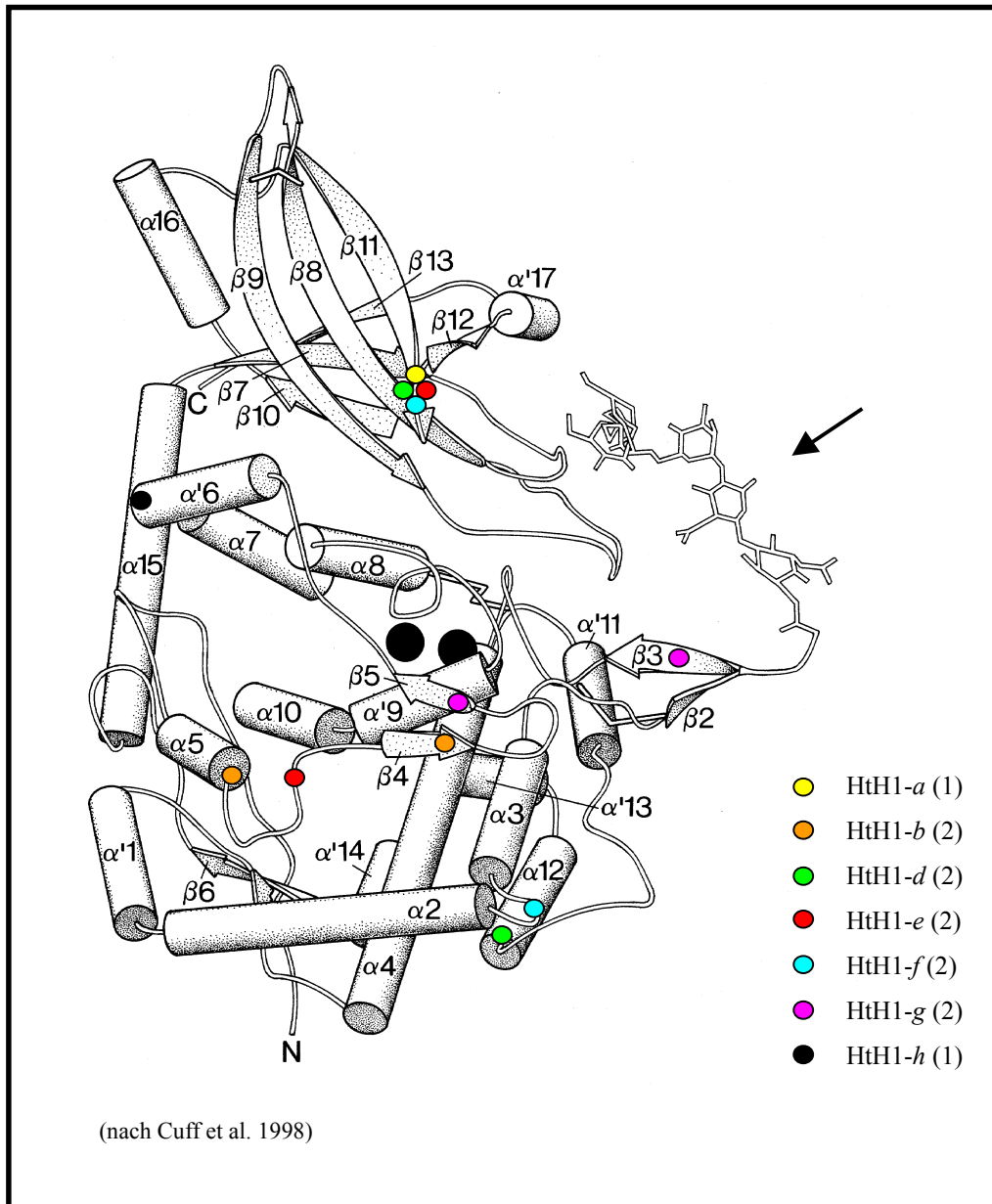
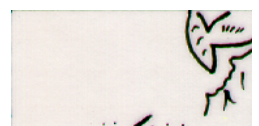


Abb. 25: Die potentiellen N-Glykosilierungsstellen der FUs vom HtH1 in der Tertiärstruktur von OdH-g.

Die Position der potentiellen N-Glykosilierungsstellen der einzelnen FUs sind in Form farbiger Kreise in die Tertiärstruktur von OdH-g eingezeichnet. Die in OdH-g nachgewiesene Kohlenhydratkette ist mit einem Pfeil markiert.

Die errechnete Molekülmasse des nativen, in die Hämolymphe sezernierten Proteins bestehend aus 3404 Aminosäuren beträgt ca. 392 kDa, was der in der SDS-PAGE bestimmten Molekülmasse von etwa 400 kDa entspricht (Keller et al. 1999). Für die einzelnen, durch proteolytische Spaltung aus dem nativen Molekül erhaltenen funktionellen Domänen wurden neben den N-terminalen Anfangssequenzen auch die Molekülmassen in



der SDS-PAGE bestimmt (Keller et al. 1999). Diese Molekülmassen stimmen für einige aus der cDNA abgeleitete Sequenzen überein. HtH1-*b* hat eine errechnete Molekülmasse von 48,1 kDa (über SDS-PAGE 48 kDa), HtH1-*e* hat 48,4 kDa (über SDS-PAGE 49 kDa), HtH1-*g* hat 46,2 kDa (über SDS-PAGE 45 kDa) und HtH1-*h* hat eine errechnete Molekülmasse von 59,2 kDa (über SDS-PAGE bestimmt mit 60 kDa). In den anderen FUs treten Unterschiede in der über SDS-PAGE bestimmten und errechneten Molekülmasse von bis zu 8 kDa auf. Diese Unterschiede können zum einen dadurch erklärt werden, daß die von uns gewählte Unterteilung der abgeleiteten Aminosäuresequenz in einzelne FUs anhand der Exon-Intron-Grenzen des Gens gezogen wurde. Diese Unterteilung stimmt nur ungefähr mit den proteolytischen Spaltprodukten überein. Zum anderen ist das native Molekül glykosiliert und kann daher eine größere Molekülmasse erhalten. Dies trifft für die funktionellen Domänen HtH1-*a* und HtH1-*f* zu. Hier sind die errechneten Molekülmassen tatsächlich geringer als die über SDS-PAGE bestimmten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß diese FUs tatsächlich im nativen Zustand glykosiliert vorliegen. Bei HtH1-*c* und HtH1-*d* sind die errechneten Molekülmassen größer.

Durch Kreuzhybridisierung einer aus einem HtH1-Klon erstellten DNA-Sonde konnte aus der oligo-dT-geprägten cDNA-Bank von *Haliothis* auch ein Klon isoliert werden, der für HtH2 kodierte. Mit Hilfe dieses Klons konnte eine spezifische HtH2-Sonde erstellt und die cDNA des HtH2 identifiziert werden. Wie im Ergebnisteil bereits geschildert, konnte auf diese Weise ein großer Teil der cDNA des HtH2 kloniert und sequenziert werden. Die darin kodierte Aminosäuresequenz umfaßt 2672 Aminosäuren, was einer errechneten Molekülmasse von 306 kDa entspricht. Darin sind die funktionellen Domänen HtH2-*c* bis HtH2-*h* vollständig und HtH2-*b* mit 94 Aminosäuren partiell enthalten. Neben den kodierten FUs besteht die cDNA aus einem 3'-UTR von 240 Nukleotiden mit Polyadenylierungssignal und poly-A⁺-Schwanz. In den insgesamt 8258 bp der cDNA tauchen in den Überlappungsregionen der einzelnen cDNA-Klone an 14 Positionen unterschiedliche Basen auf, die auf Proteinebene zu zwei Aminosäuresubstitutionen führen. Diese beiden alternativen Aminosäuren sind im Ergebnisteil geschildert. Auch bei diesen Substitutionen gehen wir davon aus, daß es sich um unterschiedliche Allele des HtH2-Gens handelt. Da für die bislang sequenzierte cDNA des HtH2 nur vier Klone ausreichen, sind in den Überlappungsbereichen der Klone entsprechend auch weniger allele Formen zu finden als in der cDNA des HtH1. Im Vergleich zwischen den abgeleiteten Aminosäuresequenzen aus der cDNA und den genomischen Sequenzen treten 20 weitere Unterschiede auf. Diese liegen wie auch beim HtH1 vornehmlich in nicht-konservierten Sequenzabschnitten (siehe Abbildung 26).



Neben der aus der cDNA bekannten kodierenden Sequenz der funktionellen Domänen HtH2-*b* bis HtH2-*h* konnten mit Hilfe der in Abbildung 14, S. 61 dargestellten degenerierten Primer weitere Abschnitte aus dem 5'-Bereich des HtH2-Gens amplifiziert werden. So ließ sich das für HtH2-*b* kodierende Exon vervollständigen und aus dem Bereich der kodierenden Sequenz von HtH2-*a* die einzelnen Exons und Introns amplifizieren. Das erste für HtH2-*a* kodierende Exon ist allerdings noch nicht vollständig kloniert und sequenziert. Es fehlen hier noch etwa 100 Aminosäuren bis zum N-terminalen Anfang des sezernierten Proteins. Anhand der exakten Übereinstimmung der Genstrukturen von HtH1 und HtH2 zwischen den bis dahin sequenzierten Abschnitten konnten wir aus den mit degenerierten Primern erhaltenen genomischen Fragmenten, deren kodierende Sequenz nicht in cDNA-Klonen enthalten und daher für uns unbekannt war, die Exon-Intron-Grenzen im Vergleich zum HtH1-Gen ermitteln. Dabei haben wir uns an den konservierten Splice-Stellen der Introns, an den Intron-Phasen, an den Positionen der Introns innerhalb der kodierenden Sequenz sowie den daraus resultierenden Exon-Größen orientiert.

Insgesamt haben wir über die genomischen Sequenzen 316 Aminosäuren von HtH2-*a* und die in der cDNA nicht kodierten fehlenden 319 Aminosäuren von HtH2-*b* ermittelt. Damit ist auch die Primärstruktur der zweiten Isoform des Hämocyanins von *Haliotis tuberculata* fast vollständig sequenziert. Ein Vergleich der funktionellen Domänen des HtH2 mit OdH ist in Abbildung 26 dargestellt. Konservierte Aminosäuren sind grün unterlegt, die sechs Histidine der Kupferbindungsstellen sind rot gekennzeichnet und die potentiellen N-Glykosilierungsstellen sind hellblau (für OdH) oder dunkelblau (für HtH2) unterlegt. Die aus der Röntgenstrukturanalyse von OdH-g bekannten Sekundärstrukturelemente sind ebenfalls mit angegeben. Auch hier zeigt sich wie beim Vergleich der Primärstrukturen von HtH1 und OdH deutlich, daß neben den in allen FUs konservierten Aminosäuren einige Positionen FU-spezifisch abweichen. Auffallend sind hier besonders FU-spezifische Sequenzeinschübe und Deletionen, die gelb unterlegt sind. Auch HtH2-*h* ist um knapp hundert Aminosäuren länger als alle anderen FUs. Diese Verlängerung ist ebenfalls gelb markiert. Es finden sich in der Primärstruktur des HtH2 zehn potentielle N-Glykosilierungsstellen. In HtH2-*c* und HtH2-*e* liegen jeweils zwei und in den restlichen FUs je eine. Sie befinden sich entweder verteilt im vorderen Bereich der Kern-Domäne oder zwischen den β -Faltblättern $\beta 11$ und $\beta 12$ in der β -Faltblatt-Domäne. Hier ist lediglich die Position der potentiellen N-Glykosilierungsstelle von HtH2-*h* um fünf Positionen zum C-Terminus hin verrutscht und befindet sich zwischen $\beta 12$ und $\alpha' 17$.



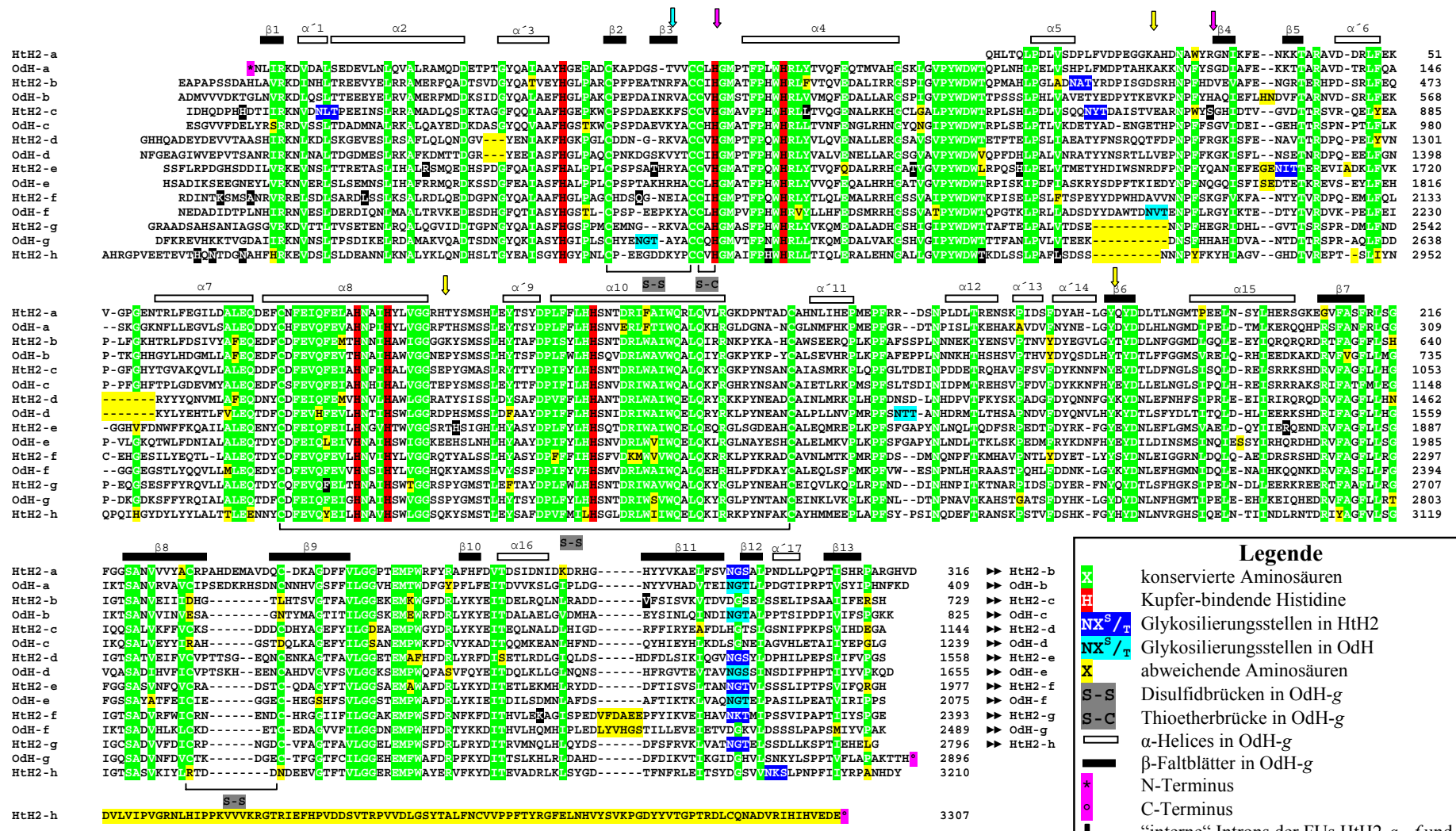


Abb. 26: Ein Sequenzalignement der FUs von Hth2 und OdH. Für Details siehe Text.

Legende

- X konservierte Aminosäuren
- H Kupfer-bindende Histidine
- NX^S / T Glykosilierungsstellen in Hth2
- NX^S / T Glykosilierungsstellen in OdH
- X abweichende Aminosäuren
- S-S Disulfidbrücken in OdH-g
- S-C Thioetherbrücke in OdH-g
- α-Helices in OdH-g
- β-Faltblätter in OdH-g
- * N-Terminus
- o C-Terminus
- ↓ "interne" Introns der FUs Hth2-a, -f und -g
- X mögliche Allele

DISKUSION

Die Lage der potentiellen N-Glykosilierungsstellen des HtH2 innerhalb der Tertiärstruktur von OdH-g ist in Abbildung 27 durch farbige Kreise symbolisiert. Wie sich hier deutlich zeigt, sind auch fast alle der im HtH2 enthaltenen potentiellen N-Glykosilierungsstellen so positioniert, daß bei tatsächlicher Glykosilierung die angehefteten Kohlenhydratketten den gleichen Raum in der Tertiärstruktur einnehmen könnten, wie die nachgewiesene Zuckerseitenkette in OdH-g. Dies sind insbesondere die in der β -Faltblatt-Domäne zwischen $\beta 11$ und $\beta 12$ liegenden Stellen der funktionellen Domänen HtH2-*a*, HtH2-*d*, HtH2-*e*, HtH2-*f* und HtH2-*g* sowie die zwischen $\beta 12$ und $\alpha'17$ liegende Stelle in HtH2-*h*. Von den in der Kern-Domäne liegenden Glykosilierungsstellen käme eine ähnliche Positionierung der Kohlenhydratkette nur für HtH2-*e* innerhalb des $\beta 5$ -Faltblattes in Frage. Eine konkrete Aussage zur tatsächlichen Glykosilierung ist aber nur anhand des nativen Proteins möglich.



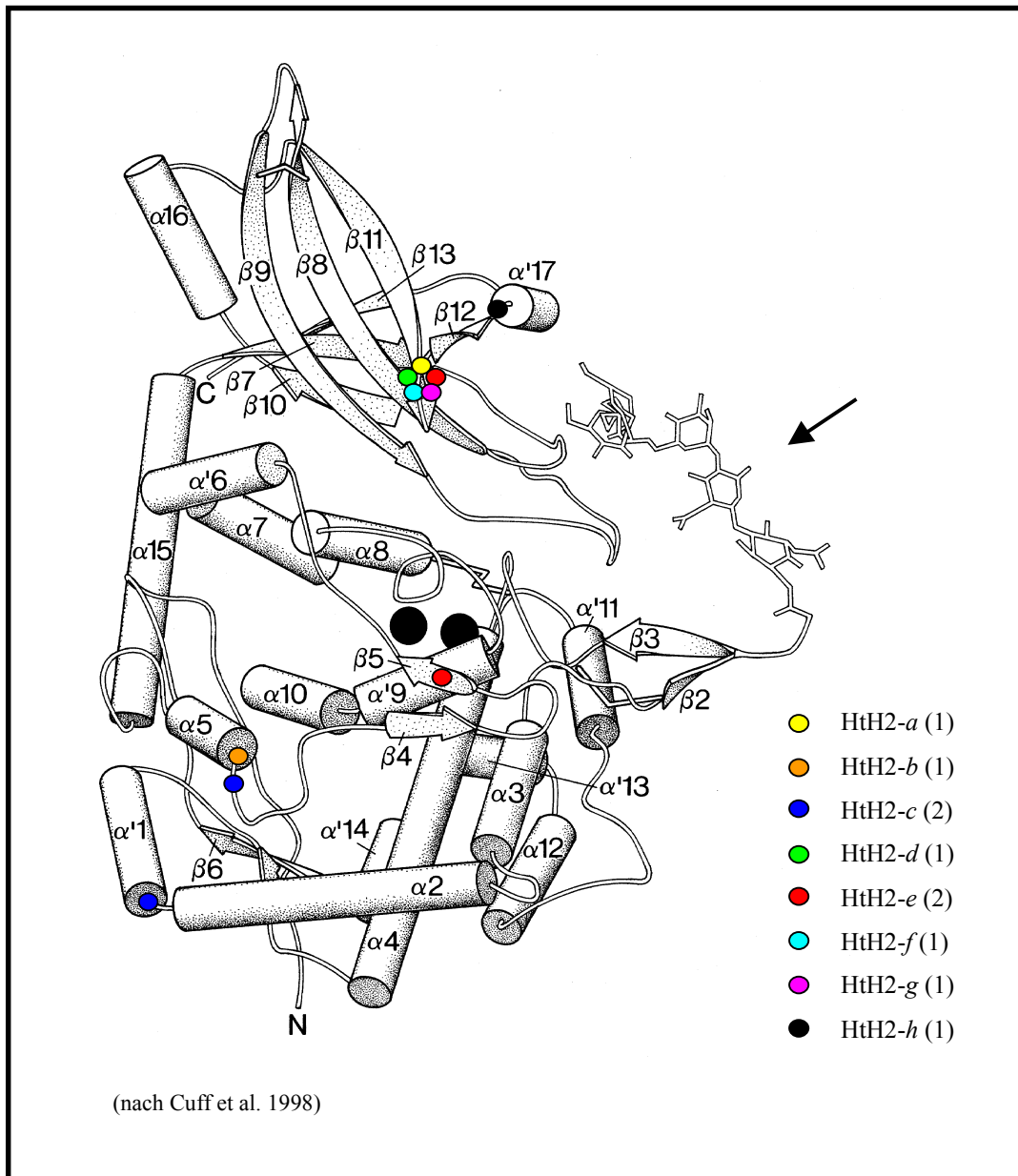


Abb. 27: Die potentiellen N-Glykosilierungsstellen der FUs vom HtH2 in der Tertiärstruktur von OdH-g.

Die Position der potentiellen N-Glykosilierungsstellen der einzelnen FUs sind in Form farbiger Kreise in die Tertiärstruktur von OdH-g eingezeichnet. Die in OdH-g nachgewiesene Kohlenhydratkette ist mit einem Pfeil markiert.

Aus dem nativen HtH2 sind durch proteolytische Spaltung und SDS-PAGE die Molekülmassen der funktionellen Domänen HtH2-d, HtH2-e, HtH2-g und HtH2-h ermittelt worden (Lieb et al. 1999). Die aus der Sequenz des HtH2 errechneten Molekülmassen dieser funktionellen Domänen stimmen in etwa mit den über SDS-PAGE bestimmten Molekülmassen überein.



Da auch HtH2 fast vollständig sequenziert ist, ist es erstmalig möglich, die Primärstrukturen der beiden Isoformen eines Gastropoden-Hämocyanins miteinander zu vergleichen. Ein solches Alignment zwischen HtH1 und HtH2 ist in Abbildung 28 gezeigt. Anders als in Abbildung 24, bei der die einzelnen funktionellen Domänen untereinander dargestellt wurden, sind in diesem Alignment die durchgehenden Sequenzen von HtH1 und HtH2 zu sehen. Die in allen funktionellen Domänen konservierten Aminosäuren sind wie in den Abbildungen 24 und 26 grün unterlegt. Die FU-spezifischen Übereinstimmungen zwischen HtH1 und HtH2 sind gelb markiert. Die potentiellen N-Glykosilierungsstellen sind blau und die Histidinreste der Kupferbindungsstellen rot gekennzeichnet. Die in den funktionellen Domänen HtH-*b* und HtH-*h* fehlenden Cysteinreste, die potentiell in allen anderen FUs die dritte in OdH-*g* nachgewiesene Disulfidbrücke zwischen $\beta 8$ und $\beta 9$ bilden, sind lila unterlegt. Pfeile markieren die Positionen, an denen auf genomischer Ebene „interne“ Introns die kodierenden Sequenzen der FUs HtH-*a*, HtH-*f* und HtH-*g* in mehrere Exons unterteilen. Diese Positionen sind in beiden HtH-Genen konserviert. Darauf wird später noch detaillierter eingegangen. FU-unabhängige Lücken (aufgrund von Deletionen bzw. Insertionen) sind in dem gezeigten Alignment schwarz hervorgehoben.



Hth1-a DNVRKDVSHLDDEVQALHGLHDVTA^{Phase 0}STGPLSFEDITSYHAAFCQDYKRKIA^{Phase 0}CVVGMPSFFFWRAVVVQAFRALLSKRKTVMGYWDWTLTLHPSLVTEPIYIDSKGKK AQTNNYWRGEBAFINNKARAVDDRFEKVEPCHYTHLMTVLDALBQDEFCKFEIQPE
Hth2-a QHLTQLDPLVSDLEFLVDFPEGGK AHDNAWYRGNKFKENKKAARAVDDRFEKVGQENTRLEFEGILLALBQDEFQNFQIQPE

Hth1-a LAENATHYLVGGK^{Phase 2}EYSNSNEVTSYDPIFLEHSNDRFAIWRLOELRGNKNPAMD^{Phase 2}AHLEHAHQLOLPPNRDSNVQVLKDHSTFADLDRYQOLGYSYDLSNINLNGMTPEOKTE^{Phase 2}DERHSKEAFASERLSEFGGGSANVVVYAQVDDPDDSDDYCEKAGDFFILGGQSEMP
Hth2-a LAENATHYLVGGGRH TYS^{Phase 2}SHDETSYDPIFLEHSNDRFAIWRLOELRGNKNPAMD^{Phase 2}AHLEHAHQLOLPPNRDSNVQVLKDHSTFADLDRYQOLGYSYDLSNINLNGMTPEOKTE^{Phase 2}DERHSKEAFASERLSEFGGGSANVVVYAQVDDPDDSDDYCEKAGDFFILGGQSEMP

Hth1-a NRYFRAPFFYDVTAEVHHLG^{Phase 0}VPLSGHYVVKTE^{Phase 0}WFSVNGTASPDLLPOPTVAYR^{Phase 0}GKGHLD Hth1-b PPVHRRHDDLLV^{Phase 0}WRKNDH^{Phase 0}TREEEYER^{Phase 0}MALERFOA^{Phase 0}TSVD^{Phase 0}CYQATVEY^{Phase 0}GLPARC^{Phase 0}PRPDAKVRFA^{Phase 0}CCMGAS^{Phase 0}FFHW^{Phase 0}RF^{Phase 0}FVQV^{Phase 0}EDALVRR^{Phase 0}CSP^{Phase 0}IGVP
Hth2-a NRYFRAPFFYDVTSDIDNIDKDRHGHYVVKAE^{Phase 0}WFSVNGSALPNDLLPOPTVAYR^{Phase 0}ARGHVD Hth2-b EAPAPSSDAHLAV^{Phase 0}RKDNH^{Phase 0}TREEEYER^{Phase 0}MALERFOA^{Phase 0}TSVD^{Phase 0}CYQATVEY^{Phase 0}GLPARC^{Phase 0}PFPEATNRFA^{Phase 0}CCMGAT^{Phase 0}FFHW^{Phase 0}RF^{Phase 0}FVQV^{Phase 0}EDALVRR^{Phase 0}CSP^{Phase 0}IGVP

Hth1-b YWDWTKPMTL^{Phase 0}LPDLAS^{Phase 0}NETVYD^{Phase 0}PYGHTH^{Phase 0}NPF^{Phase 0}FNANIS^{Phase 0}FEEGHHE^{Phase 0}TS^{Phase 0}MIDSKL^{Phase 0}APVA^{Phase 0}CEHSHLFDG^{Phase 0}ILYAF^{Phase 0}EQEDF^{Phase 0}CFEIQFELV^{Phase 0}NS^{Phase 0}HAWIGG^{Phase 0}SEDYS^{Phase 0}WAT^{Phase 0}HTAF^{Phase 0}DFI^{Phase 0}YLF^{Phase 0}SNV^{Phase 0}DRLWAIW^{Phase 0}ALCIR^{Phase 0}NKPYQAH^{Phase 0}CAQ^{Phase 0}SV^{Phase 0}EQL^{Phase 0}MP^{Phase 0}FAP^{Phase 0}SPL^{Phase 0}NNEK^{Phase 0}THSHSV^{Phase 0}P
Hth2-b YWDWTKPMAH^{Phase 0}LPGLAD^{Phase 0}NATYRDP^{Phase 0}ISGDSR^{Phase 0}NPF^{Phase 0}HDVEVAF^{Phase 0}E^{Phase 0}NGR^{Phase 0}TE^{Phase 0}HPDSR^{Phase 0}LE^{Phase 0}BQPLF^{Phase 0}GKHTRL^{Phase 0}FDS^{Phase 0}IVYAF^{Phase 0}EQEDF^{Phase 0}CFEIQFELV^{Phase 0}NS^{Phase 0}HAWIGG^{Phase 0}GGKYS^{Phase 0}SS^{Phase 0}HTAF^{Phase 0}DFI^{Phase 0}YLF^{Phase 0}SNV^{Phase 0}DRLWAIW^{Phase 0}ALCIR^{Phase 0}NKPYQAH^{Phase 0}CAWS^{Phase 0}EERQ^{Phase 0}LP^{Phase 0}FAP^{Phase 0}SPL^{Phase 0}NNEK^{Phase 0}THYNSV^{Phase 0}P

Hth1-b TDIDYVEEVLH^{Phase 0}YS^{Phase 0}DDLT^{Phase 0}FGGM^{Phase 0}EE^{Phase 0}TEEA^{Phase 0}HLRQ^{Phase 0}QHE^{Phase 0}VFAG^{Phase 0}L^{Phase 0}AG^{Phase 0}IGT^{Phase 0}SAL^{Phase 0}VDI^{Phase 0}FINK^{Phase 0}PGT^{Phase 0}OLPK^{Phase 0}ACDIA^{Phase 0}L^{Phase 0}GGAK^{Phase 0}EM^{Phase 0}AF^{Phase 0}DR^{Phase 0}LK^{Phase 0}VEI^{Phase 0}T^{Phase 0}DSL^{Phase 0}TLS^{Phase 0}DVD^{Phase 0}GDYEV^{Phase 0}TFK^{Phase 0}THDM^{Phase 0}GNAL^{Phase 0}DTD^{Phase 0}LI^{Phase 0}PHAA^{Phase 0}VSE^{Phase 0}EAH Hth1-c PTFE^{Phase 0}EKHS^{Phase 0}LR^{Phase 0}LR^{Phase 0}KN^{Phase 0}VD^{Phase 0}SL^{Phase 0}TPEE
Hth2-b TNVDYVEGVLG^{Phase 0}TY^{Phase 0}DLN^{Phase 0}FGGMD^{Phase 0}GO^{Phase 0}BEY^{Phase 0}L^{Phase 0}QROR^{Phase 0}QD^{Phase 0}TFAG^{Phase 0}LF^{Phase 0}SHIGT^{Phase 0}SA^{Phase 0}NVEI^{Phase 0}IIDH^{Phase 0}GL^{Phase 0}L^{Phase 0}TS^{Phase 0}VG^{Phase 0}TAF^{Phase 0}YLS^{Phase 0}GGKE^{Phase 0}KE^{Phase 0}KW^{Phase 0}GR^{Phase 0}LY^{Phase 0}KYEI^{Phase 0}DEL^{Phase 0}RQL^{Phase 0}N^{Phase 0}RADD^{Phase 0}VFS^{Phase 0}ISV^{Phase 0}K^{Phase 0}TDV^{Phase 0}D^{Phase 0}SE^{Phase 0}LS^{Phase 0}SEL^{Phase 0}ISAAT^{Phase 0}IFERSH Hth2-c IDH^{Phase 0}QDP^{Phase 0}HDTI^{Phase 0}LR^{Phase 0}KN^{Phase 0}VD^{Phase 0}SL^{Phase 0}TPEE

Hth1-c TNE^{Phase 0}RR^{Phase 0}MLEL^{Phase 0}EN^{Phase 0}HT^{Phase 0}VCG^{Phase 0}F^{Phase 0}NQL^{Phase 0}GAF^{Phase 0}HGE^{Phase 0}KWC^{Phase 0}PN^{Phase 0}PEAE^{Phase 0}HKVA^{Phase 0}CC^{Phase 0}VGM^{Phase 0}AV^{Phase 0}FE^{Phase 0}HT^{Phase 0}RL^{Phase 0}LAL^{Phase 0}QAL^{Phase 0}NAL^{Phase 0}RKH^{Phase 0}YS^{Phase 0}GAL^{Phase 0}PY^{Phase 0}WD^{Phase 0}TR^{Phase 0}PL^{Phase 0}SOL^{Phase 0}ED^{Phase 0}Y^{Phase 0}SH^{Phase 0}EQ^{Phase 0}Y^{Phase 0}DD^{Phase 0}PS^{Phase 0}DH^{Phase 0}VKH^{Phase 0}N^{Phase 0}PWF^{Phase 0}NGH^{Phase 0}DT^{Phase 0}VNQ^{Phase 0}DT^{Phase 0}TS^{Phase 0}VRED^{Phase 0}Y^{Phase 0}QO^{Phase 0}PE^{Phase 0}GH^{Phase 0}FT^{Phase 0}DI^{Phase 0}AQ^{Phase 0}VLL^{Phase 0}AL^{Phase 0}BQ^{Phase 0}DD^{Phase 0}CF^{Phase 0}SE^{Phase 0}VQ^{Phase 0}YE^{Phase 0}IS^{Phase 0}NP^{Phase 0}HAL^{Phase 0}VG^{Phase 0}CD
Hth2-c INS^{Phase 0}RR^{Phase 0}MAD^{Phase 0}LQS^{Phase 0}KTAG^{Phase 0}C^{Phase 0}FOQ^{Phase 0}AAF^{Phase 0}HGE^{Phase 0}KWC^{Phase 0}PS^{Phase 0}DAEK^{Phase 0}KFS^{Phase 0}CC^{Phase 0}VGM^{Phase 0}AV^{Phase 0}FE^{Phase 0}HT^{Phase 0}RL^{Phase 0}L^{Phase 0}VQ^{Phase 0}GNAL^{Phase 0}RKH^{Phase 0}CL^{Phase 0}GAL^{Phase 0}PY^{Phase 0}WD^{Phase 0}TR^{Phase 0}PL^{Phase 0}SH^{Phase 0}LE^{Phase 0}DL^{Phase 0}V^{Phase 0}QO^{Phase 0}DT^{Phase 0}AI^{Phase 0}ST^{Phase 0}VEAR^{Phase 0}NP^{Phase 0}WY^{Phase 0}SGH^{Phase 0}DT^{Phase 0}V^{Phase 0}GV^{Phase 0}DT^{Phase 0}TS^{Phase 0}VRED^{Phase 0}Y^{Phase 0}EA^{Phase 0}GF^{Phase 0}GH^{Phase 0}Y^{Phase 0}T^{Phase 0}GV^{Phase 0}AK^{Phase 0}QVLL^{Phase 0}AL^{Phase 0}BQ^{Phase 0}DD^{Phase 0}CF^{Phase 0}SE^{Phase 0}VQ^{Phase 0}YE^{Phase 0}IS^{Phase 0}NP^{Phase 0}HAL^{Phase 0}VG^{Phase 0}CE

Hth1-c PYG^{Phase 0}AS^{Phase 0}DR^{Phase 0}TY^{Phase 0}AD^{Phase 0}PI^{Phase 0}FLE^{Phase 0}HS^{Phase 0}NT^{Phase 0}DRI^{Phase 0}WAI^{Phase 0}W^{Phase 0}SL^{Phase 0}CK^{Phase 0}Y^{Phase 0}R^{Phase 0}GK^{Phase 0}PY^{Phase 0}NTAN^{Phase 0}CA^{Phase 0}IES^{Phase 0}MRR^{Phase 0}L^{Phase 0}OP^{Phase 0}GL^{Phase 0}SSA^{Phase 0}IN^{Phase 0}PD^{Phase 0}RI^{Phase 0}RE^{Phase 0}HA^{Phase 0}IF^{Phase 0}D^{Phase 0}Y^{Phase 0}NR^{Phase 0}DN^{Phase 0}FH^{Phase 0}VY^{Phase 0}TL^{Phase 0}FN^{Phase 0}GL^{Phase 0}SL^{Phase 0}Q^{Phase 0}DRE^{Phase 0}LE^{Phase 0}KI^{Phase 0}K^{Phase 0}SH^{Phase 0}ER^{Phase 0}V^{Phase 0}AG^{Phase 0}FL^{Phase 0}LS^{Phase 0}G^{Phase 0}IK^{Phase 0}SAL^{Phase 0}V^{Phase 0}K^{Phase 0}F^{Phase 0}VC^{Phase 0}TP^{Phase 0}PD^{Phase 0}NC^{Phase 0}HKA^{Phase 0}GE^{Phase 0}Y^{Phase 0}LL^{Phase 0}CD^{Phase 0}EN^{Phase 0}EM^{Phase 0}AW^{Phase 0}AY^{Phase 0}DR^{Phase 0}LF^{Phase 0}KY^{Phase 0}DI^{Phase 0}QV^{Phase 0}DEAN
Hth2-c PYG^{Phase 0}AS^{Phase 0}DR^{Phase 0}TY^{Phase 0}AD^{Phase 0}PI^{Phase 0}FLE^{Phase 0}HS^{Phase 0}NT^{Phase 0}DRI^{Phase 0}WAI^{Phase 0}W^{Phase 0}AL^{Phase 0}CK^{Phase 0}Y^{Phase 0}R^{Phase 0}GK^{Phase 0}PY^{Phase 0}NSAN^{Phase 0}CA^{Phase 0}IAS^{Phase 0}MR^{Phase 0}K^{Phase 0}L^{Phase 0}OP^{Phase 0}GL^{Phase 0}DE^{Phase 0}IN^{Phase 0}PD^{Phase 0}DE^{Phase 0}Q^{Phase 0}HAV^{Phase 0}FS^{Phase 0}V^{Phase 0}DY^{Phase 0}K^{Phase 0}NN^{Phase 0}F^{Phase 0}EV^{Phase 0}T^{Phase 0}LD^{Phase 0}FN^{Phase 0}GL^{Phase 0}SL^{Phase 0}Q^{Phase 0}DRE^{Phase 0}LS^{Phase 0}RR^{Phase 0}KS^{Phase 0}H^{Phase 0}DR^{Phase 0}V^{Phase 0}AG^{Phase 0}FL^{Phase 0}LS^{Phase 0}G^{Phase 0}IQ^{Phase 0}SAL^{Phase 0}V^{Phase 0}K^{Phase 0}F^{Phase 0}VC^{Phase 0}K^{Phase 0}SD^{Phase 0}DD^{Phase 0}CD^{Phase 0}HY^{Phase 0}AG^{Phase 0}Y^{Phase 0}LL^{Phase 0}CD^{Phase 0}EA^{Phase 0}EM^{Phase 0}W^{Phase 0}GY^{Phase 0}DR^{Phase 0}LY^{Phase 0}KYE^{Phase 0}DI^{Phase 0}QV^{Phase 0}DEAN

Hth1-c H^{Phase 0}TFY^{Phase 0}DHL^{Phase 0}FIR^{Phase 0}Y^{Phase 0}FDL^{Phase 0}K^{Phase 0}CVS^{Phase 0}GT^{Phase 0}DL^{Phase 0}FHTAN^{Phase 0}VH^{Phase 0}DSGT Hth1-d GTR^{Phase 0}DR^{Phase 0}DN^{Phase 0}Y^{Phase 0}REV^{Phase 0}TGASH^{Phase 0}IR^{Phase 0}KN^{Phase 0}ND^{Phase 0}NTGEMES^{Phase 0}RA^{Phase 0}AF^{Phase 0}LHI^{Phase 0}QD^{Phase 0}GTYES^{Phase 0}IA^{Phase 0}QY^{Phase 0}GK^{Phase 0}PK^{Phase 0}COL^{Phase 0}ND^{Phase 0}HNIA^{Phase 0}CC^{Phase 0}V^{Phase 0}GM^{Phase 0}PT^{Phase 0}FP^{Phase 0}W^{Phase 0}RL^{Phase 0}Y^{Phase 0}V^{Phase 0}VQ^{Phase 0}ENAL^{Phase 0}NR^{Phase 0}G^{Phase 0}SV^{Phase 0}VP^{Phase 0}WE^{Phase 0}MT^{Phase 0}AP^{Phase 0}IDH^{Phase 0}PH^{Phase 0}DD^{Phase 0}ATYFN
Hth2-c DL^{Phase 0}HIG^{Phase 0}DR^{Phase 0}FIR^{Phase 0}Y^{Phase 0}EAD^{Phase 0}FL^{Phase 0}CH^{Phase 0}TS^{Phase 0}LS^{Phase 0}NI^{Phase 0}FP^{Phase 0}K^{Phase 0}PS^{Phase 0}VI^{Phase 0}HDEGA Hth2-d GHH^{Phase 0}QADE^{Phase 0}Y^{Phase 0}DEV^{Phase 0}VTAASH^{Phase 0}IR^{Phase 0}KN^{Phase 0}KDL^{Phase 0}SKGEVES^{Phase 0}LR^{Phase 0}S^{Phase 0}FL^{Phase 0}QL^{Phase 0}QD^{Phase 0}GVYEN^{Phase 0}AK^{Phase 0}F^{Phase 0}GK^{Phase 0}GL^{Phase 0}DD^{Phase 0}NR^{Phase 0}KV^{Phase 0}AC^{Phase 0}CV^{Phase 0}GM^{Phase 0}PT^{Phase 0}FP^{Phase 0}W^{Phase 0}RL^{Phase 0}Y^{Phase 0}V^{Phase 0}VQ^{Phase 0}ENAL^{Phase 0}NR^{Phase 0}G^{Phase 0}SA^{Phase 0}SV^{Phase 0}VP^{Phase 0}WD^{Phase 0}WT^{Phase 0}TF^{Phase 0}LE^{Phase 0}PS^{Phase 0}LA^{Phase 0}EATYFN

Hth1-d SRQ^{Phase 0}QY^{Phase 0}DF^{Phase 0}NP^{Phase 0}FR^{Phase 0}GK^{Phase 0}LS^{Phase 0}VFN^{Phase 0}AV^{Phase 0}TR^{Phase 0}DP^{Phase 0}QAG^{Phase 0}FN^{Phase 0}SD^{Phase 0}YMY^{Phase 0}EN^{Phase 0}VLL^{Phase 0}AL^{Phase 0}EQ^{Phase 0}NY^{Phase 0}CF^{Phase 0}FEIQ^{Phase 0}FELV^{Phase 0}NAL^{Phase 0}SM^{Phase 0}L^{Phase 0}GG^{Phase 0}Q^{Phase 0}YS^{Phase 0}SS^{Phase 0}LD^{Phase 0}Y^{Phase 0}S^{Phase 0}AF^{Phase 0}DP^{Phase 0}VF^{Phase 0}FL^{Phase 0}HANT^{Phase 0}DRI^{Phase 0}WAI^{Phase 0}W^{Phase 0}EL^{Phase 0}OR^{Phase 0}F^{Phase 0}EL^{Phase 0}PE^{Phase 0}Y^{Phase 0}BEAN^{Phase 0}CA^{Phase 0}IN^{Phase 0}LM^{Phase 0}HQ^{Phase 0}DL^{Phase 0}K^{Phase 0}PE^{Phase 0}SD^{Phase 0}PH^{Phase 0}ED^{Phase 0}NV^{Phase 0}L^{Phase 0}K^{Phase 0}YS^{Phase 0}K^{Phase 0}PD^{Phase 0}GD^{Phase 0}YQ^{Phase 0}NH^{Phase 0}FG^{Phase 0}K^{Phase 0}VD^{Phase 0}NLE^{Phase 0}FH^{Phase 0}LS^{Phase 0}TP^{Phase 0}SDAT
Hth2-d SRQ^{Phase 0}QY^{Phase 0}DF^{Phase 0}NP^{Phase 0}FR^{Phase 0}GK^{Phase 0}LS^{Phase 0}VFN^{Phase 0}AV^{Phase 0}TR^{Phase 0}DP^{Phase 0}QPE^{Phase 0}LY^{Phase 0}NR^{Phase 0}YYY^{Phase 0}Q^{Phase 0}NVLL^{Phase 0}AL^{Phase 0}EQ^{Phase 0}NY^{Phase 0}CF^{Phase 0}FEIQ^{Phase 0}FELV^{Phase 0}NAL^{Phase 0}SM^{Phase 0}L^{Phase 0}GG^{Phase 0}Q^{Phase 0}YS^{Phase 0}SS^{Phase 0}LD^{Phase 0}Y^{Phase 0}S^{Phase 0}AF^{Phase 0}DP^{Phase 0}VF^{Phase 0}FL^{Phase 0}HANT^{Phase 0}DRI^{Phase 0}WAI^{Phase 0}W^{Phase 0}EL^{Phase 0}OR^{Phase 0}F^{Phase 0}EL^{Phase 0}PE^{Phase 0}Y^{Phase 0}BEAN^{Phase 0}CA^{Phase 0}IN^{Phase 0}LM^{Phase 0}HQ^{Phase 0}DL^{Phase 0}K^{Phase 0}PE^{Phase 0}SD^{Phase 0}PH^{Phase 0}ED^{Phase 0}NV^{Phase 0}L^{Phase 0}K^{Phase 0}YS^{Phase 0}K^{Phase 0}PD^{Phase 0}GD^{Phase 0}YQ^{Phase 0}NH^{Phase 0}FG^{Phase 0}K^{Phase 0}VD^{Phase 0}NLE^{Phase 0}FH^{Phase 0}LS^{Phase 0}TP^{Phase 0}SDAT

Hth1-d L^{Phase 0}K^{Phase 0}QR^{Phase 0}RHD^{Phase 0}EV^{Phase 0}FAG^{Phase 0}LE^{Phase 0}HNIGT^{Phase 0}SAD^{Phase 0}IT^{Phase 0}Y^{Phase 0}CL^{Phase 0}PD^{Phase 0}GR^{Phase 0}RGN^{Phase 0}D^{Phase 0}SHEA^{Phase 0}CT^{Phase 0}Y^{Phase 0}IL^{Phase 0}GG^{Phase 0}ET^{Phase 0}MP^{Phase 0}IF^{Phase 0}DR^{Phase 0}LY^{Phase 0}K^{Phase 0}FET^{Phase 0}K^{Phase 0}PL^{Phase 0}Q^{Phase 0}L^{Phase 0}Q^{Phase 0}V^{Phase 0}KL^{Phase 0}HGG^{Phase 0}V^{Phase 0}FELE^{Phase 0}L^{Phase 0}KAY^{Phase 0}NG^{Phase 0}SY^{Phase 0}DP^{Phase 0}HP^{Phase 0}T^{Phase 0}DP^{Phase 0}T^{Phase 0}L^{Phase 0}IF^{Phase 0}EP^{Phase 0}GT Hth1-e DTH^{Phase 0}ILD^{Phase 0}HD^{Phase 0}H^{Phase 0}EE^{Phase 0}EL^{Phase 0}V^{Phase 0}KN^{Phase 0}IID^{Phase 0}LS^{Phase 0}PR^{Phase 0}VS^{Phase 0}V^{Phase 0}KL^{Phase 0}Q^{Phase 0}RM^{Phase 0}KN^{Phase 0}RS^{Phase 0}AD^{Phase 0}Y^{Phase 0}Q
Hth2-d L^{Phase 0}R^{Phase 0}IR^{Phase 0}QR^{Phase 0}QD^{Phase 0}EV^{Phase 0}FAG^{Phase 0}LE^{Phase 0}HNIGT^{Phase 0}SAD^{Phase 0}IT^{Phase 0}Y^{Phase 0}CL^{Phase 0}PD^{Phase 0}GR^{Phase 0}RGN^{Phase 0}D^{Phase 0}SHEA^{Phase 0}CT^{Phase 0}Y^{Phase 0}IL^{Phase 0}GG^{Phase 0}ET^{Phase 0}MP^{Phase 0}IF^{Phase 0}DR^{Phase 0}LY^{Phase 0}K^{Phase 0}FET^{Phase 0}K^{Phase 0}PL^{Phase 0}Q^{Phase 0}L^{Phase 0}Q^{Phase 0}V^{Phase 0}KL^{Phase 0}HGG^{Phase 0}V^{Phase 0}FELE^{Phase 0}L^{Phase 0}KAY^{Phase 0}NG^{Phase 0}SY^{Phase 0}DP^{Phase 0}HP^{Phase 0}T^{Phase 0}DP^{Phase 0}T^{Phase 0}L^{Phase 0}IF^{Phase 0}EP^{Phase 0}GT Hth2-e S^{Phase 0}S^{Phase 0}FL^{Phase 0}RP^{Phase 0}DG^{Phase 0}H^{Phase 0}SD^{Phase 0}LL^{Phase 0}V^{Phase 0}KE^{Phase 0}V^{Phase 0}NS^{Phase 0}LT^{Phase 0}TR^{Phase 0}TAS^{Phase 0}L^{Phase 0}HL^{Phase 0}LR^{Phase 0}SM^{Phase 0}Q^{Phase 0}HS^{Phase 0}DP^{Phase 0}EQ

Hth1-e A^{Phase 0}TAS^{Phase 0}F^{Phase 0}HAL^{Phase 0}P^{Phase 0}PL^{Phase 0}CP^{Phase 0}N^{Phase 0}AA^{Phase 0}HRY^{Phase 0}AC^{Phase 0}CV^{Phase 0}GMAT^{Phase 0}FP^{Phase 0}Q^{Phase 0}RL^{Phase 0}Y^{Phase 0}V^{Phase 0}VQ^{Phase 0}DAL^{Phase 0}RR^{Phase 0}GS^{Phase 0}LV^{Phase 0}CP^{Phase 0}Y^{Phase 0}WD^{Phase 0}TK^{Phase 0}PN^{Phase 0}VE^{Phase 0}LE^{Phase 0}PE^{Phase 0}SSAT^{Phase 0}Y^{Phase 0}F^{Phase 0}Y^{Phase 0}HT^{Phase 0}RN^{Phase 0}IN^{Phase 0}IS^{Phase 0}NP^{Phase 0}LGAD^{Phase 0}LE^{Phase 0}FE^{Phase 0}GP^{Phase 0}VH^{Phase 0}EB^{Phase 0}HINTER^{Phase 0}LF^{Phase 0}SH^{Phase 0}GD^{Phase 0}CH^{Phase 0}YN^{Phase 0}WF^{Phase 0}TE^{Phase 0}VL^{Phase 0}FAL^{Phase 0}BQ^{Phase 0}ED^{Phase 0}Y^{Phase 0}CF^{Phase 0}FEIQ^{Phase 0}FELV^{Phase 0}NAL^{Phase 0}NG^{Phase 0}HT^{Phase 0}W^{Phase 0}GG^{Phase 0}SA^{Phase 0}VY^{Phase 0}GM^{Phase 0}GH^{Phase 0}Y^{Phase 0}AS^{Phase 0}Y^{Phase 0}DP^{Phase 0}IF
Hth2-e A^{Phase 0}TAS^{Phase 0}F^{Phase 0}HAL^{Phase 0}P^{Phase 0}PL^{Phase 0}CP^{Phase 0}PS^{Phase 0}ATH^{Phase 0}RY^{Phase 0}AC^{Phase 0}CV^{Phase 0}GMAT^{Phase 0}FP^{Phase 0}Q^{Phase 0}RL^{Phase 0}Y^{Phase 0}V^{Phase 0}VQ^{Phase 0}DAL^{Phase 0}RR^{Phase 0}GAT^{Phase 0}V^{Phase 0}CP^{Phase 0}Y^{Phase 0}WD^{Phase 0}LR^{Phase 0}Q^{Phase 0}SH^{Phase 0}LE^{Phase 0}PE^{Phase 0}Y^{Phase 0}TMET^{Phase 0}Y^{Phase 0}HD^{Phase 0}I^{Phase 0}WS^{Phase 0}NR^{Phase 0}DF^{Phase 0}NP^{Phase 0}RY^{Phase 0}QAN^{Phase 0}LE^{Phase 0}FE^{Phase 0}GE^{Phase 0}NT^{Phase 0}TE^{Phase 0}RE^{Phase 0}VI^{Phase 0}AD^{Phase 0}KL^{Phase 0}V^{Phase 0}GGH^{Phase 0}V^{Phase 0}FD^{Phase 0}N^{Phase 0}WF^{Phase 0}FQ^{Phase 0}AIL^{Phase 0}AL^{Phase 0}BQ^{Phase 0}ED^{Phase 0}Y^{Phase 0}CF^{Phase 0}FEIQ^{Phase 0}FELV^{Phase 0}NAL^{Phase 0}NG^{Phase 0}HT^{Phase 0}W^{Phase 0}GG^{Phase 0}SA^{Phase 0}Y^{Phase 0}QAT^{Phase 0}AS^{Phase 0}F^{Phase 0}GS^{Phase 0}PM^{Phase 0}C

Hth1-e Y^{Phase 0}HS^{Phase 0}Q^{Phase 0}T^{Phase 0}DRI^{Phase 0}WAI^{Phase 0}W^{Phase 0}EL^{Phase 0}CK^{Phase 0}Y^{Phase 0}R^{Phase 0}GL^{Phase 0}SG^{Phase 0}SEAN^{Phase 0}CA^{Phase 0}IE^{Phase 0}HMR^{Phase 0}TE^{Phase 0}L^{Phase 0}K^{Phase 0}PF^{Phase 0}SG^{Phase 0}PPY^{Phase 0}N^{Phase 0}LS^{Phase 0}H^{Phase 0}Q^{Phase 0}EYS^{Phase 0}KE^{Phase 0}ED^{Phase 0}TY^{Phase 0}K^{Phase 0}FG^{Phase 0}RY^{Phase 0}D^{Phase 0}SLE^{Phase 0}LEGR^{Phase 0}SR^{Phase 0}DEL^{Phase 0}I^{Phase 0}Q^{Phase 0}R^{Phase 0}Q^{Phase 0}E^{Phase 0}K^{Phase 0}DR^{Phase 0}TF^{Phase 0}AG^{Phase 0}FL^{Phase 0}LS^{Phase 0}CF^{Phase 0}GT^{Phase 0}SAS^{Phase 0}VS^{Phase 0}L^{Phase 0}Q^{Phase 0}VR^{Phase 0}VD^{Phase 0}HT^{Phase 0}K^{Phase 0}DA^{Phase 0}GY^{Phase 0}PT^{Phase 0}IL^{Phase 0}GC^{Phase 0}SA^{Phase 0}EM^{Phase 0}W^{Phase 0}AF^{Phase 0}DR^{Phase 0}LY^{Phase 0}KY^{Phase 0}DI^{Phase 0}QV^{Phase 0}DEAN
Hth2-e Y^{Phase 0}HS^{Phase 0}Q^{Phase 0}T^{Phase 0}DRI^{Phase 0}WAI^{Phase 0}W^{Phase 0}EL^{Phase 0}CK^{Phase 0}Y^{Phase 0}R^{Phase 0}GL^{Phase 0}SG^{Phase 0}DEAH^{Phase 0}CALE^{Phase 0}Q^{Phase 0}MRE^{Phase 0}LE^{Phase 0}Q^{Phase 0}DF^{Phase 0}SP^{Phase 0}ED^{Phase 0}TY^{Phase 0}R^{Phase 0}K^{Phase 0}FG^{Phase 0}RY^{Phase}

Abb. 28: (siehe vorangehende Seite)

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von HtH1 und HtH2 sind untereinander gestellt. Die Übergänge zwischen den funktionellen Domänen sind angegeben. Die in allen FUs konservierten Aminosäuren sind grün unterlegt, die FU-spezifischen Übereinstimmungen sind gelb markiert. Histidinreste der Kupferbindungsstellen sind rot und potentielle N-Glykosilierungsstellen blau gekennzeichnet. Lücken zwischen den Sequenzen von HtH1 und HtH2 sind schwarz unterlegt. Pfeile symbolisieren die konservierten Insertionsstellen der „internen“ Introns in den FUs *a*, *f* und *g*. Die fehlenden Cysteinreste der FUs HtH-*b* und HtH-*h* sind lila unterlegt (siehe Text).

Wie sich deutlich zeigt, sind die beiden HtH-Isoformen über weite Bereiche identisch, aber es gibt auch deutliche Unterschiede. Ein in Clustal erzeugtes Alignment der Aminosäuresequenzen von HtH1 und HtH2 zeigt eine Identität zwischen den Sequenzen von etwa 65 %. Die Ähnlichkeit der beiden Sequenzen beträgt sogar 80 %, wenn isofunktionelle Aminosäuresubstitutionen mit berücksichtigt werden. Bei den einzelnen funktionellen Domänen zeigen HtH1-*g* und HtH2-*g* mit etwa 74 % Identität und 86 % Ähnlichkeit die größte Übereinstimmung. Bei den potentiellen N-Glykosilierungsstellen der einzelnen funktionellen Domänen finden sich Übereinstimmungen vor allem in der bereits geschilderten konservierten Position der β -Faltblatt-Domäne zwischen $\beta 8$ und $\beta 9$ (siehe Abbildungen 24 und 26). In HtH-*a*, HtH-*d*, HtH-*e* und HtH-*f* liegen hier solche potentiellen Glykosilierungsstellen in beiden Isoformen. Von den in der Kern-Domäne etwas verstreuter liegenden Stellen ist lediglich die potentielle N-Glykosilierungsstelle in der funktionellen Domäne HtH-*b* (direkt hinter $\alpha 5$) bei beiden Isoformen vorhanden. Die restlichen potentiellen N-Glykosilierungsstellen sind nicht in beiden Isoformen des HtH konserviert. Die FU-spezifischen Sequenzeinschübe bzw. Deletionen, die im Vergleich mit den einzelnen funktionellen Domänen des OdH aufgetreten sind, zeigen sich auch im Vergleich der beiden Untereinheiten des HtH. Insgesamt sind in dem gezeigten Alignment zwischen HtH1 und HtH2 zwanzig Lücken eingefügt, die schwarz markiert sind. Diese FU-unabhängigen Mutationen könnten durch Deletion oder Insertion entstanden sein. Sie führen dazu, daß bis auf die funktionellen Domänen HtH-*g* und HtH-*h* die einzelnen FUs von HtH1 und HtH2 in ihrer Länge minimal voneinander abweichen. Diese Abweichungen in der Länge liegen vornehmlich in Bereichen, die außerhalb der beiden Kupferbindungsstellen des aktiven Zentrums liegen. Es liegt nahe, daß in solchen nicht-hochkonservierten Sequenzabschnitten derartige Mutationen tolerierbar sind und keine funktionellen Veränderungen hervorrufen. Lediglich in der funktionellen Domäne HtH-*g* liegt eine Deletion/Insertion zwischen den ersten beiden Histidinresten der Kupferbindungsstelle Cu-A. Die Lücke zu Beginn der funktionellen Domäne HtH1-*g* könnte von einer Verschiebung der Intron-Splice-Stelle durch eine Punktmutation herrühren.



2. Die Sequenz des *Megathura crenulata* Hämocyanins

Mit Hilfe der in Abbildung 14, S. 61 dargestellten degenerierten Primer, die wir aus den Sequenzen vom HtH ermittelt haben, konnten große Bereiche der Gene von KLH1 und KLH2 über PCR aus genomischer DNA von *Megathura crenulata* amplifiziert werden. Die Arbeiten am KLH1-Gen wurden ganz überwiegend von Bernhard Lieb angefertigt, während die Analyse des KLH2-Gens hauptsächlich von Christian Awenius im Rahmen seiner Diplomarbeit, die ich mit betreut habe, durchgeführt wurde (Awenius, 2000). So konnten bislang etwa 12,7 kb des KLH1-Gens und 12,4 kb des KLH2-Gens sequenziert werden. Aufgrund der konservierten Genstruktur der beiden HtH-Gene waren wir in der Lage, aus den genomischen Sequenzen von KLH1 und KLH2 die kodierenden Bereiche (Exons) von den Intronsequenzen zu unterscheiden.

Die partiell sequenzierte kodierende Sequenz des KLH1-Gens beträgt 6424 bp und kodiert für 2141 Aminosäuren. Darin sind die funktionellen Domänen KLH1-*c* bis KLH1-*f* vollständig enthalten. KLH1-*b* ist mit 309 Aminosäuren und KLH1-*g* mit 241 Aminosäuren kodiert. Ein Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des KLH1 mit dem entsprechenden Bereich von HtH1 zeigt etwa 70 % Identität und 87 % Ähnlichkeit zwischen den beiden Hämocyaninen. Die Übereinstimmungen zwischen KLH1 und HtH1 sind auf Ebene der Primärstrukturen also größer als zwischen HtH1 und HtH2.

Die kodierende Sequenz des partiell sequenzierten KLH2-Gens umfaßt 7420 bp. Sie enthält die vollständige Sequenz der funktionellen Domänen KLH2-*c* bis KLH2-*g* sowie 308 Aminosäuren von KLH2-*b* und 97 Aminosäuren von KLH2-*h*. Ein Vergleich zwischen KLH2 und HtH2 zeigt, daß hier die Übereinstimmungen zwischen den beiden Hämocyaninen noch größer ist als bei KLH1 und HtH1. Die Isoformen 2 von HtH und KLH sind zu etwa 75 % identisch. Hier liegt die Ähnlichkeit unter Berücksichtigung isofunktionaler Aminosäuren bei etwa 89 %.

Auch in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der beiden KLH-Isoformen finden sich potentielle N-Glykosilierungsstellen des Typs **NXS** bzw. **NXT**. Im Vergleich zu den potentiellen N-Glykosilierungsstellen im HtH treten hier Unterschiede vor allem in der Anzahl der potentiellen N-Glykosilierungsstellen aber auch einige Übereinstimmungen auf. Im KLH1 finden sich sechs solcher Stellen, während beim HtH1 im gleichen Sequenzbereich (zwischen HtH1-*b* und HtH1-*g*) zehn potentielle N-Glykosilierungsstellen enthalten sind. Von diesen sechs Positionen im KLH1 stimmen vier exakt mit denen im HtH1 überein. Dies sind die Positionen in KLH1/HtH1-*b* (hinter α 5), KLH1/HtH1-*d* (zwischen β 11 und β 12),



KLH1/HtH1-*f* (zwischen $\beta 11$ und $\beta 12$) und in KLH1/HtH1-*g* (in $\beta 3$). In beiden abgeleiteten Sequenzen fehlen potentielle N-Glykosilierungsstellen in den funktionellen Domänen KLH1/HtH1-*c*. KLH2 enthält im Sequenzabschnitt zwischen KLH2-*b* und KLH2-*h* lediglich drei potentielle N-Glykosilierungsstellen. Im gleichen Bereich liegen im HtH2 sieben solcher Positionen. Hier stimmen die beiden konservierten N-Glykosilierungsstellen zwischen den β -Faltblättern $\beta 11$ und $\beta 12$ in den funktionellen Domänen KLH2/HtH2-*d* und KLH2/HtH2-*f* überein. In KLH2-*b*, KLH2-*e* und KLH2-*g* sowie den etwa 90 Aminosäuren von KLH2-*h* liegen keine potentiellen N-Glykosilierungsstellen.

Bei einer Reihe anderer Mollusken-Hämocyanine wurden N-glykosidisch gebundene Zucker nachgewiesen. So treten bei *Helix pomatia* in der Primärstruktur der funktionellen Domäne HpH β_c -*g* drei potentielle N-Glykosilierungsstellen auf (hinter $\alpha 2$, zwischen $\beta 2/\beta 3$ und zwischen $\beta 11/\beta 12$), die alle drei tatsächlich glykosiliert sind (Vanhoergaerden et al., 1990; Xin et al., 1990). In HpH β_c -*d* ist nur eine potentielle Bindungsstelle in der Sequenz enthalten (in $\alpha 12$). Da diese FU ebenfalls glykosiliert ist, schließen die Autoren darauf, daß der N-glykosidische Zucker an dieser Stelle angehängt sein muß (Drexel et al., 1986). Die funktionelle Domäne RtH2-*a* von *Rapana thomasiana* trägt ebenfalls N-glykosidisch gebundene Zucker. Hier treten in der Primärstruktur zwei potentielle Bindungsstellen auf (hinter $\alpha 2$ und in $\alpha 12$), von denen mindestens eine tatsächlich glykosiliert sein muß (Stoeva et al., 1997). Bei *Sepia officinalis* sind N-glykosidische Zucker in der funktionellen Domäne SoH-*[f]e* nachgewiesen (Top et al., 1990). Hier sollen zwei Stellen glykosiliert sein (hinter $\beta 2$ und zwischen $\beta 11/\beta 12$).

Die Lage der potentiellen und nachgewiesenen N-Glykosilierungsstellen aller bislang zur Verfügung stehenden Sequenzen der Mollusken-Hämocyanine sind in Abbildung 29 zusammenfassend noch einmal in die Tertiärstruktur von OdH-*g* eingezeichnet. Dabei habe ich die nachgewiesenen N-Glykosilierungsstellen mit fetten Buchstaben markiert.



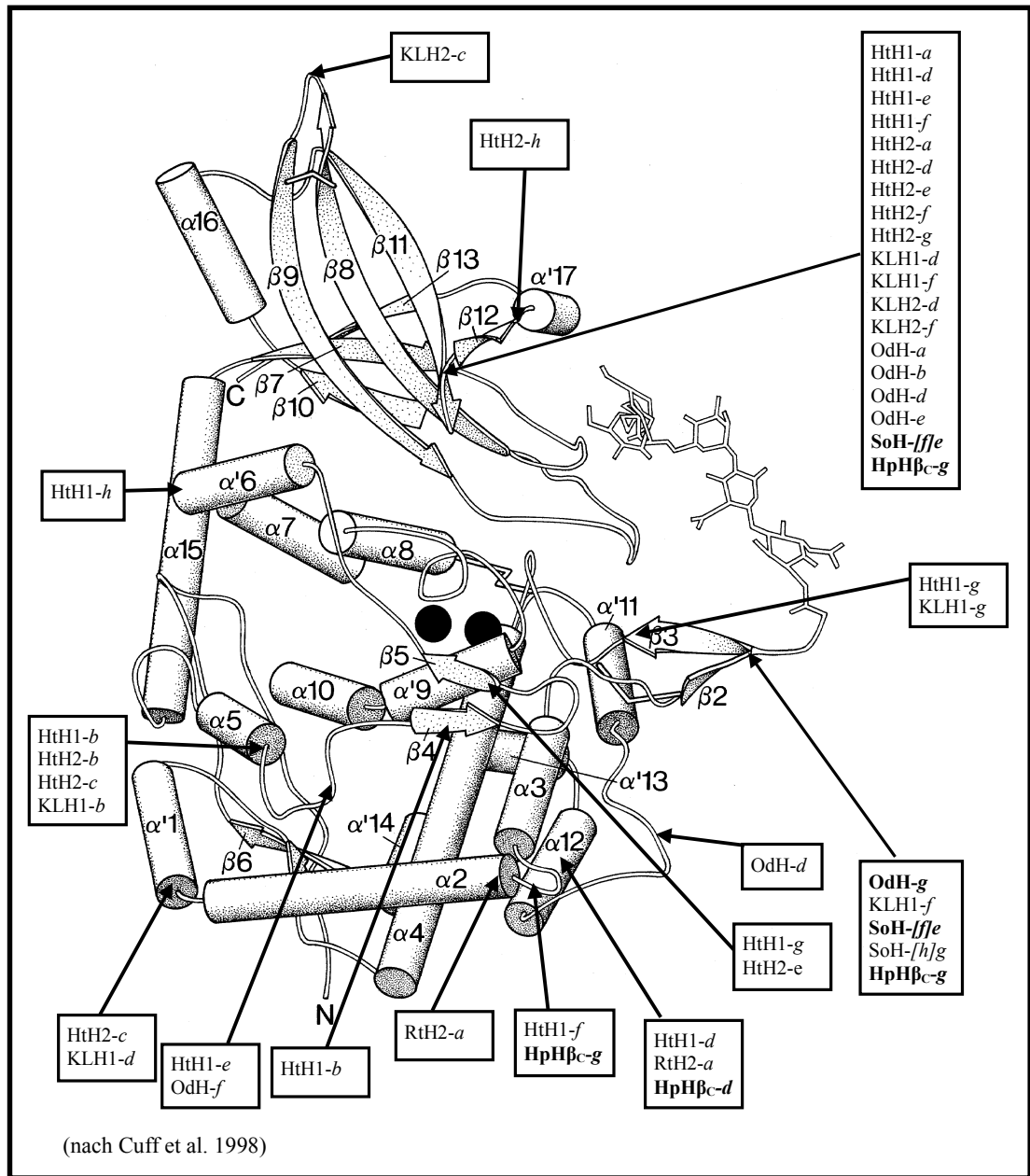


Abb. 29: Die potentiellen N-Glykosilierungsstellen bisher sequenzierter Mollusken-Hämocyanine in der Tertiärstruktur von OdH-g.

Die Pfeilspitzen zeigen die Position N-glykosidischer Bindungsstellen innerhalb der Primärstruktur von OdH-g. Die FUs der verschiedenen Mollusken-Hämocyanine, in denen Kohlenhydratseitenketten tatsächlich nachgewiesen wurden, sind in fetten Buchstaben geschrieben.



Diese Darstellung unterstreicht die bereits deutlich gemachte Konservierung der N-Glykosilierungsstellen zwischen $\beta 2/\beta 3$ und $\beta 11/\beta 12$. Für die letztere ist in HpH β_c -g und SoH-*ffe* eine Glykosilierung nachgewiesen. Bei mehr als der Hälfte der hier angegebenen potentiellen N-Glykosilierungsstellen könnte bei tatsächlicher Glykosilierung der angehängte Zucker den gleichen Raum einnehmen wie die nachgewiesene Kohlenhydratseitenkette von OdH-g.

3. Die Genstruktur der Gastropoden-Hämocyanine

Aus den erhaltenen cDNA-Sequenzen von HtH1 und HtH2 konnten spezifische Primer synthetisiert werden, mit denen wir die entsprechenden Abschnitte der HtH-Gene über PCR amplifiziert haben. Dabei war anhand der cDNA die Unterteilung in kodierende Exons und nicht-kodierende Introns möglich.

Das HtH1-Gen ist 28634 bp groß und lässt sich in 17 Exons und 16 Introns unterteilen. Es zeigt sich, daß alle acht im Protein enthaltenen FUs auf genomischer Ebene Exons entsprechen, die untereinander durch Introns in den Linker-Sequenzen zwischen den einzelnen FUs (Linker-Introns) getrennt sind. Die kodierende Sequenz der FUs HtH1-*a*, HtH1-*f* und HtH1-*g* ist darüber hinaus durch „interne“ Introns in mehrere Exons zerlegt. So besteht der kodierende Teil der FU HtH1-*a* aus vier Exons (unterteilt durch drei „interne“ Introns), HtH1-*f* aus zwei Exons und HtH1-*g* aus drei Exons. Die Positionen dieser „internen“ Introns sind in der Abbildung 24 als farbige Pfeile entsprechend den bisher gewählten Farben für die einzelnen FUs in das Alignment von HtH1 und OdH mit eingezeichnet. Da die „internen“ Introns der FUs HtH1-*a*, HtH1-*f* und HtH1-*g* alle an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Primärstruktur der FUs liegen, können wir vier verschiedene Exon-Intron-Strukturen der acht FUs im HtH1-Gen unterscheiden. Diese vier Typen sind in Abbildung 30 schematisch dargestellt. Die FUs sind hier als Blöcke gezeigt. Die ungefähre Position der Introns ist durch Pfeile symbolisiert und zur Orientierung sind die beiden Kupferbindungsstellen Cu-A und Cu-B grau schraffiert.



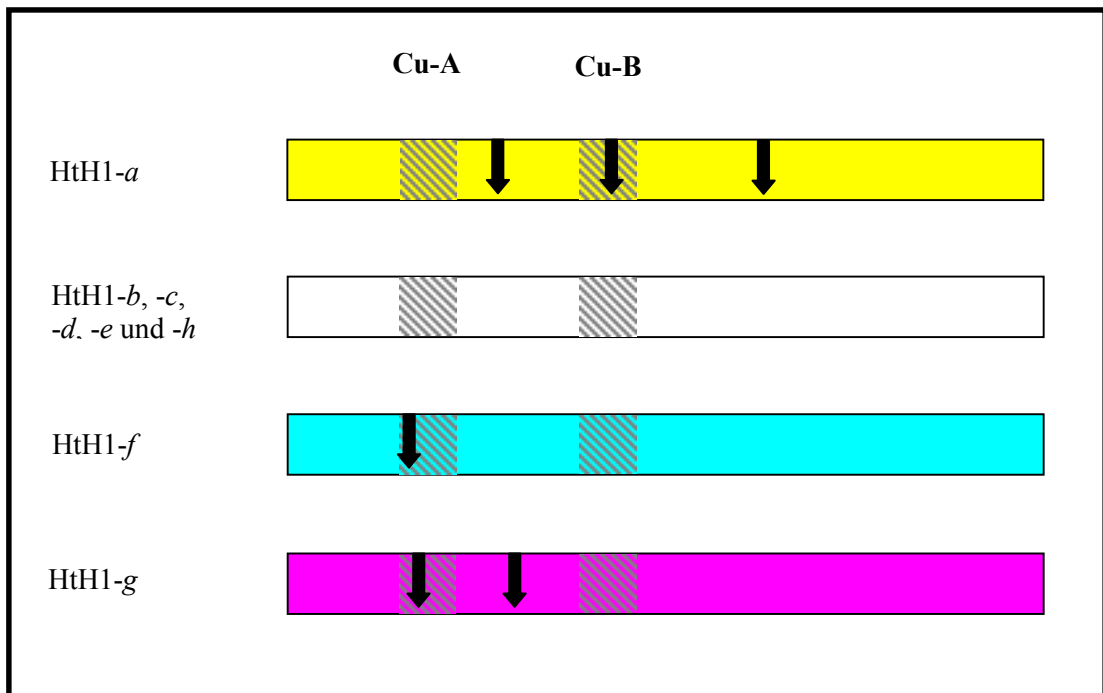


Abb. 30: Vergleich der verschiedenen Exon-Intron-Organisationen der acht FUs im HtH1-Gen.

Die für die acht FUs des HtH1 kodierenden Sequenzen sind auf genomischer Ebene in vier verschiedenen Exon-Intron-Strukturen organisiert. Diese vier verschiedenen Typen sind hier schematisch dargestellt. Die beiden Kupferbindungsstellen in jeder FU, Cu-A und Cu-B, sind als graue Bereiche markiert. Die „internen“ Introns sind als schwarze Pfeile symbolisiert.

Ein weiteres Intron im HtH1-Gen liegt im Bereich des 3'-UTR, zehn Nukleotide hinter dem letzten kodierenden Triplet von HtH1-*h*. Auch die Signalsequenz, die bislang nur 45 Nukleotide umfasst, ist durch ein „internes“ Intron in zwei Exons unterteilt, von denen das zweite lediglich 16 Nukleotide groß ist. Zwischen Signalsequenz und dem ersten Exon von HtH1-*a* liegt ebenfalls ein Linker-Intron. Eine schematische Darstellung des HtH1-Gens mit der relativen Größe der einzelnen Exons und Introns ist in Abbildung 20, S. 74 dargestellt.

Die bereits in der cDNA-Sequenz in Abbildung 16, S. 65 durch verschiedene Farben symbolisierte Unterteilung der vollständigen Primärstruktur in einzelne FUs beruht auf der hier geschilderten Genstruktur. Die bislang gebräuchliche Unterteilung der 400 kDa-Untereinheit in acht funktionelle Domänen beruhte auf der proteolytischen Spaltung der Polypeptidkette in acht Teile. Die Proteasen spalten die vollständige Untereinheit in der Regel in den Linker-Regionen zwischen den einzelnen FUs. Die proteolytische Spaltstelle und die Insertionsstelle der Linker-Introns liegen nicht an gleicher Position. Daher entsprechen die bislang aus der proteolytischen Spaltung resultierenden N-terminalen Anfangssequenzen der funktionellen Domänen nur ungefähr den von uns neu definierten



Anfängen, die aus der Trennung der kodierenden Sequenzabschnitte der acht FUs durch Linker-Introns auf genomischer Ebene herrühren. Die „internen“ Introns der funktionellen Domänen HtH1-*a*, HtH1-*f* und HtH1-*g* sind bei dieser Unterteilung der Primärstruktur in die acht einzelnen FUs nicht berücksichtigt. Dabei ist zu bemerken, daß die Insertion eines Introns in das Triplet-Raster der kodierenden Sequenz auf drei verschiedene Weisen erfolgen kann. Man spricht hier von drei verschiedenen Phasen. In Phase 0 liegt das Intron genau zwischen zwei Triplets, in Phase 1 und Phase 2 spaltet das eingefügte Intron ein Triplet in zwei Teile. Bei einem Phase 1-Intron liegt das erste Nukleotid des Triplets 5' vor dem Intron und die beiden anderen Nukleotide 3' hinter dem Intron. Bei Phase 2-Introns ist es umgekehrt. In der Genstruktur des HtH1-Gens taucht bei den acht Linker-Introns, die die kodierenden Bereiche des Signalpeptids sowie der FUs voneinander trennen, eine Regelmässigkeit auf: diese Introns liegen alle in Phase 1. Dies gilt auch für das Intron im Anschluß an das Stop-Codon. Allerdings ist die nach dem Stop-Codon folgende Sequenz nicht mehr kodieren, man muß also das Triplet-Raster rein numerisch weiterführen. Die „internen“ Introns, die die kodierenden Sequenzen von HtH1-*a*, HtH1-*f* und HtH1-*g* sowie des Signalpeptids in mehrere Exons zerlegen, kommen in unterschiedlichen Phasen vor. So liegt das Intron zwischen den beiden Exons des Signalpeptids in Phase 0, die drei „internen“ Introns in HtH1-*a* in den Phasen 0, 2 und 2, das „interne“ Intron in HtH1-*f* in Phase 0 und die „internen“ Introns in HtH1-*g* in den Phasen 1 und 0. Die Position dieser sechs „internen“ Introns innerhalb der funktionellen Domänen ist zwar verschieden, aber für zwei Positionen nahe beieinander. Die Insertionsstelle des Introns in HtH1-*f* (Phase 0) und des ersten „internen“ Introns in HtH1-*g* (Phase 1) liegen nur 19 Nukleotide (sechs Aminosäuren) auseinander. Die Insertionsstelle des ersten „internen“ Introns in HtH1-*a* und des zweiten Introns in HtH1-*g* liegen nur 24 Nukleotide (acht Aminosäuren) weit auseinander. Hier sind beide Introns in Phase 0. Die Abbildung 31 gibt die Positionen der sechs „internen“ Introns mit ihren Phasen und den Abständen zwischen den Insertionsstellen schematisch wieder.



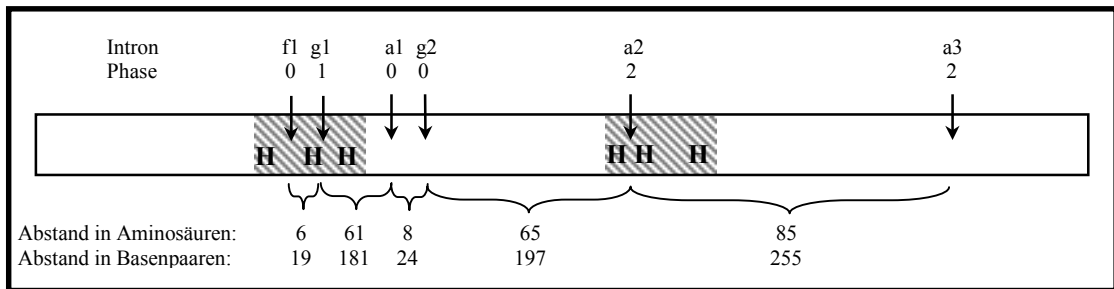


Abb. 31: Die „internen“ Introns des HtH1-Gens.

Hier ist schematisch eine funktionelle Domäne mit den sechs Histidinresten der Kupferbindungsstellen Cu-A und Cu-B dargestellt. Pfeile markieren die Insertionsstellen der sechs „internen“ Introns des HtH1-Gens. Diese sind im Gen verteilt auf drei funktionelle Domänen (Introns a1, a2 und a3 liegen in der kodierenden Sequenz von HtH1-a, f1 im kodierenden Bereich von HtH1-f und g1 und g2 zerlegen die kodierende Sequenz von HtH1-g). Die Insertionsstellen der Introns innerhalb der Primärstruktur der FUs sind bei allen sechs „internen“ Introns unterschiedlich. Die Abstände zwischen ihnen sind angegeben.

In Abbildung 31 wird deutlich, daß alle sechs „internen“ Introns innerhalb der funktionellen Domänen an unterschiedlichen Positionen liegen. Mit Ausnahme eines Paares sind auch die Phasen verschieden, was darauf hindeutet, daß diese vier Introns unabhängig voneinander in das HtH1-Gen integriert wurden. Lediglich die Introns a1 und g2 sind nahe beieinander und liegen zudem in der gleichen Phase. Dieses Intron könnte durch einen Vorgang, der als „intron-sliding“ bezeichnet wird, von seiner ursprünglich an gleicher Stelle in HtH1-a und HtH1-g liegenden Position um sechs Aminosäuren (18 Basenpaare) verschoben worden sein. Ein solcher Vorgang ist unter anderem für die Genfamilie der Globin-Gene (Stolfus & Doolittle, 1993) und die Familie der F/10 Xylanase-Gene (Sato et al., 1999) beschrieben, wird allerdings recht kontrovers diskutiert. Die im Alignment ebenfalls nahe beieinander liegenden Introns f1 und g1 liegen nicht in der gleichen Phase. Mutationsereignisse, die ein „intron-sliding“ mit dem Resultat einer Phasenverschiebung bewirken würden, sind sehr unwahrscheinlich (Stolfus & Doolittle, 1993).

Die Größe der Exons und Introns im HtH1-Gen ist sehr variabel. Die Exons sind zwischen 16 Basenpaaren (Exon s2) bis zu über 1,5 kb (Exon h/UTR) lang. Das kleinste Intron mit 174 bp Länge liegt zwischen den Exons HtH1-e und HtH1-f1, das größte Intron liegt mit über 5 kb zwischen den Exons HtH1-s2 und HtH1-a1. Die Introns untereinander zeigen so gut wie keine Sequenzhomologien. Lediglich die 5'- und 3'-Splice-Stellen sind konserviert. Diese Sequenzmotive sowie Phasen und Längen der Introns des HtH1-Gens sind in den Tabellen 8, S. 104 und 9, S. 106 mit den Intronsequenzen aller weiteren von uns sequenzierten Hämocyanin-Gene im Vergleich dargestellt.



Beim HtH2-Gen (siehe Abbildung 23, S. 79) zeigt sich, daß die Unterteilung der kodierenden Exons durch Introns auf gleiche Weise wie beim HtH1-Gen erfolgt. Die für die einzelnen FUs kodierenden Exons werden auch hier durch Linker-Introns voneinander separiert. Die für die funktionellen Domänen HtH2-*a*, HtH2-*f* und HtH2-*g* kodierenden Sequenzen werden wie auch beim HtH1 durch „interne“ Introns in vier, zwei bzw. drei Exons zerlegt. Die in den Linker-Regionen der funktionellen Domänen liegenden Linker-Introns sowie die „internen“ Introns innerhalb der kodierenden Sequenz der funktionellen Domänen HtH2-*a*, HtH2-*f* und HtH2-*g* liegen an exakt den gleichen Positionen wie im HtH1-Gen. Es stimmen sowohl die Insertionsstellen aller Introns als auch die Intron-Phasen überein. Lediglich das Intron im 3'-UTR von HtH2 liegt nicht in Phase 1 sondern in Phase 2. Da im nicht-kodierenden 3'-UTR das Triplet-Raster allerdings nur virtuell weitergeführt werden kann, ist diese Verschiebung um ein Nukleotid für die Proteinexpression ohne Relevanz.

Die kodierenden Exons beider HtH-Gene besitzen mit nur geringen Abweichungen von maximal sechs Nukleotiden die gleiche Länge. Das Exon des 3'-UTR ist im HtH2-Gen um etwa 150 Basenpaare kürzer als im HtH1-Gen. Es gibt allerdings große Unterschiede in der Länge der Introns, die in beiden HtH-Genen an gleicher Position liegen (siehe Tabelle 8, S. 104). Hier ist die größte Differenz in der Länge des Introns a4/b, das im HtH1-Gen etwa 3,2 kb und im HtH2-Gen nur 0,8 kb groß ist. Zwischen den Introns von HtH1 und HtH2 gibt es neben den konservierten Splice-Stellen keinerlei Sequenzhomologien.

Das bislang sequenzierte KLH1-Gen besteht aus neun Exons, die durch acht Introns voneinander getrennt sind. Die aus den Exons abgeleitete Aminosäuresequenz umfasst 2141 Aminosäuren. Neben den vollständig enthaltenen Sequenzen der funktionellen Domänen KLH1-*c* bis KLH1-*f* sind KLH1-*b* und KLH1-*g* partiell sequenziert. Die kodierenden Sequenzen von KLH1-*f* und KLH1-*g* sind wie bei den HtH-Genen durch „interne“ Introns in zwei bzw. drei Exons zerlegt, die exakt an denselben Positionen liegen wie bei den HtH-Genen. Auch die Phasen der Introns entsprechen exakt denen beim HtH. Das gleiche gilt auch für die Linker-Introns zwischen den für die einzelnen FUs kodierenden Exons (Lieb et al., unpubliziert).

Das partiell sequenzierte KLH2-Gen besteht aus zehn Exons und neun Introns. Es umfasst den Bereich zwischen den funktionellen Domänen KLH2-*b* und KLH2-*h*. Die aus den Exons abgeleitete Sequenz von 2473 Aminosäuren enthält die vollständige Sequenz von KLH2-*c* bis KLH2-*g* sowie die nur partiell sequenzierten KLH2-*b* und KLH2-*h*. Auch hier ist die kodierende Sequenz von KLH2-*f* und KLH2-*g* durch „interne“ Introns unterteilt. Auch hier



sind alle Introns mit ihrer Insertionsstelle und der Phase konserviert (Lieb et al., unpubliziert).

In Abbildung 32 sind die vier von uns analysierten Gene der Gastropoden-Hämocyanine schematisch miteinander verglichen. Dabei entsprechen die Größen der farbig gekennzeichneten Exons den relativen Längenverhältnissen. Die Introns sind als graue Balken eingezeichnet und stimmen nicht mit ihren relativen Längen überein.



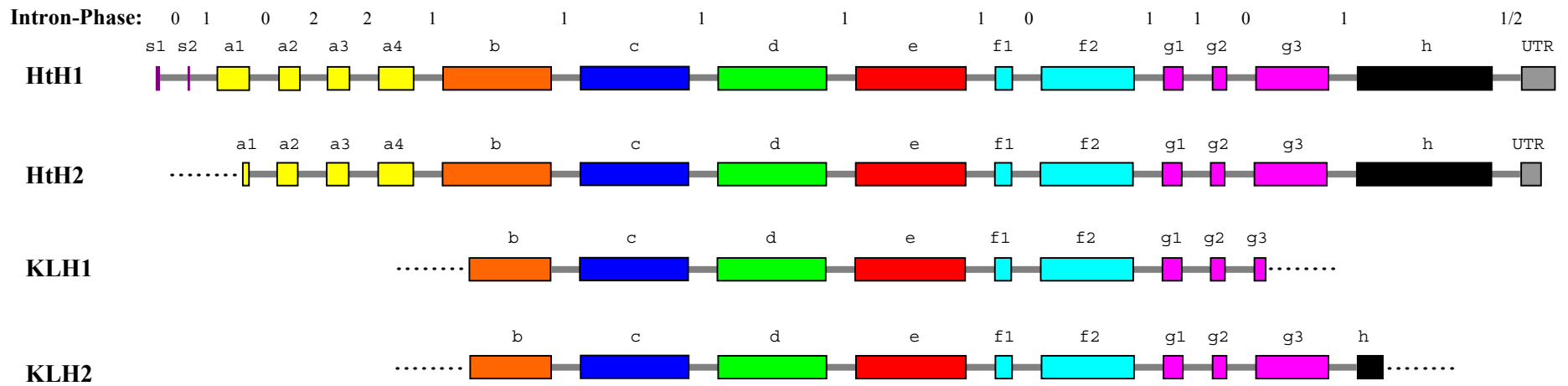


Abb. 32: Vergleich der Genstrukturen von HtH und KLH.

Neben dem vollständig sequenzierten Gen von HtH1 sind die Genstrukturen von HtH2, KLH1 und KLH2 nur partiell sequenziert. Die einzelnen Exons sind entsprechend den bislang gewählten Farben dargestellt und ihre Größe entspricht der relativen Länge der bereits sequenzierten Abschnitte. Die dazwischen liegenden Introns sind als graue Blöcke gezeigt. Ihre Länge spiegelt nicht die relativen Größenverhältnisse wieder. Die Splice-Stellen aller Introns liegen bei den vier Genen an exakt der gleichen Position und besitzen die gleiche Phase.



Wie in Abbildung 32 schematisch zu sehen ist, stimmen die Genstrukturen der vier Gastropoden-Hämocyanine überein. Die Längen der bislang sequenzierten einzelnen Exons sind mit geringen Abweichungen identisch. Lediglich die Intronlängen sind äußerst variabel. Tabelle 8 zeigt die erhaltenen Exon- und Intron-Längen sowie die Intron-Phasen der vier Hämocyanin-Gene. Die identischen Exon-Längen sind farbig hervorgehoben. Die Länge der bislang nur partiell sequenzierten Exons sind in Klammern angegeben.

Tab. 8: Vergleich der Exon- und Intron-Längen und Intron-Phasen der vier analysierten Hämocyanin-Gene.

Exakte Übereinstimmungen in der Länge der Exons sind entsprechend den bisher gewählten Farben der einzelnen FUs gekennzeichnet. Die konservierten Phasen der Linker-Introns sind grau unterlegt. In Klammern geschriebene Exon-Längen sind nur partiell sequenziert.

Exon-Größen (in bp)					Intron-Größen (in bp) und Phasen					
Exon	HtH1	HtH2	KLH1	KLH2	Intron	HtH1	HtH2	KLH1	KLH2	Intron-Phase
s1	32				s1/s2	2551				0
s2	16				s2/a1	5034				1
a1	350	(67)			a1/a2	659	1002			0
a2	221	221			a2/a3	904	597			2
a3	255	255			a3/a4	543	689			2
a4	407	407			a4/b	3198	846			1
b	1245	1239	(929)	(926)	b/c	559	474	689	1849	1
c	1242	1245	1242	1248	c/d	334	290	273	166	1
d	1239	1242	1236	1239	d/e	357	298	241	726	1
e	1260	1257	1257	1257	e/f1	174	189	327	383	1
f1	191	191	191	191	f1/f2	698	821	966	308	0
f2	1060	1057	1060	1060	f2/g1	298	866	859	603	1
g1	219	219	219	219	g1/g2	964	785	1746	266	1
g2	164	164	164	164	g2/g3	650	378	1023	554	0
g3	826	826	(126)	826	g3/h	582	398		192	1
h	1542	1543		(290)	h/3'UTR	475	535			
3'UTR	385	229								

Es wird deutlich, daß besonders die Exons, die für die FUs *a*, *f* und *g* kodieren, in allen vier Genen exakt die gleiche Länge besitzen. Die für diese FUs kodierende Sequenz ist durch „interne“ Introns in mehrere Exons unterteilt. Die Intron-Längen sind sehr unterschiedlich und reichen von 174 bp (Intron e/f1 im HtH1-Gen) bis zu über 5 kb (Intron s2/a1 im HtH1-Gen). Auffallend ist, daß die Linker-Introns alle in Phase 1 liegen (grau unterlegt).

Die konservierten Sequenzmotive der Splice-Stellen in den Introns sind in Tabelle 9 gezeigt. Neben diesen Splice-Stellen sind in einigen Exon-Intron-Übergängen noch weitere Nukleotide in den vier Genen konserviert. Diese Nukleotide sind grün unterlegt. In diesem



Vergleich wird neben der Konsensussequenz der Splice-Stellen die Konservierung der Intron-Phasen bei allen vier Genen und die Variabilität der Intron-Längen deutlich.



Tab. 9: Konsensussequenzen im Bereich der Splice-Stellen aller bislang sequenzierten Introns.

Die Konsensussequenz der Splice-Stellen ist gelb unterlegt, konservierte Nukleotide in Exons und Introns sind grün unterlegt. Das Stop-Codon im HtH1- und HtH2-Gen ist rot gekennzeichnet.

	Exon	Intron	Exon	Phase
HtH1 s1/s2	GCC CUU GUG	GUAAGUC-- (2551) --UCUACAG	GCG GGG GCU	0
HtH1-s2/a1	CU GGA GCA G	GUGAGUU-- (5034) --UUGGCAG	AC AAC GUC G	1
HtH1 a1/a2	GGU GGA AAG	GUAACUA-- (659) --CUGACAG	GCU CAA ACC	0
HtH2 a1/a2	GGA GGA AAG	GUAAGGG-- (1002) --CAUUUAG	GCC CAU GAC	0
HtH1 a2/a3	U AAA UUU GA	GUAAGUU-- (904) --UUUACAG	A UAU UCA AU	2
HtH2 a2/a3	C CGU CAC AC	GUGAGUC-- (597) --AUUGAAG	G UAC UC AU	2
HtH1 a3/a4	U GGA UAC AG	GUGAGAC-- (543) --UUUCCAG	C UAC GAC AG	2
HtH2 a3/a4	U GGC UAC CA	GUAUGUA-- (689) --UGUCCAG	G UAU GAU GA	2
HtH1 a4/b	AC CUU GAC C	GUAAGUU-- (3198) --AUUUCAG	CA CCU GUG C	1
HtH2 a4/b	AC GUU GAU G	GUAAGUG-- (846) --GUUACAG	AG GGC CCA G	1
HtH1 b/c	CA GCU CAC C	GUAAGUA-- (559) --CUUUCAG	CU ACC UUU G	1
HtH2 b/c	GA AGC CAU A	GUAAGUA-- (474) --CUUCCAG	UU GAC CAU C	1
KLH1 b/c	AU GCA CGU G	GUAAGCU-- (689) --UUUUCAG	UU AAA UUU G	1
KLH2 b/c	GU GGU CAU G	GUAAGUA-- (1849) --UUUACAG	CU GAU GCC A	1
HtH1 c/d	CC GGC ACA G	GUCCGUG-- (334) --CCACAG	GC ACC CGU G	1
HtH2 c/d	AA GGG GCA G	GUGAGAA-- (290) --CUGUCAG	GU UGC CAU C	1
KLH1 c/d	CA AGA AUA G	GUACUUG-- (273) --GUUUCAG	GU CAC CAU G	1
KLH2 c/d	CA GCU GCA G	GUAUGUU-- (166) --CAACAG	GU UCA CAC C	1
HtH1 d/e	CU GGA ACA G	GUAAGUC-- (357) --UUUUCAG	AU ACC CAU A	1
HtH2 d/e	CU GGU UCA A	GUAAGAA-- (298) --AUUUCAG	GU UCU UUC C	1
KLH1 d/e	CC GGA ACA G	GUAACUA-- (241) --GUUUCAG	AU UCU GCC C	1
KLH2 d/e	CU GGU GAA C	GUAAGAA-- (726) --GUUUUAG	AU UGA CAU C	1
HtH1 e/f1	CU GGA CGC C	GUGAGUA-- (174) --CCAACAG	AU AAA CUC A	1
HtH2 e/f1	GG GGA CAU C	GUAAGUA-- (189) --UUGACAG	GU GAC AUA A	1
KLH1 e/f1	CU GCU CAU C	GUAAGUA-- (327) --AUUCCAG	AU GAU AUU A	1
KLH2 e/f1	AA GGA AAG C	GUAUGUA-- (383) --UUUUCAG	AU GGG AUC A	1
HtH1 f1/f2	GGA CUG GAG	GUAUUUU-- (698) --GUUUCAG	AUC GCC UGU	0
HtH2 f1/f2	GGA AAU GAG	GUAUUUU-- (821) --GUUCCAG	AUC GCA UGU	0
KLH1 f1/f2	AAU AAC GAG	GUAUUUA-- (966) --UUUUCAG	GUG GCA UGC	0
KLH2 f1/f2	GGA CAU GAG	GUAUUUA-- (308) --AUUUCAG	AUU GCC UGU	0
HtH1 f2/g1	CA GGC GAA G	GUGAGAU-- (298) --AAUACAG	AU GAC CAU G	1
HtH2 f2/g1	CU GGG GAA G	GUGAGAG-- (866) --UAUCCAG	GU GGC GCU G	1
KLH1 f2/g1	CU GGU CUC G	GUGAGUU-- (859) --UAAUAG	AC CAU CAC G	1
KLH2 f2/g1	CU GGU GAA G	GUGAGAG-- (603) --UUUACAG	GU CAU ACC G	1
HtH1 g1/g2	GU ACU CAC G	GUAAGUU-- (964) --CGACCAG	GC AUG GCU A	1
HtH2 g1/g2	GU GCU CAC G	GUAUUUA-- (785) --UUUACAG	GU AUG GCC U	1
KLH1 g1/g2	GU ACA CAU G	GUAUGUA-- (1746) --CUUUUAG	GC AUG GCU A	1
KLH2 g1/g2	GU ACU CAU G	GUCAGUA-- (266) --GUUUCAG	GA AUG GCA U	1
HtH1 g2/g3	UUC CAA CAU	GUAAGAG-- (650) --UCAACAG	GGA CAC AUU	0
HtH2 g2/g3	UUC CAU GAG	GUCAGUU-- (378) --CUGCCAG	GGU CGC AUU	0
KLH1 g2/g3	UUC CAU CAU	GUGAGUU-- (1023) --UUUUCAG	GGU CAC AUA	0
KLH2 g2/g3	UUC CAC CAC	GUAAGAG-- (554) --CUUUCAG	GGA CAU AUU	0
HtH1 g3/h	AA CCG GGC G	GUGAGUA-- (582) --UACACAG	UG CAC AGA G	1
HtH2 g3/h	AA CUU GGA G	GUAUGUU-- (398) --AUUUCAG	CC CAC AGA G	1
KLH2 g3/h	AU GGA GGA G	GUAUGUU-- (192) --ACCUCAG	GU CAC GAU C	1
HtH1 h/3'UTR	UAG UUCA CAG	GUGAGGA-- (475) --AUUACAG	GUUGCUAUG	1
HtH2 h/3'UTR	UAA CGCAACAG	GUGAGAU-- (535) --AUUUCAG	GUUUCUUGG	2



Die bisherige Analyse der Genstrukturen beschränkte sich auf die vier von uns sequenzierten Hämocyanine HtH1, HtH2, KLH1 und KLH2. Im Juli 2000 wurde die Genstruktur des Hämocyanins von *Octopus dofleini*, dessen vollständige cDNA schon länger sequenziert ist (Miller et al. 1998), auf einer Tagung vorgestellt (Vincent et al., 2000). Die Genstruktur zweier Gene (A- und G-Typ), die wahrscheinlich allele Formen des OdH darstellen, umfaßt mit etwa 13,5 kb die kodierende Sequenz der funktionellen Domänen OdH-a bis OdH-g. Es handelt sich hierbei um die nahezu vollständige Genstruktur. Das Gen von OdH besteht aus elf Exons, die durch zehn Introns unterteilt sind. Die kodierende Sequenz der sieben funktionellen Domänen des OdH werden durch Introns in den Linker-Regionen voneinander separiert. Diese Linker-Introns liegen alle in Phase 1. Drei „interne“ Introns unterteilen die kodierenden Sequenzen der funktionellen Domänen OdH-*b* (das Intron liegt zwischen den beiden Kupferbindungsstellen Cu-A und Cu-B in Phase 2), OdH-*e* (das Intron liegt hier zum 3'-Ende hin in Phase 1) und OdH-*f* (dieses Intron liegt hinter der Kupferbindungsstelle Cu-B in Phase 0). Im Anfangsbereich des Gens ist ein Signalpeptid kodiert, das nicht durch ein Intron von der kodierenden Sequenz der funktionellen Domäne OdH-*a* getrennt ist. Im Anschluß an die kodierende Sequenz von OdH-*g* folgt ein 3'-UTR, der ebenfalls durch ein Intron unterteilt ist. Allerdings liegt dieses Intron nicht so dicht am Stop-Codon, wie es bei den beiden HtH-Genen der Fall ist. Abbildung 33 zeigt schematisch die Struktur des OdH-Gens im Vergleich zum HtH1-Gen (stellvertretend für die Gastropoden-Hämocyanine).

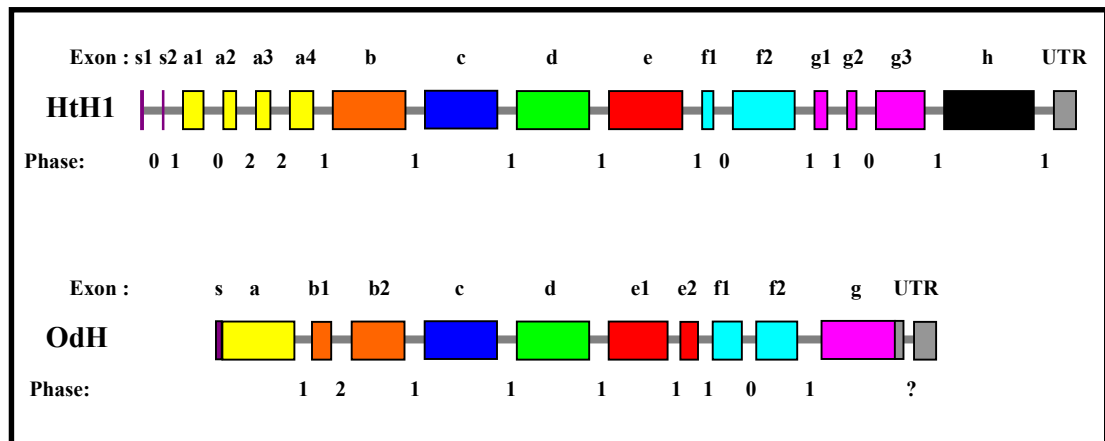


Abb. 33: Die Genorganisation von HtH1 und OdH.

Die Struktur des HtH1-Gens stellvertretend für die Archaeogastropoden-Hämocyanine ist hier mit der Organisation des OdH-Gens (Vincent et al., 2000) verglichen. Die farbigen Blöcke entsprechen in ihrer Größe der relativen Länge der Exons. Dies ist für OdH nur näherungsweise möglich, da die genaue Genorganisation noch nicht vorliegt. Die Bezeichnung der Exons von OdH wurde von mir entsprechend den Bezeichnungen bei HtH und KLH gewählt. Die Introns sind als graue Balken eingezeichnet und entsprechen nicht ihrer relativen Länge. Unter den beiden Genstrukturen sind die Phasen der Introns gezeigt.



Die Positionen der Introns in OdH ist nur ungefähr angegeben, da eine genaue Positionierung anhand der Beschreibung des OdH-Gens nicht möglich ist. Es wird allerdings sehr deutlich, daß die Linker-Introns zwischen den kodierenden Sequenzen der funktionellen Domänen sowohl bei *Octopus* als auch bei *Haliotis* und *Megathura* zwischen jeder funktionellen Domäne vorhanden sind und alle in Phase 1 liegen. Diese Introns scheinen also sehr früh in der Evolution der Mollusken-Hämocyanine im Verlauf der Genduplikationen entstanden zu sein. Sie haben sich sowohl in den Gastropoden als auch den Cephalopoden erhalten. Die „internen“ Introns in OdH zeigen keinerlei Übereinstimmung mit denen der Gastropoden. Die kodierende Sequenz der funktionellen Domänen OdH-*b* und OdH-*e* sind durch „interne“ Introns in zwei Exons separiert, was bei den Gastropoden-Hämocyaninen nicht der Fall ist. Ein „internes“ Intron, das in OdH-*f* zu finden ist, ist zwar auch in Gastropoden eingefügt, allerdings nicht an dieser Position hinter der Kupferbindungsstelle Cu-B, sondern vor der Kupferbindungsstelle Cu-A. Auch die Positionen der drei „internen“ Introns im OdH-Gen zeigen untereinander keinerlei Übereinstimmungen. Sie kommen in allen drei Phasen vor und liegen jeweils an verschiedenen Positionen innerhalb der funktionellen Domänen.

Wie bei dieser Tagung ebenfalls bekannt wurde, existieren Daten zur Genstruktur des Hämocyanins von *Sepia officinalis*. Diese gleicht offenbar der Struktur vom OdH-Gen, aber es existiert ein zusätzliches „internes“ Intron in der für SoH-*c* kodierenden Sequenz (C. Gielen, persönliche Mitteilung). Ein solches „internes“ Intron ist weder im OdH-Gen noch bei den Genen der Archaeogastropoden-Hämocyanine enthalten.

Ein möglicher Ablauf bei der Entstehung der heutigen Mollusken-Hämocyanine durch Genduplikation ist in Abbildung 34 dargestellt. Aus einem Vorläufer-Gen mit nur einer funktionellen Domäne könnte durch Genduplikation ein Gen entstanden sein, daß zwei Exons für funktionelle Domänen enthielt, die von einem Intron in Phase 1 getrennt waren. Da auch das erste Exon von HtH1-*a* durch ein Linker-Intron in Phase 1 vom Signalpeptid getrennt ist, könnten die Linker-Introns als nicht-kodierender Bereich 5' vor dem Ur-Gen (bestehend aus einer funktionellen Domäne als Exon) enthalten gewesen sein. Zwei weitere Genduplikationen könnten weiterhin zu einem Gen mit acht funktionellen Domänen geführt haben. Diese acht Exons waren durch sieben Introns voneinander getrennt, die aus dem nicht-kodierenden Abschnitt 5' vor dem ersten Exon hervorgegangen waren und alle in Phase 1 lagen. Dieses acht-FU Vorläufer-Gen der heutigen Mollusken-Hämocyanine enthielt einzelne Exons für die acht funktionellen Domänen *a* bis *h*. Nach der Trennung der Cephalopoden und Gastropoden könnte bei den Cephalopoden die achte FU *h* deletiert sein, so daß das *Octopus*-Hämocyanin heute nur sieben funktionelle Domänen enthält. Durch



Insertion von drei „internen“ Introns bei einem urtümlichen Cephalopoden bzw. sechs „internen“ Introns bei einem Vorläufer der heutigen Archaeogastropoden könnten dann die heutigen Genstrukturen von *Octopus*, *Megathura* und *Haliotis* entstanden sein.



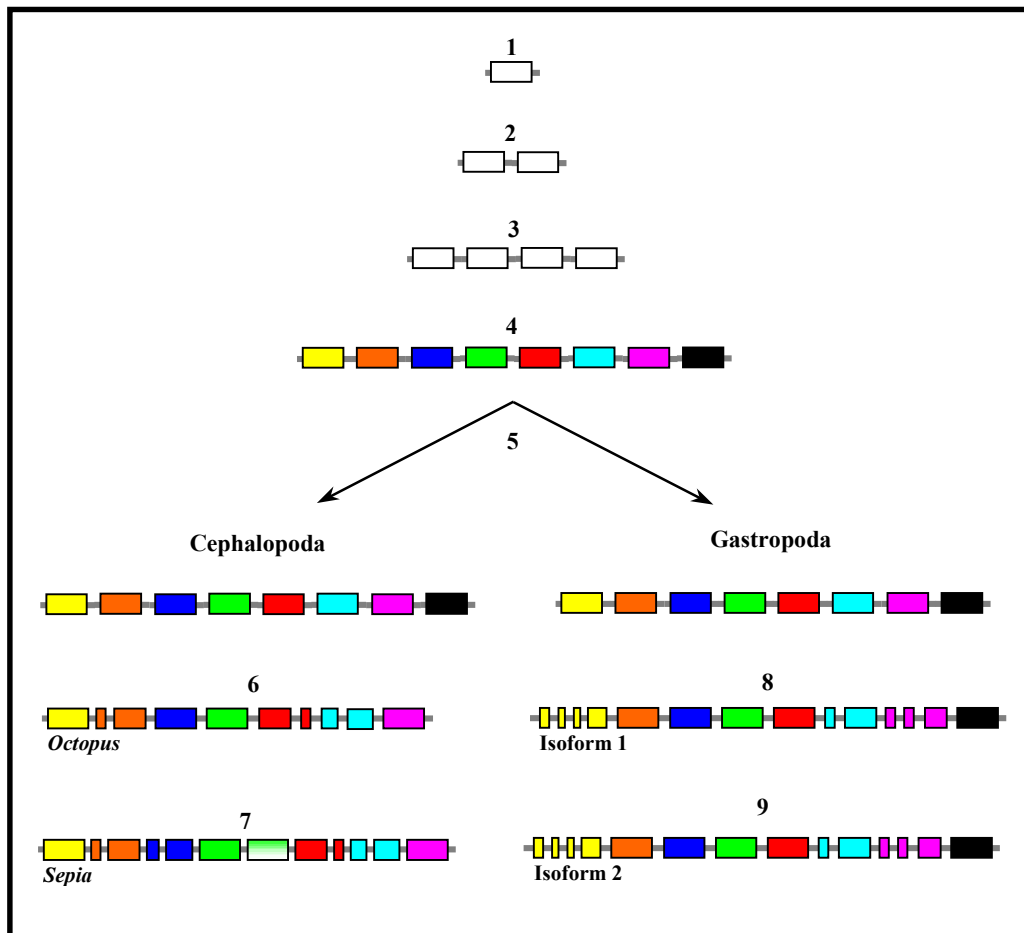


Abb. 34: Die Entstehung der heutigen Genstruktur der Mollusken-Hämocyanine.

Ein möglicher Weg, wie die heutigen Genstrukturen der Mollusken-Hämocyanine entstanden sein könnten, ist hier schematisch dargestellt. Die weißen bzw. farbigen Blöcke stellen Exons dar, graue Balken zeigen Introns. Die einzelnen Schritte sind nummeriert:

- 1 das Ur-Gen besteht aus einem Exon, das für eine funktionelle Domäne kodiert
- 2 Genduplikation führt zu einem zwei-Domänen-Gen bestehend aus zwei Exons und einem Intron in Phase 1 (erstes Linker-Intron)
- 3/4 zwei weitere Genduplikationen führen zu einem Gen aus acht Exons (kodierend für acht FUs *a* bis *h*) und sieben Introns (alle in Phase 1).
- 5 Trennung der Cephalopoden und Gastropoden (beide hatten ursprünglich acht FUs?)
- 6 Verlust der achten FU *h* bei Cephalopoden und Entstehung der heutigen Genstruktur (Insertion von drei „internen“ Introns).
- 7 Entstehung der Genstruktur von *Sepia officinalis* mit einer zusätzlichen funktionellen Domäne und einem weiteren „internen“ Intron in SoH-*c*. Die genaue Genstruktur von SoH ist noch nicht bekannt.
- 8 Entstehung der heutigen Genstruktur der Archaeogastropoden durch Insertion von sechs „internen“ Introns.
- 9 Genduplikation, die zu den heutigen beiden Isoformen geführt hat.



An welcher Stelle sich das Hämocyanin von *Sepia officinalis* mit seinen acht funktionellen Domänen entwickelt hat, bleibt noch unklar. Die vollständige Genstruktur von SoH könnte darüber Auskunft geben, wann und eventuell auch wie der Verlust der achten FU *h* bei den Cephalopoden und die Entstehung der zusätzlichen FU SoH-[*e*]/*s* stattgefunden haben könnte.

In der Organisation der Hämocyanin-Gene von Mollusken scheint es offenbar zwei Typen von Introns zu geben, die zu verschiedenen Zeiten in das Genom inserierten. Die Linker-Introns sind konserviert und liegen alle in Phase 1. Handelt es sich hierbei um frühe Introns (*intron-early*-Hypothese) nach Gilbert (1978, 1985)? Nach der *intron-early*-Hypothese, die auch als *exon-shuffling*-Hypothese bezeichnet wird, bestand das Genom früher Eukaryonten aus Mini-Genen (sie sollen heutigen Exons entsprechen), die für einzelne, kleine Protein-Module kodierten. Diese bildeten die Vorfahren heutiger struktureller Einheiten von Proteinen. Flankierend von diesen Mini-Genen lagen nicht-kodierende Sequenzabschnitte, die postranskriptional nicht entfernt werden mußten, da sich nicht innerhalb der kodierenden Sequenzen lagen. Durch Kombination solcher Mini-Gene sollen die heutigen komplexen Proteine entstanden sein. Während der Fusion dieser Mini-Gene sollen die flankierenden, nicht-kodierenden Sequenzbereiche zwischen den resultierenden Exons erhalten geblieben sein. Sie entsprechen also den heutigen Introns. Diese Hypothese stützt sich auf die Beobachtung, daß im Genom höherer Eukaryonten solche Sequenzen, die für funktionelle Einheiten von Proteinen kodieren, als Exons vorliegen und durch Introns voneinander getrennt sind. Nach dieser Hypothese könnten die Linker-Introns der Hämocyanin-Gene der Mollusken früh in der Evolution während der Kombination bzw. Verdopplung von Exons (die für eine funktionelle Domäne kodierten) entstanden sein. Allerdings soll es sich bei den postulierten Mini-Genen der *intron-early*-Hypothese um deutlich kleinere Protein-Module, etwa kurze α -Helices gehandelt haben. Die Genstruktur der Mollusken-Hämocyanine unterstützt diese Hypothese also nicht, da die einzelnen Protein-Module einer funktionellen Domäne nicht durch Introns unterteilt sind. Dennoch liegen die Linker-Introns konserviert an gleicher Position und in der gleichen Phase zwischen den funktionellen Domänen. Die erste Genduplikation eines ein-FU-Urgens mit flankierenden, nicht-kodierenden Sequenzbereichen könnte zu einem zwei-FU-Gen geführt haben, das aus zwei Exons und einem dazwischenliegenden Intron in Phase 1 bestand. In weiteren Duplikationsschritten bzw. durch ungleiche Cross-over-Ereignisse könnte ein sieben- oder acht-FU Hämocyanin-Gen entstanden sein, bei dem zwischen den Exons der einzelnen funktionellen Domänen jeweils Linker-Introns in Phase 1 gelegen haben. Es ist weiterhin zu bemerken, daß die frühen Introns nach der *intron-early*-Hypothese in Phase 0 liegen sollen, also flankierend vor und hinter den Mini-Genen, die kombiniert wurden (Roy et al., 1999). Diese Aussage stützt sich



auf eine statistische Auswertung der Intron-Phasen im Genom höherer Eukaryonten. Desweiteren muß während des Vorgangs der Neukombination von Exons (*exon-shuffling*) das Leseraster der kombinierten Exons übereinstimmen. Andernfalls wäre keine durchgehende Translation der zusammengefügt Exons möglich. Die Linker-Introns in den Hämocyanin-Genen liegen alle in Phase 1. Dies trifft sogar für das Introns zwischen dem für das Signalpeptid kodierenden Exon und dem ersten Exon der funktionellen Domäne HtH1-*a* zu. Wäre also das erste ein-FU-Exon bereits in Phase 1 gewesen, könnten durch Verdopplung und Kombination ein multi-FU-Gen entstanden sein, dessen einzelne Exons alle in der gleichen Phase und gewissermassen kompatibel für die Translation waren.

Die „internen“ Introns könnten „späte Introns“ repräsentieren. Nach der *intron-late*-Hypothese (Cavalier-Smith, 1991) sollen nicht-kodierende Sequenzabschnitte im Genom höherer Eukaryonten spät in der Evolution durch Integration in bestehende Gene entstanden sein. Diese späten Introns können in allen drei Phasen inserieren, da hier keine Fusion von Mini-Genen zur Insertion der Introns geführt hat. In den Hämocyanin-Genen liegen die „internen“ Introns tatsächlich in allen möglichen Phasen und sind nicht konserviert. Sie sind wahrscheinlich erst spät in der Evolution der Mollusken nach der Trennung der Klassen bzw. Ordnungen entstanden.

In der Literatur werden die *intron-late*- und *intron-early*-Hypothesen ausführlich und kontrovers diskutiert (Cavalier-Smith, 1991; Go, 1981; Hankeln et al., 1997; Matthews & Trotman, 1998; Patthy, 1999; Roy et al., 1999; Sato et al., 1999; Stolfus & Doolittle, 1993). Im Folgenden sollen die Genstrukturen von Tyrosinasen, Arthropoden-Hämocyanin und Hexamerinen mit einbezogen werden.

Die Tyrosinasen sind kupferbindende Proteine, die in ihrem aktiven Zentrum eine deutliche Sequenzhomologie zu den Kupferbindungsstellen Cu-A und Cu-B der Mollusken-Hämocyanine aufweisen (Huber & Lerch, 1986; Lontie et al., 1990; Markl, 1996; Morrison et al., 1994; Preaux et al., 1988; van Gelder et al., 1997; Van Holde et al., 1992). Diese Sequenzhomologien im Bereich der Kupferbindungsstellen zusammen mit Untersuchungen zu Tyrosinase-Aktivität von Mollusken-Hämocyanin (Nakahara et al., 1983) deuten darauf hin, daß diese Proteinfamilien miteinander verwandt und aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sein könnten. Es werden hier exemplarisch die Tyrosinase-Gene von *Mus musculus* (Ruppert et al., 1988) und *Neurospora crassa* (Kupper et al., 1989) gezeigt (siehe Abbildung 35, S. 114).



Wie in der Einleitung geschildert, besitzen Mollusken- und Arthropoden-Hämocyanin wenig Gemeinsamkeiten. So binden beide Proteine Sauerstoff reversibel zwischen zwei Kupferatomen und zeigen im oxygenierten Zustand ein spezifisches Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm, was auf den Cu-O₂-Cu-Komplex zurückzuführen ist. Auf Ebene der Primärstruktur zeigt sich eine Verwandtschaft im Bereich der Kupferbindungsstelle Cu-B der Arthropoden-Hämocyanine, Mollusken-Hämocyanine und Tyrosinasen. Die Kupferbindungsstelle Cu-A der Arthropoden-Hämocyanine zeigt keinerlei Übereinstimmung mit denen von Mollusken-Hämocyaninen oder Tyrosinasen. Für einen Vergleich auf genomischer Ebene steht die Genstruktur der Untereinheit *e* des Hämocyanins von *Eurypelma californicum* zur Verfügung (Voll & Voit, 1990).

Die Hexamerine der Insekten, zu denen larvale Serumproteine, Speicherproteine und Arylphorine gehören, sind mit den Arthropoden-Hämocyaninen verwandt und werden mit ihnen zusammen in eine Protein-Superfamilie gestellt (Burmester et al., 1998). Es werden die Genstrukturen von *Lsp-1β* und *Lsp-2* von *Drosophila melanogaster* (Burmester et al., 1998; Massey et al., 1997; Mousseron-Grall et al., 1997), das Arylphorin-Gen von *Calliophora vicina* (Naumann & Scheller, 1991), die Serumproteine SP-1 und SP-2 von *Bombyx mori* (Fujii et al., 1989; Sakurai et al., 1988) und die Genstruktur der Arylphorine (α und β) von *Manduca sexta* (Willott et al., 1989) mit den Mollusken-Hämocyanin-Genen verglichen.

In Abbildung 35 sind die Genstrukturen von Tyrosinasen, Arthropoden-Hämocyanin und Hexamerinen mit den verschiedenen Genstrukturen der funktionellen Domänen von *Octopus* und *Haliotis* im Vergleich dargestellt.



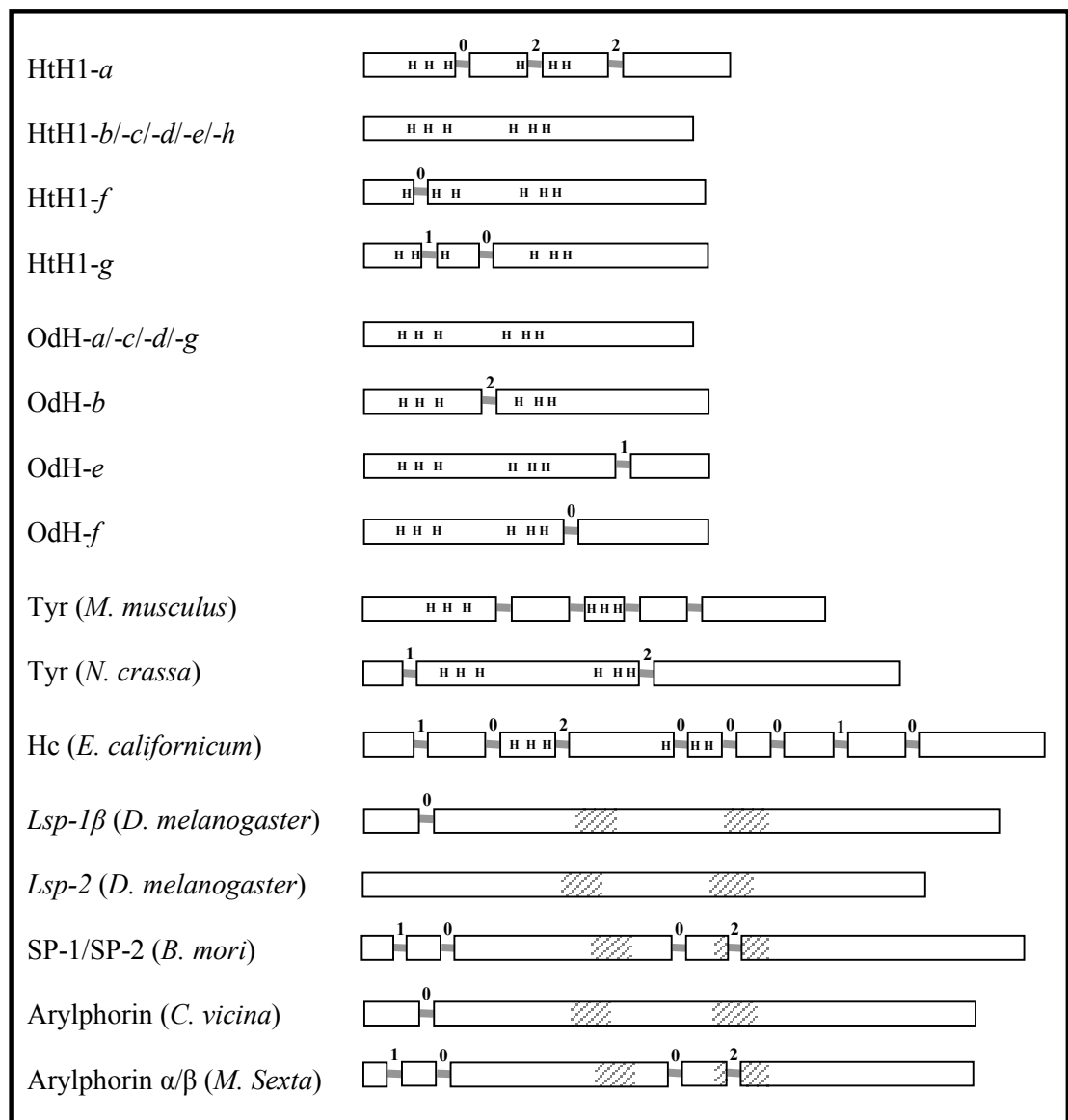


Abb. 35: Vergleich der Genstrukturen von Mollusken-Hämocyaninen, Tyrosinasen, Arthropoden-Hämocyanin und Hexamerinen.

Exons sind als weiße Blöcke und Introns als graue Balken dargestellt. Die Länge der dargestellten Exons entspricht in etwa ihrer relativen Größe, die der dargestellten Introns nicht. Die Histidinreste des aktiven Zentrums sind in den Hämocyaninen und Tyrosinasen vermerkt. Die vormaligen Kupferbindungsstellen Cu-A und Cu-B der Hexamerine sind als grau schraffierte Bereiche in ihrer ungefähren Position gezeigt. Tyr = Tyrosinase, Hc-e = Arthropoden-Hämocyanin Untereinheit e, LSP = Larvales Serum Protein, SP = Serum Protein.



Wie sich deutlich zeigt, ist keine der gezeigten Genstrukturen von Tyrosinasen, Arthropoden-Hämocyanin oder Hexamerinen mit denen der Mollusken-Hämocyanine homologisierbar. Die Positionen der Introns in den beiden gezeigten Tyrosinasen zeigen keinerlei Korrelation zu den „internen“ Introns in den FUs von HtH. Die genaue Position der „internen“ Introns im OdH lassen sind uns zwar noch nicht bekannt, aber auch nach der groben Beschreibung (Vincent et al., 2000) ist keine Übereinstimmung mit den Tyrosinasen feststellbar. Aufgrund der nur sehr geringen Sequenzhomologie zwischen Tyrosinasen und Mollusken-Hämocyaninen wird deutlich, daß die Trennung eines Vorläufer-Gens von Tyrosinasen und Mollusken-Hämocyaninen sehr weit zurückliegen muß, zumal der Ursprung der heutigen funktionellen Domänen der Mollusken-Hämocyanine im Präkambrium datiert wird (siehe Abbildung 37, S. 124). Die Genstrukturen der Superfamilie der Hexamerine und Arthropoden-Hämocyanine sind evolutiv miteinander verwandt und einige Intron-Positionen hier konserviert (Burmester et al., 1998; Markl et al., 1992; Markl & Decker, 1992). Bei einzelnen Genen wurden allerdings einige oder sogar alle der ursprünglichen Introns im Verlauf der Evolution deletiert. Damnach unterliegen verwandte Gene dieser Protein-Superfamilie einer deutlichen Variabilität in Bezug auf Zahl und Positionsunterschiede der Introns (Burmester et al., 1998).

Die Globin-Gene der Crustaceen, die in ihrer Primärstruktur keinerlei Verwandtschaft zu den beschriebenen Proteinfamilien zeigen, sind aufgrund ihres modularen Aufbaus von Interesse. Sie bestehen aus bis zu neun funktionellen Domänen, die wie das Mollusken-Hämocyanin entlang einer durchgehenden Polypeptidkette angeordnet sind. Über die Entstehung und Evolution der Globin-Gene ganz allgemein, die auch bei Bakterien, Protisten, Pflanzen, Pilzen und Vertebraten auftreten (Hardison, 1996), ist im Hinblick auf die beiden geschilderten Intron-Hypothesen viel publiziert worden (Go, 1981; Hankeln et al., 1997; Jellie et al., 1996; Matthews & Trotman, 1998; Stolfus & Doolittle, 1993). Das in diesem Zusammenhang aufschlußreichste Gen ist das Globin-Gen vom Salinenkrebs *Artemia*, das aus neun funktionellen Globin-Domänen besteht (Matthews et al., 1998). Es existiert in zwei Varianten, C- und T-Typ, die die Genprodukte zweier verschiedener Gene darstellen (Jellie et al., 1996; Matthews & Trotman, 1998). Die Genstrukturen beider Typen sind hochkonserviert und die Intron-Positionen und Phasen sind identisch. Anders als bei den HtH- und KLH-Genen, wo die einzelnen funktionellen Domänen durch Linker-Introns voneinander getrennt sind, werden die Exons der neun Globin-Domänen bei *Artemia* nur durch drei Linker-Introns separiert. Hier liegt eine Genstruktur vor, die ähnlich entstanden sein dürfte wie das Gen der Mollusken-Hämocyanine. Mehrere Genduplikationen (und Fusionen) könnten aus einem Vorläufer-Gen mit nur einer Globin-Domäne ein multi-Domänen-Globin erzeugt haben. Allerdings sind bei *Artemia* mit nur wenigen Ausnahmen



zwei „interne“ Introns pro Domäne konserviert (Matthews & Trotman, 1998). Der ein-Domänen-Vorfahr bestand somit bereits vor der Duplikation aus drei Exons und zwei „internen“ Introns. Im Verlauf der Evolution sind mehrere Linker-Introns und ein „internes“ Intron verloren gegangen. Vor der letzten Genduplikation während der Entstehung des neun-Domänen-Globins ist eines der „internen“ Introns an eine veränderte Position gewandert (*intron-sliding?*), wodurch zwei der 17 „internen“ Introns an veränderter Position liegen. Anschließend hat sich das heutige Globin-Gen von *Artemia* verdoppelt, wodurch zwei Varianten entstanden sind. Einen ähnlichen Weg habe ich für die Entstehung der Mollusken-Hämocyanine postuliert (siehe Abbildung 34, S. 110). Bei den Archaeogastropoden-Hämocyaninen endet dieser Weg ähnlich wie beim *Artemia*-Globin ebenfalls in einer Duplikation des multi-Domänen-Gens, was zur Expression von zwei Isoformen oder Varianten des gleichen Proteins geführt hat. Dieser Vergleich erklärt aber neben der ähnlichen Entstehungsweise der multi-Domänen-Gene nicht den Ursprung der Introns in den Genen der Mollusken-Hämocyanine.

Das Auftreten der heutigen Introns in den Genen der Mollusken-Hämocyanine läßt sich nicht vollständig anhand der geschilderten Intron-Hypothesen erklären. Offenbar hat es zwei Phasen in der Evolution der Hämocyanin-Gene gegeben. In der ersten Phase sind die Linker-Introns während der Vervielfältigung eines ein-FU Vorläufergens entstanden. Diese Linker-Introns sind in Position und Phase innerhalb der Cephalopoden und Gastropoden konserviert geblieben. In einer zweiten Phase sind die „internen“ Introns in die bestehenden multi-FU Gene integriert worden. Diese Ereignisse haben offenbar erst nach der Trennung der beiden Klassen stattgefunden. Die „internen“ Introns sind also deutlich jünger als die Linker-Introns.



4. Evolution der Mollusken-Hämocyanine

Im Folgenden werden die von uns sequenzierten FUs von HtH und KLH mit den momentan zur Verfügung stehenden Sequenzen der Mollusken-Hämocyanine verglichen. Dabei sind die fast vollständig sequenzierten FUs mit einbezogen. In Tabelle 10 sind alle hier diskutierten FUs unter Angabe ihrer Quelle aufgelistet. Die angegebenen Accession-Nummern der Sequenzen von HtH1 und HtH2 beziehen sich auf die in die EMBL-Datenbank eingetragenen cDNA- und Gen-Sequenzen.

Tab. 10: Alle Mollusken-Hämocyanine, von denen vollständig oder fast vollständig sequenzierte FUs zur Verfügung stehen.

In Klammern geschriebene FUs sind nur partiell sequenziert. Die Sequenzen von *Haliotis tuberculata* sind in der EMBL-Datenbank unter den angegebenen Accession-Nummern zu finden.

Cephalopoda		
<i>Octopus dofleini</i>	OdH-a bis -g	(Miller et al., 1998)
<i>Sepia officinalis</i>	SoH-(<i>[f]e</i>)	(Top et al., 1990)
	SoH-(<i>[g]f</i>) ; SoH-(<i>[h]g</i>)	(Declercq et al., 1990)
Gastropoda		
<i>Haliotis tuberculata</i>	HtH1-a bis -h	Accession-Nr. Y 13219 (cDNA) und AJ 252741 (Gen)
	HtH2-(a) ; -b bis -h	Accession-Nr. AJ012048 (cDNA) und AJ 297475 (Gen)
<i>Helix pomatia</i>	HpH β _c -d	(Drexel et al., 1987)
	HpH β _c -g	(Xin et al., 1990)
<i>Megathura crenulata</i>	KLH1-(b) ; -c bis -f, (-g)	bislang unveröffentlicht
	KLH2-(b) ; -c bis -g	bislang unveröffentlicht
<i>Rapana thomasiana</i>	RtH2-a	(Stoeva et al., 1997)

Die in dieser Tabelle angegebenen FUs der Cephalopoden- und Gastropoden-Hämocyanine sind, sofern sie nicht in Klammern geschrieben sind, vollständig sequenziert. Von den sechs in Klammern geschriebenen partiell sequenzierten FUs ist die vorhandene Aminosäuresequenz für einen sinnvollen Vergleich lang genug. Hier nicht aufgeführt sind lediglich die sehr kurzen Sequenzstücke der FUs KLH2-h und HpH β _c-h, da sie zu kurz sind.



Aus den in Tabelle 10 gezeigten 41 Sequenzen funktioneller Domänen wurde mit dem Computerprogramm Clustal ein multiples Sequenzalignment erstellt. In Abbildung 36 ist ein radialer Stammbaum gezeigt, der auf diesem multiplen Sequenzalignment basiert. Die Länge der einzelnen Äste sind über das Alignment nach der Kimura-Methode berechnet (Kimura, 1993) und geben die Distanzen der Sequenzen untereinander an. Die Bootstrap-Werte sind in % angegeben. „Bootstrapping“ bedeutet, daß das Programm Clustal aus dem erstellten Alignment mehrere (in diesem Fall 1000) phylogenetische Bäume berechnet. Die Bootstrap-Werte geben an, wie oft bei diesen Berechnungen die Verzweigungen der Äste in der gezeigten Weise berechnet wurden. Der Baum wurde mit dem Computerprogramm „TreeView“ erstellt und als Word-Dokument bearbeitet. Die topografisch an gleicher Position liegenden FUs sind wieder in den bislang verwendeten Farben dargestellt. Die nicht vollständig sequenzierten sechs FUs sind durch einen graduellen Farbverlauf gekennzeichnet. Die mit einem Stern markierten 28 FUs sind die von unserer Arbeitsgruppe sequenzierten und in dieser Arbeit beschriebenen FUs von HtH1, HtH2, KLH1 und KLH2.

Es zeigt sich deutlich, daß die bislang hauptsächlich auf immunologischer Ebene festgestellten Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen FUs untereinander auch in der Primärstruktur zu finden sind. Immunologische Untersuchungen mit einzelnen FUs haben gezeigt, daß solche FUs, die an gleicher topografischer Position innerhalb der Polypeptidkette von Hämocyaninen verschiedener Molluskenarten liegen, mehr Verwandtschaft zueinander aufweisen als die einzelnen FUs einer Polypeptidkette zueinander (Brenovitz et al., 1986; Loncke et al., 1990; Markl, 1996; Van Holde et al., 1992). Die genaue Position der einzelnen FUs innerhalb des Zylinders ist bislang weitgehend unklar. Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Antikörpern gegen einzelne FUs haben gezeigt, daß die FUs-g und -h, soweit vorhanden, im Innern des Zylinders liegen und den Kragenkomplex bilden (Gebauer et al., 1999a; Gebauer et al., 1994; Harris et al., 1993; Lambert et al., 1994a; Lamy et al., 1993; Meissner et al., 2000). Der genaue Verlauf der Polypeptidkette einer Untereinheit - insbesondere entlang der Zylinderwand - ist allerdings noch nicht bekannt. In diesem Stammbaum ist zu sehen, daß topografisch an gleicher Position innerhalb der Polypeptidkette liegende FUs aller sequenzierten Mollusken-Hämocanine jeweils in einem separaten Ast gruppiert werden. Sie besitzen also mehr Ähnlichkeit als die einzelnen FUs eines Hämocyanins untereinander.

Dabei ist zu erklären, warum die FUs SoH-[ff]e, SoH-[g]f und SoH-[h]g eine Doppelbezeichnung führen. Wie in der Einleitung und in Abbildung 3, S. 8 bereits beschrieben, besteht das Hämocyanin von *Sepia officinalis* aus acht FUs, die mit a bis h bezeichnet wurden (Wichertjes et al., 1986). Immunochemische Untersuchungen sowie



partielle Sequenzvergleiche mit OdH haben allerdings gezeigt, daß die C-terminalen FUs *f*, *g* und *h* vom SoH mit den FUs *e*, *f* und *g* vom OdH korrelieren (Loncke et al., 1990). Diese Homologie der drei C-terminalen FUs vom SoH zeigt sich auch in dem hier dargestellten Stammbaum im Vergleich mit allen anderen Sequenzen von Mollusken-Hämocyaninen.

Als einzige Ausnahme steht die N-terminale FU Rth2-*a* im Stammbaum bei den funktionellen Domänen *g*. Da das Hämocyanin von *Rapana thomasiana* neben dieser abweichenden Zuordnung von Rth2-*a* auch noch andere Besonderheiten aufweist (Gebauer et al., 1999b), ist eine detailliertere Analyse der Primärstruktur der beiden Rth-Isoformen von großem Interesse. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß es mir mit den in Abbildung 14, S. 61 beschriebenen degenerierten Primern iii und iv gelungen ist, ein kurzes Fragment von etwa 400 bp aus dem Genom von *Rapana thomasiana* zu amplifizieren und zu sequenzieren. Die darin kodierte Sequenz von 132 Aminosäuren liegt zwischen den Kupferbindungsstellen Cu-A und Cu-B. Dieses kurze Fragment wird in einem multiplen Sequenzalignment zu den FUs *c* gruppiert, eine spezifische Zuordnung zu einer der beiden für Archaeogastropoden typischen Isoformen ist allerdings nicht gegeben. Ausgehend von diesem kurzen Sequenzabschnitt sollte es möglich sein, die Primärstruktur vom Rth auf DNA-Ebene zu ermitteln.

Neben der Anordnung der korrespondierenden FUs in separaten Ästen gibt der Stammbaum der Abbildung 36 auch Auskünfte über die Verwandtschaftsverhältnisse der Mollusken-Hämocyanine. Es zeigt sich, daß die Hämocyanine der Gastropoden (abgesehen von der bereits erwähnten Stellung von Rth2-*a*) mehr Sequenzähnlichkeiten untereinander aufweisen als zu den Cephalopoden-Hämocyaninen. Besonders deutlich wird dies in den Ästen der FUs *d* und *g*, wo neben den von uns sequenzierten HtH und KLH auch eine FU von *Helix pomatia* HpH β _C sequenziert wurde. Die Cephalopoden-Sequenzen zweigen in diesen Ästen deutlich vor den Gastropoden-FUs ab. Die Sequenzen von *Octopus* und *Sepia* werden ebenfalls in einem eigenen Ast geführt, der sich erst recht spät in die beiden Arten unterteilt. Dies läßt auf eine engere Verwandtschaft zwischen *Octopus* und *Sepia* schließen. Bislang sind vom SoH nur drei FU-Sequenzen publiziert, von denen zwei nur partielle Primärstrukturen darstellen. Bei den Sequenzen der Archaeogastropoden zeigen die Isoformen 1 und 2 von *Haliotis* und *Megathura* eine deutliche Verwandtschaft zueinander. Die FUs von HtH1 und KLH1 einerseits und die FUs von HtH2 und KLH2 andererseits werden stets zusammengestellt. Dies deutet darauf hin, daß im Zuge der Evolution die beiden Isoformen der Archaeogastropoden entstanden sind, bevor sich die Vorfahren von *Haliotis* und *Megathura* voneinander getrennt haben.



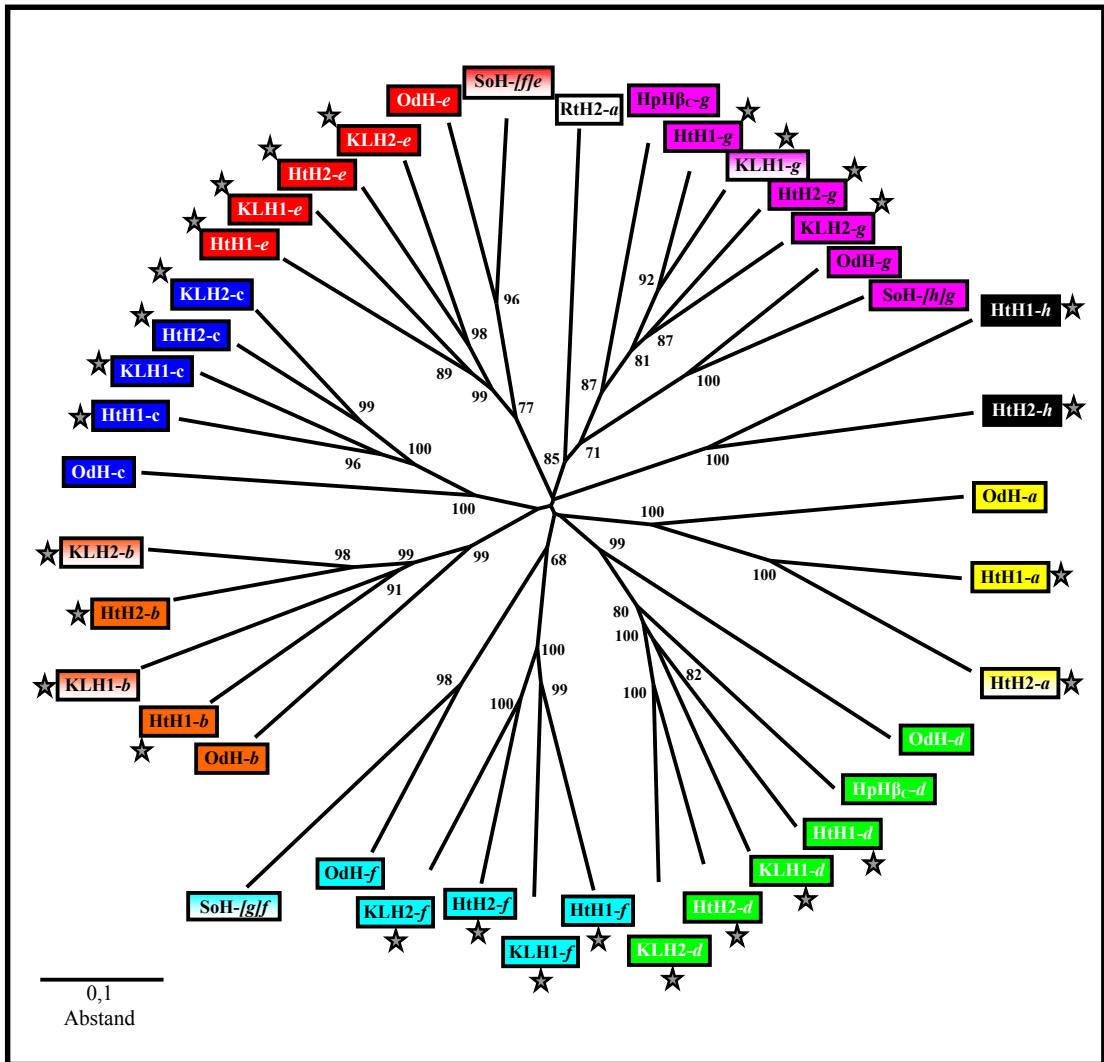


Abb. 36: Radialer Stammbaum aller bislang sequenzierten FUs von Mollusken-Hämocyaninen.

Basierend auf einem Clustal-Alignment unter Korrektur multipler Substitutionen wurde dieser Stammbaum mit dem Computerprogramm TreeView erstellt. Die nicht ganz vollständig vorhandenen Sequenzen einzelner FUs sind durch einen graduellen Farbverlauf gekennzeichnet. Die mit einem Stern markierten FUs wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe sequenziert und sind in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Bootstrap-Werte sind an den jeweiligen Verzweigungspunkten in % angegeben. Für Erläuterungen siehe Text.



Der hier dargestellte radiale Stammbaum lässt keine Aussage über die Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen FUs untereinander zu. Die acht Äste der FUs *a* bis *h* münden alle in etwa zentral in der Mitte des Baumes. Die Anordnung der acht Äste ist allerdings sehr variabel, sobald man Sequenzen aus dem Alignment entfernt oder zufügt. Die Tatsache, daß alle acht Äste der FUs *a* bis *h* unabhängig voneinander im Baum gruppiert werden, spricht dafür, daß evolutiv diese acht FUs im ursprünglichen Mollusken-Hämocyanin enthalten gewesen und relativ schnell aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind. Das Fehlen der FU *h* bei Cephalopoden stellt demnach einen späteren Verlust der achten FU dar. Die bei SoH eingefügte FU, die zu einem acht-FU-Hämocyanin bei *Sepia* führt, ist wahrscheinlich erst nach der Trennung der einzelnen Cephalopoden-Gruppen entstanden. Dafür sprechen auch biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an einem weiteren Cephalopoden-Hämocyanin, dem Hämocyanin von *Vampyroteuthis infernalis* (Vampyromorpha). Dieses aus sieben FUs bestehende Hämocyanin zeigt basierend auf diesen biochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen deutlich mehr Verwandtschaft zum OdH (Mouche et al., 1999). Da Octopoda, Sepioida und Vampyromorpha als unabhängig voneinander entstandene Cephalopoden-Ordnungen gelten, scheint das acht-FU-Hämocyanin innerhalb der Cephalopoda eine Besonderheit der Sepioidea zu sein. Für eine genauere Analyse der Evolution der Mollusken-Hämocyanine habe ich ein multiples Alignment mit Clustal von allen vollständig sequenzierten FUs erstellt. In Tabelle 11 sind die daraus resultierenden Werte für die Identitäten der einzelnen FUs gezeigt. Die sehr variablen Randbereiche, insbesondere die C-terminale Verlängerung von HtH1-*h* und HtH2-*h* sind dabei nicht berücksichtigt.



Tabelle 11 spiegelt die im Stammbaum der Abbildung 36 dargestellten Verwandtschaftsverhältnisse der Mollusken-Hämocyanine wider. Während die nicht-homologen FUs aller Hämocyanine im Durchschnitt lediglich 45 % Identität aufweisen (weiße Zellen), zeigen die homologen FUs aus verschiedenen Molluskenklassen etwa 55 % Übereinstimmung (grau unterlegt). Die homologen Gastropoden-Sequenzen aus Prosobranchiern versus Pulmonaten zeigen durchschnittlich 64 % Identität, wobei hier nur die FUs HpH β _{c-d}, HpH β _{c-g} und RtH2-*a* mit den entsprechenden FUs von HtH und KLH verglichen wurden (türkis unterlegt). Die korrespondierenden FUs der beiden Hämocyanin-Isoformen der Archaeogastropoden sind miteinander verglichen etwa zu 68 % identisch (grün unterlegt), während innerhalb derselben Isoform durchschnittlich 73 % Übereinstimmung vorliegt (rot unterlegt). Die größte Übereinstimmung von fast 80 % zeigen die FUs HtH2-*c* und KLH2-*c*. Der bislang einzige mögliche Vergleich dieser Art innerhalb der Cephalopoden ist der zwischen OdH-*g* und SoH-*ffg* mit einer Übereinstimmung der Sequenzen von 73 % (lila unterlegt).

Aus dem gleichen multiplen Sequenzalignment wurde mit dem Computerprogramm ProtDist eine Distanzmatrix erstellt, in der die Abstandsverhältnisse der FUs untereinander unter Korrektur möglicher Rückmutationen nach der Dayhoff-Methode berechnet wurden. Unter der Annahme, daß eine molekulare Uhr existiert, daß also die Evolution der Mollusken-Hämocyanine mit einer konstanten Mutationsrate erfolgte, kann aus dieser Distanzmatrix die Phylogenie der Mollusken sowie die Entstehung der Mollusken-Hämocyanine berechnet werden. Zur Berechnung dieses phylogenetischen Baums, bei der mir Thorsten Burmester freundlicherweise geholfen hat, wurde aus paleontologischen Daten die Aufspaltung der Cephalopoden und Gastropoden vor 520 Millionen Jahren als Eichpunkt verwendet (Benton, 1993). In Abbildung 37 ist ein solcher phylogenetischer Baum dargestellt. Die Werte der Zeitskala beziehen sich auf Millionen Jahre (aus dem Englischen **m**illion **y**ears **a**go = MYA). Aus der Distanzmatrix wurden auch die Standardabweichungen berechnet.



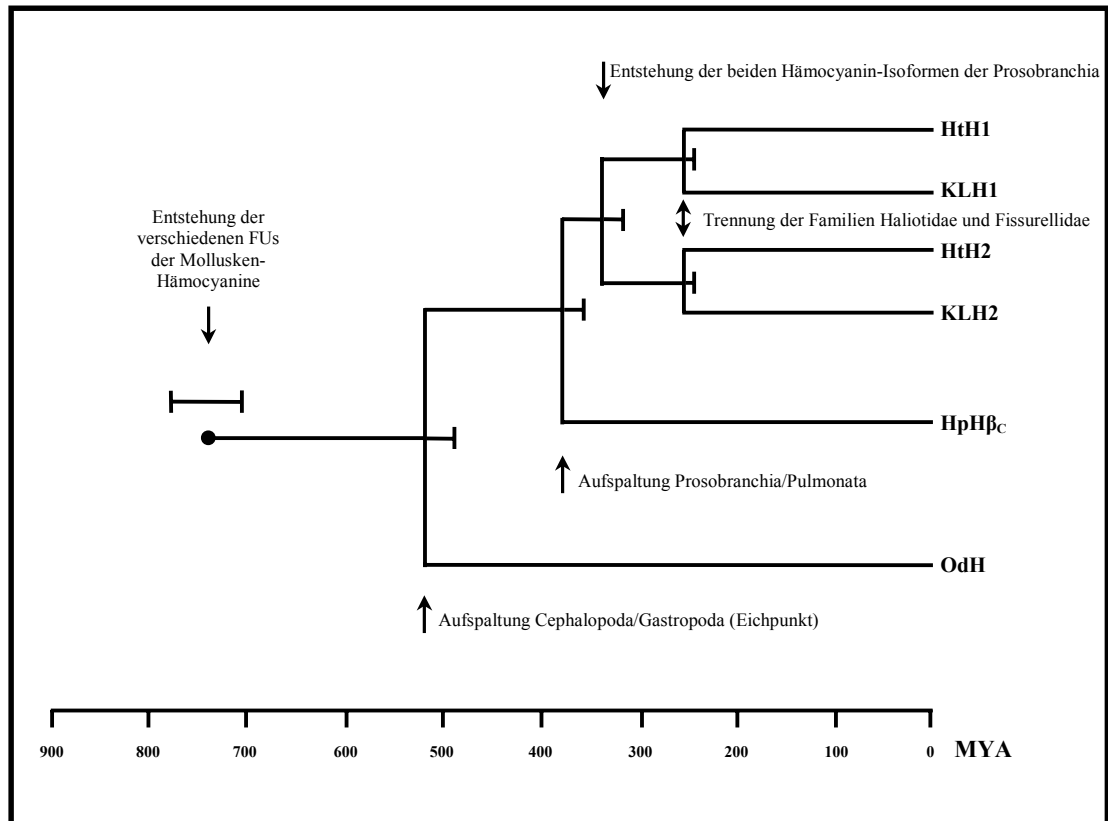


Abb. 37: Phylogenetischer Baum der Mollusken-Hämocyanine.

Nach diesen Berechnungen sind die acht FUs des heutigen Mollusken-Hämocyanins bereits im Präkambrium vor etwa 744 ± 46 Millionen Jahren entstanden. Demnach könnte zum Beispiel das Fossil *Kimberella*, das als Ur-Mollusk des ausklingenden Präkambriums interpretiert wird (Fedonkin & Waggoner, 1997), ein multi-FU-Hämocyanin besessen haben. Für die anhand paleontologischer Daten bestimmte Trennung der Cephalopoden und Gastropoden ergibt sich aus der Distanzmatrix ein Wert von 520 ± 29 Millionen Jahren. Innerhalb der Gastropoden haben sich hiernach die Vorderkiemerschnecken vor etwa 379 ± 20 Millionen Jahren von den Lungenschnecken getrennt, was der Datierung anhand fossiler Daten entspricht (Benton, 1993; Yochelsen, 1979). Die beiden Isoformen der Archaeogastropoden-Hämocyanine haben sich nach diesen Berechnungen vor 339 ± 19 Millionen Jahren durch Genduplikation entwickelt und die Aufspaltung der Vorfahren von *Haliotis* und *Megathura* hat vor etwa $255 \pm 7,3$ Millionen Jahren stattgefunden.



Demnach wäre die heutige Genstruktur der Archaeogastropoden-Hämocyanine mindestens 340 Millionen Jahren alt und seitdem völlig konserviert geblieben.

Bei einer Standardabweichung von maximal 6 % liefern diese Berechnungen sehr detaillierte Daten über die Evolution der Mollusken. Allerdings sind diese Aussagen mit Vorsicht zu behandeln, da wir bei der Berechnung zwei Voraussetzungen getroffen haben, die nicht zwangsläufig zutreffen müssen. Zum einen gehen wir von der Existenz einer molekularen Uhr aus. Wir setzen also voraus, daß die Evolution der Mollusken-Hämocyanine innerhalb der letzten 750 Millionen Jahre einer konstanten Mutationsrate unterlegen war. Diese Annahme ist strittig, da sich die Mutationsrate beispielsweise durch Veränderung von Umwelteinflüssen, etwa der UV-Einstrahlung auf die Erdatmosphäre, verschieben kann. Zum anderen gehen wir bei der Berechnung von der von Benton (1993) anhand fossiler Funde bestimmten Trennung der Cephalopoden und Gastropoden vor 520 Millionen Jahren aus. Diese Datierung unterliegt allerdings auch einigen Schwankungen. So wird beispielsweise der Cephalopoden-Gastropoden-Split von Yochelson (1979) vor etwa 600 Millionen Jahren angesetzt. Dieser Unterschied beruht auf der Datierung des Präkambriums und des Kambriums. Wenn wir diesen Eichpunkt für unsere Berechnungen verwenden, verschieben sich alle Aufspaltungseignisse deutlich nach hinten. So wären etwa die einzelnen FUs des heutigen Mollusken-Hämocyanins nicht vor 744 ± 46 Millionen Jahren entstanden sondern vor 831 ± 51 Millionen Jahren. Die exakte Datierung bestimmter Aufspaltungseignisse im Laufe der Evolution der Mollusken ist also nur bedingt und in einem recht großen Zeitfenster möglich. Dennoch können wir anhand unserer Sequenzdaten deutlich belegen, daß bereits relativ weit im Präkambrium ein sauerstofftransportierendes Protein aus acht funktionellen Domänen existierte.



5. Ausblick

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Daten liefern wir den Großteil der bislang zur Verfügung stehenden Sequenzen von Mollusken-Hämocyaninen. Für eine phylogenetische Analyse der einzelnen Mollusken-Klassen anhand von Hämocyanin-Sequenzen wären besonders die Primärstrukturen der bislang noch nicht sequenzierten Klassen Bivalvia und Polyplacophora von großem Interesse. Mit Hämocyanin-Sequenzen aller Mollusken-Klassen ließe sich vielleicht die Evolution der Großgruppen der Mollusken rekapitulieren. Das gleiche gilt für die Verwandtschaftsbeziehungen einzelner Familien oder Gattungen innerhalb der verschiedenen Klassen. So wäre beispielsweise die Sequenz des Hämocyanins von *Rapana thomasiana* im Hinblick auf die beobachteten Eigenheiten dieses Hämocyanins (Gebauer et al., 1999b) verglichen mit anderen Gastropoden-Hämocyaninen interessant.

Vielleicht läßt sich mit einem Vergleich der Primärstrukturen von Mollusken-Hämocyaninen aller Mollusken-Klassen auch klären, warum verschiedene Aggregationsformen auftreten. Besteht zum Beispiel eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein einer FU *h* und der Bildung von Didekameran?

Neben dieser phylogenetisch orientierten Analyse der Primärstrukturen kann aufgrund unserer Ergebnisse die Expression von rekombinantem Hämocyanin in Angriff genommen werden. So wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits FUs rekombinant hergestellt, wenn auch noch nicht in renaturiertem Zustand. Dies ist besonders im Hinblick auf die medizinisch-immunologische Anwendung des KLH von großem Wert. Momentan wird das klinisch eingesetzte KLH aus den Schnecken gewonnen. Durch den Einsatz von rekombinantem KLH könnte man langfristig auf diese Quelle verzichten, und man könnte den Wirkstoff möglicherweise sogar gezielt verbessern. Und schließlich könnte man anhand von rekombinantem Hämocyanin Struktur-Funktions-Beziehungen im Detail untersuchen.



E. Zusammenfassung

Als erste komplette Sequenz eines Gastropoden-Hämocyanins wurde das Hämocyanin von *Haliotis tuberculata* über cDNA vollständig kloniert und sequenziert. Die Primärstruktur besteht aus 3404 Aminosäuren mit einer errechneten Molekülmasse von 392 kDa. Neben der vollständigen Primärstruktur des sezernierten Proteins ist in der cDNA eine Signalsequenz kodiert. Es findet sich kein Start-Codon für die Translation, die mRNA ist also noch nicht ganz vollständig kloniert und sequenziert.

Mit Hilfe spezifischer Primer wurde die Genstruktur des HtH1-Gens zwischen der Signalsequenz und dem 3'-UTR über PCR aus genomischer DNA ermittelt. Dies ist die erste bekannte Genstruktur eines Schnecken-Hämocyanins. Das Gen umfaßt etwa 28,6 kb und besteht aus 17 Exons und 16 Introns. Die kodierende Sequenz des Signalpeptids und der acht FUs sind in den Linker-Regionen durch Introns (Linker-Introns) getrennt, die alle in Phase 1 liegen. Die Signalsequenz von bislang 48 Nukleotiden sowie die Sequenz der funktionellen Domänen HtH1-*a*, HtH1-*f* und HtH1-*g* sind durch „interne“ Introns in zwei bis vier Exons unterteilt. Diese „internen“ Introns inserieren an unterschiedlichen Positionen und in unterschiedlichen Phasen in die kodierende Sequenz der einzelnen FUs.

Von der Untereinheit HtH2 wurde über cDNA und genomische PCR die vollständige kodierende Sequenz der funktionellen Domänen HtH2-*b* bis HtH2-*h* und ein großer Teil von HtH2-*a* sequenziert. Die partielle Primärstruktur umfaßt 3307 Aminosäuren. Es fehlen noch etwa 100 Aminosäuren aus dem N-terminalen Bereich von HtH2-*a*. Das Fragment des HtH2-Gens von 18,3 kb besteht aus 15 Exons und 14 Introns. Die Exon-Größen und die Positionen sowie Phasen der Introns („interne“ Introns und Linker-Introns) entsprechen exakt den Verhältnissen im HtH1-Gen. Zwischen korrespondierenden Introns in HtH1 und HtH2 besteht neben den konservierten Splice-Stellen keinerlei Sequenzhomologie.

Die Genstruktur der Archaeogastropoden (HtH und KLH) ist in allen Exons und Introns hochkonserviert. Das soeben auf einer Tagung vorgestellte Hämocyanin-Gen von *Octopus dofleini* (OdH) zeigt eine Korrelation zu den Archaeogastropoden-Hämocyaninen in den Linker-Introns, die ebenfalls alle in Phase 1 liegen. Die „internen“ Introns des OdH-Gens korrespondieren nicht mit den „internen“ Introns der Archaeogastropoden-Hämocyanine. Das Vorläufer-Gen der Mollusken-Hämocyanine scheint demnach Linker-Introns in Phase 1 besessen zu haben, nicht aber „interne“ Introns. Diese sind offenbar erst nach der Trennung der Cephalopoden und Gastropoden entstanden. Ein Vergleich der Genstrukturen der



Mollusken-Hämocyanine mit Genen von Tyrosinasen, Arthropoden-Hämocyaninen und Hexamerinen zeigt keine Übereinstimmung.

Multiple Sequenzalignments und daraus erstellte phylogenetische Stammbäume mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen von HtH1, HtH2, KLH1, KLH2 und anderen Mollusken-Hämocyaninen zeigen, daß topografisch an gleicher Position innerhalb der Polypeptidkette verschiedener Hämocyanine liegende FUs mehr Ähnlichkeit zueinander besitzen als die einzelnen FUs innerhalb eines Hämocyanins untereinander. Innerhalb der Gastropoden-Hämocyanine zeigen die FUs der Archaeogastropoden-Hämocyanine eine größere Ähnlichkeit als zum Hämocyanin von *Helix pomatia*. Das gleiche gilt auch für FUs der korrespondierenden Isoformen HtH1 und KLH1 bzw. HtH2 und KLH2.

Auf der Annahme basierend, daß eine „molekulare Uhr“ existiert, läßt sich mit Hilfe einer Distanzmatrix die Phylogenie der Mollusken-Hämocyanine rekapitulieren und die einzelnen Aufspaltungsereignisse im Verlauf der Evolution der Mollusken datieren. Als Eichpunkt für die molekulare Phylogenie dient die aus paleontologischen Daten bestimmte Trennung der Cephalopoden und Gastropoden vor 520 Millionen Jahren. Die Berechnungen ergeben, daß die acht funktionellen Domänen der heutigen Mollusken-Hämocyanine vor etwa 750 Millionen Jahren entstanden sind. Die Trennung der Pulmonaten und Prosobranchia hat demnach vor ca. 380 Millionen Jahren stattgefunden, was paleontologischen Daten entspricht. Vor 340 Millionen Jahren sind durch Genduplikation die beiden heutigen Isoformen der Archaeogastropoden entstanden und vor 255 Millionen Jahren haben sich die Familien der Fissurellidae und Haliotidae voneinander getrennt.



F. Anhang

1. Abkürzungen

AMV-RT	Avian myeloblastosis virus Reverse Transkriptase
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
CI	Chloroform-Isoamylalkohol
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxygenin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FU	Functional unit (Funktionelle Einheit, Funktionelle Domäne)
GTC	Guanidinthiocyanat
HpH	<i>Helix pomatia</i> Hämocyanin
HtH	<i>Haliothis tuberculata</i> Hämocyanin
Ig	Immunglobulin, Antikörper
IPTG	Isopropyl- β -D-Galactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton, 10^3 Dalton
KLH	<i>Megathura crenulata</i> Hämocyanin (Keyhole Limpet Hemocyanin)
MMLV-RT	Moloney murine leukemia virus Reverse Transkriptase
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz
MYA	Million years ago
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
OdH	<i>Octopus dofleini</i> Hämocyanin
ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase chain reaction
pfu	Plaque forming units
PLG	Phase Lock Gel
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RT	Reverse Transkriptase
RtH	<i>Rapana thomasi</i> Hämocyanin
SDS	Sodiumdodecylsulfat



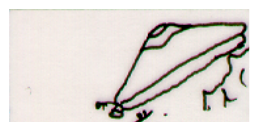
SoH	<i>Sepia officinalis</i> Hämocyanin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UTR	untranslated region (Untranslatierter Bereich)
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galctosid

2. Abkürzungscodes der Aminosäuren

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

3. IUPAC-Codes für degenerierte Nukleotide

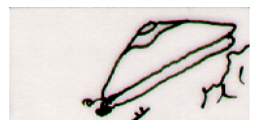
M	A oder C	N	jedes der vier Nukleotide
R	A oder G	B	nicht A
W	A oder T	D	nicht C
S	C oder G	H	nicht G
Y	C oder T	V	nicht T
K	G oder T		



4. Verwendete Primer

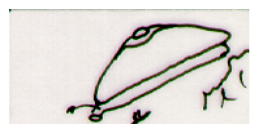
Tab. 12: Bezeichnung und Sequenz aller verwendeten Primer.

Nummer	Name/Orientierung	Sequenz (in 5'-3'-Richtung)
<u>HtH1-spezifische Primer</u>		
2	HtH1-c DS1	GGAAGTTGGTAAAGGGGGCGA
4	HtH1-c US1	GACAGAATCACCAGAGAGCAT
6	HtH1-d DS1	TCGTGATGTCTCCTTTGCTTC
8	Haliotis ef1 DS	ATAATGGAGGGCGTCTGAATG
9	Haliotis ef2 DS	GAGGGCGTCTGAATGAGGTCT
10	HtH1-f Klon 16 US	AGGGGTCTATCTGGGTCGG
12	Hal f random Bank DS	GGACTGCGTGCTTCTTGGTGA
15	HtH1-3'-UTR DS	TCCTCATCGTCTCGTTCACCA
18	Kpn-Sonde US	GAGGTACCGACAAGTATCCCTGC
20	Xho-Sonde DS	AACTCGAGTGGTGAATCATGAAG
21	Californien 1 DS	NNNCTCGAGCAGGCGATGCCAATGGGGGAACACGGG
22	Californien 2 DS	NNNCTCGAGNCKRTGCCARTGNGGRAA
23	Californien 3 DS	NNNCTCGAGCGAGTGGTGAATCATGAAGACAGGGTC
24	Californien 4 DS	NNNCTCGAGRTGRTGDATCATRAANAC
25	HtH1-g US1	CCACAACCCAGTCACAAAGGC
27	HtH1-d US1	CAAAACCACAGGACGGATTTCG
30	HtH1-g DS1	GCCTTTGTGACTGGGTTGTGG
35	HtH1-g US2	AAGGCTGAGACCGACAACC
36	HtH1-b US1	GAGGAGGGACACCATCACACG
40	HtH1-b US3	GAGAGATTCAGGCCGACACA
41	HtH1-b DS3	ATCTTCCTGCTCAAATGCGTA
64	HtH1-a US6	CCTTACTGGGACTGGACGC
73	HtH1-a DS5	CAGATGGCGAAGAGGCGGTCAACGTTGGAG
80	HtH1-g Intron 1 DS1	TGCTTGGTGTAGAGGCGATGC
82	HtH1-b DS7	GTTGGCAAACAGTTTTCGAATCTATCATCCT
83	HtH1-a US10	GGCTTGTTTCAGTTTCTACTCGTCGCCCTTG
84	HtH1-a DS7	CGTTCTTTGGAGTGGCGTTCGTCTAGTTCT
85	HtH1-a US9	AGAAGTAGACGAACGCCACTCCAAAGAACG



Fortsetzung von Tabelle 12

Nummer	Name/Orientierung	Sequenz (in 5'-3'-Richtung)
<u>HtH2-spezifische Primer</u>		
A	HtH2 RACE DS2	ATTCTTTCTGATGTGGCTTGC
C	HtH2-e US1	ATGCTGACCGCCAACAACG
D	HtH2-f US1	GCATTAGCCCAGAGGACGT
F	HtH2-g DS1	AGGCAGTTGTCCAGTCCCA
G	HtH2-g US1	TGCTGTGCTGGGAGGGGAG
H	HtH2-h DS1	GGAGTCGGACAAGAACGCC
I	HtH2-3'-UTR DS	AGAGAAGAACGCCAATGTCCT
J	HtH2 Dom c/d US	GCAAGCCACATCAGAAAGAAT
M	HtH2-f DS2	ACGTCCTCTGGGCTAATGC
N	HtH2-g US2	TGGGACTGGACAACTGCCT
O	HtH2-g DS2	CTCCCCTCCCAGCACAGCA
P	HtH2-h US1	GGCGTTCTTCTCCGACTCC
Q	HtH2-d DS1	CGCCATCTCTGTGGCTCCTCC
S	HtH2-d US1	GGAGGAGAAACAGAGATGGCG
U	HtH2-e DS2	CGTTGTTGGCGGTCAGACT
X	HtH2-b US1	CTCTTCATACCTCCGTGGGCA
Y	HtH2-b DS1	TGCCCACGGAGGTATGAAGAG
Z	HtH2-c US1	TTCAATCAGACAAAACCGCCG
Ä	HtH2-c DS2	CGGCGGTTTTGTCTGATTGAA
II	HtH2-b DS4	TGAAGGCGAAAGGTTTGAGAGGCTGGCGTT
<u>random- und degenerierte Primer</u>		
random-Xho I	Californien 5 DS	NNNCTCGAGNNNNNNNNNNNNNNNN
ii US	WHRL US	ATGGCNGTNTTYCCNCAYTGGCA
iii US	PYWDW US	GGYYTNCNCTACTGGGAYTGGAC
ivUS	WAIWQ US	TGGGCNATRTGGCARGC
ii DS	WHRL DS	TGCCARTGNGGRAANACNGCCAT
iii DS	PYWDW DS	GTCCARTCCAGTANGGNARRCC
iv DS	WAIWQ DS	GCYTGCCAYATNGCCCA



G. Literatur

- Albrecht, U. (1996). "Zum Biosyntheseort des Hämocyanins bei Schnecken: Ultrastruktur der Porenzellen von *Megathura* im Vergleich zu *Haliotis* und *Lymnaea*," Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Awenius, C. (2000). "Zur Primär- und Genstruktur des Hämocyanins der Großen Schlüssellochschncke *Megathura crenulata*," Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Benton, M. J. (1993). "The Fossil Record 2." , Chapman & Hall, London.
- Billiald, P.; Lamy, J.; Wichertjes, T.; Van Bruggen, E. F. J.; Loncke, P.; Gielens, C.; Preaux, G. (1990). "Immunoelectron microscopy of the haemocyanins of *Octopus dofleini* and *Octopus vulgaris*." in: Invertebrate Dioxygen Carriers, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, Leuven, 343-346.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucl. Acids Res.*, 7, 1513-1523.
- Boteva, R.; Severov, S.; Genov, N.; Beltramini, M.; Filippi, B.; Ricchelli, F.; Tallandini, L.; Pallhuber, M. M.; Tognon, G.; Salvato, B. (1991). "Biochemical and functional characterization of *Rapana thomasiana* hemocyanin." *Comp. Biochem. Physiol*, 100 B, 493-501.
- Brenowitz, M.; Munger, K.; Bonaventura, C.; Bonaventura, J. (1986). "Immunochemical relationships and subunit composition of selected molluscan hemocyanins." *Invertebrate Oxygen Carriers*, B. Linzen, ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 241-244.
- Bretos, M. (1980). "Age determination in the keyhole limpet *Fissurella crassa* (Archaeogastropoda:Fissurellidae) based on shell growth rings." *Biol. Bull.*, 159, 606-612.



- Brouwer, M.; Ryan, M.; Bonaventura, J.; Bonaventura, C. (1978). "Functional and structural properties of *Murex fulvescens* hemocyanin: isolation of two different subunits required for reassociation of a molluscan hemocyanin." *Biochemistry*, 17(14), 2810-2815.
- Burmester, T.; Massey, H. C. J.; Zakharkin, S. O.; Benes, H. (1998). "The Evolution of Hexamerins and the Phylogeny of Insects." *J. Mol. Evol.*, 47, 93-108.
- Cavalier-Smith, T. (1991). "Intron phylogeny: a new hypothesis." *Trends Genet.*, 7(5), 145-148.
- Cohen, S. N.; Chang, A. C.; Hsu, L. (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69(8), 2110-2114.
- Cuff, M. E.; Miller, K. I.; vanHolde, K. E.; Hendrickson, W. A. (1998). "Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin." *J. Mol. Biol.*, 278, 855-870.
- Dayhoff, M. O.; Barker, W. C.; Hunt, L. T. (1983). "Establishing homologies in protein sequences." *Methods Enzymol.*(91), 524-45.
- Declercq, L.; Witters, R.; Preaux, G. (1990). "Partial sequence determination of *Sepia officinalis* hemocyanin via cDNA." *Invertebrate Dioxygen Carriers*, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, 131-134.
- Denizot, F.; Golstein, P. (1981). "Specific cooperative induction by KLH or invertebrate hemolymph of mouse polyclonal T cell-mediated cytotoxicity." *Cell Immunol.*, 58, 333-344.
- Dissous, C.; Grzych, J. M.; Capron, A. (1986). "*Schistosoma mansoni* shares a protective oligosaccharide epitope with freshwater and marine snails." *Nature*, 323(6087), 443-445.
- Drexel, R.; Schneider, H.-J.; Sigmund, S.; Linzen, B.; Gielens, C.; Lontie, R.; Preaux, G.; Lottspeich, F.; Henschen, A. (1986). "Partial primary structure of the *Helix pomatia* β c-hemocyanin functional unit d." *Invertebrate oxygen carriers*, B. Linzen, ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 255-258.



- Drexel, R.; Siegmund, S.; Schneider, H. J.; Linzen, B.; Gielens, C.; Preaux, G.; Lontie, R.; Kellermann, J.; Lottspeich, F. (1987). "Complete amino-acid sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*).” *Biol. Chem. Hoppe Seyler*, 368(6), 617-635.
- Dube, P.; Orlova, E. V.; Zemlin, F.; Van Heel, M.; Harris, J. R.; Markl, J. (1995). "Three dimensional structure of keyhole limpet hemocyanin by cryoelectron microscopy and angular reconstitution.” *J. Struct. Biol.*, 115(3), 226-232.
- Fedonkin, M. A.; Waggoner, B. M. (1997). "The Late Precambrian fossil *Kimberella* is a mollusc-like bilaterian organism.” *Nature*, 388, 868-871.
- Finotto, M.; Gielens, C.; Witters, R.; Van Beeumen, J.; Preaux, G. (1990). "Amino-acid sequence of the C-terminal part of functional unit h from the β_c -hemocyanin of *Helix pomatia*.” *Invertebrate Dioxygen Carriers*, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, 107-111.
- Fujii, T.; Sakurai, H.; Izumi, S.; Tomino, S. (1989). "Structure of the gene for the arylphorin-type storage protein SP 2 of *Bombyx mori*.” *J Biol Chem*, 264(19), 11020-11025.
- Gebauer, W.; Harris, J. R.; Heid, H.; Süling, M.; Hillenbrand, R.; Söhngen, S.; Wegener-Strake, A.; Markl, J. (1994). "Quaternary structure, subunits and domain patterns of two discrete forms of keyhole limpet hemocyanin: KLH 1 and KLH 2.” *Zoology*, 98(1), 51-68.
- Gebauer, W.; Harris, J. R.; Geisthardt, G.; Markl, J. (1999a). "Keyhole Limpet Hemocyanin Type 2 (KLH2): Detection and Immunolocalization of a Labile Functional Unit h.” *J. Struct. Biol.*, 128, 280-286.
- Gebauer, W.; Stoeva, S.; Voelter, W.; Dainese, E.; Salvato, B.; Beltramini, M.; Markl, J. (1999b). "Hemocyanin subunit organization of the gastropod *Rapana thomasiana*.” *Arch. Biochem. Biophys.*, 372(1), 128-134.
- Gebauer, W.; Harris, J. R. (1999c). "Controlled cleavage of KLH1 and KLH2 by the V8 protease from *Staphylococcus aureus*: Reassociation, electrophoretic and transmission electron microscopy study of peptide fragments.” *Eur. J. Biochem.*, 262(1), 166-175.



- Gielens, C.; De Sadeleer, J.; Preaux, G.; Lontie, R. (1987). "Identification, separation and characterization of the hemocyanin components of *Helix aspersa*." *Comp. Biochem. Physiol.*, 88 B(1), 181-186.
- Gielens, C.; Vanhoergaerden, R.; Muylle, K.; Preaux, G. (1990). "Microheterogeneity of functional unit d of the β_c -hemocyanin of *Helix pomatia*." Invertebrate Dioxigen Carriers, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, 147-152.
- Gilbert, W. (1978). "Why Genes in pieces." *Nature*, 271, 501.
- Gilbert, W. (1985). "Genes-in-Pieces Revisited." *Science*, 228, 823-824.
- Go, M. (1981). "Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin." *Nature*, 291, 90-92.
- Grzych, J. M.; Dissous, C.; Capron, M.; Torres, S.; Lambert, P. H.; Capron, A. (1987). "*Schistosoma mansoni* shares a protective carbohydrate epitope with keyhole limpet hemocyanin." *J. Exp. Med.*, 165(3), 865-878.
- Hankeln, T.; Friedl, H.; Ebersberger, I.; Martin, J.; Schmidt, E. R. (1997). "A variable intron distribution in globin genes of *Chironomus*: evidence for recent intron gain." *Gene*, 205, 151-160.
- Hardison, R. C. (1996). "A brief history of hemoglobins: Plant, animal, protist and bacteria." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5675-5679.
- Harris, J. R.; Cejka, Z.; Wegener-Strake, A.; Gebauer, W.; Markl, J. (1992a). "Two-dimensional crystallization, transmission electron microscopy and image processing of keyhole limpet hemocyanin (KLH)." *Micron Microsc. Acta*, 23(3), 287-301.
- Harris, J. R.; Markl, J. (1992b). "Electron microscopy of a double helical tubular filament in keyhole limpet (*Megathura crenulata*) hemolymph." *Cell Tissue Res*, 269(3), 411-20.



- Harris, J. R.; Gebauer, W.; Markl, J. (1993). "Immunoelectron microscopy of hemocyanin from the keyhole limpet (*Megathura crenulata*): a parallel subunit model." *J. Struct. Biol.*, 111, 96-104.
- Harris, J. R.; Gebauer, W.; Söhngen, S. M.; Markl, J. (1995). "Keyhole limpet haemocyanin (KLH): purification of intact KLH1 through selective dissociation of KLH2." *Micron*, 26(3), 201-212.
- Harris, J. R.; Gebauer, W.; Guderian, F. U.; Markl, J. (1997a). "Keyhole limpet hemocyanin (KLH), I: Reassociation from Immucothel® followed by separation of KLH1 and KLH2." *Micron*, 28(1), 31-41.
- Harris, J. R.; Gebauer, W.; Söhngen, S. M.; Nermut, M. V.; Markl, J. (1997b). "Keyhole limpet hemocyanin (KLH), II: Characteristic reassociation properties of purified KLH1 and KLH2." *Micron*, 28(1), 43-56.
- Harris, J. R.; Gebauer, W.; Adrian, M.; Markl, J. (1998). "Keyhole limpet hemocyanin (KLH): Slow in vitro reassociation of KLH1 and KLH2 from Immucothel(R)." *Micron*, 29(5), 329-339.
- Harris, J. R.; Markl, J. (1999). "Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review." *Micron*, 30, 597-623.
- Harris, J. R.; Scheffler, D.; Gebauer, W.; Lehnert, R.; Markl, J. (2000). "*Haliotis tuberculata* hemocyanin (HtH): analysis of oligomeric stability of HtH1 and HtH2, and comparison with keyhole limpet hemocyanin KLH1 and KLH2." *Micron*, 31, 613-622.
- He, M.; Wilde, A.; Kaderbhai, M. A. (1989). "A simple single-step procedure for small-scale preparation of *Escherichia coli* plasmids." *Nucl. Acids Res.*, 18, 1660.
- Helling, F.; Shang, A.; Calves, M.; Zhang, S.; Ren, S.; Yu, R. K.; Oettgen, H. F.; Livingston, P. O. (1994). "GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines." *Cancer Res.*, 54(1), 197-203.
- Herskovits, T. T.; Hamilton, M. G.; Mazzella, L. J. (1986). "Hemocyanin of the chiton *Acanthopleura granulata*." *Biochemistry*, 25(12), 3612-9.



- Herskovits, T. T. (1988). "Recent aspects of the subunit organization and dissociation of hemocyanins." *Comp. Biochem. Physiol.*, 91 B(4), 597-611.
- Herskovits, T. T.; Blake, P. A.; Gonzalez, J. A.; Hamilton, M. G.; Wall, J. S. (1989). "Subunit structure and higher order assembly of the hemocyanins of the Melongenidae family: *Melongena corona* (Gmelin), *Busycon canaliculatum* (Linne), *B. carica* (Gmelin), *B. contrarium* (Conrad), and *B. spiratum* (Lamarck)." *Comp. Biochem. Physiol.*, 94 B(2), 415-21.
- Herskovits, T. T.; Hamilton, M. G. (1991). "Higher order assemblies of molluscan hemocyanins." *Comp. Biochem. Physiol.*, 99 B(1), 19-34.
- Huber, M.; Lerch, K. (1986). "Active-site and protein structure of tyrosinase: comparison to hemocyanin." in: *Invertebrate Oxygen Carriers*, B. Linzen, ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 265-276.
- Jellie, A. M.; Tate, W. P.; Trotman, C. N. A. (1996). "Evolutionary History of Introns in a Multidomain Globin Gene." *J. Mol. Evol.*, 42, 641-647.
- Jurincic, C. D.; Engelmann, U.; Gasch, J.; Klippel, K. F. (1988). "Immunotherapy in bladder cancer with keyhole-limpet hemocyanin: a randomized study." *J. Urol.*, 139(4), 723-726.
- Jurincic-Winkler, C.; Klippel, K. F.; Beuth, J.; Markl, J. (1995). "Value of keyhole limpet hemocyanin in prevention of superficial bladder cancer recurrence." *Onkologie*, 18, 41-50.
- Jurincic-Winkler, C. D.; Von der Kammer, H.; Beuth, J.; Scheit, K. H.; Klippel, K. F. (1996). "Antibody response to keyhole limpet hemocyanin (KLH) treatment in patients with superficial bladder carcinoma." *Anticancer Res.*, 16(4a), 2105-10.
- Keller, H. (1994). "Biochemisch-immunologische Charakterisierung des Hämocyanins der marinen Schnecke *Haliothis tuberculata*," Diplomarbeit, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.



- Keller, H.; Lieb, B.; Altenhein, B.; Gebauer, D.; Richter, S.; Stricker, S.; Markl, J. (1999). "Abalone (*Haliotis tuberculata*) hemocyanin type 1 (HtH1) - Organization of the ~400 kDa subunit, and amino acid sequence of its functional units *f*, *g* and *h*." *Eur. J. Biochem.*, 264, 27-38.
- Kimura, M. (1993). "The neutral theory of molecular evolution." *Sci. Am.*, 241(5), 98-108.
- Kupper, U.; Niedermann, D. M.; Travaglini, G.; Lerch, K. (1989). "Isolation and Characterization of the Tyrosinase Gene from *Neurospora crassa*." *J. Biol. Chem.*, 264(29), 17250-17258.
- Lambert, O.; Boisset, N.; Penczek, P.; Lamy, J.; Taveau, J.-C.; Frank, J.; Lamy, J. N. (1994a). "Quaternary structure of *Octopus vulgaris* hemocyanin: three-dimensional reconstruction from frozen-hydrated specimens and intramolecular location of functional units Ove and Ovb." *J. Mol. Biol.*, (238), 75-87.
- Lambert, O.; Boisset, N.; Taveau, J. C.; Lamy, J. N. (1994b). "Three dimensional reconstruction from a frozen hydrated specimen of the chiton *Lepidochiton* sp. hemocyanin." *J. Mol. Biol.*, 244(5), 640-647.
- Lambert, O.; Boisset, N.; Taveau, J. C.; Lamy, J. N. (1995a). "Three dimensional reconstruction of *Sepia officinalis* hemocyanin from frozen hydrated specimens." *Arch. Biochem. Biophys.*, 316(2), 950-959.
- Lambert, O.; Boisset, N.; Taveau, J. C.; Préaux, G.; Lamy, J. N. (1995b). "Three-dimensional Reconstruction of the α_D and β_C -Hemocyanins of *Helix pomatia* from Frozen-Hydrated Specimens." *J. Mol. Biol.*, 248, 431-448.
- Lambert, O.; Taveau, J. C.; Boisset, N.; Lamy, J. N. (1995c). "Three dimensional reconstruction of the hemocyanin of the protobranch bivalve mollusc *Nucula hanleyi* from frozen hydrated specimens." *Arch. Biochem. Biophys.*, 319(1), 231-243.
- Lamy, J.; Lamy, J. N.; Leclerc, M.; Compin, S. (1986). "Preliminary results on the structure of *Octopus dofleini* hemocyanin." in: *Invertebrate Oxygen Carriers.*, B. Linzen, ed., Springer, Heidelberg, 231-234.



- Lamy, J.; Leclerc, J.; Sizaret, P.-Y.; Lamy, J.; Miller, J.; McParland; Van Holde, K. E. (1987). “*Octopus dofleini* hemocyanin: structure of the seven-domain polypeptide chain.” *Biochemistry*, 26, 3509-3518.
- Lamy, J.; Gielens, C.; Lambert, O.; Taveau, J. C.; Motta, G.; Loncke, P.; De Geest, N.; Preaux, G.; Lamy, J. (1993). “Further approaches to the quaternary structure of *octopus* hemocyanin: a model based on immunoelectron microscopy and image processing.” *Arch. Biochem. Biophys.*, 305(1), 17-29.
- Lamy, J.; You, V.; Taveau, J. C.; Boisset, N.; Lamy, J. N. (1998). “Intramolecular localization of the functional units of *Sepia officinalis* hemocyanin by immunoelectron microscopy.” *J. Mol. Biol.*, 284, 1051-1074.
- Langley, K. E.; Villarejo, M. R.; Fowler, A. V.; Zamenhof, P. J.; Zabin, I. (1975). “Molecular basis of beta-galactosidase alpha-complementation.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72(4), 1254-1257.
- Lieb, B.; Altenhein, B.; Lehnert, R.; Gebauer, W.; Markl, J. (1999). “Subunit organization of the abalone *Haliotis tuberculata* hemocyanin type 2 (HtH2), and the cDNA sequence encoding its functional units *d*, *e*, *f*, *g* and *h*.” *Eur. J. Biochem.*, 265, 134-144.
- Lieb, B.; Altenhein, B.; Markl, J. (2000). “The Sequence of a Gastropod Hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*.)” *J. Biol. Chem.*, 275(8), 5675-5681.
- Lips, D.; Gielen, C.; Preaux, G.; Lontie, R. (1981). “Evidence for two types of polypeptide chains in the hemocyanin of *Buccinum undatum*.” *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, 90 B, 128.
- Loncke, P.; Vanderzande, M.; Gielens, C.; Preaux, G. (1990). “Identification of the missing functional unit in *Octopus vulgaris* hemocyanin from a comparison with *Sepia officinalis* hemocyanin.” in: *Invertebrate Dioxygen Carriers*, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, 295-298.
- Lontie, R.; Witters, R.; Gielens, C.; Preaux, G. (1990). “Comparison of the amino-acid sequences of molluscan hemocyanins and of tyrosinases.” in: *Invertebrate Dioxygen Carriers*, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, 141-146.



- Malley, A.; Saha, A.; Halliday, W. J. (1965). "Immunochemical studies of hemocyanin from the giant keyhole limpet (*Megathura crenulata*) and the horseshoe crab (*Limulus polyphemus*)." *J. Immunol.*, 95, 141-147.
- Markl, J. (1987). "Der Immunmodulator Hämocyanin - ein multigener allosterischer Proteinkomplex." in: Welche Chancen hat die Tumorimmunologie heute?, K. E. Klippel, R. Harzmann, eds., SMV, München, 73-86.
- Markl, J.; Wegener-Strake, A.; Savel-Niemann, A. (1990). "Neues zur Struktur des Keyhole-Limpet-Hämocyanins (KLH)." *Immucothel Workshop*, K. H. Kurth, ed., Walter Druck, Stuttgart, 7-24.
- Markl, J.; Nour el Din, M.; Winter Simanowski, S.; Simanowski, U. A. (1991a). "Specific IgG activity of sera from Egyptian schistosomiasis patients to keyhole limpet hemocyanin (KLH)." *Naturwissenschaften*, 78(1), 30-31.
- Markl, J.; Savel-Niemann, A.; Wegener-Strake, A.; Süling, M.; Schneider, A.; Gebauer, W.; Harris, J. R. (1991b). "The role of two distinct subunit types in the architecture of keyhole limpet hemocyanin (KLH)." *Naturwissenschaften*, 78(1), 512-514.
- Markl, J.; Burmester, T.; Decker, H.; Savel Niemann, A.; Harris, J. R.; Süling, M.; Naumann, U.; Scheller, K. (1992). "Quaternary and subunit structure of Calliphora arylphorin as deduced from electron microscopy, electrophoresis, and sequence similarities with arthropod hemocyanin." *J. Comp. Physiol.*, 162 B(8), 665-680.
- Markl, J.; Decker, H. (1992). "Molecular structure of the arthropod hemocyanins." in: *Adv. Comp. Environ Physiol.*, C. P. Mangum, ed., Springer, Heidelberg, 325-376.
- Markl, J. (1996). "Blue blood: structure, function and evolution of hemocyanins." *Chemie In Unserer Zeit*, 30(1), 6-18.
- Massey, H. C. J.; Kejzlarova-Lepesant, J.; Willis, R. L.; Castleberry, A. B.; Benes, H. (1997). "The *Drosophila* LSP-1 β gene: a structural and phylogenetic analysis." *Eur. J. Biochem.*, 245, 199-207.
- Matthews, C. M.; Trotman, C. N. A. (1998). "Ancient and Recent Intron Stability in the *Artemia* Hemoglobin Gene." *J. Mol. Evol.*, 47, 763-771.



- Matthews, C. M.; Vandenberg, C. J.; Trotman, C. N. A. (1998). "Variable Substitution Rates of the 18 Domain Sequences in *Artemia* Hemoglobin." *J. Mol. Evol.*, 46, 729-733.
- Meissner, U.; Dube, P.; Harris, J. R.; Stark, H.; Markl, J. (2000). "Structure of a Molluscan Hemocyanin Dodecamer (HtH1 form *Haliotis tuberculata*) at 12 Å Resolution by Cryoelectron Microscopy." *J. Mol. Biol.*, 298, 21-34.
- Miller, K. I.; Schabtach, E.; van Holde, K. E. (1990). "Arrangement of subunits and domains within the *Octopus dofleini* hemocyanin molecule." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(4), 1496-1500.
- Miller, K. I.; Cuff, M. E.; Lang, W. F.; VargaWeisz, P.; Field, K. G.; vanHolde, K. E. (1998). "Sequence of the *Octopus dofleini* hemocyanin subunit: Structural and evolutionary implications." *J. Mol. Biol.*, 278, 827-842.
- Morrison, R.; Mason, K.; Frost-Mason, S. (1994). "A cladistic analysis of the evolutionary relationships of the members of the tyrosinase gene family using sequence data." *Pigment Cell Res.*, 7, 388-393.
- Mouche, F.; Boisset, N.; Lamy, J.; Zal, F.; Lamy, J. N. (1999). "Structural Comparison of Cephalopod Hemocyanins: Phylogenetic Significance." *J. Struct. Biol.*, 127, 199-212.
- Mousseron-Grall, S.; Kejzlarova-Lepesant, J.; Burmester, T.; Chihara, C.; Pictet, R.; Barray, M.; Delain, E.; Lepesant, J. A. (1997). "Sequence, structure, and evolution of the ecdysone-inducible *Lsp-2* gene of *Drosophila melanogaster*." *Eur. J. Biochem.*, 245(191-198).
- Nakahara, A.; Suzuki, S.; Kino, J. (1983). "Tyrosinase activity of squid hemocyanin." in: Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982, E. J. Wood, ed., Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, London, New York, 319-322.
- Naumann, U.; Scheller, K. (1991). "Complete cDNA and gene sequence of the developmentally regulated arylphorin of *Calliphora vicina* and its homology to insect hemolymph proteins and arthropod hemocyanins." *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177(3), 963-72.



- Orlova, E. V.; Dube, P.; Harris, J. R.; Beckman, E.; Zemlin, F.; Markl, J.; Van Heel, M. (1997). "Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution." *J. Mol. Biol.*, 271(3), 417-437.
- Patthy, L. (1999). "Genome evolution and the evolution of exon-shuffling--a review." *Gene*, 238(1), 103-114.
- Preaux, G.; Gielens, C.; Witters, R.; Lontie, R. (1988). "The structure of molluscan hemocyanins and their homology with tyrosinases." *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 97(11-12), 1037-1044.
- Roy, S. W.; Nosaka, M.; de Souza, S.; Gilbert, W. (1999). "Centripetal modules and ancient introns." *Gene*, 238, 85-91.
- Ruppert, S.; Muller, G.; Kwon, B.; Schutz, G. (1988). "Multiple transcripts of the mouse tyrosinase gene are generated by alternative splicing." *Embo J.*, 7(9), 2715-2722.
- Ryan, M.; Terwilliger, N. B.; Terwilliger, R. C.; Schabach, E. (1985). "Chiton hemocyanin structure." *Comp. Biochem. Physiol.*, 80 B, 647-656.
- Sakurai, H.; Fujii, T.; Izumi, S.; Tomino, S. (1988). "Structure and Expression of Gene coding for Sex-specific Storage Protein of *Bombyx mori*." *J. Biol. Chem.*, 263(16), 7876-7880.
- Sambrook, J.; Maniatis, T.; Fritsch, E. F. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor.
- Sato, Y.; Niimura, Y.; Yura, K.; Go, M. (1999). "Module-intron correlation and intron-sliding in family F/10 xylanase genes." *Gene*, 238, 93-101.
- Scheller, K.; Karlson, P. (1977). "Effects of ecdysteroids on RNA synthesis of fat body cells in *Calliphora vicina*." *J. Insect Physiol.*, 23(2), 285-291.
- Senozan, N. M.; Landrum, J.; Bonaventura, J.; Bonaventura, C. (1981). "Hemocyanin of the giant keyhole limpet, *Megathura crenulata*." in: *Invertebrate Oxygen-binding Proteins*, J. Lamy, J. Lamy, eds., Dekker, New York, 703-717.



- Senozan, N. M.; Briggs, M. (1989). "Hemocyanin levels in the giant keyhole limpet, *Megathura crenulata*, from the coast of California." *Comp. Biochem. Physiol.*, 94 A, 195-199.
- Siezen, R. J.; van Bruggen, E. F. (1974). "Structure and properties of hemocyanins. XII. Electron microscopy of dissociation products of *Helix pomatia* alpha-hemocyanin: quaternary structure." *J. Mol. Biol.*, 90(1), 77-89.
- Söhngen, S. M.; Stahlmann, A.; Harris, J. R.; Müller, S. A.; Engel, A.; Markl, J. (1997). "Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH)." *Eur. J. Biochem.*, 248(2), 602-614.
- Stoeva, S.; Idakieva, K.; Rachev, R.; Voelter, W.; Genov, N. (1997). "Amino terminal oxygen binding functional unit of the *Rapana thomasiana grosse* (gastropod) hemocyanin: carbohydrate content, monosaccharide composition and amino acid sequence studies." *Comp. Biochem. Physiol. B*, 117(1), 101-107.
- Stoeva, S.; Schütz, J.; Gebauer, W.; Hundsdörfer, T.; Manz, C.; Voelter, W. (1999). "Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH)." *Biochim. Biophys. Acta*, 1435, 94-109.
- Stolfus, A.; Doolittle, W. F. (1993). "Slippery introns and globin gene evolution." *Curren. Biol.*, 3(4), 215-217.
- Swordlow, R. D.; Ebert, R. F.; Lee, P.; Bonaventura, C.; Miller, K. I. (1996). "Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers." *Comp. Biochem. Physiol. B*, 113(3), 537-548.
- Terwilliger, N. B.; Terwilliger, R. C.; Meyhofer, E.; Morse, M. P. (1988). "Bivalve hemocyanins - a comparison with other molluscan hemocyanins." *Comp. Biochem. Physiol. B*, 89(1), 189-195.
- Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. (1997). "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucl. Acids Res.*, 24, 4876-4882.



- Top, A.; Gielens, C.; Witters, R.; Van Beeumen, J.; Preaux, G. (1990). "Partial amino-acid sequence and location of the carbohydrate chain in functional unit f of *Sepia officinalis* hemocyanin." in: Invertebrate Dioxygen Carriers, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, 119-123.
- Van Breemen, J. F. L.; Schuurhuis, G. J.; Van Bruggen, E. F. J. (1977). "Morphology of *Helix pomatia* hemocyanin and its subunits." in: Structure and Function of Haemocyanin., J. V. Bannister, ed., Springer, Berlin, 122-127.
- Van Gelder, C. W. G.; Flurkey, W. H.; Wichers, H. J. (1997). "Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases." *Phytochemistry*, 45(7), 1309-1323.
- Van Holde, K. E.; Miller, K. I.; Lang, W. H. (1992). "Molluscan hemocyanins: structure and function." in: Blood and Tissue Oxygen Carriers, C. P. Mangum, ed., Springer Verlag, Berlin, 257-300.
- Van Holde, K. E.; Miller, K. I. (1995). "Hemocyanins." *Adv. Protein. Chem.*, 47, 1-81.
- Van Kuik, J. A.; Kamerling, J. P.; Vliegthart, J. F. G. (1990). "Carbohydrate analysis of hemocyanins." in: Invertebrate Dioxygen Carriers, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, Leuven, 157-163.
- Vanderzande, M.; Gielens, C.; Preaux, G. (1990). "Isolation of functional units g and h from the hemocyanin of *Sepia officinalis* and partial amino-acid sequence of functional unit h." in: Invertebrate Dioxygen Carriers, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, 125-129.
- Vanhoegaerden, R.; Gielens, C.; Preaux, G. (1990). "Location of the carbohydrate chains in functional unit g of the β_c -hemocyanin of *Helix pomatia*." in: Invertebrate Dioxygen Carriers, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, 153-156.
- Vincent, A.; Van Olden, E.; Rorrer, K.; Dumdeang, D.; Van Holde, K. E.; Miller, K. I. (2000) "Gene sequence for *Octopus defleini* hemocyanins." *XIIth International Conference on Invertebrate Dioxygen Binding Proteins*, Roscoff, Frankreich



- Voll, W.; Voit, R. (1990). "Characterization of the gene encoding the hemocyanin subunit *e* from the tarantula *Eurypelma californicum*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5312-5316.
- Ward, J. (1967). "Distribution and growth of the keyhole limpet *Fissurella barbadensis* (Gmelin)." *Bull. Mar. Sci.*, 17, 299-318.
- Ward, K. N. (1981). "Helper activity of T lymphocytes which have been stimulated by keyhole limpet haemocyanin in vitro." *Immunology*, 43(1), 111-116.
- Wichertjes, T.; Gielens, C.; Schutter, W. G.; Preaux, G.; Lontie, R.; Van Bruggen, E. F. J. (1986). "The quaternary structure of *Sepia officinalis* hemocyanin." *Biochim. Biophys. Acta*, 872, 183-194.
- Willott, E.; Wang, X. Y.; Wells, M. A. (1989). "cDNA and gene sequence of *Manduca sexta* arylphorin, an aromatic amino acid-rich larval serum protein. Homology to arthropod hemocyanins." *J. Biol. Chem.*, 264(32), 19052-19059.
- Wood, E. J.; Chaplin, M. F. (1983). "Distribution of carbohydrate residues amongst the domains of mollusc, multi-domain respiratory proteins." in: *Structure and Function of Invertebrate Respiratory Proteins - EMBO Workshop 1982*, E. J. Wood, ed., Harwood Academic Publishers GmbH, Chur, London, New York, 141-142.
- Xin, X.; Gielens, C.; Witters, R.; Preaux, G. (1990). "Amino-acid sequence of functional unit *g* from the β_c -hemocyanin of *Helix pomatia*." in: *Invertebrate Dioxygen Carriers*, G. Preaux, R. Lontie, eds., Leuven University Press, Leuven, 113-117.
- Yochelsen, E. L. (1979). "Early Radiation of Mollusca and Mollusc-like Groups." in: *The Origin of Major Invertebrate Groups*, M. R. House, ed., Academic Prss, London, 323-358.



Lebenslauf

1. Persönliche Daten

Name : Benjamin Altenhein
geboren am / Ort : 16.04.1970 in Münster / Westfalen
Wohnort : Elsässer Platz 7, 65195 Wiesbaden
Familienstand : ledig

2. Schulische Laufbahn

August 1975 – Juni 1983 Laborschule Bielefeld
August 1983 – Mai 1990 Helmholtz-Gymnasium Bielefeld mit Abiturabschluß,
Note 2,2

3. Hochschule

WS 90/91 Immatrikulation an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
im Fach Biologie
Vordiplomsprüfung abgelegt im September 1992

SS 93 Wechsel zur Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Diplomprüfung abgelegt im Januar 1997, Note 1,0 mit
Auszeichnung
Promotion seit April 1997 am Lehrstuhl für molekulare
Tierphysiologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bei Prof.
Dr. Jürgen Markl

